



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

**Búsqueda e identificación de marcadores
moleculares de resistencia a mastitis en bovinos**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional del Litoral
en el área de Ciencias Veterinarias

Lic. Juan Pablo Nani

Director: PhD Luis F. Calvino

Co-director: Dr. Ariel F. Amadio

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela.

Rafaela, Santa Fe, 2016

Contenido

Agradecimientos	5
Abreviaturas	6
Resumen.....	9
Abstract	11
Capítulo I.....	13
I.1 Introducción general	13
I.2 Mastitis bovina.....	14
I.3 Pérdidas Económicas	15
I.4 Calidad de leche.....	17
I.5 Mastitis clínicas y subclínicas	17
I.6 Microorganismos causantes	18
I.7 Recuento de células somáticas.....	21
I.8 Score de células somáticas (SCS).....	23
I.9 Control de la mastitis	25
I.10 Factores que afectan la incidencia de mastitis	27
I.11 Genética de la mastitis	28
I.12 Resistencia a mastitis	29
I.13 Marcadores moleculares	31
I.14 Estudios de asociación	36
I.15 Selección Genómica	38
I.16 Genotipificación	39
I.17 Marcadores Moleculares asociados a Mastitis	41
I.18 Bioinformática	42
I.19 Bases de datos.....	42
I.20 Base de datos de QTL.....	43

I.21 Genes candidatos	44
I.21.1 Generales	45
I.21.2 Inicio de la Respuesta Inmune	46
I.21.3 Activación de la respuesta inmune, y eliminación del patógeno	49
I.21.4 Resolución de la infección	56
I.21.5 Otros genes candidatos	61
I.22 Objetivos	62
I.22.1 Objetivo general	62
I.22.2 Objetivos particulares	62
I.23 Materiales y Métodos	63
I.23.1 Animales y datos fenotípicos	63
I.23.2 Regiones y genes candidatos	63
I.23.3 Genotipificación	64
I.23.4 Bases de datos	64
I.23.5 Análisis de resultados	69
Capítulo II	70
II.1 Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en genes candidatos y su relación con el score de células somáticas	70
II.2 Resumen	71
II.3 Introducción	72
II.4 Materiales y métodos	73
II.4.1 Animales y datos fenotípicos	73
II.4.2 Extracción de ADN	73
II.4.3 Selección de marcadores en genes candidatos:	74
II.4.4 Genotipificación	74
II.4.5 Análisis estadístico	75

II.5 Resultados	76
II.5.1 Marcadores SNP.....	76
II.5.2 Análisis de asociación	82
II.6 Discusión.....	85
II.7 Conclusiones del capítulo II	88
Capítulo III.....	89
III.1 Estudio de asociación del genoma completo con el score de células somáticas.....	89
III.2 Resumen.....	90
III.3 Introducción	91
III.4 Materiales y Métodos.....	92
III.4.1 Población y fenotipos.....	92
III.4.2 Extracción de ADN	93
III.4.3 Genotipificación y Control de Calidad	93
III.4.4 Desequilibrio de ligamiento	94
III.4.5 Estudio de asociación.....	94
III.5 Resultados	95
III.5.1 Desequilibrio de ligamiento	97
III.5.2 Datos fenotípicos y GWAS	100
III.6 Discusión.....	104
III.7 Conclusiones del capítulo III	108
Conclusiones Generales	109
Desafíos a futuro.....	111
Bibliografía	112

Agradecimientos

A mi esposa

A mi director y co-director de tesis

A mis colegas del INTA

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT) y al INTA

Al personal de Las Taperitas SA

Abreviaturas

A: Adenosina.

ABCG2 (ATP Binding Protein Cassette G2)

ADN: ácido desoxi-ribonucleico.

AFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism).

ARN: ácido ribonucleico.

ATP: Adenosina trifosfato.

ATP1A1: Enzima ATPasa transportadora de potasio y sodio subunidad alfa-1.

BCRP: Proteína resistente al cáncer (Breast Cancer Resistance Protein).

BoLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad bovino (Bovine Leukocyte Antigen).

BRCA1: Proteína de susceptibilidad a cáncer mamario 1 (Breast Cancer 1).

BTA: Autosoma de Bos taurus (Bos Taurus Autosome).

C: Citosina.

C4A: Factor del Complemento 4.

CMT: Test de mastitis California (California Mastitis Test).

CXCR1: Receptor de quimosinas tipo 1.

DGAT1: Diacilglicerol O-aciltransferasa 1.

DYD: Desviación del rendimiento de las hijas (Daughter yield deviations).

EBV: Valores de cría estimados (Estimated Breeding Values).

FDR: Tasa de falsos positivos (False Discovery Rate).

FEZL: Forebrain embryonic zinc finger-like.

FGF2: Factor de crecimiento del fibroblasto 2.

G: Guanina.

GAS: Selección asistida por genes (Gene-Assisted Selection).

GEBV: Valor de cría genómico (Genomic Breeding Values).

GH: Hormona de crecimiento (Growth Hormone).

GHR: receptor transmembrana de hormona de crecimiento (Growth Hormone Receptor).

GWAS: Estudio de asociación de genoma completo (Genome Wide Association Study).

HRM: Análisis de alta resolución de fusión (High Resolution Melting assay).

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Equilibrium).

IGF-1: Factor de crecimiento tipo insulina 1 (Insulin-like growth factor).

IIM: Infección Intra Mamaria.

IL: interleuquina.

Ile: Isoleucina.

LD: Desequilibrio de ligamiento (Linkage Disequilibrium).

LPS: Lipo-polisacárido.

MAF: Frecuencia alélica mínima (Minor Allele Frequency).

MAS: Selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection).

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

NLR: Receptor de tipo Nod (Nod Like Receptors).

PA: Análisis de vías metabólicas (Pathway Analysis)

PCR: Reacción de cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

PMN: Leucocitos polimorfonucleares.

PRL: Prolactina bovina.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptor).

PTA: Capacidad de transmisión predicha (Predicted Transmission Ability).

QTL: Locus del carácter cuantitativo (Quantitative Trait Locus).

RAPD: Amplificación al azar de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA).

RCS: Recuento de células somáticas.

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism).

SCS: Score lineal de células somáticas (Somatic Cell Score).

SCS-SD: Desviación estandar del score lineal de células somáticas.

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism).

SQL: Lenguaje de Consulta Estructurado (Structure Query Language)

SSR: Repetición se secuencia simple (Simple Sequence Repeat).

T: Timidina.

TLR: Receptores de tipo Toll (Toll-Like Receptors).

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Val: Valina.

Resumen

La inflamación de la glándula mamaria, causada generalmente por microorganismos se denomina mastitis. La mastitis es considerada una patología infecciosa y es una de las enfermedades más prevalentes en los rodeos lecheros bovinos. La mastitis es considerada la patología que produce mayores pérdidas económicas tanto para el productor como para la industria láctea en general ya que produce una disminución en la producción, afecta la calidad de la leche, la tasa de preñez, posee altos costos de diagnóstico y tratamiento, y reduce la vida útil del animal en producción.

Los programas de control de mastitis basados en reducir el número de nuevas infecciones y limitar la duración de las infecciones existentes mediante prácticas de higiene y el uso de antibióticos han mostrado eficacia dispar frente a los distintos patógenos. Estas limitantes promovieron la búsqueda de alternativas que permitan minimizar el uso de antibióticos, tanto mediante la estimulación de los sistemas de defensa del animal o mediante la selección de animales que muestren mayor resistencia natural a las infecciones.

La prevención y el control de la mastitis bovina mediante la mejora de las defensas naturales en los animales es importante para incrementar la calidad de la leche y consecuentemente de los productos lácteos. La resistencia a mastitis es un rasgo complejo que depende de componentes genéticos, ambientales y fisiológicos. Las limitaciones de las medidas clásicas de control han llevado a la búsqueda de alternativas para reducir al mínimo el uso de antibióticos, siendo una de ellas la selección de animales naturalmente resistentes.

El recuento de células somáticas (RCS) en leche está directamente relacionado con el nivel de inflamación en la ubre, y ha demostrado ser una de las técnicas de diagnóstico más útiles para detectar la presencia de la mastitis especialmente para los casos subclínicos. Mientras más alto es el RCS, más acentuada es la respuesta inflamatoria. A fin de estandarizar los valores para el uso de

métodos estadísticos, el RCS se transforma a Score de células somáticas (SCS). En este trabajo de tesis se usaron dos estrategias: 1) identificar polimorfismos en genes candidatos (seleccionados en base a su función biológica, fisiológica, funcional, o evidencia previa de asociación con la enfermedad) y 2) utilizar un panel de más de 50.000 marcadores de tipo SNP distribuidos uniformemente en el genoma, a fin de identificar regiones cromosómicas asociadas a la variación en el score de células somáticas (SCS), en un estudio de asociación de genoma completo (GWAS, Genome Wide Association Study). Los diferentes análisis se identificaron 8 marcadores significativamente asociados con el SCS. Se confirmó también que el SCS está influenciado por múltiples loci distribuidos por todo el genoma, cada uno contribuyendo con un efecto relativamente pequeño. Estos resultados contribuyen a obtener un mejor conocimiento sobre las regiones genómicas que influyen en el SCS en rodeos lecheros argentinos y a posibilitar el uso de estos marcadores en el diseño de programas de selección que utilicen información molecular.

Abstract

Inflammation of the mammary gland, usually caused by microorganisms is called mastitis. Mastitis is considered an infectious disease and is one of the most prevalent diseases in dairy cattle. Mastitis is considered to be the pathology that produces the most economic losses for both, the producer and the dairy industry, causing a decrease in production, affecting the quality of milk, the pregnancy rate, and having high costs for diagnosis and treatment as well as reducing the productive life of the animal.

Mastitis control programs based on reducing the number of new infections and limiting the duration of existing infections by hygienic practice and using antibiotics has shown mixed efficacy against different pathogens. These limitations promoted the search for alternatives to minimize the use of antibiotics, by stimulating the animal's defense systems or by selecting animals showing natural resistance to infections.

Prevention and control of bovine mastitis by improving the natural defenses in animals is important in order to increase milk and dairy products quality. Mastitis resistance is a complex trait that depends on genetic, environmental and physiological components. The limitations of classical control programs have led to the search for alternatives to minimize the use of antibiotics by selecting naturally resistant animals.

Somatic cell count (SCC) in milk is directly related to the level of inflammation in the udder, and has proven to be one of the most useful diagnostic techniques to detect the presence of mastitis especially for subclinical cases. The higher the SCC, the more pronounced the inflammatory response is. In order to standardize the values for the use of statistical methods, the SCC is transformed somatic cell score (SCS).

In this thesis two strategies were used: 1) to identify polymorphisms in candidate genes (based on known biological, physiological, or functional relevance to the disease) and 2) use a panel of more than 50,000 SNP markers evenly distributed throughout the bovine genome in order to

identify chromosomal regions associated with variation in somatic cell score (SCS) in a Genome Wide Association Study (GWAS). In the association analysis, eight different markers were found significantly associated with the SCS. This analysis confirmed that the SCS is influenced by multiple loci distributed throughout the genome, each contributing a relatively small effect. These results contributed to a better understanding of the genomic regions influencing the SCS in Argentine dairy herds and together with the use of molecular markers may contribute significantly to the design of better selection programs.

Capítulo I

I.1 Introducción general

I.2 Mastitis bovina

A través de los años, la producción de leche por animal se ha visto incrementada dramáticamente. En la mayoría de los países productores el incremento en rendimiento de leche por vaca se ha duplicado en los últimos 40 años (Oltenacu y Broom, 2010), principalmente por los rápidos avances en genética y manejo, implicando un aumento en la rentabilidad para los productores. Sin embargo, varios estudios han demostrado que las vacas de alta producción tienen un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas (Uribe y col., 1995; Van Dorp y col., 1998). Entre estas, la mastitis es una de las enfermedades más prevalentes en los rodeos lecheros en todo el mundo. La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria. Si bien la inflamación no indica necesariamente la presencia de una infección, en la mayoría de los casos es causada por agentes bacterianos, por lo cual es usualmente considerada como una enfermedad infecciosa. La mastitis es el resultado de la interacción entre varios factores de manejo y del medio, que determinan que aumente la exposición a los microorganismos causales, disminuya la resistencia natural de la vaca hacia la enfermedad y/o se favorezca el paso de los microorganismos a través del canal del pezón para acceder al epitelio secretor de la glándula mamaria (Schalm y col., 1971). La magnitud de los cambios patológicos que se producen dependerá de la severidad de la inflamación; en los casos clínicos la alteración tanto del cuarto afectado como de la leche es evidente, mientras que en los casos subclínicos la alteración, aunque presente, no es aparente, sino solo detectable por métodos de diagnóstico complementarios. Estos casos pueden caracterizarse por un aumento de las células somáticas, mayormente neutrófilos, presentes en la leche (Schalm y col., 1971).

Figura 1.1: Vaca de la raza Holstein presentando inflamación y enrojecimiento de la glándula mamaria (mastitis clínica).

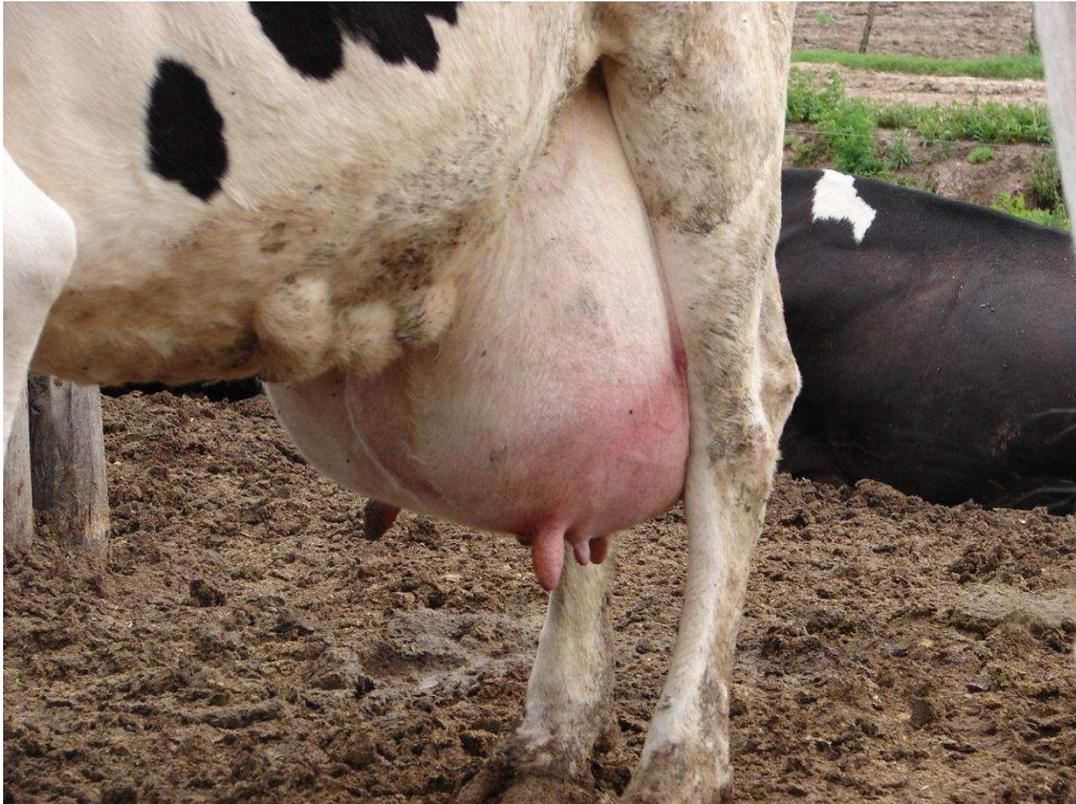


Foto: INTA EEA Rafaela

I.3 Pérdidas Económicas

La mastitis bovina es considerada la patología que produce mayores pérdidas económicas tanto para el productor como para la industria láctea en general; casi el 70 % de éstas son debidas a una reducción en la producción láctea causada por infecciones subclínicas (Philpot, 1999; Calvinho y col., 2001). La mastitis produce una disminución en la producción, no sólo durante la enfermedad sino aún luego de que la infección fuera eventualmente eliminada, ya que los niveles de producción de la vaca luego de la recuperación continuarán siendo más bajos que los de una vaca sana. Por otro lado también afecta la calidad de la leche y la tasa de preñez. Además, debe considerarse que, como consecuencia de la terapia antibiótica que se utiliza para su tratamiento y control, se generan riesgos para la salud humana por la posible presencia de trazas de antibióticos en la leche de

consumo y el potencial de generar resistencia en patógenos humanos por el uso indebido de tratamientos antibióticos en los animales afectados (Smith y col., 2002). Otras pérdidas económicas asociadas con la mastitis incluyen: costos de medicamentos para el tratamiento; costos del veterinario para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad; aumento de horas de mano de obra dedicada al cuidado de los animales afectados. La leche descartada por tratamiento antibiótico es comparable al daño producido por una baja de producción, donde los costos de alimentación para producir la leche descartada deben ser también tenidos en cuenta. Finalmente la reducción en la vida útil del animal representa una pérdida importante reflejada por el costo de reemplazar prematuramente un animal en producción (Seegers y col. 2003).

La pérdida de producción no es siempre visible para el productor, ya que es leche no producida y por lo tanto, nunca vista, convirtiéndose en un costo oculto o una pérdida de ingresos.

Figura 1.2: Leche aguada y con aparición de coágulos, signos manifiestos de una mastitis subclínica.



Foto: INTA EEA Rafaela

I.4 Calidad de leche

La calidad de la leche se ve severamente disminuida durante la mastitis, en términos de higiene, composición y seguridad al consumidor. Desde el punto de vista industrial, la mastitis genera cambios en la composición de la leche (Cuadro 1.1) que alteran las características organolépticas de la leche; tiene efectos directos sobre los cultivos iniciadores y la coagulación por renina, disminuye el rendimiento de los quesos, afecta la estabilidad al calor de la leche ocasionando problemas para la condensación y producción de leche en polvo, y afecta la longevidad de los productos lácteos (Munro y col., 1984).

Cuadro 1.1. Influencia de la inflamación de la glándula mamaria bovina en la composición de la leche (adaptado de Oliver y Calvino, 1995).

Componentes aumentados	Componentes disminuidos
Lactoferrina	Lactosa %
Inmunoglobulinas	Proteína
Seroalbúmina	Caseína
α -macroglobulina	β -lactoglobulina
Antitripsina	α -lactoalbúmina
Colesterol	Grasa % - Ácidos grasos

I.5 Mastitis clínicas y subclínicas

La mastitis bovina puede clasificarse como clínica o subclínica. La mastitis clínica está caracterizada por una respuesta inflamatoria aparente de la glándula mamaria (Figura 1.1) o cambios macroscópicos en la leche. Los cambios más característicos en la leche son la aparición de coágulos, grumos, cambios de color o una apariencia aguada de la misma (Figura 1.2). Se presentan los signos cardinales de la inflamación: temperatura elevada (calor), hinchazón, enrojecimiento (rubor), sensibilidad al tacto (dolor) y función alterada.

Cuando no se aprecian signos clínicos en la glándula mamaria ni cambios en la leche se trata de una mastitis subclínica. En estos casos las vacas producen menos leche y de menor calidad. Las técnicas de laboratorio tales como el cultivo bacteriológico y el recuento de células somáticas (RCS) son entonces necesarias para detectar la infección y la inflamación, respectivamente. El RCS está directamente relacionado con el nivel de inflamación en la glándula mamaria, mientras más alto es el RCS, más acentuada es la respuesta inflamatoria. Por otro lado, los cultivos bacteriológicos pueden ser negativos cuando la concentración de patógenos en la glándula mamaria es baja; sin embargo, un RCS superior a 200.000 células/ml predice inflamación aún en ausencia de infección detectable (Dohoo y Leslie, 1991; Schepers y col., 1997).

I.6 Microorganismos causantes

Los microorganismos causantes de mastitis se pueden clasificar en ambientales y contagiosos en función de sus características de distribución e interacción con el pezón y su canal. La transmisión de patógenos contagiosos hacia cuartos no infectados ocurre principalmente durante el proceso de ordeño. La leche de cuartos infectados puede contaminar las unidades de ordeño, manos de los ordeñadores y toallas utilizadas para la higiene pre ordeño, que luego actúan como reservorios de agentes infecciosos. Los principales patógenos contagiosos son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma spp.* (Fox y Gay, 1993). La fuente primaria de patógenos ambientales es el ambiente de la vaca (estiércol, material de cama, material vegetal, tierra, y agua contaminada). La exposición de la glándula mamaria a los patógenos ambientales ocurre principalmente entre ordeños. Los patógenos ambientales más frecuentemente encontrados son varias especies de estreptococos y bacterias Gram negativas, siendo *Escherichia coli* el patógeno ambiental más prevalente en esta categoría (Smith y Hogan, 1993).

Dentro de las mastitis de causa bacteriana, más del 95% de los casos son producidos por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*. Desde hace algunos años se ha reportado un aumento en la incidencia de infecciones intramamarias (IIM) por bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y otros coliformes (Blood y col., 1992; Bray y Shearer, 1993); mientras que entre los patógenos menores predominan *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Corynebacterium bovis* (Timms y Schultz, 1987; Nickerson y Boddie, 1994). En los países de alto desarrollo lechero, donde los productores han aplicado sistemáticamente programas de control basados en higiene y terapia antibiótica, se ha observado una disminución de la prevalencia de los organismos patógenos contagiosos, *S. aureus* y *S. agalactiae*, y un incremento relativo de los patógenos ambientales, *Streptococcus no agalactiae* y coliformes (Todhunter y col., 1995). En el caso de la Argentina, donde la producción lechera es predominantemente basada en pasturas, en las mastitis subclínicas se observa una mayor prevalencia de *Staphylococcus aureus* y distintas especies de *Streptococcus* y, en menor proporción se aíslan organismos coliformes (Tabla 1.1) (Calvinho y col., 1991; Chertcoff y col., 1996). En algunas localidades de nuestro país, los valores de prevalencia de mastitis alcanzan el 58%. (Calvinho y col., 1991; Chaves y col., 1996; Tirante y col., 1998; Calvinho, 1999; Calvinho y Tirante, 2005).

Tabla 1.1: Frecuencia de aislamiento de algunos organismos patógenos mayores obtenidos de mastitis subclínicas en distintas cuencas lecheras de la Argentina.

Organismos	A	B	C	D	E	F	G	H	I
S. aureus	54	43,2	21,7	17	25,3	31,5	16,6	21,9	13,9
S. agalactiae	23,4	13,5	2,7	-	8,8	11,6	5,4	5,8	1,6
S. uberis	2,8	19,2	5,9	-	-	-	9,2	-	-
S. dysgalactiae	1,8	5,3	2,2	-	3,6	-	-	-	-
Streptococcus spp.	4,1		1,7	23,4	19,3	5,82	13,3	4,34	6,5
Coliformes	2,8	1,6	0,9	-	2,7	3,1	5,9	2	-

Referencias: los datos se expresan en porcentajes, que fueron calculados sobre las muestras con aislamientos positivos. A: Tessi y col. (1978) (Cuenca central santafesina), B: González y col. (1980) (Cuenca de Córdoba), C: Calvino y col. (1991), (Cuenca Central Santafesina), D: Giraudo y col. (1995) (Cuenca de Córdoba), E: Chertcoff y col. (1996) (varias cuencas); F: Tirante y col. (1998) (varias cuencas); G: Acuña y col. (2001) (varias cuencas); H: Chaves y col. (2001) (varias cuencas); I: Amand de Mendieta y col. (2001) (Cuenca Mar y Sierras).

En un estudio más reciente se relevaron 51 tambos de la provincia de Córdoba, Argentina, con rodeos de entre 100 y 250 vacas en ordeño, de donde se recolectaron más de dos mil muestras de leche (Dieser y col., 2013). La prevalencia de mastitis subclínica en estos rodeos, detectada en base a RCS $\geq 200,000$ células/ml, fue del 53,9%. Los resultados de los análisis bacteriológicos se muestran en la tabla 1.2. Los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) fueron el grupo de bacterias más comúnmente aislado, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium* spp. Entre las Gram negativas, *Enterobacter* spp. y *Escherichia coli*. fueron las bacterias más frecuentemente observadas, seguidas por *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. y *Serratia* spp.

Tabla 1.2: Frecuencia de patógenos aislados de casos de mastitis subclínica en rodeos de la provincia de Córdoba

Bacteria aislada	n	% (95% CI)
SCN	582	52.1 (50.6-53.6)
Staphylococcus aureus	238	21.3 (20.3-22.3)
Corynebacterium spp.	58	5.2 (4.9-5.5)
Streptococcus agalactiae	49	4.4 (4.1-4.6)
Streptococcus dysgalactiae	49	4.4 (4.1-4.6)
Staphylococcus intermedius	43	3.8 (3.6-4.1)
Enterobacter spp.	26	2.3 (2.2-2.5)
Escherichia coli	23	2.1 (1.9-2.2)
Streptococcus acidominimus	21	1.9 (1.8-2.0)
Arcanobacterium spp.	8	0.7 (0.7-0.8)
Enterococcus spp.	7	0.6 (0.6-0.7)
Streptococcus uberis	5	0.4 (0.4-0.5)
Pseudomonas spp.	5	0.4 (0.4-0.5)
Serratia	3	0.3 (0.3-0.3)
Total	1117	

Tabla adaptada de Dieser y col., 2013.

I.7 Recuento de células somáticas

El recuento de células somáticas (RCS) ha demostrado ser una de las técnicas de diagnóstico más útiles a la hora de detectar la presencia de mastitis subclínica (Dohoo y Meek 1982; Schukken y col., 2003). Actualmente, la industria láctea en algunos países se basa en este método para los sistemas de pago por calidad de la leche (Viguié y col., 2009), donde los niveles elevados de células somáticas en leche de tanque de frío son penalizados. Desde el punto de vista genético, el RCS presenta una heredabilidad mayor que la de la mastitis clínica (Lund y col., 1999) y una correlación estadística con las infecciones bacterianas casi igual a la unidad, lo que indica que el RCS es un excelente predictor de las

infecciones subclínicas (Weller y col., 1992). Para determinar el número de células somáticas (CS) en la leche existen métodos directos, que son aquellos que cuentan partículas o células y los indirectos, que estiman la cantidad de células sobre la base de reacciones químicas que ponen en evidencia componentes celulares. Los dispositivos automáticos de conteo de células permiten la determinación de forma directa y rápida. El método directo más difundido para contar CS en leche es el método fluoro-opto-electrónico. Los contadores “Fossomatic” y el “Bentley” son los más utilizados, donde las células se tiñen utilizando tintes fluorescentes antes de contarlas (Dohoo y Meek, 1982). En las pruebas indirectas para detectar la mastitis se destaca el “California Mastitis Test” (CMT) que fue desarrollado por Schalm y Noorlander en 1957. El CMT utiliza un reactivo que lisa la membrana celular de las células somáticas presentes en la muestra de leche y así el ADN en las células reacciona con el reactivo del producto formando un gel que refleja el recuento de células de la leche (Fig. 1.3). Es una técnica sencilla pero muy útil para la detección de mastitis subclínica en el tambo, y proporciona un resultado inmediato. No es un reemplazo para el RCS de laboratorio, pero tiene varios usos importantes. La reacción del CMT es negativa hasta un nivel de recuento de células de aproximadamente 400.000 células/ml, por lo tanto, es una prueba útil para indicar la presencia de la mastitis subclínica al pie de la vaca. La interpretación de los RCS se basa en el número total de células presentes, incluyendo células epiteliales y glóbulos blancos. En la leche de una glándula mamaria sana, se considera que el 10 al 20% está compuesto por células epiteliales y el resto por macrófagos, linfocitos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (Harmon 2001).

Figura 1.3: Paleta de cuatro pocillos para realizar el “California Mastitis Test”. El reactivo del test forma un gel al entrar en contacto con una determinada concentración de células somáticas en la leche



Foto: NMConline

I.8 Score de células somáticas (SCS)

Para facilitar el manejo de los datos obtenidos de los valores de RCS de vacas individuales, es conveniente transformarlos usando el logaritmo en base 2, a través de la siguiente ecuación propuesta por Shook (1982): $SCS = \log_2 (RCS/100.000) + 3$. De este modo, un RCS de 100.000 células/ml se convierte en una puntuación de 3. Cada aumento (o disminución) en 1 unidad en la puntuación se asocia con una duplicación (o reducción a la mitad) del RCS. Por ejemplo: un SCS de 2 es equivalente a un RCS de 50.000 células/ml, y SCS de 4 y 5 corresponden a 200.000 y 400.000 células/ml respectivamente (Tabla 1.3). Este método de puntuación se ha utilizado desde 1983 en todos los controles lecheros oficiales en los EE.UU y paulatinamente se ha adoptado en todo el mundo. El SCS proporciona valores estandarizados para el uso de métodos estadísticos convencionales, por ejemplo: 1) media igual a la mediana, 2) distribución normal, y 3) varianza uniforme entre muestras dentro de la lactancia, entre vacas dentro de un tambo, o entre hijas de un mismo

toro (Shook y Schutz 1994). Estas propiedades no se cumplen usando el RCS. El SCS tiene una distribución normal de manera que la media, mediana y la moda tienen el mismo valor. Por lo tanto la media divide el 50% superior de la parte inferior del 50 % de los datos, y la media se encuentra a corta distancia de la mayoría de las observaciones. La ventaja de la varianza uniforme puede ser difícil de apreciar, pero es una de las razones más importantes. Brevemente, si las varianzas difirieren entre grupos, tanto la media y la varianza tendrían que ser estimadas para cada grupo. Sin esta propiedad, una varianza tendría que ser calculada para cada grupo y las varianzas calculadas para un pequeño número de observaciones no son confiables y tienen grandes errores. Estas propiedades permiten obtener un promedio mensual de SCS y así calcular un promedio por lactancia. El promedio por lactancia es la medida básica que se utiliza para los programas de evaluación genética (Shook y Schutz, 1994).

Tabla 1.3 Relación entre el “Score” (SCS) y el recuento (RCS cel./ml) de células somáticas en leche.

SCS	RCS
0	12.500
1	25.000
3	100.000
4	200.000
9	6.400.000
10	12.800.000

Tabla adaptada de NMConline.

El aumento del número de CS está sujeto a distintos factores independientes de una infección. Sin embargo, la mayor influencia en el contenido individual de células de un animal la ejerce la inflamación como respuesta a una infección. Las células presentes en un cuarto sano son fundamentalmente macrófagos, mientras que durante la inflamación se produce un aumento en la proporción de leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos. En casos de mastitis, más del 90% de las CS pertenecen a esta serie de células blancas (Calvinho, 1992). Las principales funciones de los PMN son fagocitar y destruir los agentes infecciosos. Las bacterias que atraviesan el canal del pezón (primera línea de defensa) entran la cisterna del pezón y se encuentran con la segunda y principal línea de defensa: los leucocitos. Una vez que se ha iniciado una respuesta inflamatoria, los PMN son las primeras células en ser reclutadas al sitio de infección. El reclutamiento de los PMN hacia la glándula mamaria es una función normal del mecanismo de defensa de la vaca y suele ser muy eficaz para erradicar la mayoría de las infecciones que se producen (Kehrli y Shuster, 1994; Riollet y col., 2001). El SCS caracteriza en cierta medida la salud de la ubre durante la lactancia y puede considerarse como indicativo de la presencia o ausencia de infección, la cantidad y duración de las infecciones, la gravedad y el número de cuartos infectados. Un bajo SCS indica un nivel bajo o ausencia de infección en toda la lactancia. Los aumentos en SCS entre lactancias y entre meses dentro de la lactancia son atribuibles al aumento de la mastitis. En ausencia de infección, el SCS se mantiene bajo, aún con el avance en la edad o el estado de lactancia. También. SCS bajos se asocian con una baja probabilidad de mastitis clínica (Shutz, 1994; Shook y Schutz 1994).

I.9 Control de la mastitis

Los programas de control de mastitis están basados en reducir el número de nuevas infecciones y limitar la duración de las infecciones existentes. El plan de control de los cinco puntos es un conjunto de cinco principios que, si se siguen, pueden ayudar a reducir la

incidencia de mastitis y disminuir los RCS. Los cinco principios son: 1) registrar y tratar todos los casos clínicos, 2) rutina de ordeño higiénica que incluya la desinfección de pezones post-ordeño, 3) utilización de terapia antibiótica vaca seca al finalizar la lactancia, 4) eliminar las vacas con mastitis crónica y 5) realizar un mantenimiento regular de la máquina de ordeñar. Estos principios han existido por años (Neave y col., 1969), tras haber sido formulados en la década del 60 y han sido, al menos, parcialmente responsables de disminuir la incidencia de mastitis, principalmente por patógenos contagiosos (Neave y col., 1969; Hillerton y col., 1995), pero han sido menos exitosos con los patógenos ambientales (Shukken y col., 1990, Lam y col., 1997). El plan de los cinco puntos fue actualizado, proponiéndose una ampliación a un programa de diez puntos formulado por el National Mastitis Council en 2001, que incluye como medidas adicionales (1) el establecimiento de objetivos de control, (2) el mantenimiento de un medio ambiente limpio y confortable, (3) llevar registros y monitorear la salud mamaria, (4) realizar medidas de bioseguridad para evitar el ingreso de patógenos contagiosos y (5) revisar periódicamente el programa de control.

Si bien estos programas han contribuido en forma sustancial a reducir la prevalencia de la enfermedad, la terapia antibiótica ha mostrado eficacia dispar frente a los distintos organismos patógenos (Erskine, 2004) y la mastitis ha ido en aumento en muchos países durante los últimos 30 años, a pesar de los avances en los tratamientos veterinarios. Además, el uso indiscriminado de los antibióticos promueve la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Estas limitantes han determinado la búsqueda de alternativas que permitan minimizar el uso de antibióticos, tanto mediante la estimulación de los sistemas de defensa del animal para controlar las infecciones o mediante la selección de los animales que muestren mayor resistencia natural a las IIM (Denis y col., 2009; Rupp y Boichard, 2003).

I.10 Factores que afectan la incidencia de mastitis

La incidencia de la mastitis está influenciada por varios factores externos al manejo. Algunos de los factores más influyentes son: la estación del año, el número de lactancias (o partos), los días en lactancia, la raza, la velocidad de ordeño y la conformación de la ubre.

Estación del año: Las mastitis generalmente se detectan con frecuencias aproximadamente iguales a lo largo del año, pero hay diferencias entre los patógenos causantes. Generalmente los ambientales se aíslan más frecuentemente en los meses del verano, y los contagiosos en los de invierno (Dohoo y col., 1983; Schukken y col., 1989).

Lactancia: El número de lactancia o número de parto de la vaca ha sido identificado como un indicador de riesgo en varios estudios (Schutz y col., 1990; Weller y col., 1992; Barkema y col., 1998; Pryce y col., 1999). Todos estos estudios concluyeron que la incidencia de mastitis aumentó con el número de partos o lactancias.

Etapas de la lactancia: La etapa de la lactancia también influye en el riesgo de aparición de mastitis, que incluso es diferente entre vaquillonas y vacas multíparas (Barkema y col., 1998). En tambos de bajo RCS, existe una mayor incidencia de mastitis durante el primer mes de lactancia, pero por el contrario, entre los tambos de alto RCS, no se observa un efecto de la etapa de la lactancia (Erskine y col., 1988).

Raza: Se encontraron sólo pequeñas diferencias entre las razas. Bannerman y col. (2008) determinaron que vacas de raza Montbeliard y Abondance del Este Francia y Simmental y Brown Swiss de Europa central tienen RCS más bajos y menor frecuencia de casos de mastitis comparadas con la raza Holstein. Comparando las razas Holstein y Jersey se han reportado varios estudios donde se concluye que las vacas de raza Jersey tienen una menor susceptibilidad a mastitis, aunque los RCS son generalmente más altos que los de Holstein (Bannerman y col., 2008; Youngerman y col., 2004).

Velocidad de ordeño: Rupp y Boichard (1999) describieron que la velocidad de ordeño se correlaciona negativamente con el RCS pero no con mastitis. Por otro lado, Waage y col. (1998) demostraron que vaquillonas con una velocidad de flujo de leche más baja son más susceptibles a la mastitis que las que presentaron una velocidad media a alta.

Conformación de la ubre: Existen altas correlaciones genéticas entre la longitud de los pezones, la longitud y profundidad de la ubre, la inserción anterior, y casos de mastitis en varias poblaciones de vacas lecheras (Lund y col., 1994; Rupp y Boichard, 1999; Sørensen y col., 1999). En general, los resultados indican que la selección para mejorar la conformación de la ubre también disminuye el RCS y la mastitis clínica.

I.11 Genética de la mastitis

Los parámetros genéticos, como la heredabilidad, las correlaciones fenotípicas y genéticas, son parámetros estadísticos útiles para medir la componente genética de un rasgo o un grupo de rasgos. No requieren ningún conocimiento sobre el número o la naturaleza de los genes implicados y se estiman a partir de los datos fenotípicos por la correlación entre parientes (Falconer, 1989). La heredabilidad es la parte de la diferencia fenotípica entre los animales que, en promedio, es atribuible a la diferencia genética. Una mayor heredabilidad indica una importancia genética relativamente mayor y en menor grado una influencia del medio ambiente como causales de la variabilidad entre los fenotipos. Una alta heredabilidad también indica la oportunidad de hacer más rápida la mejora genética y una mayor confiabilidad (Falconer, 1989).

La genética es complementaria a las herramientas del manejo usadas para combatir la mastitis. La selección genética es un proceso que resulta en un cambio sostenido en la composición genética del rodeo, que es acumulativo y permanente. La variabilidad genética para la resistencia a la mastitis representa sólo una pequeña proporción de la varianza total, pero no es despreciable y proporciona una oportunidad interesante en la selección, por lo

tanto, debe ser considerada como una herramienta complementaria para mejorar la resistencia a la mastitis en el ganado lechero bovino (Rupp y Boichard, 2003).

La heredabilidad de la mastitis es relativamente baja, y generalmente han sido estimadas por debajo del 5% (Mrode y Swanson, 1996). Las heredabilidades estimadas a partir del promedio por lactancia fue del 6% para RCS, y entre el 10 y 12% para SCS (Monardes y col., 1983), por lo tanto, una mayor heredabilidad es otra de las ventajas del uso de SCS en lugar de RCS para las estimaciones en las evaluaciones genéticas. Por otra parte, se encontró que la heredabilidad es similar para los rodeos con SCS medios, bajos o altos (Banos y Shook, 1990; Boettcher y col., 1992). Si bien las heredabilidades de la mastitis, RCS y SCS son medias o bajas, esto no quiere decir que la genética no tenga un papel importante en la característica, ya que la efectividad en la selección de características de baja heredabilidad se puede mejorar utilizando más hijas por padre.

I.12 Resistencia a mastitis

La resistencia a mastitis es una característica compleja que depende de un componente genético, pero también de factores fisiológicos, anatómicos y ambientales. En una escala más global, la resistencia podría definirse como la habilidad del individuo de impedir la infección o de sobreponerse rápidamente a la misma. La selección genética en los rodeos lecheros se ha enfocado principalmente en el aumento de la producción, hasta hace 20 años los principales caracteres a seleccionar eran los de composición de la leche (contenido de grasa y proteína) y algunas características morfológicas, como capacidad de la ubre y forma. Esta selección basada sólo en producción ha actuado en detrimento de los caracteres relacionados con la sanidad, evidenciada por ejemplo, por las correlaciones negativas entre la producción y la incidencia de mastitis clínicas (Uribe y col., 1995). La resistencia a mastitis y el RCS también están asociados a otros caracteres, como por ejemplo la longevidad de los animales, ya que se hallaron altas correlaciones entre mastitis y RCS con

la esperanza de vida de las vacas (Sander-Nielsen y col., 1999; Pryce y col., 1999). La tendencia desfavorable en fertilidad y sanidad, producto de los programas de mejoramiento enfocados sólo en la producción, fue cambiando los objetivos de selección en los últimos años. De este modo, los países escandinavos fueron pioneros en implementar la selección basada en la inclusión de muchos rasgos funcionales, además de los productivos, y, sobre todo, la resistencia a mastitis (Heringstad y col., 2000). La inclusión de la resistencia a la mastitis en los objetivos de selección ha demostrado ser eficaz en estos países. En Noruega, la incidencia de la mastitis clínica fue de 0,44 (1994) a 0,23 (2002) vacas tratadas por vaca-año (Osteras y col., 2007).

La selección para aumentar la resistencia genética a mastitis se puede hacer directamente o indirectamente. La selección directa significa que el rasgo real se mide en el animal o sus parientes; en la selección indirecta se mide un rasgo indicador que está altamente correlacionado con la enfermedad. El RCS promediado en una lactancia es una medida indirecta muy importante para el control de la mastitis. Es la medida más comúnmente utilizada, porque está disponible a través de la mayoría de los sistemas de control lechero y está correlacionado con la mastitis. Se han estimado moderadas a altas correlaciones genéticas entre mastitis y RCS (0,3 - 0,9) lo que indica que la selección por bajo RCS puede aumentar la resistencia a la mastitis en un rodeo (Weller y col., 1992; Zhang y col., 1994; Mrode y Swanson, 1996).

Una manera de mejorar la efectividad de la selección para caracteres con baja heredabilidad sería, en el caso de la mastitis, la de incluir más hijas de un toro en prueba de progenie. Esto conlleva a mayores costos para los productores y a largos periodos de espera a que las hijas de un toro en prueba empiecen su etapa productiva. Una alternativa a la prueba de progenie es el uso de marcadores moleculares de ADN. La identificación de marcadores genéticos que permitan implementar programas de selección animal teniendo en cuenta la resistencia a mastitis, permitiría disminuir las pérdidas producidas por esta

enfermedad, disminuir el uso de antibióticos y mejorar la tasa de cambio genético. Distintas regiones cromosómicas han sido asociadas a resistencia a mastitis, sin embargo, existe mucha discrepancia sobre los marcadores moleculares que se podrían utilizar. Esta controversia puede ser debida a las diferencias entre poblaciones y la complejidad de la mastitis, ya que la resistencia o susceptibilidad podría depender de distintas vías moleculares y estar regulada por diferentes genes (Rupp y Boichard, 2003). Además de las diferencias genéticas, las diferencias en el manejo de los animales pertenecientes a diferentes sistemas de producción, podrían determinar variaciones en los marcadores moleculares asociados a características productivas y/o de resistencia a enfermedades.

Los sistemas de producción de leche en Argentina son muy diferentes de los de Europa, Estados Unidos y Canadá. Mientras que los países con lechería más desarrollada tienen sistemas intensivos, en nuestro país la producción de leche está ligada a la utilización de pasturas, aunque la participación de las mismas ha mostrado una disminución en los últimos años (Gastaldi et al., 2015 incluyendo también suplementación estratégica con silajes y concentrados, comparables a los sistemas de Nueva Zelanda. Es por estas diferencias que los estudios de asociación de características genéticas con la enfermedad realizados en otros países no son siempre extrapolables al nuestro. Más aún, en la Argentina no existen estudios sobre resistencia/susceptibilidad genética a la mastitis (Poli y Roldán, 2009). Por lo tanto, es importante contar con estudios locales para la identificación de marcadores moleculares que se puedan aplicar a la población bovina de nuestro país.

I.13 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares representan la variación a nivel del ADN, tales como deleciones, duplicaciones, inversiones y/o inserciones. Los marcadores pueden mostrar dos modos de herencia, dominante/recesivo o codominante. Si el patrón genético de homocigotas puede ser distinguido del de los heterocigotas, entonces un marcador se dice

que es codominante. Generalmente los marcadores codominantes son más informativos que los marcadores dominantes. Un marcador molecular de ADN es una posición física identificable en un cromosoma, cuya herencia puede ser monitoreada (Hyperdictionary, 2003). El uso de marcadores moleculares que revelan las variaciones (polimorfismos) a nivel del ADN en una población es una herramienta fundamental en genética animal (Vignal y col., 2002).

A diferencia de las situaciones más simples, donde las enfermedades o condiciones son causadas por la alteración de un solo gen, en las enfermedades/condiciones complejas varios genes tienen una pequeña contribución al fenotipo, y es por esto que deben realizarse estudios de asociación genómicos. Para esto deben detectarse individuos susceptibles y resistentes y utilizar marcadores moleculares distribuidos a lo largo del genoma con el fin de localizar las variaciones que estarían asociadas con la condición (Risch y Merikangas, 1996). Recientemente, se han realizado esfuerzos para localizar los genes que afectan características de importancia económica en el ganado lechero. Los marcadores genéticos asociados con estos genes se pueden utilizar eficientemente en la técnica conocida como “selección asistida por marcadores” (MAS, abreviatura del inglés “Marker Assisted Selection”) para aumentar el progreso genético (Lande y Thompson, 1990).

Algunos de los marcadores más comúnmente utilizados para estudiar los genomas o la filogenia de una especie son:

- RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) que compara los polimorfismos de longitud de fragmentos de ADN generados por enzimas de restricción.
- AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) similares a los RFLP.

- RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”), que es un tipo de marcador molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica fragmentos de forma aleatoria.
- Microsatélites o SSR (“Simple Sequence Repeat”) que son secuencias de ADN en las que un fragmento constituido por di o tri-nucleótidos se repite de manera consecutiva.
- SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) caracterizados por ser polimorfismos de un solo nucleótido.

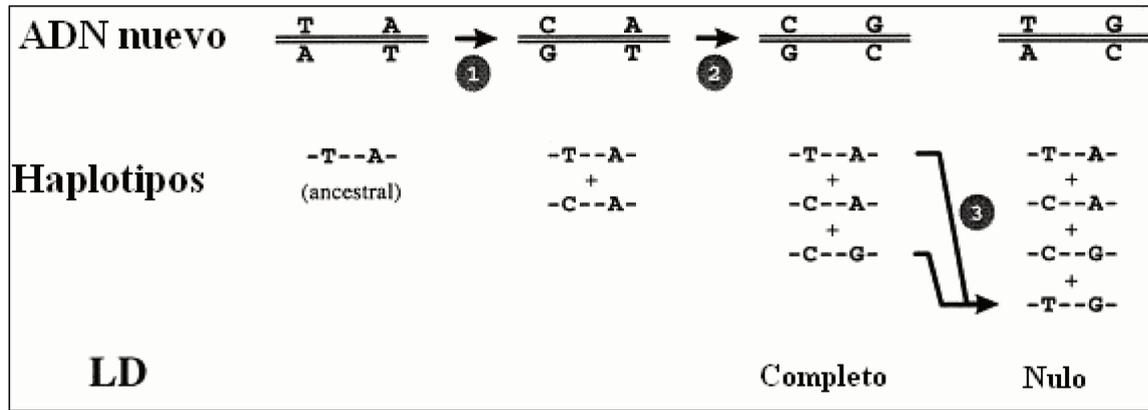
Los SNP (pronunciado “snips”) son los marcadores moleculares de ADN más ampliamente utilizados hoy en día ya sea en humanos, animales, plantas o microorganismos. Son variaciones de un sólo nucleótido en una secuencia de ADN y son la forma más común de polimorfismo en genomas de mamíferos, los cuales representan el 90% de las variaciones y que se presentan con una frecuencia de uno de cada 300 nucleótidos en promedio (Collins y col., 1998). Son posiciones individuales de pares de bases complementarias en el ADN genómico en el que existen diferentes alternativas de secuencia (alelos) en individuos normales en alguna población, en la cual, el alelo menos frecuente tiene una abundancia de 1% o mayor (Brookes 1999). Los SNP pueden clasificarse en no codificantes (ncSNP) y codificantes (cSNP), de acuerdo a la naturaleza del nucleótido que es afectado. Los cSNP se localizan en regiones codificantes del genoma, y pueden a su vez modificar (no sinónimo) o no (sinónimo) el aminoácido codificado por el codón (Brookes, 1999). Existen varias razones para la creciente popularidad del uso de SNP como marcadores moleculares en estudios poblacionales. La primera es la mayor prevalencia en el genoma comparado con otro tipo de marcadores moleculares, suministrando un gran número de marcadores cercanos o dentro del locus de interés. Segundo, puede esperarse que algunos de los SNP localizados en genes afecten directamente las estructuras de las proteínas codificadas o el nivel de transcripción de los genes, pudiendo considerarse como candidatos a alteraciones genéticas

responsables de las diferencias en los fenotipos observados. Tercero, mientras que otros tipos de marcadores, como las secuencias repetitivas presentan alguna inestabilidad (es decir mutaciones que afectan el largo de la repetición), los SNP son heredados de forma mucho más estable y en forma de bloques, lo que permite identificar las variaciones genotipificando sólo algunos SNP del bloque pudiendo así inferir el genotipos de los demás. Por último, existen nuevas tecnologías de genotipificación de SNP en masa, lo cual disminuye los costos, permite la automatización y posibilita la realización de estudios genéticos más confiables (Landegren y col., 1998; Morozova y col., 2008). Mediante el uso de este tipo de análisis, y la información obtenida del proyecto genoma bovino recientemente finalizado, el número de SNP descritos en bases de datos supera los dos millones (Elsik y col., 2009).

En forma similar a otros marcadores, los SNP pueden mapearse y utilizarse en conjunto con el objetivo de identificar loci cuya variación alélica este asociada con la variación de un carácter cuantitativo (QTL, Quantitative Trait Loci), es decir, un fenotipo cuantificable, y realizar el mapeo fino de una región cromosómica, para poder definir el o los genes que contribuyen a la característica fenotípica (Stone y col., 2005; Snelling y col., 2005; Calvo y col., 2006; Leyva-Baca y col., 2007). Su utilización se basa en el principio de desequilibrio de ligamiento (LD, Linkage Disequilibrium) (Figura 1.4), el cual se refiere a la ausencia de asociación al azar entre alelos. Es decir, cuando alelos de dos o más loci no segregan independientemente, existe LD entre ellos. La importancia de este concepto radica en que el LD indicaría una interacción funcional entre los loci asociados con el fenotipo de interés (Neale y col., 2008). Pueden identificarse así SNP o haplotipos (conjunto de alelos) que contribuyen a la característica particular (ya sea alterando la secuencia de la proteína o la transcripción del gen) o más comúnmente SNP que se encuentran en LD con la característica analizada. Para la implementación exitosa de programas de selección es necesaria la identificación del o los polimorfismo/s responsables del efecto observado, pudiendo

utilizarse así la denominada selección asistida por genes (GAS, Gene-Assisted Selection) (Dekkers, 2004).

Figura 1.4: Creación y pérdida del LD



Se parte de un locus ancestral para dos posiciones de pares de bases. A menos que ambas posiciones sean polimórficas el concepto de LD no se aplica. Evento 1 implica un cambio [T→C (A→G)] del primer par de bases para crear un SNP y un nuevo (segundo) haplotipo que aumentará su frecuencia en la población. Entonces, el evento 2 cambia [A→G (T→C)] otro par de bases para crear el segundo SNP y otro (tercer) haplotipo que también aumenta a una frecuencia apreciable. En esta etapa existe LD completa entre las dos posiciones por lo tanto, una T en la primera posición es siempre acompañada por una A en la segunda posición, y una G en la segunda posición por una C en el primero. El evento 3 representa la recombinación meiótica posterior, a través de lo cual se forma un cuarto haplotipo y que no está en LD (adaptado de Brooks y col., 1999).

I.14 Estudios de asociación

Un estudio de asociación genética se utiliza para encontrar genes candidatos o regiones genómicas que contribuyen con un rasgo fenotípico, evaluando la correlación entre el fenotipo y el genotipo. Cuando un genotipo dentro de una población está ligado con un rasgo fenotípico determinado, más a menudo de lo que se esperaría por casualidad, se dice que está asociado genéticamente.

Una forma eficiente de realizar estudios de asociación es limitar, mediante una cuidadosa preselección, cuales marcadores moleculares son evaluados para una característica determinada. La base de la selección puede ser focalizada hacia marcadores localizados en

genes candidatos seleccionados por su función biológica, genes sugeridos por experimentos de expresión diferencial o candidatos posicionales obtenidos a partir de estudios de ligamiento previos. El uso de SNP que podrían tener consecuencias funcionales, como los cSNP no sinónimos o localizados en secuencias promotoras de la transcripción es obviamente recomendado (Brookes, 1999). En el caso de la resistencia a mastitis es una función compleja que involucra varias vías metabólicas con diferentes moléculas y células como protagonistas. Es por esto que la búsqueda de asociación se ha orientado generalmente hacia los genes que controlan la intensidad y calidad de la respuesta inmune innata, como son los que codifican para opsoninas, receptores celulares y enzimas involucradas en la fagocitosis. También se ha orientado hacia aquellos que controlan la especificidad de la respuesta inmune adaptativa tales como los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad bovino (BoLA, Bovine Leukocyte Antigen) y receptores de linfocitos (TLR's), como también otros genes reportados como asociados con variaciones en el RCS (Ogorevc y col., 2009; Leyva-Baca y col., 2007). Una forma de analizar las vías metabólicas y los genes relacionados con la respuesta inmune es la realización de estudios de patrones de expresión global mediante la utilización de microarreglos de ADN sobre tejido animal sometido a una infección experimental (Lutzow y col., 2008; Swanson y col., 2009).

Un estudio de asociación de genoma completo (GWAS, genome-wide association study), consiste en evaluar simultáneamente decenas de miles, y hasta millones de marcadores moleculares de tipo SNP distribuidos uniformemente en el genoma de diferentes individuos con el fin de determinar asociaciones entre estos polimorfismos y la característica observada. Este tipo de estudios permite localizar regiones genómicas asociadas a una característica cuantitativa o enfermedad de tipo poligénica, donde más de una región o gen contribuye a la variación fenotípica, y sin tener previo conocimiento de los genes o regiones involucradas.

I.15 Selección Genómica

Para el ganado lechero, la mayoría de las características de importancia económica son controladas por muchos genes, cada uno de efecto pequeño (Cole y col., 2009; Hayes y col., 2010). Debido a esto, se necesita una gran cantidad de datos para estimar los efectos con precisión, y se necesitan marcadores densamente distribuidos en el genoma para asegurar que la asociación entre el marcador y el QTL persiste a través de las familias. La reciente secuenciación del genoma bovino, condujo al descubrimiento de millones de SNP y ha sido clave para la reducción dramática en el costo de genotipificación. La selección genómica se refiere a las decisiones de selección sobre la base de los valores de cría genómicos (GEBV, Genomic Breeding Values). Para calcular un GEBV, primero se deriva una ecuación de predicción basada en los SNP. El genoma completo se divide en pequeños segmentos, cuyos efectos se estiman en una población de referencia en la que los animales poseen fenotipo y genotipo conocido. De esta manera, los efectos de todos los loci que contribuyen a la variación genética son capturados, incluso si los efectos de los loci individuales son muy pequeños. En las generaciones posteriores, los animales pueden ser genotipificados para los marcadores para así determinar qué segmentos de cromosomas han heredado. Así, los efectos estimados de los segmentos que tiene cada animal pueden ser sumados sobre todo el genoma para predecir el GEBV. Meuwissen y col. (2001) demostraron, usando simulaciones, que era posible lograr precisiones de valores de cría de 0,85 usando solamente la información de los marcadores en animales sin fenotipo propio.

De esta manera las evaluaciones genómicas han revolucionado la cría del ganado lechero al aumentar considerablemente la precisión de las estimaciones del valor genético de los animales jóvenes y han duplicado la tasa de progreso genético. Las predicciones son cada vez más precisas ya que los nuevos animales se añaden a la población de referencia. Todos los toros jóvenes adquiridos por las principales organizaciones de comercialización de

semen ahora se seleccionan sobre la base de las evaluaciones genómicas, lo que ha permitido una amplia comercialización de los toros más jóvenes (Wiggans y col., 2011).

I.16 Genotipificación

La tecnología para genotipificación de SNP es variada e incluye los métodos tradicionales como PCR-RFLP, tetraprimer-PCR (o ARMS-PCR), PCR alelo-específica, y técnicas más complejas como la secuenciación de ADN, PCR en tiempo real (Taqman®, HRM), espectrometría de masas (MALDI-ToF), sistemas multiplex basados en electroforesis capilar (SNPlex®, SnaPshot®), microarreglos de ADN, entre otros (de la Vega y col., 2005; Wang y col., 2009; Matukumalli y col., 2009). Los microarreglos de ADN contienen cientos de miles de sondas de ADN que están dispuestas en un pequeño chip, lo que permite evaluar los diferentes SNP simultáneamente, como también determinar homocigotas y heterocigotas en una muestra. La escala de SNP que pueden ser genotipificados simultáneamente es enorme. Esta escala puede ir desde algunos miles de SNP seleccionados en estudios previos por estar en LD con características de interés y que su diseño puede ser personalizado para el cliente, hasta chips conteniendo cientos de miles (y hasta millones para el caso de humanos) de SNP distribuidos uniformemente a lo largo del genoma bovino, especialmente útiles para selección genómica. Dos matrices de genotipificación de alta densidad se han desarrollado recientemente y están disponibles para análisis genómico de la especie bovina (Figura 1.5): El BovineHD BeadChip desarrollado por la firma Illumina contiene 777.962 SNP, y el Axiome-Genome-Wide BOS 1 de la firma Affymetrix que contiene 648.874 SNP. Estos productos tienen cada uno un diseño único y una densidad de marcadores que permite mapeo fino de QTL, la detección de variación del número de copias, y la selección genómica multirracial (Rincón y col., 2011). A su vez, existen chips de baja densidad de marcadores (3000 y 7000 SNP) que permiten genotipificar animales a un costo menor y que incluyen marcadores seleccionados. Estos chips de baja densidad (LD, Low Density) generan

genotipos de animales que luego pueden ser usados para reconstruir (imputar) sus correspondientes genotipos de alta densidad en poblaciones relacionadas. La selección del sistema a utilizar resulta de un balance de los costos por genotipo y el número de genotipos a generar.

Figura 1.5: Descripción de los chips de genotipificación de la marca Affymetrix (A) y de la marca Illumina (B)

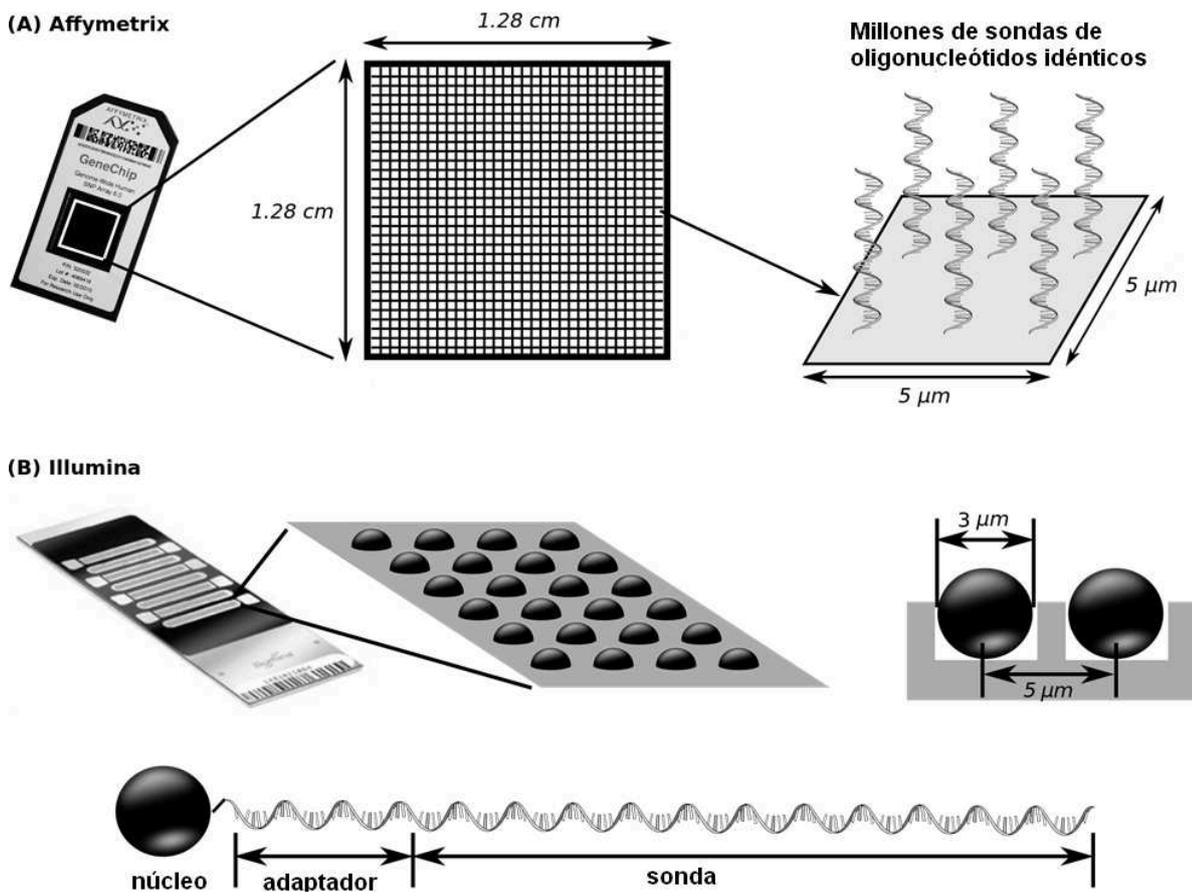


Imagen adaptada de Barillot y col., 2012.

I.17 Marcadores Moleculares asociados a Mastitis

La utilización de los marcadores se basa en el principio de LD. La existencia de un número finito de material genético heredable significa que debe haber un número finito de loci afectando las variaciones en el fenotipo. De hecho, existe evidencia de que la distribución del efecto en los loci es tal que existen muchos genes con efectos pequeños y muy pocos con grandes efectos (Shrimpton y Robertson, 1998; Hayes y Goddard, 2001). Una de las limitaciones de la aproximación del mapeo de QTL es que se necesita un efecto relativamente grande para identificar un locus asociado al fenotipo de interés (Cole y col., 2009) por lo que, en enfermedades complejas, las verdaderas asociaciones son más difíciles de detectar (Pighetti y Elliott, 2011). Identificar marcadores o SNP en genes específicos asociados con la respuesta inmune es una alternativa a la selección por marcadores para resistencia a mastitis. Esta aproximación se sobrepone a uno de los principales problemas del GWAS (Genome Wide Association Study), en el cual los análisis estadísticos de correlaciones múltiples pueden pasar por alto genes que estén realmente asociados con el fenotipo de interés (Hayes y Goddard. 2010). Hasta el momento, la aproximación que se enfoca en el efecto de un gen candidato sólo ha sido efectiva en la identificación de un limitado número de genes, más precisamente en ganado bovino lechero dos mutaciones puntuales han sido detectadas en los genes DGAT1 (Diacilglicerol O-aciltransferasa 1) (Grisart y col., 2002) y ABCG2 (ATP Binding Protein Cassette G2) (Cohen-Zinder y col., 2005) asociadas a rendimiento en leche y composición. Es por ello que la identificación de marcadores relacionados a características complejas necesita de una aproximación basada en la integración de los polimorfismos, los diferentes genes y regiones cromosómicas relacionadas en las vías metabólicas (Ogorevc y col., 2009).

I.18 Bioinformática

La bioinformática es un campo interdisciplinario que desarrolla y mejora los métodos para almacenar, recuperar, organizar y analizar datos biológicos y que ayuda a resolver los problemas asociados con la manipulación de la creciente generación de datos biológicos. Una actividad importante en la bioinformática es el desarrollo de herramientas de software para generar conocimiento biológico útil.

En el campo de la genética y la genómica ayuda en la secuenciación de genomas y las variaciones (mutaciones) observadas. Desempeña un papel en la minería de textos de la literatura biológica y el desarrollo de ontologías biológicas y genéticas para organizar y consultar los datos biológicos. También juega un papel importante en el análisis de genes, la expresión de las proteínas y su regulación. Aporta herramientas de ayuda en la comparación de los datos genéticos y genómicos y, más en general, en la comprensión de los aspectos evolutivos de la biología molecular. A un nivel más integrador, ayuda a analizar y catalogar las vías biológicas y redes. En la biología estructural, ayuda en la simulación y modelado de ADN, ARN, y estructuras de proteínas así como las interacciones moleculares.

I.19 Bases de datos

La generación de grandes cantidades de información, tanto de datos genealógicos, fenotípicos, ambientales, y de secuencia, así como su comparación, supone la utilización de herramientas informáticas que permitan tanto el almacenamiento, como el análisis de la misma. El lenguaje de consulta estructurado (SQL Structure Query Language) es un lenguaje de programación basado en el manejo del álgebra y el cálculo relacional que permite trabajar con base de datos relacionales. SQL utiliza la flexibilidad y potencia de los sistemas relacionales permitiendo así una gran variedad de operaciones de manera eficiente. Uno de los interpretadores de SQL (Structure Query Language, Lenguaje de Consulta

Estructurado) más difundidos y utilizados es el llamado MySQL. Así, MySQL permite crear base de datos y tablas, insertar datos, modificarlos, eliminarlos, ordenarlos, hacer consultas y realizar operaciones de manera rápida y con bajo requerimiento de memoria. Se diseñan así las tablas y relaciones correspondientes acordes al tipo de información almacenada, así como los mecanismos de consulta y recuperación de la información. Existen también otras bases de datos que han sido desarrolladas específicamente para el almacenamiento de datos genotípicos y fenotípicos como GGSD (Day-Williams, 2009), IGS (Fiddy y col., 2006) y GeneLink (Gillanders y col., 2004).

I.20 Base de datos de QTL

El desarrollo de la base de datos “Cattle QTLdb” (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>) es un proyecto liderado por la Universidad Estatal de Iowa, EEUU, y ha recopilado todos los datos de QTL para ganado bovino publicados durante los últimos 12 años (Hu y col., 2015). La base y sus herramientas hacen posible comparar, confirmar y localizar los genes responsables de las características cuantitativas importantes en el genoma bovino. La última actualización de la base contiene, hasta la escritura de este trabajo, 36.693 QTL, producto de 623 publicaciones, representando 492 características diferentes. Los QTL asociados a características relacionadas con mastitis se encuentran distribuidos en todos los cromosomas, lo cual puede deberse a que existen numerosos factores genéticos y ambientales que contribuyen al fenotipo, incluyendo interacciones específicas patógeno-huésped. En la tabla 1.4 se muestran los caracteres relacionados con mastitis y el número de QTL asociados.

Tabla 1.4: Número de QTL asociados a caracteres relacionados con mastitis publicados en QTLdb.

Carácter	Nº de QTL
Mastitis clínica	151
RCS	77
SCS	1018
Total	1246

RCS: recuento de células somáticas. SCS: somatic cell score.

I.21 Genes candidatos

Los polimorfismos en genes que codifican para los diferentes factores defensivos encargados de detectar y eliminar los patógenos son potenciales candidatos en un programa de selección por marcadores. Moléculas y receptores asociados con la respuesta inmune son propensos a contribuir en la resistencia o susceptibilidad a la mastitis (Sharma y col., 2011). Muchos estudios han identificado polimorfismos en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Rupp y col., 2007; Sharif y col., 1998) y receptores de citoquinas (Youngerman y col., 2004). Otros polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inmune innata también se han estudiado, como el de lactoferrina (Wojdak-Maksymiec y col., 2006). Otra forma de analizar las vías metabólicas y los genes relacionados con la respuesta inmune es la realización de estudios de patrones de expresión global mediante la utilización de microarrays sobre tejido animal sometido a una infección experimental. (Lutzow y col., 2008; Swanson y col., 2009). A continuación, se analiza una selección de genes candidatos asociados significativamente ($p < 0,05$) con mastitis, recuento de células somáticas (RCS) y su transformación logarítmica, el score lineal de células

somáticas (SCS), informados en publicaciones relevantes hasta la fecha, almacenados en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

I.21.1 Generales

Existen algunas proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana presentes en la leche que actúan defendiendo a la glándula mamaria ante el ingreso de un patógeno; por lo tanto, los genes que codifican para estas proteínas son potenciales candidatos para su estudio. Tal es el caso de la lactoferrina, cuyo gen se localiza en el cromosoma 22 (BTA22). La lactoferrina es una glicoproteína que se encuentra en la mayoría de las secreciones, incluyendo lágrimas, saliva y leche y existen numerosos reportes sobre su actividad bacteriostática in vivo e in vitro. (Nuijens y col., 1996; Sordillo y col., 1997). Su poder bacteriostático se debe a su capacidad de capturar iones Fe^{3+} , privando a los microorganismos de éstos (Bullen y col., 1972). Por medio de la técnica de genotipificado de RFLP, Wojdak-Maksymiec y col (2006) encontraron una asociación significativa entre genotipos del gen de lactoferrina (LTF) y el RCS en 124 vacas Holstein-Fresian de la región de Pomerania, Polonia.

Las β -defensinas son otro grupo de péptidos con actividad antibiótica y citotóxica contra diferentes microorganismos y protegen a la glándula mamaria de los patógenos (Tunzi y col., 2000). Está demostrado que en tejidos de glándula mamaria bovina infectada, así como en células somáticas de la leche existen transcriptos de β -defensina (Roosen y col., 2004; Bagnicka y col., 2007). Bagnicka y col. (2007) secuenciaron el gen que codifica para la β -defensina 4A (BNBD4, BTA27, N° de acceso de GenBank: AF008307) en una población de 212 vacas de la raza Holstein-Friesian polacas y encontraron 10 polimorfismos en la región intrónica del gen. Uno de estos polimorfismos, ubicado en la posición nucleotídica 2239 y representado por una transición C > T, resultó estar significativamente asociado al RCS en

leche, como también a porcentaje de grasa, proteína y lactosa en leche. La Tabla 1.5 lista un resumen de genes candidatos de proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana con marcadores moleculares asociados a mastitis.

Tabla 1.5: Resumen genes candidatos generales con marcadores asociados a mastitis

Gen	Nombre	BTA	Referencia	Fenotipo	Población
LTF	Lactoferrina	22	Wojdak-Maksymiec y col., 2006	RCS	Holstein polacas
BNBD4	β -defensina 4	27	Bagnicka y col., 2007	RCS	Holstein polacas

RCS: Recuento de células somáticas.

I.21.2 Inicio de la Respuesta Inmune

El primer paso para movilizar los mecanismos de la inmunidad contra los patógenos es el reconocimiento de su presencia. Para esto los mamíferos están equipados con una batería de receptores que detectan la presencia de moléculas componentes de patógenos: los TLR (Toll Like Receptors); NLR (Nod Like Receptors), receptores “scavenger” y receptores de lectinas tipo C; que representan la familia de los receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRR's) y que son los responsables de desencadenar la respuesta inmune (Akira y Takeda, 2004; Ip y col., 2009). El dominio extracelular del TLR2 está caracterizado por contener múltiples repeticiones ricas en leucinas y esta región es fundamental en el reconocimiento de patrones de patógenos (Texereau y col., 2005). Zhang y col. (2009) estudiaron el gen que codifica para el TLR2 (acceso: NM_174197) y encontraron 3 mutaciones dentro de la región codificante para el dominio extracelular de la proteína. Uno de estos tres polimorfismos está localizado en la posición nucleotídica 385 (T > G), produce el cambio de un residuo de asparagina por otro de glutamina y mostró estar significativamente asociado al SCS. Las vacas con genotipos TT y TG presentaron mayor SCS que aquellas con genotipo GG para una población de 242 vacas de las razas Holstein,

Sanhe y Simmental, en rodeos de China y Mongolia. Otro de los receptores de tipo “*toll*”, el TLR4, se secuenció en búsqueda de polimorfismos en 40 toros Holstein canadienses de la Canadian Dairy Network con valores de cría (EBV) extremos para SCS (Sharma y col., 2006). En esa población se encontraron tres polimorfismos que luego fueron genotipificados en 338 toros de la misma procedencia. De esos tres polimorfismos, uno está ubicado en la posición nucleotídica 2021 del exón III del gen TLR4 (rs8193069), produciendo un reemplazo de treonina (alelo C) por isoleucina (alelo T) en dominio transmembrana-citoplasmático predicho para la proteína. El alelo C de éste, estaría asociado significativamente a los valores de cría más bajos para SCS (Sharma y col., 2006). La relación entre otros dos polimorfismos en el gen TLR4 y el SCS también se evaluó en rodeos de Holstein, Sanhe y Simmental chinos. El primero fue un SNP localizado en el intrón I, en la posición 4525 (A > G) que se asoció significativamente con el SCS. Las vacas con el genotipo AA experimentaron SCS significativamente más bajos que aquellas con el genotipo GG, mientras que las vacas heterocigotas presentaron valores intermedios (Wang y col., 2007).

El gen NOD2, ubicado en el BTA18 (por sus siglas de su nombre en inglés, nucleotide-binding oligomerization domain containing 2), codifica para la proteína del mismo nombre, también conocida como “dominio reclutador de caspasa 15 (CARD15). Es un receptor de reconocimiento de patrones de patógenos, y actúa junto con otras proteínas de vigilancia intracelular, reconociendo moléculas bacterianas que contienen una estructura específica llamada muramil dipéptido (MDP), que es el motivo mínimo encontrado en todos los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Kufer y col., 2006). Pant y col (2007) utilizaron semen de 338 toros Holstein canadienses, seleccionados por poseer valores de cría extremos para SCS y rendimiento en proteína. Extrajeron ADN y secuenciaron el gen CARD15 y sus regiones flanqueantes, e identificaron 4 polimorfismos de tipo SNP. Uno de esos SNP está localizado en la posición nucleotídica

3020, presentando los alelos A o T (rs43710288) y, por medio de análisis estadísticos, determinaron que el alelo T está asociado significativamente a EBV para SCS, resultando en un incremento en el SCS sobre animales que poseen el alelo A.

Las lectinas fijadoras de manosa (por sus siglas en inglés: mannan binding lectin MBL) son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las lectinas tipo C, dependientes de calcio, que se clasifican dentro del grupo de las colectinas (Holmskov y col., 2003). Son sintetizadas en el hígado y secretadas al torrente sanguíneo, donde son capaces de unirse a carbohidratos presentes en la superficie de bacterias, virus, protozoos y células tumorales, mediando la opsonización directamente o por medio de la activación del complemento por la vía de las lectinas (Ip y col., 2009). Mediante el estudio de la variación genética del gen MBL1 (GenBank: NC_007329.2), en 1.053 vacas de tres razas de ganado lechero de China (Holstein, Luxi y Bohai), Wang y col. (2011) secuenciaron el gen y encontraron tres nuevos polimorfismos. Un SNP en el intrón I y los otros dos en la región del exón II. De los dos ubicados en el exón, uno de ellos, en la posición nucleotídica 2651, presenta una mutación G > A, que se traduce en un cambio de aminoácidos (Val > Ile) y se encontró significativamente asociado a SCS. El análisis estadístico mostró que las vacas con genotipos GG y GA tuvieron SCS significativamente más bajos que los individuos AA lo que sugiere un papel importante de este SNP en la respuesta inmune contra la mastitis. En la tabla 1.6 se presenta un resumen de los genes candidatos involucrados en el inicio de la respuesta inmune con marcadores asociados a mastitis.

Tabla 1.6: Resumen genes candidatos del inicio de la respuesta inmune innata con marcadores asociados a mastitis.

Gen	Nombre	BTA	Referencia	Fenotipo	Población
TLR2	Receptor Tipo "Toll" 2	17	Zhang y col., 2009	SCS	Holstein, Sanhe y Simmental chinas
TLR4	Receptor Tipo "Toll" 4	8	Sharma y col., 2006	EBV-SCS	Holstein canadienses
TLR4	Receptor Tipo "Toll" 4	8	Wang y col., 2007	SCS	Holstein, Sanhe y Simmental chinas
CARD15	Dominio Reclutador de Caspasa 15	18	Pant y col., 2007	EBV-SCS	Holstein canadienses
MBL1	Lectina Fijadora de Manosa 1	28	Wang y col., 2001	SCS	Holstein, Luxi y Bohai chinas

SCS: Score de células somáticas; EBV: Valor de cría estimado.

I.21.3 Activación de la respuesta inmune, y eliminación del patógeno

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) bovino juega un papel esencial en la inducción y regulación de la respuesta inmune adquirida y ha sido asociado con resistencia a una variedad de enfermedades (Rothschild y col., 2000). Lundén y col. (1990) encontraron una asociación significativa entre un haplotipo DQ1A del BoLA y valores de cría para susceptibilidad a mastitis clínica evaluada en hijas de toros de las razas Roja y Blanca suecas. Las variantes alélicas del exón 2 del gen BoLA-DRB3 (DRB3.2, el más polimórfico en la región de los MHC clase II) han sido estudiadas por su asociación a la resistencia o susceptibilidad a mastitis bovina. Dietz y col. (1997) utilizaron el recuento de células somáticas (RCS) correspondiente a 1100 vacas Holstein de rodeos del norte de Estados Unidos, como medida de la salud de la ubre y genotipificaron el gen, encontrando que el alelo *16 del BoLA-DRB3.2 (BoLADRB3.2*16) está significativamente asociado a valores de RCS más altos. En un estudio similar, la presencia del alelo DRB3.2*16 se asoció con

elevados valores de cría para SCS, y el alelo DRB3.2*8 se asoció con altos valores de cría para incidencia de mastitis clínicas (Kelm y col., 1997). Usando la técnica de RFLP, en ADN proveniente de sangre de vacas Holstein y Jersey canadienses, Sharif y col. (1998) encontraron que los alelos BoLA DRB3.2*3 y *11 se asociaron con un menor RCS, mientras que los alelos DRB3.2*22 y DRB3.2*23 con un mayor RCS. Por otro lado, el alelo DRB3.2*3 también se asoció con menor incidencia de mastitis clínica, mientras que el alelo DRB3.2*8 se asoció con mayor riesgo de mastitis. El alelo DRB3.2*3 se asoció con un aumento de anticuerpos en leche, así como la reducción de incidencia de mastitis y RCS.

Una vez activados, los TLR's inducen la expresión de una variedad de genes involucrados en la respuesta inmune. Estos son los que codifican para citoquinas, péptidos antimicrobianos, moléculas co-estimuladoras, moléculas del MHC y otros efectores necesarios para defenderse de los patógenos invasores (Janeway y col., 2002). Los receptores de citoquinas presentes en la superficie de los neutrófilos como CXCR1 (receptor de quimosinas tipo 1) inducen la activación de los neutrófilos, la quimiotaxis y la consiguiente fagocitosis de los patógenos (Peveri y col., 1988; Podolin y col., 2002). Los polimorfismos en el gen que codifica el CXCR1 (BTA2) han sido estudiados por varios autores. Un polimorfismo de tipo SNP se ubicó en la posición nucleotídica 777 G > C (acceso: U19947) y produce una mutación en la posición aminoacídica 245, el reemplazo de un residuo de glutamina por una histidina (Q245H) en la proteína, y fue estudiado por Youngermann y col. (2004) en dos rodeos de razas Holstein y Jersey. En este estudio los autores describieron que los animales con genotipo CC mostraron un incremento significativo en la prevalencia de mastitis subclínicas, respecto de los demás genotipos, sólo en las vacas de raza Holstein; como así también que los genotipos CC y GC estarían asociados a un aumento del SCS. En 2008, Leyva-Baca y col., secuenciaron el gen CXCR1 (GenBank: AC150887.4) y sus regiones flanqueantes, a partir de ADN obtenido de semen de 338 toros Holstein canadienses y encontraron tres nuevos polimorfismos en la región 5' no

codificante (-344T>C, -1768T>A, y -1830A>G) y un cuarto ya reportado en la región codificante (777 G>C). El SNP en la posición -1768 (rs41255711) se halló como significativamente asociado a SCS y el alelo A mostró estar asociado a un aumento en el SCS. En otro estudio realizado por Galvao y col. (2011) hallaron que los genotipos CC y GC del SNP ubicado en la posición 777, presentaban una tasa de incidencia de mastitis clínica menor a las de genotipos GG, pero no encontraron asociaciones significativas entre los genotipos y el RCS en un rodeo de 350 vacas de la raza Holstein provenientes de 23 tambos comerciales de Estados Unidos. En una población de 610 vacas Holstein chinas, Chen y col. (2011) encontraron los 3 polimorfismos en la región 5' no codificante del mismo gen, hallados anteriormente por Leyva-Baca y col. (2008) y un nuevo SNP, en la posición 783C>A fue detectado en la región codificante. Los 3 SNP hallados en la región no codificante se correlacionaron significativamente con el SCS pero no fue así para el nuevo SNP en la región codificante.

El gen FEZL (Forebrain embryonic zinc finger-like) está ubicado en BTA22 codifica para una proteína que contiene dominios del tipo “dedos de zinc” seguido de un residuo de glicinas (Matsuo-Takasaki y col., 2000). Un “dedo de zinc” es un pequeño motivo estructural que se caracteriza por contener uno o más iones de zinc a fin de estabilizar la estructura secundaria de la proteína (Klug y Rodhes, 1987). El término se usó originalmente para describir el aspecto de dedo de una estructura hipotética de un factor de transcripción de *Xenopus laevis* pero ahora ha llegado a abarcar una amplia variedad de estructuras proteicas que contienen estos dominios de unión a otras moléculas y pueden actuar como factores de transcripción de ADN (Klug, 1999). Estudios realizados por Sugimoto y col. (2006) revelaron por medio de análisis de QTL que existe un locus asociado a SCS mapeado en el gen. En el mismo estudio comprobaron que vacas con alto SCS contienen una proteína FEZL con un residuo de glicinas más largo (de 12 a 13 glicinas) en la posición 105 y además que el tratamiento de células epiteliales mamarias bovinas con LPS inducía la expresión de

FEZL, seguida de un incremento en la producción de TNF- α e IL-8. Estos hallazgos motivaron un estudio de asociación entre este polimorfismo y valores de cría extremos para SCS, en 918 toros de raza Holstein japoneses, mostrando una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y valores de cría para SCS (Sugimoto y col., 2011).

Otro regulador importante de la respuesta inflamatoria es la osteopontina, codificada por el gen SPP1 (secreted phosphoprotein 1) se encuentra localizado en el BTA6. Es una citoquina producida por las células T activadas (Patarca y col., 1989). Entre otras propiedades halladas para la osteopontina, se encuentra la de conferir resistencia a infecciones por varios patógenos intracelulares, a través del reclutamiento y activación de los macrófagos y promover así la inmunidad mediada por células (Th1) (Weber y col., 2002). Un análisis realizado por Alain y col. (2009) reveló que fue encontrada osteopontina en células somáticas de leche luego de un desafío intramamario con *E. coli*, junto a un aumento en el RCS. En el mismo trabajo se encontró que en la región promotora del gen SSP1, en la posición -1301 hay una transición G > A (ss1304523469) asociada a valores extremos de EBV para SCS, cuando realizaron el análisis en una población de 578 toros Holstein canadienses.

La clusterina (CLU), descrita como una glicoproteína secretada por las células de Sertoli, recibe su nombre de su capacidad para mediar en la agrupación (clustering) de células (Blaschuk y col., 1983). Está ampliamente distribuida en los tejidos y altamente conservada entre especies manteniendo un 70-80% de similitud en su secuencia entre mamíferos (Jenne y Tschopp, 1992). Si bien la función de la clusterina ha sido difícil de establecer, se sabe que tiene la capacidad de unirse a una amplia gama de ligandos biológicos, como componentes del complemento (Tschopp y col., 1993), inmunoglobulinas (Wilson y Easterbrook-Smith, 1992) y componentes de la pared celular de *S. aureus* (Partridge y col., 1996). El ARN mensajero de la clusterina se ha encontrado en todo el tejido animal y también en leche (Jenne y col., 1992). Más aún, se hallaron altos niveles de

expresión durante una variedad de enfermedades incluyendo mastitis bovina (Silkensen y col., 1994; Swanson y col., 2009). Para estudiar el posible efecto de la clusterina en la mastitis, Wang y col. (2012) secuenciaron el gen ubicado en el BTA8, en búsqueda de polimorfismos, y encontraron uno en la posición nucleotídica +15781 G > A (NC_007306.4) en el exón 7 del gen, por medio de la técnica de RFLP. Este SNP demostró estar significativamente asociado al SCS en la población de estudio, compuesta por 1137 vacas Holstein chinas y siendo el alelo A el que mostró estar asociado con un aumento en el SCS.

El gen del receptor de interleuquina 10 (IL-10R α), localizado en el BTA15, también fue estudiado como gen candidato, ya que la IL-10 actúa como antiinflamatorio en las superficies mucosas y está involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria durante las infecciones intramamarias por diferentes patógenos (Bannerman y col., 2004; Kauf y col., 2007; Zhu y Paul, 2008). Verschoor y col. (2009) secuenciaron este gen (NCBI-GeneID: 513478) a partir de ADN proveniente de 40 toros Holstein y encontraron seis SNP en el gen. Uno de los SNP, en la posición 1185 C > T (ss104807645) mostró estar asociado significativamente a EBV para SCS, en un grupo de 633 toros canadienses de las razas Holstein, Jersey y Guernsey.

El factor del complemento 4 (C4) es una molécula esencial en la activación del complemento por la vía clásica y por la vía de las lectinas (Sjoholm y col., 2006). Es un péptido corto que presenta actividad bactericida y anafiláctica (Zipfel y Reuter, 2009). Su gen codificante, el C4A (GenBank: NC007324.4) está ubicado en BTA23 y contiene 41 exones y 40 intrones. Está estrechamente ligado a la región genómica del BoLA, que a su vez, está asociada a susceptibilidad a mastitis (Rupp y Boichard, 2003; Park y col., 2004). Se han reportado elevados niveles de expresión del ARNm de C4A en glándulas mamarias infectadas con *E. coli* (Günther y col., 2009). En 2012, Yang y col. estudiaron el gen secuenciando muestras de ADN de 60 vacas Holstein chinas y encontraron 3 nuevos polimorfismos en este gen. Luego estos SNP se genotipificaron en 1182 vacas de la misma

raza. Dos de esos SNP (rs132741478 y rs137485678) en las posiciones 2994 A > G y 3649 G > C del exón 10, resultaron significativamente asociados a SCS. Las vacas con el genotipo AA en la posición 2994 tuvieron valores más altos de SCS que las de genotipos GG y AG y, las de genotipo GG en la posición 3649 tuvieron valores más altos de SCS que aquellas con genotipos GC y CC En la Tabla 1.7 se resumen los genes candidatos de la activación de la respuesta inmune y eliminación del patógeno con marcadores asociados a mastitis.

Tabla 2.7: Resumen genes candidatos de activación de la respuesta inmune y eliminación del patógeno con marcadores asociados a mastitis

Gen	Nombre	BTA	Referencia	Fenotipo	Población
BoLA	Bovine Leukocyte Antigen	23	Lundén y col. (1990)	EBV-MC	Rojas y Blancas suecas
BoLA	Bovine Leukocyte Antigen	23	Dietz y col. (1997)	SCS	Holstein estadounidenses
BoLA	Bovine Leukocyte Antigen	23	Kelm y col. (1997)	EBV-MC	Holstein estadounidenses
BoLA	Bovine Leukocyte Antigen	23	Sharif y col. (1998)	SCS; MC	Holstein y Jersey canadienses
CXCR1	Receptor de Quimosinas CXC tipo 1	2	Youngermann y col. (2004)	SCS	Holstein y Jersey estadounidenses
CXCR1	Receptor de Quimosinas CXC tipo 1	2	Leyva-Baca y col (2008)	EBV-SCS	Holstein canadienses
CXCR1	Receptor de Quimosinas CXC tipo 1	2	Galvao y col. (2011)	MC	Holstein estadounidenses
CXCR1	Receptor de Quimosinas CXC tipo 1	2	Chen y col. (2011)	SCS	Holstein chinas
FEZL	Forebrain embryonic zinc finger-like	22	Sugimoto y col. (2006)	EBV-SCS	Holstein japoneses
SPP1	secreted phosphoprotein 1	6	Alain y col. (2009)	EBV-SCS	Holstein canadienses
CLU	Clusterina	8	Wang y col. (2012)	SCS	Holstein chinas
IL-10R α	receptor de interleuquina 10	15	Verschoor y col. (2009)	EBV-SCS	Holstein, Jersey y Guernsey canadienses
C4A	factor del Complemento 4	23	Yang y col., 2012	SCS	Holstein chinas

EBV: Valor de cría estimado; MC: Mastitis clínica; SCS: Score de células somáticas.

I.21.4 Resolución de la infección

Una vez eliminados los patógenos, la respuesta se centra en liberarse de los restos de microorganismos y recuperar la homeostasis celular. La Na^+ , K^+ -ATPasa es una enzima transmembrana que utiliza ATP para transportar tres iones Na^+ fuera y dos iones K^+ dentro de la célula manteniendo el balance homeostático en el citoplasma. La leche contiene una alta concentración de iones K^+ respecto de los Na^+ , debido a que el sodio es removido de las células secretorias de la glándula mamaria por la Na^+ , K^+ -ATPasa localizada en la membrana baso lateral (Linzell y Peaker, 1971). Esta enzima también juega un rol importante en el mecanismo de muerte celular y apoptosis (Yu, 2003), lo que está asociado a varias enfermedades. Durante la mastitis ocurre un dramático incremento en la concentración de Na^+ y una disminución en la de K^+ (Vandeputte-Van y col., 1993; Auldist y col., 1995; Hoeben y col., 1999). Esta variación puede deberse a la inhibición de la actividad ATPasa del sistema transportador de hierro. Con estos antecedentes, Liu y col. (2012) estudiaron el gen ATP1A1 como un posible candidato de resistencia a mastitis bovina. Analizaron la región codificante del gen buscando polimorfismos en una población de 320 vacas Holstein chinas, evaluando también la actividad ATPasa de la enzima en los diferentes genotipos encontrados. En su estudio encontraron un SNP en la posición nucleotídica -15739 C > A en el exón 8 del gen ATP1A1 (acceso: NC_007301.3). El genotipo CC del gen que codifica la enzima resultó estar significativamente asociado a una disminución en el SCS y por lo tanto, los animales con ese genotipo serían más resistentes a mastitis. Paralelamente también encontraron una mayor actividad ATPasa en los animales con el genotipo CC como así también un menor rendimiento en leche. Estos resultados sugieren que el gen ATP1A1 juega un rol importante en la resistencia a mastitis.

El gen de la proteína de susceptibilidad a cáncer mamario 1 (BRCA1) fue estudiado por estar asociado a predisposición al cáncer mamario en mujeres, pero también se comprobó que el gen está altamente conservado entre mamíferos (Miki y col., 1994), que esta proteína tiene actividad

reparadora del ADN dañado, actúa como reguladora del ciclo celular y transcripcional e interviene en otras vías metabólicas importantes inhibiendo células tumorales y manteniendo la estabilidad del genoma (Xu y col., 2012). El gen BRCA1 bovino fue ubicado en el BTA19 (Krum y col., 2003) y también fue localizado en las cercanías de un QTL para SCS (Bennewitz y col., 2004; Daetwyler y col., 2008). Es por esto que el gen BRCA1 es considerado como uno de los potenciales genes candidatos asociados a mastitis y SCS. En 2012, Yuan y col. secuenciaron el gen BRCA1 en vacas de raza Holstein, Sanhe y Simmental de China y Mongolia e identificaron 3 polimorfismos de tipo SNP. Utilizando la técnica de RFLP genotipificaron los SNP en la población y luego del análisis identificaron uno de los SNP, ubicado en el exón 10 del gen, en la posición nucleotídica 28300 (referencia: NC_007317.4) que presentaba una mutación A > C, responsable del cambio de aminoácidos prolina por treonina y que está significativamente asociado al SCS.

El receptor transmembrana de hormona de crecimiento está codificado por el gen GHR (Growth Hormone Receptor) y localizado en el BTA20 (Frank y col., 1994) es un transductor de la acción de la hormona y juega un rol fundamental en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Lucy y col., 2001). Este receptor se encuentra localizado en numerosas células del sistema inmune incluyendo células T, B y monocitos, y promovería también la proliferación celular y/o su supervivencia (Taub y col., 2010). Waters y col. (2010) estudiaron 7 polimorfismos en este gen, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre un SNP en la posición 33994639 A > C, en el intrón 2 (ss15981016) y la variable DYD (Daughter yield deviation) para SCS en 914 toros Holstein-Friesian. Otro polimorfismo en el gen GHR, produce una sustitución en la secuencia de aminoácidos de una fenilalanina (279F) por una tirosina (279Y) en la posición 279 y se encuentra en el dominio transmembrana del gen GHR. Este polimorfismo, ubicado en el exón 8 del gen, ha sido estudiado por sus efectos en la producción de leche (Blott y col., 2003; Viitala y col., 2006; Waters y col., 2010). Rahmatalla y col. (2011) encontraron un efecto significativo de este polimorfismo (ss159831015) sobre el SCS en un estudio realizado sobre 1370 vacas de la raza Holstein alemanas, reportando que el alelo 279Y está asociado a una reducción en el SCS.

El factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) juega un papel fisiológico muy importante en la regulación del crecimiento, desarrollo, metabolismo y lactancia (Daughaday y Rotwein, 1989; Hossner y col., 1997; Breier, 1999; Lucy, 2008) y el gen que lo codifica se encuentra en el BTA5. Mullen y col. (2011) identificaron y genotipificaron 10 polimorfismos de los cuales nueve fueron nuevos y uno había sido previamente publicado (rs29012855). El material genético se obtuvo a partir de muestras de sangre de 22 vacas de diferentes razas y cruzas (Belgian Blue x Holstein, Aberdeen Angus x Holstein, Charolais, Simmental y Holstein puras) y de semen 914 toros Holstein. Uno de los nuevos polimorfismos encontrados, ubicado en la posición 71175747 A > G (ss161151665), mostró estar significativamente asociado a la variable DYD para SCS.

El gen RASGRF1 (Ras protein-specific guanine nucleotide releasing factor 1), ubicado en el BTA21, está involucrado en la expresión de la GH y del IGF-1 y estaría ligado a la respuesta inflamatoria del eje GH-IGF-1, (Drake y col., 2009) regulando la respuesta inflamatoria a la mastitis mediante la transducción de señales y la proliferación celular (Burvenich y col., 1999). Magee y col. (2011) hallaron un polimorfismo en la posición 25039690 C > T (ENSBTAG00000019940) significativamente asociado al SCS en una población de 848 toros Holstein-Friesian de Irlanda.

La familia de los transportadores ABC es la más numerosa de los transportadores transmembrana. Estas proteínas unen ATP y usan su energía para transportar una amplia variedad de substratos incluyendo iones, péptidos, azúcares, lípidos, carcinógenos y otras xenotoxinas contra gradiente a través de la membrana celular (Higgins y col., 1992; Childs y col., 1994). ABCG2 (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2) pertenece a esta súper familia de transportadores y muchos autores han demostrado que el gen ABCG2 se encuentra en un región del BTA6, que contiene un grupo de genes ligados a un QTL con un efecto importante sobre el rendimiento en leche (Ron y Weller., 2007; Cohen-Zinder y col., 2005; Olsen y col., 2005; Komisarek y Dorynek, 2009). A partir de estos antecedentes, Yue y col. (2010) estudiaron los polimorfismos en el gen ABCG2 (también conocido como breast cancer resistance protein, BCRP). Para buscar los

polimorfismos en este gen secuenciaron ADN proveniente de sangre de 485 vacas Holstein chinas y encontraron 2 nuevos polimorfismos en las posiciones nucleotídicas 45599 y 45610 (NC_007304.3) con cambios de A > C y A > G respectivamente, que se localizaron en el séptimo intrón; y se encontraron asociados significativamente con el SCS en la población de estudio.

El gen FGF2, ubicado en el BTA6, codifica para el factor de crecimiento de fibroblastos 2. La presencia de ARNm para este factor fue reportada en la glándula mamaria bovina durante diferentes estadios del desarrollo de la misma, lo cual sugiere que tendría un rol de importancia en el desarrollo y reorganización del tejido mamario (Plath y col., 1998). Por medio de la secuenciación del gen FGF2 (GenBank: NC_007304), Wang y col. (2008) detectaron un solo SNP en la posición 11646 (alelos A y G) en el intrón I, en tres poblaciones diferentes de Holstein: dos rodeos de Estados Unidos y uno de Israel. El polimorfismo mostró estar significativamente asociado al SCS en la población israelí que estuvo compuesta por 606 toros. Los análisis de los efectos genotípicos revelaron que los genotipos GG y AG se asociaron con una disminución significativa en el SCS. En la tabla 1.8 se lista un resumen de genes candidatos involucrados en la resolución de la infección.

Tabla 1.8: Resumen genes candidatos involucrados en la resolución de la infección con marcadores asociados a mastitis.

Gen	Nombre	BTA	Referencia	Fenotipo	Población
ATP1A1	Na ⁺ , K ⁺ - ATPasa	3	Liu y col. (2012)	SCS	Holstein chinas
BRCA1	proteína de susceptibilidad a cáncer mamario 1	19	Yuan y col. (2012)	SCS	Holstein, Sanhe y Simmental de China y Mongolia
GHR	receptor transmembrana de hormona de crecimiento	20	Waters y col. (2010)	DYD-SCS	Holstein-Friesian irlandeses
GHR	receptor transmembrana de hormona de crecimiento	20	Rahmatalla y col. (2011)	SCS	Holstein alemanas
IGF-1	factor de crecimiento tipo insulina 1	5	Mullen y col. (2011)	DYD-SCS	Holstein irlandeses
RASGRF1	Ras protein-specific guanine nucleotide releasing factor 1	21	Magee y col. (2011)	SCS	Holstein-Friesian irlandesas
ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily G, member 2	6	Yue y col. (2010)	SCS	Holstein chinas
FGF2	factor de crecimiento del fibroblasto 2	6	Wang y col. (2008)	EBV-SCS	Holstein israelíes

EBV: Valor de cría estimado; DYD: Daughter Yield Deviation; SCS: Score de células somáticas.

I.21.5 Otros genes candidatos

Los genes que se encuentran en una región cercana o en un QTL son candidatos a estudios de asociación, solo por su cercanía, sin que su función biológica pueda relacionarse directamente con el fenotipo. Este es el caso del CACNA2D1, situado en el BTA4, que codifica para la subunidad 1 α de la proteína canal de calcio dependiente de voltaje 2/delta y fue considerado como gen candidato porque fue mapeado en la región genómica de un QTL para SCS (Zhang y col., 1998) y en las cercanías de un QTL para RCS (Daetwyler y col., 2008; Longueri y col., 2006). Por medio de la técnica de RFLP, Yuan y col. (2011) encontraron una asociación significativa entre el SNP en la posición nucleotídica 526745 A > G (exón 25, GenBank: NC_007302.4) y el SCS en una población compuesta de 240 vacas no relacionadas de las razas Holstein, Sanhe y Simmental provenientes de rodeos de China y Mongolia (Tabla 1.9).

Tabla 1.9: Gen no relacionado en forma directa a la interacción hospedador – patógeno candidato con marcadores asociados a mastitis.

Gen	Nombre	BTA	Referencia	Fenotipo	Población
CACNA2D1	subunidad 1 α de la proteína canal de calcio dependiente de voltaje 2/delta	4	Yuan y col. (2011)	SCS	Holstein, Sanhe y Simmental de China y Mongolia

I.22 Objetivos

I.22.1 Objetivo general

1. Identificar marcadores moleculares asociados a resistencia/susceptibilidad a mastitis bovina, a partir de variantes alélicas conocidas y nuevas obtenidas a partir de secuenciación.

I.22.2 Objetivos particulares

1.1 Caracterizar el recuento de células somáticas de una población en estudio a lo largo de dos lactancias completas a partir de controles lecheros.

1.2 Definir regiones y genes candidatos en el genoma bovino relacionados con la resistencia a mastitis a partir de estudios previos y búsqueda bibliográfica.

1.3 Genotipificar la población en estudio para un grupo de marcadores seleccionados en genes candidatos y utilizando un panel comercial de alta densidad de SNP.

1.4 Analizar la posible asociación de los marcadores con parámetros estimados a partir del recuento de células somáticas.

1.5 Desarrollar una base de datos que constituya un sistema de almacenamiento y análisis de los datos fenotípicos y genotípicos generados.

I.23 Materiales y Métodos

I.23.1 Animales y datos fenotípicos

Los datos fenotípicos se obtuvieron de registros de controles lecheros de dos lactancias completas de 4516 animales, provenientes de 14 tambos pertenecientes a la empresa “Las Taperitas” S.A. de la zona centro de la provincia de Santa Fe, Argentina y de tres tambos pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela (Rafaela, Santa Fe, Argentina). Para todos los animales se contó con la información genealógica completa incluyendo animales nacidos en el año 1994.

Los datos recabados en los controles lecheros fueron medidas productivas como kilogramos de leche, grasa, proteína; y sanitarios, como RCS, entre otras características de cada animal. Además también se contó con información complementaria de cada animal como ocurrencia de enfermedades, partos y abortos, que complementan la información almacenada en las bases de datos.

De estos 4516 animales los cuales presentan datos fenotípicos se seleccionaron 1488 en total, para ser genotipificados y llevar adelante estudios de asociación con marcadores moleculares. En este número de animales también se incluyeron los 25 toros, padres de las vacas seleccionadas. Las vacas se seleccionaron en base a la estructura familiar, número de lactancias con registros de controles lecheros, número de controles por lactancia y representatividad de los toros/tambo presentes

I.23.2 Regiones y genes candidatos

Utilizando la información generada a partir de la secuenciación del genoma bovino, y a partir de una extensa búsqueda bibliográfica de estudios previos de asociación y expresión, se seleccionaron un conjunto de genes, principalmente relacionados con la respuesta inmune y/o asociados a

resistencia a mastitis, para determinar los SNP descriptos para estos genes candidatos. Estos genes fueron descriptos en la Introducción del presente trabajo.

La selección de regiones y genes, sin embargo, es un proceso que debe actualizarse continuamente de acuerdo a los diferentes estudios publicados. Para seleccionar los marcadores se emplearon las bases de datos que nuclean los estudios de mapeo de QTL como la QTLdb (www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html); también las bases de datos de SNP, como la dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) y bases de datos de anotación de genes y variaciones como Ensembl (www.ensembl.org).

I.23.3 Genotipificación

Este trabajo de tesis se enmarcó dentro de un proyecto PAE (Áreas Estratégicas), en el cual se propuso el estudio de la asociación de diferentes marcadores moleculares con características productivas y sanitarias, incluyendo diferentes enfermedades que afectan los rodeos lecheros. Para esto, se diseñó en conjunto un sistema de genotipificación SNPlex® (Applied Biosystems, Tobler y col., 2005) para 96 SNP relacionados con características productivas y resistencia a enfermedades para ser analizados por los diferentes laboratorios que conformaron la red, como también el panel de alta densidad que contiene 54.609 SNP (BovineSNP50 beadchip de la firma Illumina) altamente informativos distribuidos uniformemente en el genoma bovino.

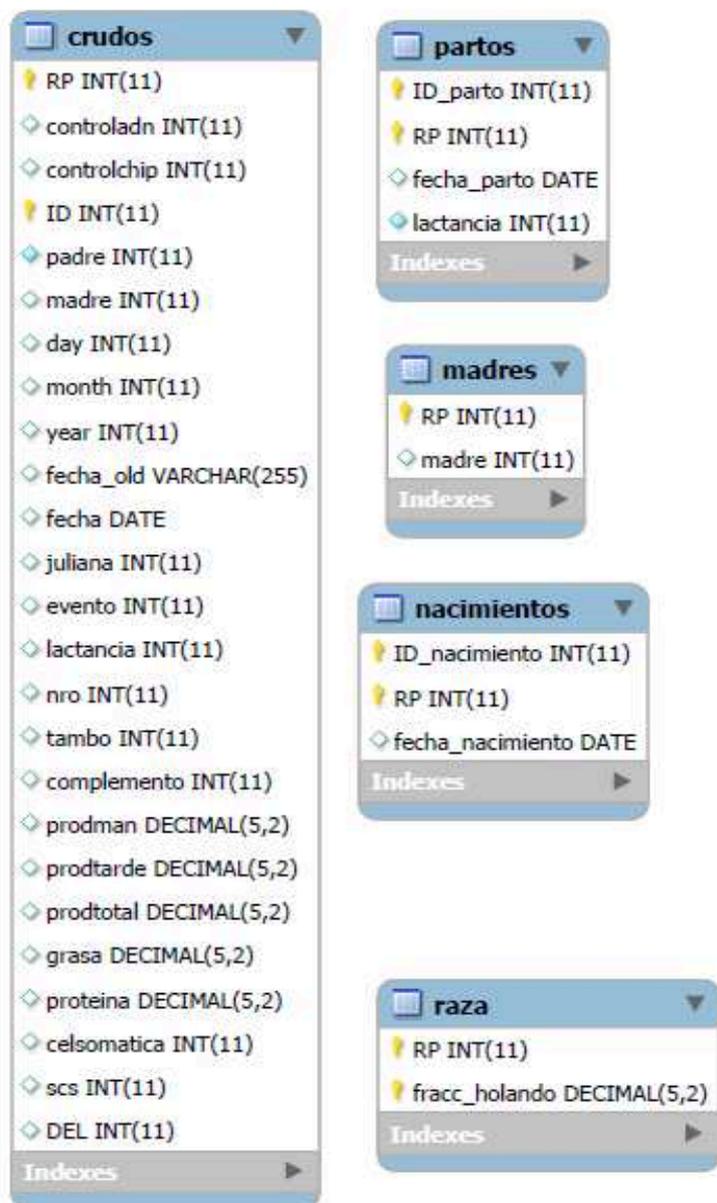
I.23.4 Bases de datos

Para el almacenamiento de los datos que se utilizaron a lo largo de todo el trabajo, se diseñaron tres bases de datos MySQL para que contuvieran los datos fenotípicos, genotipos de genes candidatos y genotipos del chip de 54.000 SNP, respectivamente.

La información fenotípica fue almacenada en una base de datos MySQL diseñada específicamente para tal fin. Los archivos originales de los datos de origen fueron modificados para ingresarlos en la base relacional usando scripts de Perl y Python para que tuvieran la estructura

correcta. La base de datos fenotípicos contiene cinco tablas relacionales diferentes donde se almacenaron los datos de controles lecheros completos incluyendo datos productivos detallados e información adicional sobre cada animal (Figura 1.6). La información para cada animal se almacenó en la tabla “crudos” y constó de: RP del animal y sus progenitores (padre, madre), fecha de nacimiento en diferentes formatos (fecha_old, juliana) y fue separada en día (day), mes (month) y año (year). El campo evento indica el código de evento registrado; los eventos son: controles lecheros, partos, servicios, diagnóstico de enfermedades y observaciones realizadas por los veterinarios sobre cada animal. Esta tabla también registra el número de lactancia de la vaca (lactancia) y los días en lactancia al momento del control (DEL), la correspondiente producción de leche para el control lechero durante la mañana (prodman), la tarde (prodtarde) y la total del día (prodtotal), así como la cantidad de grasa (grasa) y proteína (proteína) producidas. El control lechero incluye la información sobre el recuento de células somáticas (celsomatica) y el score lineal calculado (scs). Existen también en esta base de datos tablas complementarias que permiten relacionar los animales con información extra como la raza, genealogía, partos, servicios y datos sanitarios que permitirán realizar estudios complementarios. En la base de datos “crudos” se registraron en total 862.130 controles lecheros pertenecientes a 24.194 animales. Esta base se utilizó para editar los datos, realizando los controles de calidad de los datos a analizar en cada uno de los estudios de asociación, por medios de scripts de edición y consulta para así obtener cada sub-set de datos filtrados.

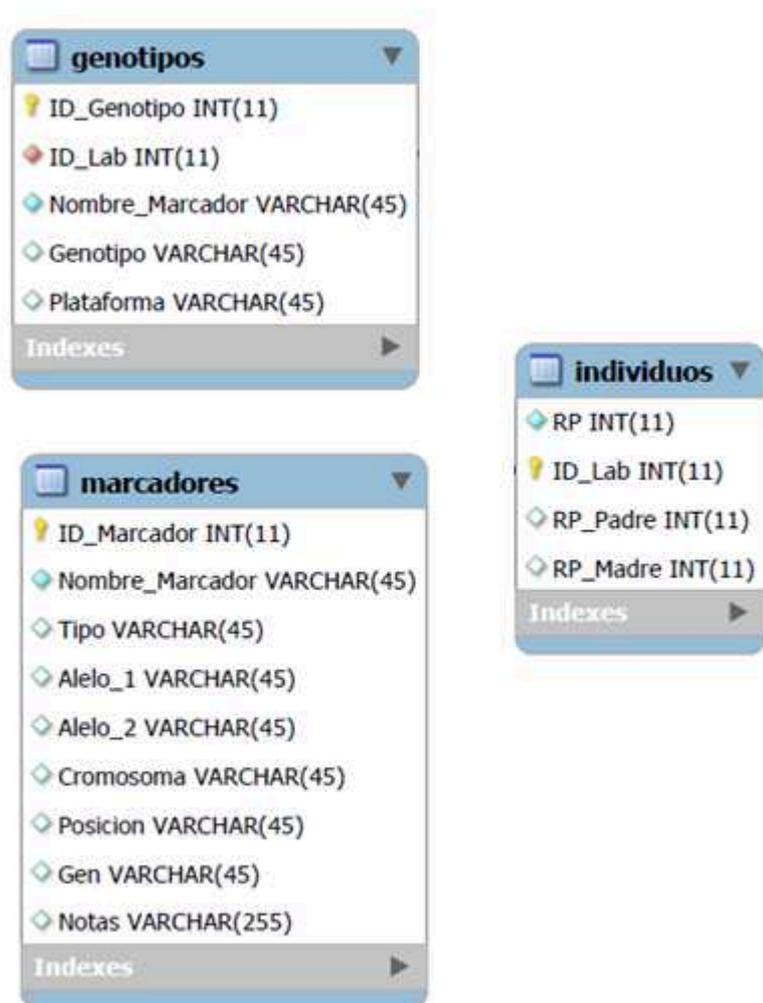
Figura 1.6. Estructura de la base de datos fenotípica



La información de los genotipos perteneciente a las diferentes plataformas de genotipificación se almacenó en dos bases de datos diferentes: una para los animales genotipificados con la plataforma SNPlex y la otra con la información del chip BovineSNP50. La base de datos con la información de la plataforma SNPlex (Figura 1.7) contuvo tres tablas con la información de 1666 individuos genotipificados con los 45 marcadores en genes candidatos. La tabla “genotipos” almacenó la información sobre cada animal genotipificado (ID_Genotipo), el nombre asignado a cada marcador

(Nombre_Marcador), el genotipo correspondiente para cada animal (Genotipo) y la identificación de la plataforma de genotipificación (Plataforma). La tabla “marcadores” almacenó la información de cada marcador, listando los genotipos para los alelos correspondientes (Alelo_1, Alelo_2), localización física del marcador en el genoma (Cromosoma, Posicion) y gen que lo contiene.

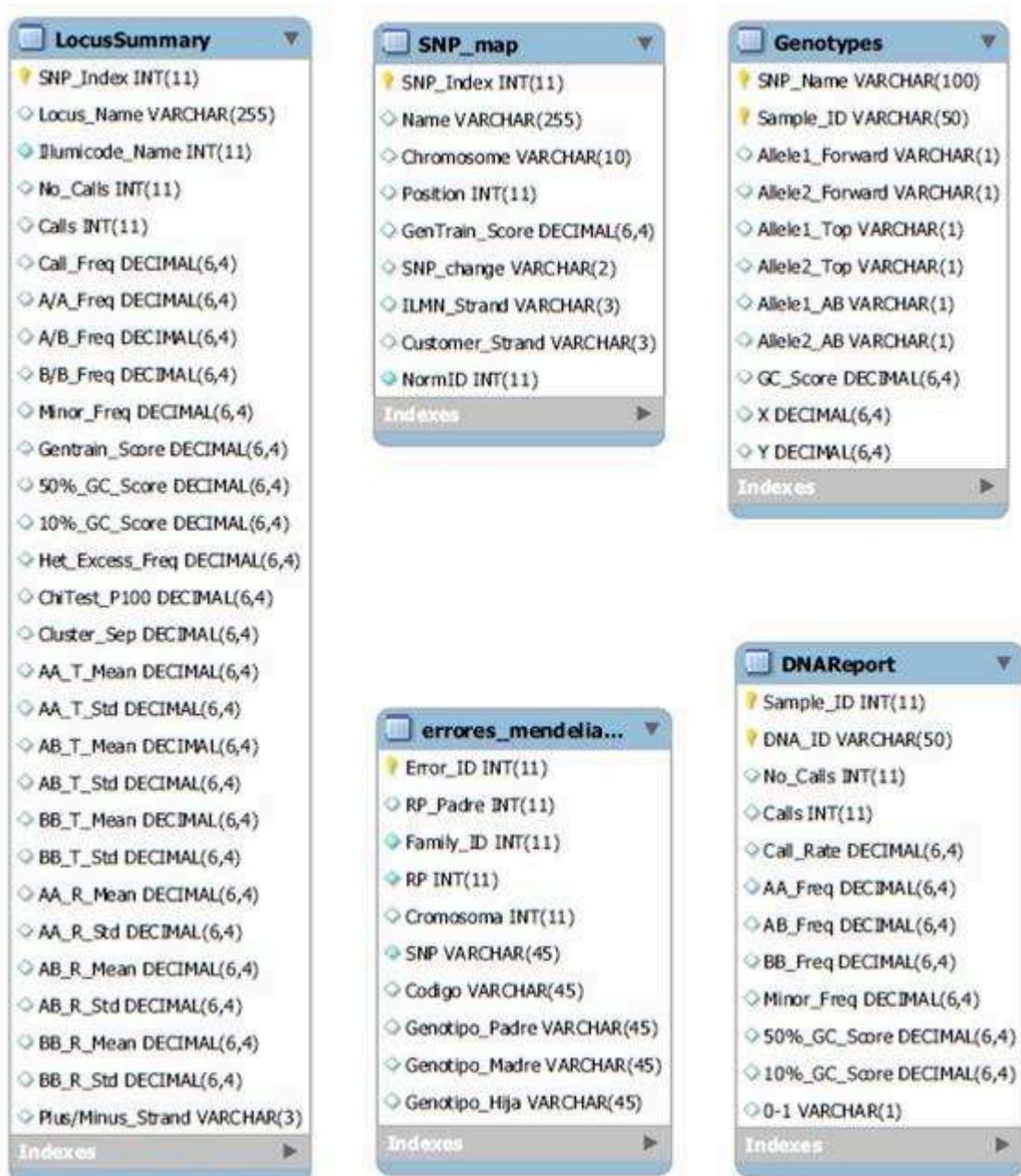
Figura 1.7. Estructura de la base de datos genotípicos con información de la genotipificación con la plataforma SNPlex.



La base de datos con información del chip de genotipificado de alta densidad (BovineSNP50) contuvo seis tablas donde fue almacenada la información de los 54.609 marcadores en el chip (Figura 1.8). Las tablas almacenaron estadística sobre los marcadores, posiciones físicas de cada

marcador en el genoma (SNP_map); estadística sobre los genotipos (Genotypes), y resultados de los controles de calidad dinámicos efectuados sobre los marcadores (DNAReport) y genotipos (errores_mendelianos).

Figura 1.8. Estructura de la base de datos genotípica con información del chip de alta densidad.



I.23.5 Análisis de resultados

Se analizaron los resultados de genotipificación correspondientes a las diferentes tecnologías utilizadas (SNPlex, BovineSNP50) para determinar la posible asociación de los marcadores moleculares con la resistencia/susceptibilidad a mastitis.

Para el estudio de asociación de genes candidatos se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas, y la relación entre cada marcador y haplotipos se analizó utilizando modelos lineales mixtos (Henderson 1984), implementados en los programas WOMBAT (Meyer, 2007) y PLINK (Purcell y col., 2007). En cada capítulo, se dan más precisiones sobre los modelos utilizados.

Capítulo II

II.1 Polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en genes candidatos y su relación con el score de células somáticas

II.2 Resumen

La prevención y el control de la mastitis bovina mediante la mejora de las defensas naturales en los animales es importante para incrementar la calidad de los productos lácteos. La resistencia a mastitis es un rasgo complejo que depende de componentes genéticos, ambientales y fisiológicos. Las limitaciones de las medidas clásicas de control han llevado a la búsqueda de alternativas para reducir al mínimo el uso de antibióticos mediante la selección de animales naturalmente resistentes. Los polimorfismos en genes relacionados con el sistema inmune innato son fuertes candidatos a ser evaluados como marcadores genéticos. En este capítulo se evaluó un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en genes candidatos para características sanitarias y de producción, y se determinó su asociación con el score de células somáticas (SCS) como indicador de mastitis en vacas lecheras argentinas. Se evaluaron 941 vacas Holstein: (n = 677) y Holstein x Jersey (n = 264), hijas de 22 toros de 14 tambos pertenecientes a la cuenca lechera central de la provincia de Santa Fe, Argentina. Dos de los 21 marcadores genotipificados, se asociaron significativamente ($P < 0,05$) con el SCS: GHR_140 y OPN_8514C-T. El genotipo heterocigota para GHR_140 mostró un efecto favorable asociado a menores SCS. Por otro lado, el genotipo heterocigota para OPN8514C-T mostró estar asociado a un aumento en el SCS. Los genotipos combinados de OPN mostraron incluso un efecto mayor. Estos resultados muestran que estos marcadores pueden contribuir al diseño de programas de selección asistida por marcadores.

II.3 Introducción

Múltiples regiones cromosómicas se han asociado con la resistencia a la mastitis (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>). La búsqueda e identificación de marcadores genéticos asociados con la resistencia a la mastitis se ha centrado principalmente en dos enfoques: la búsqueda de QTL, y los polimorfismos en genes candidatos. El enfoque del gen candidato asume que un gen implicado en la fisiología del rasgo a mejorar puede contener una mutación que es responsable de la variación en el fenotipo. El gen, o parte del gen se secuencian en diferentes animales y las variaciones en la secuencia de ADN (polimorfismos) son testeados estadísticamente con la variación en el fenotipo (Hayes y Goddard, 2010). Con un enfoque más específico, este proceso puede identificar marcadores moleculares adecuados para usarse en la selección asistida por marcadores en modelos experimentales. Los polimorfismos en genes asociados con el sistema inmune innato son fuertes candidatos a ser evaluados en este tipo de estudios. Los genes que codifican los receptores y factores responsables de la detección y eliminación de agentes patógenos son propensos a contribuir a la variación total en la resistencia o susceptibilidad a la mastitis en el ganado lechero (Sharma y col., 2011). Varios estudios han identificado polimorfismos en los genes que codifican para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad Bovino (BoLA) (Rupp y col., 2007; Sharif y col., 1998) y los receptores de citoquinas (Youngerman y col., 2004). Otros polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inmune innata, como el de la lactoferrina también se han estudiado (Wojdak-Maksymiec y col., 2006). Otros tipos de candidatos son los posicionales: genes situados en una región cromosómica identificados a partir de una exploración genómica, con posibilidades de albergar un QTL. Muchos QTL asociados a los rasgos de producción han demostrado estar estrechamente relacionados con mastitis, ya que existe una correlación negativa bien establecida entre producción y mastitis (Oltenucu y Broom, 2010). Otra forma de obtener genes candidatos es analizar las vías metabólicas y los genes que participan en la respuesta inmune y que muestran patrones de expresión diferenciales utilizando microarrays en animales infectados experimentalmente (Lützow y col.,

2008; Swanson y col., 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar un conjunto de SNP seleccionados en genes candidatos y determinar su asociación con el SCS como indicador de mastitis en vacas lecheras de la cuenca central de Argentina.

II.4 Materiales y métodos

II.4.1 Animales y datos fenotípicos

En el estudio se analizaron un total de 6584 controles lecheros pertenecientes a 941 vacas: Holstein (n = 677) y Holstein x Jersey (n = 264), que van desde el 100% Holstein al 87,5 % Jersey; siendo el porcentaje medio Holstein 87%. Todas las vacas son hijas de 22 toros y pertenecientes a 14 tambos de una empresa situada en el centro de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, Argentina. Todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de alimentación, sanidad y fueron ordeñadas dos veces al día. El recuento de células somáticas se registró cada 40 días por control oficial.

Para la determinación de RCS las muestras de leche fueron preservadas con azidiol (0,3 %) a 4°C y se analizaron a las 24 hs. Las determinaciones del RCS fueron realizadas por un laboratorio comercial (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos, Esperanza) utilizando un contador automático Somacount 300 (Bentley Instruments, Minnesota, EE.UU.). Las muestras de leche fueron calentadas a 39-40 ° C para facilitar la homogeneización. Todas las vacas estudiadas tenían al menos 4 registros durante una lactancia (promedio = 6). Los datos analizados corresponden a muestras tomadas entre 20 y 400 días en lactancia.

II.4.2 Extracción de ADN

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular de los animales analizados en tubos con EDTA como anticoagulante. Se extrajo ADN genómico a partir de sangre fresca utilizando un kit comercial (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit, Axygen Biosciences, Union City, CA)

según el protocolo proporcionado por el fabricante. La cantidad y calidad de ADN se verificó mediante la medición de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific *NanoDrop*™ 1000.

II.4.3 Selección de marcadores en genes candidatos:

Los marcadores fueron seleccionados de diferentes fuentes: i) SNP en genes que resultaron asociados en estudios de mapeo de QTL afectando el RCS o SCS, en la base de datos “QTLdb” (www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html), ii) SNP en genes previamente asociados con rasgos de resistencia a la enfermedad y la producción lechera y; iii) SNP en genes expresados diferencialmente en estudios transcripcionales. Las bases de datos como dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) y Ensembl (www.ensembl.org) fueron utilizadas para localizar la posición y extraer las secuencias flanqueantes de cada marcador.

II.4.4 Genotipificación

La genotipificación se realizó mediante el sistema SNPlex® (Applied Biosystems) (Tobler y col., 2005). El panel de SNP se diseñó utilizando la herramienta de diseño proporcionada por el fabricante y se incluyeron SNP en 15 genes y regiones candidatas. En total se incluyeron 40 SNP en el diseño. Tres de los SNP no estaban registrados, y fueron identificados durante la secuenciación de las regiones seleccionadas en los toros de la población (datos no publicados). Las reacciones de genotipificación fueron realizadas en termociclador (Eppendorf Mastercycler) y corridas en un secuenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El control de calidad de los resultados se realizó utilizando el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

II.4.5 Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas para cada SNP, y se utilizó la prueba de χ^2 para verificar que la segregación de alelos estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($P < 0,05$). El análisis de asociación entre los genotipos y el SCS se llevó a cabo utilizando el método de máxima verosimilitud restringida (REML) en un modelo lineal mixto utilizando el programa estadístico “Wombat” (Meyer, 2007) aplicando la siguiente ecuación:

$$Y_{ijklmno} = \mu + L_i + \text{HYST}_j + \text{DIM}_k + \text{HF}_1 + G_m + A_n + \text{PE}_o + e_{ijklmno}$$

dónde: Y_{ijkln} = es el valor de SCS correspondiente al día del recuento; μ = media del rodeo; L_i = efecto fijo del número de lactancia ; HYST_j = efecto fijo de la combinación del rodeo (H), año (Y) y estación (S) del recuento; DIM_k es la covariable representando los días en lactancia; HF_1 es el efecto fijo de la proporción de raza Holstein en el animal; G_m = es el efecto fijo del genotipo/combinado, A_n = es el efecto aleatorio genético aditivo del animal, distribuido como $\sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_a^2)$, que tiene en cuenta las (co)varianzas entre animales debido a las relaciones de genéticas formando la matriz A, basada en registros de pedigrí; PE_o es el efecto aleatorio del ambiente permanente distribuido como $\sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_{pe}^2)$, y e_{ijklno} = es el error, distribuido como $(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$. El coeficiente de verosimilitud y el criterio de información Akaike (AIC) fueron comparados (Akaike, 1973) para determinar la calidad relativa de ajuste del modelo. Para tener en cuenta el riesgo de falsos positivos en el test múltiple, se utilizó el método “False Discovery Rate” (FDR). El valor p umbral correspondiente a un FDR de 0,20 se calculó utilizando el paquete “qvalue” del entorno estadístico “R” (Storey y Tibshirani 2003). SNP con valores de p menores de 0 igual al valor q correspondiente fueron considerados como significativamente asociados.

Las heredabilidades fueron calculadas como:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2}$$

dónde σ_a^2 representa el valor estimado de la varianza genética aditiva, σ_{pe}^2 es el valor estimado de la varianza del ambiente permanente y σ_e^2 es la varianza residual.

II.5 Resultados

II.5.1 Marcadores SNP

Del total de 40 SNP que fueron incluidos originalmente en el panel de genotipificación, 38 pasaron el control de calidad del software de la plataforma SNPlex[®] (GeneMapper v4.0) de mediana de señal y genotipo, y de discriminación de clústeres. Los dos SNP descartados están localizados dentro del gen de la interleuquina 8 (IL-8) y del gen de la ácido graso sintasa-1 (FASN-1). Tres SNP adicionales que se genotipificaron se excluyeron del análisis por considerarse que estaban más allá del alcance de este trabajo, ya que son la mutación causante de trastornos genéticos: BLAD (deficiencia de adhesión de leucocitos bovinos; Shuster y col., 1992), DUMPS (deficiencia de la uridina monofosfato sintasa; Schwenger y col., 1993), y CVM (malformación vertebral compleja; Thomsen y col., 2006).

De los 35 SNP restantes, 6 de ellos (17 %) fueron excluidos debido a la baja tasa de asignación de genotipo (por debajo del 90%). La frecuencia alélica mínima (MAF, minor allele frequency) para cada SNP restante que fue analizado se presenta en la Tabla 2.1. De los 29 SNP restantes, 3 de ellos fueron monomórficos para este grupo de animales seleccionados, por lo que fueron excluidos de los análisis posteriores. Uno de los SNP, ABCG2_199 (rs43702337) es un marcador que está ubicado en una región exónica del gen ABCG2 (ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2) se eliminó porque su MAF no alcanzó el límite inferior de 0,05. Luego, como control de calidad de la genotipificación se analizaron las posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), utilizando la prueba χ^2 de Pearson, comparando las frecuencias genotípicas observadas con las frecuencias genotípicas esperadas. De los 25 marcadores restantes, 4 mostraron desviaciones

significativas del HWE y también se descartaron a pesar de que los supuestos de no mutación, no migración o emigración, tamaño infinito de la población, panmixia e inexistencia de presión selectiva no se cumplen completamente en esta población. Finalmente, se analizaron los 21 SNP restantes para encontrar asociaciones. Tres de esos SNP: PRL_in1 (polimorfismo ubicado en el intrón 1 del gen codificante de prolactina bovina, PRL), GH_51 y GH_335 (ubicados en el gen de la hormona de crecimiento bovina, GH) fueron recientemente descubiertos por secuenciación de cada región conteniendo gen seleccionado (resultados no publicados). Las MAF de los 21 SNP finales variaron entre 0,08 para el marcador PPARGC1A_337 (rs17870811), ubicado en una región intrónica del gen PPARGC1A bovino (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha) y 0,48 (GH_51).

Tabla 2.1: Resumen estadístico para los SNP genotificados.

SNP	Rs identificador o cambio	Gen	región en el gen	localización BTA:nucleótido	Genotipo	Frecuencia genotípica	MAF	HWE
SNP9	rs43375517	ARL4A	5' UTR	4:20296999	C/C G/C G/G	0,10 0,47 0,43	0,34	0,21
SNP12	rs42213673	ETV1	Intergénica	4: 22111819	C/C C/T T/T	0,41 0,47 0,12	0,36	0,52
SNP24	rs43745957		Intergénica	4:24305381	C/C C/T T/T	0,22 0,47 0,31	0,45	0,16
OBESE_305T-C	rs29004488	OBESE-LEP	exón	4:93262056	C/C C/T T/T	0,28 0,54 0,18	0,45	0,00**
ABCG2_199	rs43702337	ABCG2	exón	6:38027010	A/A A/C C/C	0,98 0,02 0,00	0,01*	0,81
SPP1_11740	rs132812135	SPP1/OPN	3'UTR	6:38120968	C/C A/C A/A	0,08 0,41 0,51	0,29	0,87
OPN_8514C-T	Intrón 4 (position 8514 NW_255516.1)	SPP1/OPN	intrón	6:38122666	C/C C/T T/T	0,28 0,50 0,22	0,47	0,80
PPARGC1A_c1892	rs109579682	PPARGC1A	intrón	6:44875251	A/A A/G G/G	0,04 0,34 0,62	0,21	0,57
PPARGC1A_230	rs133669403	PPARGC1A	exón	6:44875315	A/A A/G G/G	0,02 0,25 0,74	0,14	0,27
PPARGC1A_337	rs17870811	PPARGC1A	intrón	6:44875421	C/C C/T T/T	0,85 0,15 0,00	0,08	0,21
CSN1_BD	A53T	CSN1	exón	6:87148464	A/A A/G G/G	0,00 0,00 1,00	0,00*	0,00

CSN1_BF	S66L	CSN1	exón	6:87150003	C/C	1,00	0,00*	0,00
					C/T	0,00		
					T/T	0,00		
CSN1_BCF	rs43703010	CSN1	exón	6:87157262	A/A	0,81	0,10	0,93
					A/G	0,18		
					G/G	0,01		
CSN2_Ser122Arg	rs43703013	CSN2	exón	6:87181453	C/C	0,90	0,06	0,00**
					G/C	0,09		
					G/G	0,01		
CSN2_Pro67His	rs43703011	CSN2	exón	6:87181619	C/C	0,40	0,35	0,02**
					A/C	0,49		
					A/A	0,11		
CSN3_68	rs43706475	CSN3	exón	6:87390479	T/T	1,00	0,00*	0,00
					T/G	0,00		
					G/G	0,00		
CSN3_165	rs43703015	CSN3	exón	6:87390576	C/C	0,72	0,15	0,12
					C/T	0,26		
					T/T	0,01		
CSN3_221	rs43703017	CSN3	exón	6:87390632	A/A	0,83	0,09	0,37
					A/G	0,17		
					G/G	0,01		
IL8_28	rs43707839	IL8	splice	6:90561773	C/C	0,25	0,50	0,90
					A/C	0,50		
					A/A	0,26		
GH_335	no publicado	GH	exón	19:48768766	C/C	0,03	0,14	0,01**
					A/C	0,22		
					A/A	0,75		
GH_51	no publicado	GH	intrón	19:48769040	C/C	0,27	0,48	0,58
					C/T	0,51		
					T/T	0,22		
GHR_140	F279Y	GHR	exón	20:31909479	T/T	0,70	0,16	0,17
					T/A	0,26		
					A/A	0,03		
PRLR_S18N	rs135164815	PRLR	exón	20:39115344	A/A	0,73	0,14	0,57
					G/A	0,25		
					G/G	0,02		
UTMP_1296G-A	rs132991801	UTMP	exón	21:59667572	A/A	0,13	0,36	0,80
					A/G	0,47		
					G/G	0,40		
LTF_90	rs41256920	LTF	5'UTR	22:53521978	C/C	0,05	0,22	0,71

					C/A	0,35		
					A/A	0,61		
LTF_250	rs43706485	LTF	5'UTR	22:53522038	C/C	0,04	0,21	0,90
					C/G	0,33		
					G/G	0,63		
PRL_g8398G-A	rs211032652	PRL	exón	23:35106206	A/A	0,01	0,12	0,80
					A/G	0,21		
					G/G	0,78		
PRL_in1	no publicado	PRL	intrón	23:35110940	C/C	0,08	0,30	0,09
					C/T	0,44		
					T/T	0,48		
SCD1_A293V	rs41255693	SCD1	splice	26:21144707	C/C	0,72	0,15	0,33
					C/T	0,25		
					T/T	0,03		

Para los SNP sin identificador rs publicado, el cambio producido en la proteína fue usado como identificador. Se muestran también las frecuencias genotípicas, alélicas y desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) basados en P-valores obtenidos de un χ^2 . Todas las posiciones obtenidas son correspondientes al ensamblado del genoma bovino UMD3.1, obtenido de la base de datos ENSEMBL (<http://ensemble.org>). * Marcadores con MAF por debajo del 0,05 y ** con desviaciones del HWE ($P < 0,05$) no fueron considerados para los siguientes análisis.

Para los genes que contienen más de un SNP, se analizaron también los genotipos combinados (Tabla 2.2). Todas las combinaciones posibles de genotipos fueron incluidas en el análisis de asociación. Para todas las posibilidades de combinación de genotipos, solo el gen que codifica para la lactoferrina bovina (Lf) presentó todas las combinaciones posibles en nuestra población. (9/9). Los conteos para el resto de los genotipos fueron: CSN3 (marcadores ubicados en la región del gen de la kappa-caseína 3) (6/9); PRL (marcadores ubicados en la región del gen de la prolactina bovina) (8/9); PPARGC1A (marcadores en la región del gen PPARGC1A) (10/27); OPN (región del gen SPP1) (6/9) y GH (marcadores en la región del gen que codifica la hormona de crecimiento bovina) (8/9).

Tabla 2.2: Frecuencias de los genotipos combinados.

Locus	Genotipo	N	Frecuencia
LTF	AA/CC	7	0,01
	AA/CG	124	0,14
	AA/GG	415	0,47
	AC/CC	20	0,02
	AC/CG	149	0,17
	AC/GG	134	0,15
	CC/CC	12	0,01
	CC/CG	18	0,02
	CC/GG	6	0,01
CSN3	AA/CC	517	0,58
	AA/TT	12	0,01
	AA/CT	212	0,24
	AG/CC	132	0,15
	AG/CT	13	0,01
	GG/CC	5	0,01
PRL	CC/AA	7	0,01
	CC/AG	34	0,04
	CC/GG	31	0,03
	CT/AA	5	0,01
	CT/AG	132	0,14
	CT/GG	273	0,29
	TT/AG	28	0,03
	TT/GG	417	0,45
PPARGC1A	AA/GG/CC	37	0,04
	AG/GA/CC	58	0,06
	AG/GG/CC	218	0,24
	AG/GG/CT	29	0,03
	GG/AA/CC	14	0,02
	GG/GA/CC	140	0,15
	GG/GA/CT	26	0,03
	GG/GG/CC	298	0,33
	GG/GG/CT	83	0,09
OPN	GG/GG/TT	3	0,00
	AA/CC	232	0,28
	AA/TC	169	0,20
	AA/TT	19	0,02
	AC/TC	247	0,30
	AC/TT	91	0,11
	CC/TT	71	0,09
	GH	CC/AA	131
CC/AC		90	0,10
CC/CC		24	0,03
TC/AA		352	0,38
TC/AC		112	0,12
TC/CC		5	0,01
TT/AA		199	0,22
TT/AC		2	0,00

II.5.2 Análisis de asociación

Luego del análisis, 2 de los 21 marcadores genotificados exitosamente mostraron estar significativamente asociados ($P < 0,05$) con el SCS. Los efectos de cada genotipo se muestran en la

Tabla 2.3. El genotipo T/A en el GHR_140 mostró un efecto positivo, al tener valores más bajos de SCS ($-0,37 \pm 0,18$), mientras que el genotipo T/T en OPN_8514C-T mostró un efecto negativo, teniendo valores más altos de SCS ($0,38 \pm 0,18$).

Del análisis de asociación de los genotipos combinados solo los correspondientes al gen OPN mostraron estar significativamente asociados con el SCS. El genotipo AC/TT confirmó los resultados obtenidos durante el análisis de los efectos de los SNP individuales, mostrando asociación con un aumento en el SCS ($0,30 \pm 0,13$).

Los SNP hallados como asociados a SCS (GHR_140 y OPN_8514C-T) fueron previamente descritos como asociados con caracteres lecheros. GHR_140 es una sustitución de una A por una T en el exón 8 del gen que codifica para el receptor de la hormona de crecimiento bovino (GHR, Growth Hormone Receptor), lo que produce el cambio del aminoácido fenilalanina (F) por tirosina (Y) en la posición 279 (F279Y), en el dominio transmembrana de la proteína (Blott y col., 2003). OPN_8514C-T es una sustitución de una C por una T en el intrón 4 del gen SPP1 (Secreted phosphoprotein 1).

Tabla 2.3. Magnitud del efecto del genotipo (y su correspondiente desviación estándar) para los SNP y combinados, que mostraron estar significativamente asociados ($P < 0,05$) con SCS.

SNP	Genotipos/efecto del marcador (DE)					Valor P
GHR_140	TT	TA	AA			0,008
	0	-0,37 (0,18)	-0,15 (0,07)			
OPN_8514C-T	CC	CT	TT			0,024
	0,00	0,17 (0,09)	0,38 (0,18)			
OPN	AA/TC	AA/TT	AC/TC	AC/TT	CC/TT	0,018
	0,019(0,10)	0,19 (0,24)	0,05 (0,09)	0,30 (0,13)	0,04 (0,14)	

Las heredabilidades y otros componentes de varianza estimados se muestran en la Tabla 2.4, junto con la proporción estimada de variación fenotípica representada por los diferentes efectos aleatorios y su error estándar estimado. Los valores estimados de heredabilidad oscilaron entre 0,094 (modelo sin marcador) a 0,091. Las proporciones de varianza genotípica explicada por los diferentes marcadores fueron 0,025, 0,015, y 0,035 para GHR_140, OPN_8514C-T, y los marcadores combinados de OPN, respectivamente. El valor de repetibilidad estimada para el SCS en este conjunto de datos fue de 0,47.

Tabla 2.4. Valores estimados de los componentes de varianza (errores estándar) para los diferentes marcadores.

	Sin marcador	GHR_140	OPN_8514C-T	OPN
σ_e	1,012 (0,320)	1,010 (0,310)	1,011 (0,312)	1,007 (0,324)
σ_a	0,198 (0,053)	0,193 (0,049)	0,0,195 (0,051)	0,191 (0,050)
σ_{pe}	0,904 (0,027)	0,905 (0,025)	0,904 (0,031)	0,905 (0,050)
σ_p	2,114 (0,592)	2,107 (0,585)	2,110 (0,572)	2,105 (0,610)
h^2	0,094	0,092	0,092	0,091
$\% V_a \text{SNP}^1$	-	0,025	0,015	0,035
$Vrat_e^2$	0,479 (0,095)	0,478 (0,081)	0,478 (0,076)	0,476 (0,072)
$Vrat_{pe}^3$	0,428 (0,087)	0,428 (0,083)	0,428 (0,079)	0,428 (0,076)

¹ proporción de la varianza genotípica explicada por el marcador. ^{2,3} proporción de la varianza fenotípica explicada por los efectos aleatorios.

II.6 Discusión

Los valores de heredabilidad y repetibilidad estimados en este estudio son consistentes con estudios publicados previamente (Mrode y Swanson 1996; Evans y Berry 2005; Rupp y Boichard 1999). Los marcadores encontrados como significativamente asociados con el SCS en este estudio explican sólo una pequeña proporción de la varianza genética total y esto es debido a la baja heredabilidad y la naturaleza poligénica del SCS, que se ve afectada por un gran número de variantes distribuidas a lo largo de todo el genoma bovino.

En el presente estudio, un panel de SNP seleccionados en diferentes genes o regiones candidatas fue evaluado para una población de bovinos lecheros. Varios SNP fueron descartados debido a: fallos del sistema de genotipificado (8), falta de relación con el objetivo del presente estudio (3), o limitaciones genéticas para el análisis (8).

Se detectaron asociaciones de dos SNP individuales y para los genotipos combinados de dos marcadores en uno de los genes candidatos. Los efectos detectados por el análisis fueron pequeños, y los marcadores se encuentran en dos genes diferentes. Un gen está directamente relacionado con el sistema inmune (OPN) y el otro puede considerarse relacionado con muchas funciones biológicas diferentes.

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada implicada en diversos procesos biológicos. Es una citoquina producida principalmente por los macrófagos y las células T activadas (Patarca y col., 1989), que está considerada como una importante reguladora de la respuesta inflamatoria y es codificada por el gen SPP1 (secreted phosphoprotein 1). Entre otras propiedades encontradas para osteopontina, se ha demostrado que confiere resistencia a las infecciones por varios patógenos intracelulares, a través del reclutamiento y la activación de los macrófagos (Weber y col., 2002). Un análisis del gen de SPP1 por Alain y col. (2009) reveló que la transcripción del gen de la osteopontina se detectó como expresada tempranamente en las células somáticas durante la mastitis.

En el presente trabajo se demostró que los diferentes genotipos del marcador OPN_8514C-T afectaron significativamente el SCS. Los animales con el genotipo T/T mostraron valores más altos del SCS ($0,38 \pm 0,18$; $P < 0,05$) en promedio que los animales con los otros genotipos; resultado que luego fue confirmado por el análisis de los genotipos combinados de los SNP en el gen SPP1. Los individuos con el genotipo combinado AC/TT fueron los que tuvieron un SCS más alto ($0,30 \pm 0,13$; $P < 0,05$). El genotipo C/T en OPN8514C-T fue el más frecuentemente encontrado (la mitad de nuestra población), y los animales restantes tuvieron proporciones similares de genotipos C/C y T/T ($0,28$ y $0,22$ respectivamente). Estudios previos han mostrado asociaciones significativas de variantes del gen SPP1 con características de composición de la leche, como porcentaje de grasa y proteína (Cohen y col., 2004; Schnabel y col., 2005). En investigaciones previas se informaron frecuencias genotípicas similares en rodeos de Holstein y Holstein Friesian, a las halladas en los animales de nuestro estudio (Leonard y col., 2005; Khatib y col., 2007). En esos estudios, como en éste, el genotipo heterocigota C/T fue el predominante. El polimorfismo C/T en la posición 8514 del gen SPP1 fue previamente asociado con porcentajes de proteína y grasa en leche en 1,362 toros (Leonard y col., 2005); sin embargo, según las fuentes relevadas esta es la primera vez que se reporta una asociación entre este polimorfismo y el SCS. El efecto hallado para el genotipo combinado fue mayor que el efecto del SNP OPN_8514C-T. Es bien conocido que la potencia y la precisión del mapeo por asociación se puede mejorar mediante la agrupación de SNP en bloques de haplotipos (Zhao y col., 2007). Varios estudios han reportado que el análisis de genotipos combinados o análisis de haplotipos resultaron en la detección de una asociación significativa con el rasgo, mientras que el análisis de un único SNP no dio lugar a ninguna asociación significativa (Clark, 2004; Lambert y col., 2013). Aunque este SNP se ha estudiado en nuestra población y debe ser validado para diferentes poblaciones, tiene un valor potencial como marcador molecular para ser usado en un programa de selección asistida por marcadores.

El receptor de la hormona de crecimiento es un receptor de transmembrana, codificado por el gen de GHR (Growth Hormone Receptor), localizado en el BTA20 (Frank y col., 1994). Es un

transductor de acción de la hormona y desempeña un papel clave en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono (Lucy y col., 2001). Se expresa en numerosas células inmunes, incluyendo células T, células B y monocitos, y es conocido por promover la proliferación celular y/o su supervivencia (Taub y col., 2010). Varios estudios mapearon QTL afectando el SCS en el BTA20, cerca del gen GHR (Rodríguez-Zas y col., 2002; Ashwell y col., 2004; Ron y col., 2004; Casas y Snowden, 2008). En este trabajo, el análisis de asociación del marcador GHR_140 (F279Y) mostró que los animales que llevan el genotipo heterocigota T/A presentaron SCS significativamente inferiores ($-0,39 \pm 0,20$, $P < 0,05$) que los animales con otro genotipo. El alelo menos representado en la población fue el 279Y mostrando una frecuencia de 0,16; las frecuencias genotípicas observadas fueron 0,70 para el homocigota T/T, 0,26 para el heterocigota T/A y 0,03 para el homocigota A/A. La baja frecuencia del genotipo homocigota A/A en este estudio fue consistente con la hallada en otras poblaciones Holstein- Friesian de Países Bajos y Nueva Zelanda (Blott y col., 2003), el Reino Unido (Banos y col., 2008) e Italia (Fontanesi y col., 2007). Rahmatalla y col. (2011) describieron que diferentes genotipos de F279Y mostraron efectos altamente significativos en los rendimientos de leche y lactosa y un efecto significativo en la reducción de RCS para el alelo 279Y. Sin embargo, ya que el genotipo A/A no se encuentra en elevada frecuencia en diferentes poblaciones Holstein, se debe llevar a cabo un análisis más detallado con poblaciones más grandes para verificar el verdadero efecto del genotipo. Polimorfismos en este gen se han asociado significativamente con SCS y rasgos productivos en diferentes rodeos Holstein de varios países. Blott y col. (2003) mapearon un QTL con un efecto importante en la producción y composición de leche en rodeos Holstein y Jersey de diferentes países, señalando que el SNP es el nucleótido responsable (QTN, Quantitative Trait Nucleotide) o está estrechamente asociado con la mutación causal. Viitala y col. (2006) confirmaron que el SNP F279Y explica la mayor parte de la varianza del QTL afectando el rendimiento de leche y proteína en rodeos de raza Ayrshire finlandesa, pero también encontraron otra asociación entre el SNP PRLR_S18N (cambio de serina por asparagina en la posición 18) con proteína y producción de grasa. En otro estudio Waters y col. (2010) reportaron

32 nuevos SNP por resecuenciación del gen GHR, y también confirmaron que el SNP F279Y está fuertemente asociado con el rendimiento en leche, grasa y proteína. Uno de los 32 polimorfismos, el GHR_19.1 estaba situado en un intrón a 2349 pb “corriente arriba” del exón 3 y se asoció con SCS. Por lo tanto, basado en las pruebas mencionadas, este marcador podría ser útil en un programa de selección para mejorar la resistencia a la mastitis junto con otros rasgos de producción de leche. Aunque el alelo 279Y está fuertemente asociado con alta producción de leche y menor SCS, ocurre con poca frecuencia en el ganado lechero. Se deben realizar estudios para aclarar si este polimorfismo está afectando también a otros rasgos relativos a la producción de leche, reproductivos o conformacionales, lo que puede haber llevado a una selección negativa en rodeos lecheros.

II.7 Conclusiones del capítulo II

En conclusión, se informó aquí la asociación entre dos marcadores, uno de los cuales no está directamente relacionado con las funciones inmunes, con el SCS en una población de bovinos lecheros de Argentina. Los marcadores OPN_8514C-T, GHR_140, y los marcadores combinados para OPN afectan significativamente el SCS en este rodeo, proporcionando información útil para su aplicación en los programas de mejoramiento.

Capítulo III

III.1 Estudio de asociación del genoma completo con el score de células somáticas

III.2 Resumen

Este estudio tuvo como objetivo comprender la arquitectura genómica de un rodeo lechero de Argentina mediante la medición LD y la identificación de loci asociados con parámetros calculados a partir del recuento de células somáticas (RCS). Los datos fenotípicos consistieron en 3.530 registros de RCS de 544 vacas raza Holstein y Holstein x Jersey propiedad de una empresa ubicada en la cuenca lechera central de la provincia de Santa Fe, Argentina. Los RCS se registraron cada 40 días. Los datos genotípicos consistieron en 38.872 SNP. Para la cuantificación del LD la correlación cuadrada de los alelos en cada locus (r^2) se calculó para todos los pares de SNP en cada cromosoma. Se calcularon tres variables diferentes a partir del RCS: la media aritmética (AM), el valor máximo (MAX) y la media aritmética de los 3 valores superiores (TOP3). Los parámetros genéticos para las tres variables se estimaron utilizando un modelo animal. Para tener en cuenta el riesgo de falsos positivos se estableció una tasa de falso descubrimiento (false discovery rate, FDR) de 0,20. Las correlaciones fenotípicas entre las tres variables fueron: 0,69 entre TOP3 y AM; 0,83 entre TOP3 y MAX y 0,53 entre MAX y AM. El estudio de asociación de genoma completo (GWAS) con las tres variables diferentes mostró que AM se asoció significativamente con dos SNP: ARS-BFGL-NGS-114608 (BTA1) y Hapmap60306-rs29023088 (BTA5). MAX y TOP3 se asociaron significativamente con cuatro SNP: ARS-BFGL-NGS-107594, ARS-BFGL-NGS-104220 (BTA10), BTA-43543-no-rs (BTA18) y ARS-BFGL-NGS-109705 (BTA6). MAX y TOP3 fueron variables fenotípicas equivalentes a ser utilizadas en un GWAS. Como era de esperar, rasgos poligénicos de baja heredabilidad como el RCS están influidos por múltiples loci distribuidos por todo el genoma, cada uno con un efecto relativamente pequeño. Estos resultados contribuyen a obtener un mejor conocimiento sobre las regiones genómicas que influyen en el RCS en rodeos lecheros argentinos.

Palabras clave: mastitis, resistencia, GWAS, leche.

III.3 Introducción

El uso de marcadores moleculares asociados con la variación fenotípica ha ayudado en la identificación de polimorfismos en genes que causan estas variaciones, y por lo tanto son valiosos a la hora de usarlos en un programa de selección asistida por marcadores (MAS, marker-assisted selection) (Dekkers, 2004). Más recientemente, estos marcadores se han utilizado para aumentar la precisión en la predicción de los valores de cría estimados (estimated breeding values, EBV), donde se utilizan mapas de marcadores de alta densidad sobre todo el genoma para predecir los llamados valores de crías genómicos (GEBV, genomic estimated breeding values) con la tecnología llamada “selección genómica” (Meuwissen y col., 2001). La genotipificación en paralelo (multiplexing) de alto rendimiento de SNP permite identificar los alelos existentes en grandes poblaciones a costos relativamente bajos (Matukumalli y col., 2009) y por consiguiente, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, genome-wide association study) se pueden realizar de forma rutinaria en los rodeos. Un GWAS pone a prueba cada SNP para una asociación con una variación en el fenotipo, asumiendo que el SNP se encuentra en LD con, o cerca de, una mutación causal que afecta la característica en estudio (Hirschhorn y Daly, 2005) lo que permite evaluar de una manera eficiente y simultáneamente miles de variantes genéticas a lo largo de todo el genoma. Medir el grado de LD o de la segregación no aleatoria de los alelos en diferentes loci en el genoma puede ayudar a revelar los acontecimientos históricos de recombinación, lo cual es crucial para rastrear y mapear los rasgos importantes, y ayuda también a determinar la densidad de SNP necesarios para detectar las variantes causales, así como también para selección genómica (Goddard y Hayes, 2009). El LD es específico de población por lo que debe ser determinado para cada una de ellas. En los rodeos donde el tamaño efectivo de la población es relativamente pequeño y se encuentran bajo intensa selección, la medida de LD es mayor, y abarca grandes distancias a lo largo del genoma (de Roos y col., 2008; Sargolzaei y col., 2008). Los objetivos de este trabajo fueron detectar marcadores moleculares de tipo SNP que estén asociados con el score de células somáticas (SCS) a través de un

GWAS y, analizar el grado de LD en nuestra población para evaluar la inclusión de esta información en un programa de selección.

III.4 Materiales y Métodos

III.4.1 Población y fenotipos

Los datos fenotípicos consistieron en 3.530 controles lecheros de 544 vacas de raza Holstein ($n = 379$) y cruza Holstein x Jersey ($n = 165$), que van desde el 100% Holstein al 87,5% Jersey; siendo el promedio 87% Holstein. Todas las vacas fueron hijas de 22 toros y pertenecen a 14 tambos propiedad de una empresa ubicada en la cuenca lechera central de Argentina. Todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de alimentación y sanitarias y se ordeñaron en forma mecánica dos veces al día. Los RCS se registraron cada 40 días por control oficial.

Para la determinación del RCS, las muestras de leche se conservaron con azidiol (0,3%) a 4°C y se analizaron dentro de las 24hs. Las determinaciones del RCS fueron realizadas por un laboratorio comercial (Laboratorio Regional de Servicios Analíticos, Esperanza, Santa Fe) utilizando un contador automatizado Somacount 300 (Bentley Instruments, Minnesota, EE.UU.). Las muestras de leche fueron calentadas a 39-40°C para facilitar su homogeneización. Todas las vacas incluidas en el estudio tenían al menos 4 registros durante una lactancia (media = 6). Los datos analizados correspondieron desde 20 a 400 días en lactancia.

El RCS se transformó en SCS como describe Shook (1982). Se calcularon tres variables diferentes a partir del RCS por lactancia: la media aritmética (AM), el máximo valor (MAX) y la media aritmética de los 3 valores más altos en la lactancia (TOP3). MAX fue utilizado por primera vez en los estudios genéticos por Koeck y col. (2012) y mostró una alta correlación genética con TD (test day) > 200 , TD > 500 y PK (variable binaria para detectar la presencia o ausencia de picos de RCS durante la lactancia). Estas variables mostraron una correlación genética más alta con mastitis que los promedios de RCS en diferentes periodos de lactancia (Koeck y col., 2012). TOP3 fue

definido como la media aritmética de los 3 valores más altos de RCS para una vaca. Se utilizó TOP3 para tratar de diferenciar situaciones en las que una vaca muestra un fuerte pico único de RCS de las lactancias que presentan más de un pico. De esta manera, con el TOP3 intentamos capturar eventos de altos valores sostenidos o repetitivos de RCS, en lugar de sólo un pico.

III.4.2 Extracción de ADN

Las muestras de sangre se obtuvieron de vena caudal de los 544 animales seleccionados en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Se extrajo ADN genómico a partir de sangre fresca utilizando un kit comercial (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit, Axygen Biosciences, Union City, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad de ADN se estimó mediante la medición de absorbancia (A_{260} ; relación $A_{260/280}$, respectivamente) en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop®1000.

III.4.3 Genotipificación y Control de Calidad

La genotipificación se llevó a cabo utilizando un chip BovineSNP50v2 (Illumina) en un laboratorio comercial (GeneSeek, Lincoln, NE, EE.UU.). El control de calidad de la genotipificación se realizó mediante el programa PLINK v1.07 (Purcell y col., 2009). Para los 54.609 SNP inicialmente genotipificados, sólo los SNP que pasaron los siguientes criterios fueron incluidos en el análisis: (a) la frecuencia alélica mínima (MAF) $> 5\%$; (b) porcentaje de genotipos no asignado para un SNP en todas las muestras $< 5\%$, y (c) grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$). Todo SNP sin posición física definida en un cromosoma también fue excluido de los análisis posteriores.

Las inconsistencias mendelianas fueron detectadas con PLINK y luego los genotipos inconsistentes, categorizados como “missing”, fueron imputados posteriormente con el programa BEAGLE v3.3.2 (Browning y Browning, 2009) utilizando 20 iteraciones del algoritmo de

imputación. Después de la eliminación por control de calidad quedaron 38.872 SNP y 540 animales restantes.

III.4.4 Desequilibrio de ligamiento

Utilizando el programa PLINK se calculó la correlación cuadrada de los alelos en dos loci (r^2) para cada par de SNP en cada cromosoma como método de cuantificación del LD (Hill y Robertson, 1968). Los pares de SNP se agruparon en intervalos de distancias de 10Kb desde 0 a 10Mb. Con el fin de evaluar el grado de LD a varias distancias en cada cromosoma, se calculó la media aritmética de r^2 para pares de SNP en cada intervalo. El r^2 se calculó de la siguiente manera:

$$r^2 = \frac{D^2}{f(A)f(a)f(B)f(b)}$$

Donde $D = f(AB) - f(A)f(B)$, y $f(AB)$, $f(A)$, $f(a)$, $f(B)$ y $f(b)$ son las frecuencias observadas del haplotipo AB y de los alelos A, a, B, y b, respectivamente.

III.4.5 Estudio de asociación

Los parámetros genéticos para las tres variables se estimaron por el método de máxima verosimilitud restringida (REML) usando el programa WOMBAT (Meyer, 2007). Se utilizó un modelo animal multivariado con el fin de estimar las correlaciones genéticas y fenotípicas. Los datos fueron analizados utilizando el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + L_i + HYS_j + PH_k + A_l + e_{ijkl}$$

donde y_{ijkl} es la variable respuesta correspondiente a AM, MAX y TOP3; μ es el promedio de la población; L_i es el número de lactancia ($i= 2$ a 6) del animal l , del HYS-grupo: el efecto fijo teniendo en cuenta la combinación de rodeo (H), año (Y) y estación (S) de parto ($j= 1$ a 115); PH_k es el efecto fijo de la proporción de raza Holstein en el animal; A_l es el efecto genético aditivo del animal distribuido como $\sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_a^2)$, teniendo en cuenta las (co)varianzas entre animales debido a

las relaciones genéticas en la matriz de relaciones **A** basada en los registros de pedigrí (24.197 individuos) y e_{ijkl} , distribuido como $\sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$ es el residuo.

Una vez que se estimaron los fenotipos corregidos, las asociaciones entre cada SNP y el fenotipo corregido para AM, MAX y TOP3 se calcularon usando un modelo lineal general en PLINK usando la siguiente fórmula:

$$y_i^* = \mu + \text{SNP}_i + e_i$$

Donde y_i^* es el fenotipo (correspondiente a AM, MAX y TOP3) ajustado por los efectos ambientales; μ es la media del rodeo; SNP_i es el efecto fijo del genotipo del SNP; y e_i es el residuo. Para tener en cuenta el riesgo de falsos positivos debido al problema de test múltiples se utilizó una tasa de falso descubrimiento o falsos positivos (false discovery rate, FDR). Usando el paquete "qvalue" en el programa estadístico R (Storey y Tibshirani 2003) se calcularon los valores de q. Se estableció un umbral de valor q de 0,20.

III.5 Resultados

Un resumen descriptivo de marcadores SNP en cada cromosoma se detalla en la Tabla 3.1. El cromosoma más largo fue el 1 con 161,1 Mb de longitud total y el más corto el 25 con 44,1Mb de longitud total. Del total de marcadores, 383 SNP no informaron una posición definida en el genoma, y se excluyeron de los análisis posteriores (información brindada por Illumina). El BTA1 presentó el mayor número de marcadores con 2.461 SNP y el BTA27 fue el de menor número con 699 SNP. Cada cromosoma exhibió diferente densidad marcadores, desde 17,10 SNP/Mb en el BTA25 a 8,68 SNP/Mb en el cromosoma X, siendo la densidad media de todos los cromosomas 14,86 SNP/Mb (aproximadamente 1 SNP cada 71 Kb).

Tabla 3.1. Resumen de los marcadores SNP analizados sobre cada cromosoma bovino.

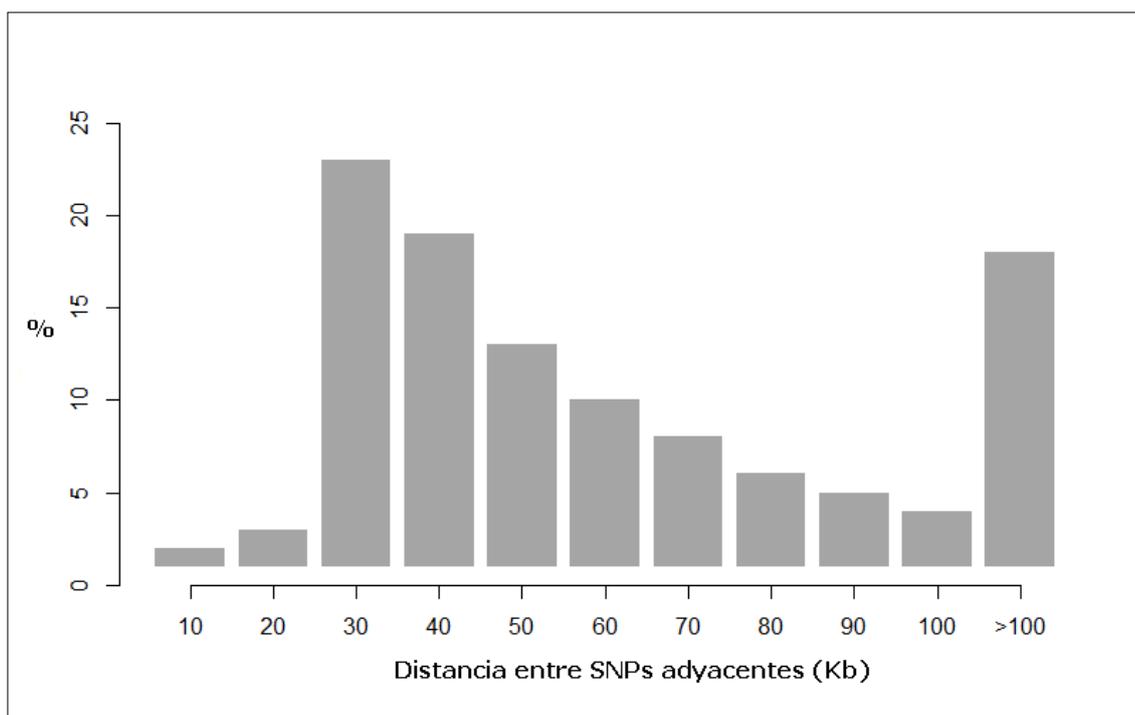
BTA	Tamaño (Mb)	Nº de SNP	Densidad (SNP/Mb)	Distancia promedio \pm SD ² (Kb)
Nulo	-	383	-	-
1	161,1	2.461	15,28	65,4 \pm 67,8
2	140,8	1.989	14,13	69,9 \pm 77,0
3	127,9	1.845	14,43	68,0 \pm 96,6
4	124,5	1.792	14,39	67,0 \pm 58,6
5	125,8	1.575	12,52	79,1 \pm 113,6
6	122,6	1.831	14,93	65,0 \pm 69,2
7	112,1	1.683	15,01	66,8 \pm 76,8
8	116,9	1.788	15,30	63,6 \pm 53,5
9	108,1	1.498	13,86	70,4 \pm 65,9
10	106,4	1.600	15,04	65,1 \pm 85,8
11	110,2	1.658	15,05	64,7 \pm 59,1
12	85,4	1.243	14,56	73,2 \pm 96,9
13	84,4	1.358	16,09	61,6 \pm 52,4
14	81,3	1.338	16,46	62,2 \pm 56,1
15	84,6	1.294	15,30	64,8 \pm 61,1
16	77,9	1.227	15,75	66,3 \pm 68,6
17	76,5	1.162	15,19	64,4 \pm 67,4
18	66,1	1.020	15,43	64,2 \pm 63,2
19	65,3	1.074	16,45	59,2 \pm 52,1
20	75,8	1.153	15,21	62,5 \pm 57,3
21	69,1	1.034	14,96	68,8 \pm 69,4
22	61,8	933	15,10	65,7 \pm 55,5
23	53,4	818	15,32	63,8 \pm 59,4
24	65,3	948	14,52	66,4 \pm 61,0
25	44,1	754	17,10	57,4 \pm 45,9
26	51,8	809	15,62	63,0 \pm 50,7
27	48,7	699	14,35	64,9 \pm 65,3
28	46,1	736	15,97	62,8 \pm 53,6
29	60	784	13,07	65,2 \pm 68,4
X	88,5	768	8,68	193,8 \pm 389,0
Total	2.642,5	39.255	14,86	62,0 \pm 74,1

¹ Basado en UMD3.1. ²Entre SNP adyacentes.

III.5.1 Desequilibrio de ligamiento

La distancia media (DE) entre todos los pares de SNP adyacentes en todos los cromosomas fue de $68,4 \pm 88,8$ Kb. 52% de los SNP distaron entre 20 y 50 Kb (20.078 pares de SNP) y sólo el 17% de los SNP resultaron estar a más de 100 Kb de distancia (6.657 pares de SNP) (Figura 3.1). La distancia máxima entre dos SNP adyacentes se encontró en el BTAX, y fue de 4,7 Mb. La menor distancia entre pares de SNP fue encontrada en el BTA13, con sólo 65 pb.

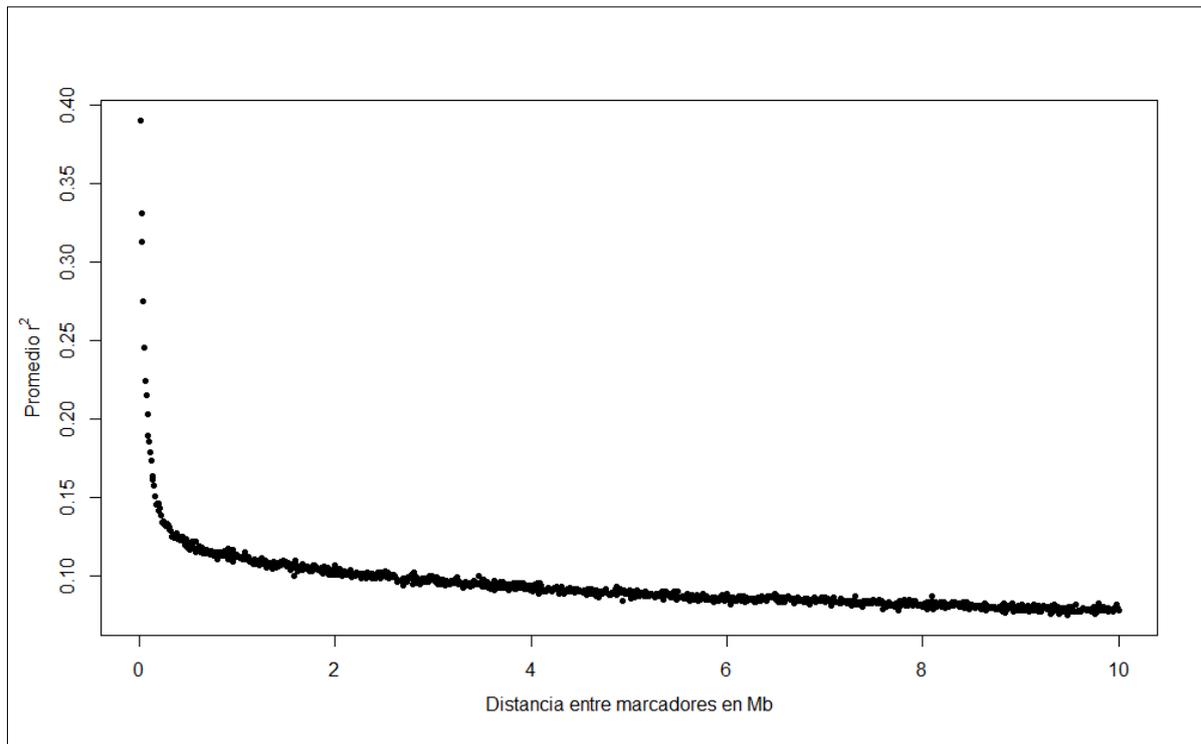
Figura 3.1. Resumen estadístico de la distribución de las distancias en kilopares de bases



Como era de esperar el promedio de r^2 disminuye rápidamente al aumentar la distancia genética, mostrando una tendencia exponencial. La figura 3.2 muestra una vista descriptiva del descenso del promedio de r^2 con la distancia genética en todos los cromosomas. Cada punto de datos de la Figura 3.2 representa el promedio de r^2 desde 10Kb hasta 10^4 Kb en incrementos de 10 Kb. Se observaron valores altos de LD entre pares de SNP a distancias más pequeñas. A distancias de menos de 10Kb

el promedio de r^2 fue de 0,40. Entre 40 y 50 Kb fue de 0,25 y para distancias mayores a 100Kb fue 0,18.

Figura 3.2. Promedio de r^2 sobre distancia genética para todos los cromosomas bovinos cada 10Kb hasta 10Mb.



La tabla 3.2 muestra un resumen del LD entre los SNP adyacentes. Los r^2 promedio (su correspondiente desviación estándar) entre SNP adyacentes oscilaron entre $0,20 \pm 0,25$ para el BTA27 hasta $0,28 \pm 0,29$ para el BTA10 y el promedio general fue de $0,25 \pm 0,28$. En la tabla 3.2 también se reportan los SNP adyacentes con $r^2 = 1$: el BTA1 tiene el mayor porcentaje de SNP adyacente con $r^2 = 1$ con 6,38% y el BTA25 tiene el porcentaje más bajo con 2,92%; siendo 4,92% la media del genoma. La distancia genética más larga entre SNP adyacentes con $r^2 = 1$ fue encontrada en el BTA10 y abarcó 5,77 Mb, y la menor fue encontrada en el BTA25 con 0,70 Mb.

Tabla 3.2. Resumen de los SNP adyacentes en cada cromosoma¹

BTA	SNP ²	N _(r²=1)	Dist. máxima ³	r ² promedio ± DE	% SNP r ² =1 ⁴
1	2.445	156	1,75	0,25 ± 0,29	6,38
2	1.985	105	1,53	0,25 ± 0,29	5,29
3	1.843	94	2,32	0,25 ± 0,28	5,10
4	1.789	107	2,59	0,25 ± 0,29	5,98
5	1.572	82	3,69	0,26 ± 0,29	5,22
6	1.826	98	1,53	0,26 ± 0,28	5,37
7	1.681	82	1,30	0,27 ± 0,29	4,88
8	1.783	101	1,27	0,26 ± 0,29	5,66
9	1.491	64	1,83	0,24 ± 0,28	4,29
10	1.594	89	5,77	0,28 ± 0,29	5,58
11	1.650	84	1,31	0,25 ± 0,29	5,09
12	1.240	37	1,51	0,22 ± 0,26	2,98
13	1.356	52	1,60	0,25 ± 0,28	3,83
14	1.334	64	1,12	0,28 ± 0,30	4,80
15	1.290	49	1,31	0,21 ± 0,26	3,80
16	1.222	65	1,60	0,25 ± 0,29	5,32
17	1.161	50	1,24	0,24 ± 0,28	4,31
18	1.018	44	1,10	0,23 ± 0,27	4,32
19	1.071	52	1,90	0,22 ± 0,27	4,86
20	1.147	52	1,14	0,25 ± 0,28	4,53
21	1.026	53	1,82	0,26 ± 0,29	5,17
22	925	42	1,62	0,24 ± 0,28	4,54
23	817	46	2,04	0,21 ± 0,25	5,63
24	947	55	1,52	0,25 ± 0,29	5,81
25	753	22	0,70	0,22 ± 0,26	2,92
26	806	49	1,08	0,25 ± 0,29	6,08
27	698	21	0,93	0,20 ± 0,25	3,01
28	727	22	2,09	0,22 ± 0,26	3,03
29	782	27	1,00	0,22 ± 0,26	3,45
X	686	38	1,00	0,23 ± 0,28	5,54
total	38.665	1902	1,71 ± 0,96	0,25 ± 0,28	4,92

¹ Basado en UMD3.1; ²Numero de SNP adyacentes. ³ mayor distancia en Mb entre SNP adyacentes con r²=1. ⁴N_{(r²=1)/SNP.}

III.5.2 Datos fenotípicos y GWAS

Las medias aritméticas, desviaciones estándar, coeficientes de variación, valores máximos y mínimos y las heredabilidades de cada variable se enumeran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Promedios, desviaciones estándar, coeficientes de variación, valores máximos y mínimos y las heredabilidades de cada variable

Variable ^a	Media	DE	CV	Máximo	Mínimo	h ² (DE)
TOP3	5,10	1,14	0,22	9,02	1,33	0,03 (0,01)
MAX	5,83	1,32	0,23	9,00	2,01	0,02 (0,01)
AM	4,05	1,04	0,26	7,00	1,00	0,04 (0,02)

^aVariables calculadas a partir del RCS por lactancia

Las correlaciones genéticas y fenotípicas estimadas entre todas las variables se muestran en la Tabla 3.4. Una correlación muy alta se encontró entre el TOP3 y MAX.

Tabla 3.4. Correlaciones genéticas (encima de la diagonal) y fenotípicas (debajo) (DE) entre las variables.

Variable ^a	TOP3	MAX	AM
TOP3	–	0,89 (0,06)	0,49 (0,02)
MAX	0,83 (0,03)	–	0,37 (0,01)
AM	0,69 (0,04)	0,53 (0,02)	–

^aVariables calculadas a partir del RCS por lactancia.

El GWAS realizado con las tres variables diferentes y fijando una tasa de falso descubrimiento (FDR) $\leq 0,20$ mostró que AM se asoció de forma significativa ($p < 0,000015$) con dos SNP: ARS-BFGL-NGS-114 608 situado en la posición 37.909.243 del BTA1, y Hapmap60306-rs29023088 en

la posición 60.665.676 del BTA5. MAX y TOP3 se asociaron significativamente con cuatro SNP: ARS-BFGL-NGS-107594 (posición 40460414), ARS-BFGL-NGS-104220 (posición 42555055) ambos ubicados en el BTA10; BTA-43543-no-rs en la posición 46.124.864 del cromosoma18, y ARS-BFGL-NGS-109705 (posición 8.129.819) en BTA26 (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Marcadores significativamente asociados con las variables calculadas¹.

Variable ¹	SNP	BTA	Posición ² (bp)	Valor P
AM	ARS-BFGL-NGS-114608	1	37.909.243	5,16E-06
AM	Hapmap60306-rs29023088	5	60.665.676	8,20E-06
TOP3	ARS-BFGL-NGS-107594	10	40.460.414	1,43E-06
TOP3	ARS-BFGL-NGS-104220	10	42.555.055	7,07E-06
TOP3	BTA-43543-no-rs	18	46.124.864	9,04E-06
TOP3	ARS-BFGL-NGS-109705	26	8.129.819	1,02E-05
MAX	ARS-BFGL-NGS-107594	10	40.460.414	2,00E-06
MAX	ARS-BFGL-NGS-104220	10	42.555.055	4,00E-06
MAX	ARS-BFGL-NGS-109705	26	8.129.819	8,00E-06
MAX	BTA-43543-no-rs	18	46.124.864	1,10E-05

¹Variables calculadas a partir del SCS por lactancia: la media aritmética de los controles (AM), el valor máximo (MAX) la media aritmética de los tres valores mayores (TOP3).² Basado en UMD3.1..

De acuerdo con las correlaciones fenotípicas encontradas, en el estudio de asociación MAX y TOP3 presentaron los mismos cuatro SNP asociados significativamente: ARS-BFGL-NGS - 107594, ARS-BFGL-NGS-104220, ARS-BFGL-NGS-109705 y BTA-43.543-no-rs (Figura 3.3).

De los seis SNP que están asociados significativamente con las diferentes variables calculadas, cinco de ellos presentaron un genotipo homocigota como el más frecuente, con valores de frecuencias desde 0,65 hasta 0,87 y M AF entre 0,07 y 0,20. De la misma manera, estos cinco SNP tuvieron los alelos favorables como los más prevalentes, con frecuencias alélicas que oscilaron entre 0,80 y 0,93, y mostrando valores negativos en el efecto de SNP (Tabla 3.6).

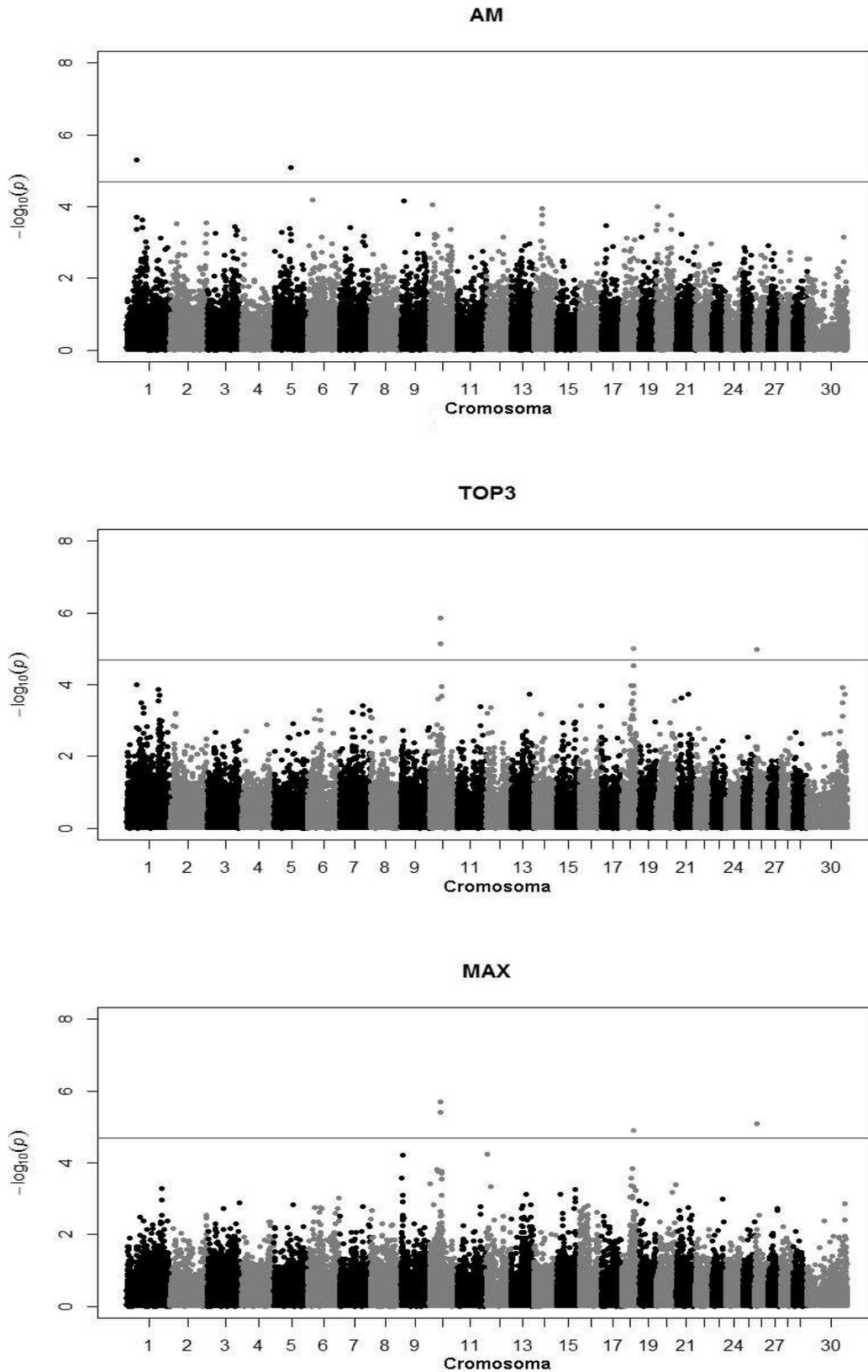
Tabla 3.6. Tamaños de efectos (DE) por genotipo y MAF para los SNP significativamente asociados con las diferentes variables calculadas a partir del SCS.

SNP	BTA	MA(F)	Variable ^a	B/B	B/A	A/A
ARS-BFGL-NGS-114608	1	B (0,20)	AM	0,65 (0,42)	0	-0,11 (0,08)
Frecuencia genotípica				0,05	0,31	0,65
Hapmap60306-rs29023088	5	A (0,14)	AM	0,22 (0,20)	0	-0,27 (0,21)
Frecuencia genotípica				0,01	0,26	0,73
ARS-BFGL-NGS-107594	10	B (0,07)	TOP3	0,79 (0,61)	0	-0,53 (0,16)
			MAX	0,72 (0,69)	0	-0,67 (0,44)
Frecuencia genotípica				0	0,13	0,87
ARS-BFGL-NGS-104220	10	B (0,07)	TOP3	2,04 (0,68)	0	-0,40 (0,41)
			MAX	1,51 (1,05)	0	-0,53 (0,36)
Frecuencia genotípica				0	0,13	0,87
BTA-43543-no-rs	18	B (0,07)	TOP3	0,40 (0,15)	0	-0,05 (0,15)
			MAX	1,52 (0,42)	0	-0,52 (0,27)
Frecuencia genotípica				0	0,13	0,87
ARS-BFGL-NGS-109705	26	A (0,45)	TOP3	-0,04 (0,25)	0	0,56 (0,23)
			MAX	-0,17 (0,05)	0	0,53 (0,49)
Frecuencia genotípica				0,29	0,52	0,18

^aVariables calculadas a partir del SCS por lactancia: Media aritmética (AM), valor máximo (MAX) media aritmética de los tres valores máximos (TOP3).

Aunque los alelos favorables fueron más frecuentes, los tamaños de sus efectos fueron más pequeños que los de los alelos desfavorables y sus valores de RCS no transformados correspondieron aproximadamente a un valor de 25.000 células/ml más bajos que los del genotipo heterocigoto.

Figura 3.3. Gráfico de Manhattan del $-\log_{10}$ de los valores P de todos los SNP para cada variable. Los cromosomas están ordenados de izquierda a derecha del 1 al 30 (cromosoma sexual X). Por encima de la línea horizontal se encuentran los SNP que pasaron el umbral de la corrección por FDR de 0,20.



III.6 Discusión

En este estudio se identificaron seis SNP asociados con rasgos calculados a partir del RCS, que está altamente correlacionado con la mastitis. En los últimos años varios autores han estudiado diferentes variables calculadas a partir del RCS para mejorar las posibilidades de progreso genético en la selección de resistencia contra la mastitis (Green y col., 2004; de Haas y col., 2008; Urioste y col., 2010, 2012; Koeck y col., 2012). En este trabajo, se utilizaron tres rasgos a partir del SCS: AM, TOP3 y MAX. De estos, AM, se ha utilizado durante muchos años para capturar la variación en el período de lactancia. MAX también fue utilizado en varios estudios y se correlacionó con casos clínicos de mastitis (Green y col., 2004; Koeck y col., 2012). Más recientemente, la transformación logarítmica de la desviación estándar de SCS (SCS-SD) fue sugerida para capturar picos en el RCS, y se relacionó con la mastitis clínica (Green y col., 2004; Urioste y col., 2010, 2012). Por otra parte, fue utilizado recientemente en un GWAS (Wijga y col., 2012). De acuerdo con la información relevada, TOP3 (la media aritmética de los 3 valores mas altos) nunca fue utilizado antes de este trabajo.

En el conjunto de datos analizados en este estudio, MAX y TOP3 tienen una alta correlación genética (0,89), y parecen capturar las mismas variaciones en el SCS. También mostraron asociaciones con los mismos SNP. Como era de esperar, todas las variables mostraron una baja heredabilidad (0,02-0,04) según lo demostrado previamente por diferentes estudios (de Haas y col., 2008; Urioste y col., 2010; Koeck y col., 2012). Las diferentes variables utilizadas reflejan dos aspectos genéticos diferentes de las variaciones del SCS: AM refleja más la longitud y el número de períodos con elevado RCS (ya que un SCS por lactancia más elevado es probablemente debido a infecciones recurrentes o un recuento de células recurrentemente más alto), mientras TOP3 y MAX reflejan sólo la presencia y la altura de los picos en los RCS, con un único pico en el caso de MAX y posiblemente varios en el caso de TOP3. Estas diferencias también se reflejaron en los resultados del estudio de asociación, dando evidencia de que los rasgos utilizados revelan diferentes aspectos

de la respuesta a la infección o al menos que podrían distinguirse diferentes loci implicados en la misma.

El desequilibrio de ligamiento decae rápidamente en distancias cortas, y se mantiene ligeramente por encima de cero para distancias más largas. Según Meuwissen y col. (2001) un nivel mínimo de LD para la selección genómica debe ser $r^2 = 0,2$ con el fin de lograr una precisión de 0,85 cuando se calculan valores de cría genómicos. En esta población se observó este nivel de LD ($r^2 = 0,2$) entre pares de SNP separados aproximadamente por 82 Kb. De acuerdo con el nivel de LD encontrado en esta población, un mínimo de aproximadamente 32.000 marcadores se requeriría para realizar un estudio de asociación con una buena precisión (suponiendo que una variación causal o un QTL se encuentre a mitad de camino entre dos SNP) y también para llevar a cabo una selección genómica. Teniendo en cuenta que hasta una distancia de 82.000 bp, el LD se encuentra todavía en un valor de 0,2 se consideró a los genes dentro de esta región como candidatos posibles.

La region que rodea al marcador ARS-BFGL-NGS-114608 (BTA1) de acuerdo con la base de datos Ensembl (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/) contiene 4 genes: PROS1 (proteína S alfa), ARL13B (factor de ADP-ribosilación tipo 13B), NSUN3 (NOP2/familia de sub-dominios, miembro 3) y STX19 (sintaxina 19). El gen PROS1 codifica una proteína llamada proteína S (vitronectina), que tiene un papel importante en el control de la coagulación de la sangre (Castoldi y Hackeng, 2008). Filippesen y col. (1990) investigaron la unión de la proteína bovina S a *Streptococcus dysgalactiae* aislados de bovinos con mastitis, y estudiaron el papel de la proteína S en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales bovinas. El estudio demostró que la proteína bovina S podría ser un importante mediador de la adherencia de *S. dysgalactiae* a las células epiteliales de bovinos. Además, ha sido demostrado que la vitronectina aumenta la ingestión de bacterias opsonizadas por los monocitos a través de la estimulación de receptores de las células, apoyando así el sistema inmune del huésped (Preissner, 1989).

La region circundante al marcador Hapmap60306-rs29023088 (BTA5) contiene cinco genes: SNRPF (ribonucleoproteína pequeña nuclear F), CCDC38 (proteína conteniendo dominio coiled-

coil 38), AMDHD1 (proteína conteniendo dominio amidohidrolasa 1), LTA4H (leucotrieno A-4 hidrolasa) y HAL (histidina amoníaco-liasa). Dentro de esta región Ashwell y col. (2004) situaron un QTL que afecta el SCS. El gen LTA4H codifica para la leucotrieno A-4 hidrolasa, una epoxi hidrolasa que cataliza el último paso en la biosíntesis del mediador proinflamatorio leucotrieno B4 (Haeggström y col., 1990). El leucotrieno B4 es un potente agente quimiotáctico que induce el reclutamiento y la acumulación de neutrófilos en la glándula mamaria bovina (Boutet y col., 2003).

Dentro de la región que rodea el marcador ARS- BFGL-NGS-107594 (BTA10) Boichard y col. (2003) posicionaron un QTL que afecta el SCS en razas de ganado lechero francés y en Holstein. No existen genes anotados dentro de la ventana de 82 Kb alrededor de ARS-BFGL-NGS-104220; sin embargo, Kühn y col. (2003) situaron un QTL que afecta el RCS a una distancia aproximada de 1 cM.

Para el marcador BTA-43543-no-rs (BTA18), la ventana contiene 10 genes: FXYD1/3/5/7 (reguladores de transporte de iones contenedores de dominios FXYD), LIG4 (ligasa IV dependiente de ATP), FAM187B (familia con similitud de secuencia 187, miembro B), MAG (glicoproteína asociada a mielina), LSR (receptor de lipoproteína estimulada por lipólisis), USF2 (factor de transcripción corriente arriba 2 interactuante con C-Fos) y HAMP (péptido antimicrobiano hepcidina). Existen muchos estudios previos posicionando QTL que afectan al SCS en esta región: Baes y col. (2009) y Brand y col. (2009) utilizaron rodeos de raza Holstein de Alemania; Schrooten y col. (2000) utilizaron rodeos Holstein holandeses. Un reciente estudio de tipo GWAS (Abdel-Shafy y col., 2014) redujo la región a 0,05 Mb, y posiciona el QTL 3 Mb corriente abajo del SNP BTA-43543-no-rs. Otra investigación por Lund y col. (2007) también posicionó un QTL en esta región, que afecta al SCS en tres razas de ganado lechero nórdico. Entre los 10 genes que se encuentran dentro de esta región solamente el gen HAMP posee una función que podría estar relacionada con la mastitis. El gen HAMP codifica para la hepcidina, que es una proteína rica en cisteína, abundante en diferentes tejidos animales, con propiedades antimicrobianas, la cual cumple una función en la defensa del huésped contra las bacterias (Park y col., 2000).

Dentro de la región circundante al marcador ARS-BFGL-NGS-109705 (BTA26) hay un gran QTL posicionado por Ashwell y col. (2004) que afecta al SCS en vacas Holstein de EE.UU. Dentro de esta región, se encuentra sólo un gen: PRKG1 (proteína quinasa, dependiente de GMPc, tipo I). El PRKG1 codifica para una proteína serina/treonina quinasa que actúa como mediador clave en la vía de señalización del óxido nítrico (NO)/cGMP (Butt y col., 1993). Esta proteína también está implicada en la señalización del Ca^{2+} , que tiene un papel directo en la inducción de la apoptosis. Las proteínas que son fosforiladas por PRKG1 regulan la activación plaquetaria y la adhesión, así como la contracción del músculo liso (Lohmann y col., 1997).

Varios estudios que realizan GWAS con rasgos relacionados con mastitis se publicaron recientemente. Meredith y col. (2013) y Abdel-Shafy y col. (2014) utilizaron DYD de SCS como el fenotipo para realizar GWAS. Sodeland y col. (2011) también utilizaron DYD, pero en este caso para mastitis clínica y SCS. Sólo dos regiones en los cromosomas 13 y 20 pueden considerarse similares entre el estudio de Meredith y col. (2013) y el de Sodeland y col. (2011), ya que están sólo separados por 1Mb. Sin embargo, la mayoría de las asociaciones reportadas, incluyendo las reportadas en el presente trabajo, se corresponden con diferentes ubicaciones en el genoma. El SNP más cercano entre los resultados de este trabajo en comparación con los anteriores es BTA-43543-no-rs, que se encuentra aproximadamente a 3Mb de distancia de un SNP detectado por Abdel-Shafy y col. (2014) en el cromosoma 18. Esto es lo suficientemente cerca para superponerse con QTL detectados anteriormente, pero la región de 0,05 Mb reportada por Abdel-Shafy y col. (2014) en su estudio no se solapa con el SNP detectado en este estudio.

Wijga y col. (2012) realizaron un GWAS usando promedios de SCS por lactancia y SCS-SD basado en controles test-day durante la primera lactancia. A diferencia de los resultados de este trabajo, Wijga y col. (2012) reportaron una alta correlación entre las variables estudiadas (SCS-SD y SCS) y encontró el mismo SNP asociado con las dos variables. En este estudio, diferentes variables mostraron estar asociadas a diferentes SNP, lo cual aporta a una mejor comprensión de las bases genéticas de la resistencia a la mastitis.

III.7 Conclusiones del capítulo III

Los resultados del análisis de LD y GWAS contribuyeron a una mejor comprensión de la arquitectura genómica de ganado vacuno lechero de Argentina y también a profundizar en el conocimiento de las regiones genómicas que influyen en el SCS. La comparación de las variables calculadas a partir del SCS: MAX y TOP3 se comportaron de manera similar, presentando altas correlaciones genéticas y fenotípicas, indicando así que estas variables fueron equivalentes en este GWAS. AM por un lado y TOP3 y MAX por el otro, mostraron estar asociadas a diferentes SNP, poniendo en evidencia que capturan diferentes aspectos de la respuesta a mastitis. Como era de esperar, no existen QTL con grandes efectos, demostrando que los QTL que afectan estas variables están dispersos por todo el genoma, contribuyendo cada uno con un pequeño efecto. Aunque son necesarios más estudios, esta investigación contribuye al conocimiento de los mecanismos de resistencia/susceptibilidad a la mastitis que podrán ser luego aplicados en los programas de mejoramiento.

Conclusiones Generales

Este es el primer estudio en recoger información fenotípica y genotípica detallada de ganado vacuno lechero en Argentina, lo que permitió evaluar la posible asociación entre diferentes marcadores moleculares y el recuento de células somáticas en leche.

La recopilación de forma rutinaria y detallada de información fenotípica de calidad es indispensable al momento de llevar a cabo el mejoramiento de las características. El mejoramiento de la salud de la glándula mamaria y, por consiguiente, de la calidad de la leche permitirá mejorar tanto el rendimiento como la calidad de los productos lácteos.

El uso de bases de datos relacionales durante el proyecto facilitó el análisis y almacenamiento de los datos. Se eliminaron problemas como la redundancia y los errores aumentando así la eficiencia en casi todos los aspectos del trabajo de computación (almacenamiento, procesamiento y acceso). Utilizando códigos relativamente simples se pudieron realizar múltiples consultas, operaciones matemáticas, estadísticas y controles de calidad, que luego fueron almacenados para ejecutarse cada vez que ingresan datos nuevos a la base, pudiendo cambiar los criterios de selección de datos a voluntad del investigador. Por esto se puede concluir que para la investigación en genómica, genética y en programas de mejoramiento, el uso de bases de datos correlacionales con consultas en lenguaje de tipo SQL es una herramienta altamente eficiente. Por otro lado la implementación de este sistema de almacenamiento permitirá, junto con la expansión de la capacidad de almacenamiento, el análisis de información generada por los diferentes estudios.

Sobre la base de estos resultados de los análisis de genes candidatos se detectaron dos SNP asociados con SCS y, de acuerdo con estudios anteriores, no sólo los genes implicados en la respuesta inmune y sus funciones básicas, sino también otras regiones genómicas no directamente relacionadas con el sistema inmune, están implicados en la resistencia/susceptibilidad a la mastitis.

Los resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento y el estudio de asociación de genoma completo permitieron detectar 6 SNP asociados con diferentes variables calculadas a partir del SCS contribuyendo a una mejor comprensión de la arquitectura genómica de ganado vacuno lechero perteneciente a estos rodeos.

El estudio de asociación de genoma completo confirmó también que caracteres poligénicos como el RCS están influenciados por múltiples QTL dispersos por todo el genoma, cada uno con un efecto relativamente pequeño y también por un componente ambiental, por lo que la heredabilidad de la característica es baja. Las diferentes variables calculadas a partir del RCS (TOP3, MAX y AM) permitieron capturar diferencias en los marcadores asociados y por lo tanto mecanismos diferentes de respuesta a mastitis, poniendo en evidencia que contar con controles lecheros periódicos es indispensable tanto para el manejo del rodeo como para un programa de mejoramiento.

Este estudio es el primero de su tipo en realizarse en rodeos lecheros de Argentina y aporta información valiosa que contribuye sustancialmente al conocimiento de las regiones cromosómicas implicadas y de los mecanismos de resistencia a la mastitis; información fundamental para luego ser aplicada tanto en los programas de mejoramiento genético como al potencial desarrollo de nuevas medidas de control de la enfermedad.

Desafíos a futuro

- La inclusión de controles lecheros menos espaciados en el tiempo es fundamental para modelar posibles patrones de RCS. Además de los promedios por lactancia, diferentes patrones de RCS están asociados a diferentes patógenos (de Haas y col., 2002). Esto presentaría una ventaja operativa y económica al momento de tomar decisiones de manejo, como también al momento de encarar un programa de mejoramiento genético.
- La información generada en este estudio proveerá las bases para estudios de vías metabólicas: Los resultados de las regiones cromosómicas conteniendo genes, que aparecen como asociadas con la resistencia a mastitis, podrán ser utilizados para inferir grupos de genes funcionalmente relacionados y que complementarán el estudio de asociación. Del mismo modo, se estudiarán los ARN mensajeros provenientes de CS obtenidas de animales sometidos a una infección experimental por *S. aureus*. En este estudio se identificarán genes diferencialmente expresados durante la infección con el fin de aportar información sobre los mecanismos moleculares implicados en la respuesta Inmune.
- Generar un sistema de evaluación genómico es una herramienta de la que, hoy en día, no se puede prescindir para lograr eficiencia en la producción lechera. Este trabajo apunta a sentar bases para desarrollar un programa de mejoramiento a nivel regional, con acceso a información libre para ser usado por los productores y criadores. El desarrollo de bases de datos y rutinas de análisis de este trabajo son escalables a la escala de selección genómica, por lo cual solo resta contar con una población de referencia confiable para poder implementar este sistema de selección.

Bibliografía

Abdel-Shafy, H., Bortfeldt, R.H., Tetens, J., Brockmann, G.A., 2014. Single nucleotide polymorphism and haplotype effects associated with somatic cell score in German Holstein cattle. *Genet. Sel. Evol.* 46, 35.

Akira S, Takeda K. 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol.* 327:581-9. Review.

Alain K, Karrow NA, Thibault C, St-Pierre J, Lessard M, Bissonnette N. 2009. Osteopontin: an early innate immune marker of *Escherichia coli* mastitis harbors genetic polymorphisms with possible links with resistance to mastitis. *BMC Genomics.* 10.

Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 87:468-75.

Auldism MJ, Coats S, Rogers GL, McDowell GH. 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Aust J Exp Agr.* 35:427-436.

Baes C, Brand B, Mayer M, Kühn C, Liu Z, Reinhardt F, Reinsch N. 2009. Refined positioning of a quantitative trait locus affecting somatic cell score on chromosome 18 in the German Holstein using linkage disequilibrium. *J Dairy Sci.* 8:4046-54.

Bagnicka E, Strzalkowska N, Flisikowski K, Szreder T, Jóźwik A, Prusak B, Krzyzewski J, Zwierzchowski L. 2007. The polymorphism in the beta4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. *J Anim Breed Genet.* 124:150-6.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:463-72.

Bannerman DD, Springer HR, Paape MJ, Kauf AC, Goff JP. 2008. Evaluation of breed-dependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Dairy Res.* 75:291-301.

Banos G, Shook GE. 1990. Genotype by environment interaction and genetic correlations among parities for somatic cell count and milk yield. *J Dairy Sci.* 73:2563.

Banos G, Woolliams JA, Woodward BW, Forbes AB, Coffey MP. 2008. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *J Dairy Sci.* 91:3190-200.

Barkema HW, Shaken YH, Lam TJ, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 81: 411-419.

Bennewitz J, Reinsch N, Paul S, Looft C, Kaupe B, Weimann C, Erhardt G, Thaller G, Kühn Ch, Schwerin M, Thomsen H, Reinhardt F, Reents R, Kalm E. 2004. The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *J Dairy Sci.* 87:431-42.

Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. 1983. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem.* 258:7714-20.

Blood DC, Radostits OM, Arundel JH, Gay CC. 1992. *Medicina Veterinaria: libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino.* 7^a ed. México DF, MX. Interamericana McGraw-Hill. v. 2, pp. 539-602.

Blott S, Kim JJ, Moisisio S, Schmidt-Küntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisart B, Johnson D, Karim L, Simon P, Snell R, Spelman R, Wong J, Vilkki J, Georges M, Farnir F, Coppieters W. 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genet.* 163:253-66.

- Boettcher PJ, Hansen LB, VanRaden PM, Ernst CA. 1992. Genetic evaluation of Holstein bulls for somatic cells in milk of daughters. *J Dairy Sci.* 75:1127.
- Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Levéziel H. 2003 Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet Sel Evol.* 35:77-101.
- Boutet P, Bureau F, Degand G, Lekeux P. 2003. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J Dairy Sci.* 86:3430-9.
- Brand B, Baes C, Mayer M, Reinsch N, Kühn C. 2009. Identification of a two-marker-haplotype on *Bos taurus* autosome 18 associated with somatic cell score in German Holstein cattle. *BMC Genet.* 10:50.
- Bray DR, Shearer JK. 1993. *Milking management II – Mastitis.*, US. University of Florida, Florida Cooperative Extension Service.
- Breier BH. 1999. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:209–218.
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNP. *Gene.* 234:177-86. Review.
- Browning BL and Browning SR. 2009. A unified approach to genotype imputation and haplotype phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am J Hum Genet.* 84:210-223.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. 1972. Iron binding proteins and infection. *Br J Haematol.* 23:389-92. Review.
- Burvenich C, Paape MJ, Hoeben D, Dosogne H, Massart-Leën AM, Blum J. 1999. Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest Anim Endocrinol.* 17:149-159.
- Butt E, Geiger J, Jarchau T, Lohmann S M, Walter U. 1993. The cGMP-dependent protein kinase - gene, protein, and function. *Neurochem Res.* 18:27-42

Calvinho LF, Vitulich CA, Zurbriggen MA, Canavesio VR, Tarabla HD. 1991. Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios* 18:188-196.

Calvinho LF. 1992. Parámetros sanitarios. Conteo de células somáticas, métodos, valor predictivo. ProCaLe. Inf. Técnica No. 8. pp. 5 y en Resúmenes de Jornadas Técnicas 1992-1993 del ProCaLe, Centro Regional Santa Fe, EEA Rafaela.

Calvinho LF. 1999. Análisis de leche de tanque de frío. Actas de X Jornadas de Salud Animal, Esperanza Santa Fe. pp 1-6.

Calvinho LF. 2001. 40th Ann. Meet. Natl. Mastitis Council-Reno, Nevada, pp 199-200.

Calvinho LF, Tirante L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE Sección Cs. Vet.* 4:29-40.

Calvo JH, Martinez-Royo A, Silveri L, Floriot S, Eggen A, Marcos-Carcavilla A, Serrano M. 2006. Isolation, mapping and identification of SNP for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on chromosome 3. *Cytogenet Genome Res.* 114:39-43.

Casas E, Snowden GD. 2008. A putative quantitative trait locus on chromosome 20 associated with bovine pathogenic disease incidence. *J Anim Sci.* 86:2455–2460

Castoldi E, Hackeng TM. 2008. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol.* 15:529-36.

Chaves, C.J., L. Tirante, y R. Chertcoff. 1996. Prevalencia de infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus* en vaquillonas preparto. In: Mem. Cong. Nac. Cal. de Leche y Mast. Río Cuarto. P 28.

Chen R, Yang Z, Ji D, Mao Y, Chen Y, Li Y, Wu H, Wang X, Chang L. 2011. Polymorphisms of the IL8 gene correlate with milking traits, SCS and mRNA level in Chinese Holstein. *Mol Biol Rep.* 38:4083-8.

Chertcoff R, Tirante L, Chaves CJ, La Monna N, Oliveri R. 1996. Relevamiento de infecciones mamarias en tambos de distintas cuencas lecheras del país. En Memorias del Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. Río Cuarto, 7-9 de Noviembre. Póster 26.

Childs S, Ling V. 1994. The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol* 21–36

Clark AG. 2004. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol*. 27:321–333

Coffey EM, Vinson WE, Pearson RE. 1985. Heritabilities for lactation average of somatic cell counts in first, second, and third or later parities. *J Dairy Sci*. 68:3360.

Cohen M, Seroussi E, Band M R, Lewin H A, Drackley J K, Larkin D M, Everts-van der Wind A, Heon-Lee J, Loor, J J, Shani M. 2004. SPP1 is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein 29th International Conference on Animal Genetics ISAG, Tokyo, Japan.

Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loor JJ, Everts-van der Wind A, Lee JH, Drackley JK, Band MR, Hernandez AG, Shani M, Lewin HA, Weller JI, Ron M. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res*. 15:936-944.

Cole JB, VanRaden PM, O'Connell JR, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Schnabel RD. 2009. Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *J Dairy Sci*. 92:2931–2946.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 8:1229–1231.

Dabdoub SAM. 1984. Genetic and phenotypic relationships among mastitis, somatic cell concentration and milk yield. Ph.D. Dis., Univ. Wisconsin, Madison.

Daetwyler HD, Schenkel FS, Sargolzaei M, Robinson JA. 2008. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J Dairy Sci*. 91:3225-36.

- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10:68–91.
- Day-Williams A G. 2009. Generic Genetic Studies Database (GGSD), Users Manual & Tutorial.
- de Haas, Y, Barkema, HW, Veerkamp, RF. 2002. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve of somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 85: 1314-1323.
- de Haas Y, Ouweltjes W, ten Napel J, Windig JJ, de Jong G. 2008. Alternative somatic cell count traits as mastitis indicators for genetic selection. *J. Dairy Sci.* 91, 2501–2511.
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. 2005. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 573:111-35.
- de Roos APW, Hayes BJ, Spelman RJ, Goddard ME. 2008. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genet.* 179:1503-1512.
- Dekkers JCM. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci.* 82:E313-328.
- Denis M, Wedlock DN, Lacy-Hulbert SJ, Hillerton JE, Buddle BM. 2009. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? *N Z Vet J.* 57:132-140
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME. 1997. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 80:406-12.
- Dohoo IR, Leslie KE. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev Vet Med.* 10:225-237.
- Dohoo IR, Meek AH. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J.* 23:119-125.
- Dohoo IR, Martin WS, Meek AH, Sandals WCD. 1983. Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows. I. The data. *Prev Vet Med* 1:321-334.
- Drake NM, Park YJ, Shirali AS, Cleland TA, Soloway PD. 2009. Imprint switch mutations at *Rasgrf1* support conflict hypothesis of imprinting and define a growth control mechanism upstream of IGF1. *Mamm Genome.* 20:654–63.

Elsik CG, Tellam RL, Worley KC and The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Sci.* 324:522-8.

Erskine RJ. 2004. Philosophical approach to antibiotic therapy: know the cow, bug and drug. In: *Proc. 43rd Annual Meeting National Mastitis Council.* Pág. 8-11.

Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer SB, Campbell MA. 1988. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J Am Vet Medic Assoc.* 192:761-765.

Evans R, Berry D. 2005. Genetics of Udder Health in Ireland. Report by the Irish Cattle Breeding Federation.

Falconer DS. 1989. *Introduction to Quantitative Genetics.* 3rd ed. Longman, Inc., New York, NY.

Fiddy S, Cattermole D, Xie D, Yuan Duan X, Mott R. 2006. An integrated system for genetic analysis. *BMC Bioinf.* 7:210

Filippesen LF, Valentin-Weigand P, Blobel H, Preissner KT, Chhatwal GS. 1990. Role of complement S protein (vitronectin) in adherence of *Streptococcus dysgalactiae* to bovine epithelial cells. *Am J Vet Res.* 51:861-5.

Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Beretti F, Dall'Olio S, Davoli R, Russo V. 2007. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds Italian. *J Anim Sci.*6:415-420.

Fox LK, Gay JM. 1993. Contagious mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9:475.

Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS, Arnold CS. 1994. Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endoc.* 135:2228–2239.

Galvão KN, Pighetti GM, Cheong SH, Nydam DV, Gilbert RO. 2011. Association between interleukin-8 receptor-a (CXCR1) polymorphism and disease incidence, production, reproduction, and survival in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 94:2083-91.

Gastaldi L, Litwin G, Maekawa M, Centeno A, Engler P, Cuatrin A, Chimicz J, Ferrer J L, Suero M. 2015. El tambo argentino: Una mirada integral a los sistemas de producción de leche de la Región Pampeana. Informe técnico INTA EEA Rafaela.

Gillanders EM, Masiello A, Gildea D, Umayam L, Duggal P, Jones MP, Klein AP, Freas-Lutz D, Ibay G, Trout K, Wolfsberg TG, Trent JM, Bailey-Wilson JE, Baxevanis AD. 2004. GeneLink: a database to facilitate genetic studies of complex traits. *BMC Genom.* 5:81

Goddard M, Hayes B. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat. Rev. Genet.* 10:381–391.

Green MJ, Green LE, Shaken YH, Bradley AJ, Peeler EJ, Barkema HW, de Haas Y, Collis VJ, Medley GF. 2004. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J.Dairy Sci.* 87, 1256–1264.

Grisart B, Coppeters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12:222-31.

Günther J, Koczan D, Yang W, Nürnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 40:31–44.

Haeggström JZ, Wetterholm A, Vallee BL, Samuelsson B. 1990. Leukotriene A4 hydrolase: an epoxide hydrolase with peptidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:431-7.

Harmon RJ. 2001. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.

Hayes BJ, Goddard ME. 2001. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genet Sel Evol.* 33(3):209-29.

Hayes BJ, Goddard ME. 2010. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. *Genome.* 53(11):876-83.

- Henderson CR. 1984. Application of linear models in animal breeding. University of Guelph. Guelph, Ontario.
- Heringstad B, Klemetsdal G and Ruane J. 2000. Selection for mastitis in dairy cattle: a review with focus on the situation of the Nordic countries. *Livestock Production Science* 64: 95-106
- Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67–113.
- Hill WG, Robertson A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet.* 38:226–231.
- Hillerton JE, Bramley AJ, Staker RT, McKinnon CH. 1995. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J Dairy Res.* 62:39-50.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 6:95–108.
- Hoeben D, Burvenich C, Eppard PJ and Hard DL. 1999. Effect of recombinant bovine somatotropin on milk production and composition of cows with *Streptococcus uberis* mastitis. *J. Dairy Sci.* 82: 1671-1683.
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. 2003. Collections and ficolins: Hmoral lectins of the innate immune defense. *Ann Rev Immunol.* 21:547-78.
- Hossner KL, McCusker R H, Dodson MV. 1997. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Anim. Sci.* 64:1–15.
- Hu ZL, Park CA, Reecy JM. 2015 Developmental progress and current status of the Animal QTLdb. *Nucleic Acids Res.* pii: gkv1233.
- Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev.* 230:9-21.
- Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.*20:197–216.

- Jenne DE, Tschopp J. 1992. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci.* 17:154–159.
- Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. 2007. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus*. *J Anim Sci.* 82:39-46.
- Kehrli ME, Shuster DE. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 77:619-627.
- Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrli ME, Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH. 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 80:1767–1775.
- Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM, Rosa GJ. 2007. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *J Dairy Sci.* 90:2966-70.
- Klug A, Rhodes D. 1987. "Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 473–82.
- Klug A. 1999. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J Mol Biol.* 293:215–8.
- Koeck A, Miglior F, Kelton DF, Schenkel FS. 2012. Alternative somatic cell count traits to improve mastitis resistance in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 95,432–439.
- Komisarek J, Dorynek Z. 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet.* 50: 125–132.
- Krum SA, Womack JE, Lane TF. 2003. Bovine BRCA1 shows classic responses to genotoxic stress but low in vitro transcriptional activation activity. *Oncogene* 22:6032–6044.
- Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ. 2006. Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 1072:19-27. Review.
- Kühn Ch, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Brockmann GA, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R,

Russ I, Averdunk G, Blümel J, Kalm E. 2003. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci.* 86:360-8.

Lambert JC, Grenier-Boley B, Harold D, Zelenika D, Chouraki V, Kamatani Y, Slegers K, Ikram MA, Hiltunen M, Reitz C, Mateo I, Feulner T, Bullido M, Galimberti D, Concari L, Alvarez V, Sims R, Gerrish A, Chapman J, Deniz-Naranjo C, Solfrizzi V, Sorbi S, Arosio B, Spalletta G, Siciliano G, Epelbaum J, Hannequin D, Dartigues JF, Tzourio C, Berr C, Schrijvers EM, Rogers R, Tosto G, Pasquier F, Bettens K, Van Cauwenberghe C, Fratiglioni L, Graff C, Delepine M, Ferri R, Reynolds CA, Lannfelt L, Ingelsson M, Prince JA, Chillotti C, Pilotto A, Seripa D, Boland A, Mancuso M, Bossù P, Annoni G, Nacmias B, Bosco P, Panza F, Sanchez-Garcia F, Del Zompo M, Coto E, Owen M, O'Donovan M, Valdivieso F, Caffarra P, Scarpini E, Combarros O, Buée L, Champion D, Soininen H, Breteler M, Riemenschneider M, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Trégouët DA, Williams J, Amouyel P. 2013. Genome-wide haplotype association study identifies the FRMD4A gene as a risk locus for Alzheimer's disease. *Mol Psych.* 18:461-70.

Lande R, Thompson R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genet.* 124:743-756.

Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. 1998. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8:769-76.

Leonard S, Khatib H, Schutzkus V, Chang YM, Maltecca C. 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 88:4083–4086.

Leyva-Baca I, Schenkel F, Sharma BS, Jansen GB, Karrow NA. 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins. *Anim. Genet.* 38:198-202.

Leyva-Baca I, Schenkel F, Martin J, Karrow NA. 2008. Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. *J Dairy Sci.* 91:407-17.

- Linzell JL, Peaker M. 1971. Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.* 216: 683-700
- Liu YX, Xu CH, Gao TY, Sun Y. 2012. Polymorphisms of the ATP1A1 gene associated with mastitis in dairy cattle. *Genet Mol Res.* 11:651.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22:307-12. Review.
- Longeri M, Polli M, Strillacci MG, Samore AB, Zanotti M. 2006. Short communication: quantitative trait loci affecting the somatic cell score on chromosomes 4 and 26 in Italian Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 89:3175–3177.
- Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci* 84(ESuppl): E113–E119.
- Lucy MC. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulinlike growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 43(Suppl. 2), 31–39.
- Lund MS, Jensen J, Petersen PH. 1999. Estimation of Genetic and Phenotypic Parameters for Clinical Mastitis, Somatic Cell Production Deviance, and Protein Yield in Dairy Cattle Using Gibbs Sampling. *J. Dairy Sci.* 82:1045–51.
- Lund MS, Sahana G, Andersson-Eklund L, Hastings N, Fernandez A, Schulman N, Thomsen B, Viitala S, Williams JL, Sabry A, Viinalass H, Vilkki J. 2007 Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three Nordic dairy cattle breeds. *J Dairy Sci.* 90:5282-90.
- Lund T, Miglior F, Dekkers JCM, Burnside EB. 1994. Genetic relationships between clinical mastitis, somatic cell count, and udder conformation in Danish Holsteins. *Livest Prod Sci.* 39:243-251.

Lundén A, Sigurdardóttir S, Edfors-Lilja I, Danell B, Rendel J, Andersson L. 1990. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Anim Genet* 21:221-32.

Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res.* 2:4-18.

Magee DA, Sikora KM, Berkowicz EW, Berry DP, Howard DJ, Mullen MP, y col.,. 2010. DNA sequence polymorphisms in a panel of eight candidate bovine imprinted genes and their association with performance traits in Irish Holstein-Friesian cattle. *BMC Genetics.* 11:93.

Matsuo-Takasaki M, Lim JH, Beanan MJ, Sato SM, Sargent TD. 2000. Cloning and expression of a novel zinc finger gene, *Fez*, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos. *Mech Dev.* 93(1-2):201-4.

Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF,. 2009. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS ONE* 4(4).

Meredith BK, Berry DP, Kearney F, Finlay EK, Fahey AG, Bradley DG, Lynn DJ. 2013. A genome-wide association study for somatic cell score using the Illumina high-density bovine beadchip identifies several novel QTL potentially related to mastitis susceptibility. *Front Genet* 4, 229.

Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genet.* 157:1819-1829.

Meyer K. 2007. WOMBAT: a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *J Zhejiang Univ Sci B.* 8:815–821.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Sci.* 266:66-71.

- Monardes HG, Kennedy BW, Moxley IE. 1983. Heritabilities of measures of somatic cell count per lactation. 1. Dairy Sci. 66:1707
- Morozova O, Marra MA. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics. 92:255-64.
- Mrode RA, Swanson GJT. 1996. Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. Anim Breed Abstracts. 64:847-857.
- Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Giblin L, Kenny LA, Magee DA, Meade KG, Waters SM. 2011. Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. Front. Gene. 2:3.
- Munro GL, Grieve PA, Kitchen BJ. 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. Aust J Dairy Tech. 39:7.
- Neale B, Ferreira M, Medland S, Posthuma D. 2008. Statistical Genetics. Taylor and Francis Group, New York, USA. pp. 100-109.
- Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci 52(5):696–707
- Nickerson SC, Boddie RL. 1994. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. J Dairy Sci. 77:2526–2536.
- Nuijens JH, van Berkel PH, Schanbacher FL. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1:285-95. Review.
- Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. Anim Genet. 40:832-51.
- Oliver SP, Calvinho LF. 1995. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. J Anim Sci. 73:18-33.

Olsen HG, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg PR, Sundaasen KK, Svendsen M, Meuwissen TH. 2005. Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genet.* 169:275-283

Oltenu PA, Broom DM. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim Welf.* 19:39–49.

Osteras O, Solbu H, Refsdal AO, Roalkvam T, Filseth O, and Minsaas A. 2007. Results and evaluation of thirty years of health recordings in the Norwegian dairy cattle population. *J Dairy Sci.* 90: 4483-4497

Pant SD, Schenkel FS, Leyva-Baca I, Sharma BS, Karrow NA. 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in bovine CARD15 and their associations with health and production traits in Canadian Holsteins. *BMC Genomics.* 15;8:421.

Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J. Vet. Sci.* 5:29–39.

Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC 3rd. 1989. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.* 170:145-161.

Partridge SR, Baker MS, Walker MJ, Wilson MR. 1996. Clusterin, a putative complement regulator, binds to the cell surface of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Infect. Immun.* 64:4324-4329.

Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 167:1547-59.

Philpot WN. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. En: *Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad*

Higiénica de Leche de Pequeños Productores. Osorno, CL. 6-8 Dic. 1999. U.Chile, Fac.Cs.Veterinarias y Pecuarias, UFOCO S.A. p.49-84.

Pighetti GM, Elliott AA. 2011. Gene polymorphisms: the keys for marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16:421-32.

Plath A, Einspanier R, Gabler C, Peters F, Sinowatz F, Gospodarowicz D, Schams D. 1998. Expression and localization of members of the fibroblast growth factor family in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*. 81:2604–2613.

Podolin PL, Bolognese BJ, Foley JJ, Schmidt DB, Buckley PT, Widdowson KL, Jin Q, White JR, Lee JM, Goodman RB, Hagen TR, Kajikawa O, Marshall LA, Hay DW, Sarau HM. 2002. A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. *J Immunol*. 169:6435-44.

Poli M, Roldán D. 2009. El impacto de la selección genética sobre la calidad de leche. Memorias de las Terceras Jornadas internacionales de calidad de leche. pp31-39, Vicénte Lopez, Buenos Aires, 26 al 28 de marzo de 2009.

Preissner KT. 1989. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. *Blut* 59, 419–431.

Pryce JE, Nielsen BL, Veerkamp RF, Simm G. 1999. Genotype and feeding system effects and interactions for health and fertility traits in dairy cattle. *Livest Prod Sci*. 57:193-201.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 81:559-75.

Rahmatalla S, Müller U, Strucken E, Reissmann M, Brockmann G. 2011. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *J Appl Genetics*. 52:459–465.

- Rincon G, Weber KL, Van Eenennaam AL, Golden BL, Medrano JF. 2011. Hot topic: performance of bovine high-density genotyping platforms in Holsteins and Jerseys. *J Dairy Sci*, 94:6116-6121
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci*. 84:1077-84.
- Risch N, Merikangas K. 1996. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. *Sci*. 273:1516–1517.
- Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Heyen DW, Lewin HA. 2002. Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85:3081–3091.
- Ron M, Feldmesser E, Golik M, Tager-Cohen I, Kliger D, Reiss V, Domochofsky R, Alus O, Seroussi E, Ezra E, Weller JI. 2004. A complete genome scan of the Israeli Holstein population for quantitative trait loci by a daughter design. *J Dairy Sci*. 87:476–490.
- Ron M, Weller JI. 2007. From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. *Anim. Genet*. 38:429–439.
- Roosen S, Exner K, Paul S, Schröder JM, Kalm E, Looft C. 2004. Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm Genome*. 15:834-42.
- Rothschild MF, Skow L, Lamont SJ. 2000. Breeding for disease resistance in farm animals. Pages 73–105 en: *The Major Histocompatibility Complex and Its Role in Disease Resistance and Immune Responsiveness*. Axford RF, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB. ed. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Ruegg, P.L. and T. J. Tabone. 2000. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J Dairy Sci* 83:2805-2809.

- Rupp R, Boichard D. 1999. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *J Dairy Sci.* 82:2198-2204.
- Rupp R, Boichard D. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res.* 34:671-88. Review.
- Rupp R, Hernandez A, Mallard BA. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci.* 90:1029-38.
- Sander-Nielsen U, Pedersen GA, Pedersen J and Sørensen P. 1999. Genetic variation in disease traits and their relationships with survival in Danish dairy cattle. *Interbull, Bulletin* 21: 170-177
- Sargolzaei M, Schenkel FS, Jansen GB, Schaeffer LR. 2008. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. *J Dairy Sci.* 91:2106-2117.
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. 1971. Milk formation, composition and alteration in mastitis, pp. 72-93. In: *Bovine mastitis*. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci.* 80:1833-1840.
- Schnabel RD, Kim JJ, Ashwell MS, Sonstegard TS, VanTassell CP, Connor EE, Taylor JF. 2005. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. *Proc Natl Ac Sci USA.* 102:6896–6901.
- Schrooten C, Bovenhuis H, Coppieters W, van Arendonk JA. 2000. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 83:795-806.
- Schukken YH, Grommers FJ, Brand A, Van de Geer D. 1989. Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. *Vet Rec.* 125:60-63.

Schukken YH. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidem Infect.* 130:335-349.

Schutz, M.M., Hansen, L.B., Steuernagel, G.R., Reneau, J.K. and Kuck, A.L. 1990. Genetic parameters for somatic cells, protein, and fat in milk of Holsteins. *J Dairy Sci.* 73:494-502.

Schwenger B, Schöber S, Simon D. 1993. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics* 16:241–244.

Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet.* 29:185-93.

Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA. 2006. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 89:3626-35.

Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview Asian-Australasian. *J Anim Sci.* 24:429–438

Shook GE. 1982. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. *Proc Natl Mastitis Council*, p. 150-166.

Shook GE, Schutz MM. 1994. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *J Dairy Sci.* 77:648-58. Review.

Shrimpton AE, Robertson A. 1988. The isolation of polygenic factors controlling bristle score in *Drosophila melanogaster*. II. Distribution of third chromosome bristle effects within chromosome sections, *Genet* 118:445-459.

Shuster DE, Kehrlí ME Jr, Ackermann MR, Gilbert RO. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9225–9229.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 34:475–491.

- Silkensen JR, Schwochau GB, Rosenberg ME. 1994. The role of Clusterin in tissue injury. *Biochem Cell Biol* 72:483–488.
- Sjoholm AG, Jonsson G, Braconier JH, Sturfelt G, Truedsson L. 2006. Complement deficiency and disease: an update. *Mol. Immunol.* 43:78–85.
- Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris JG. 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 99:6434–6439.
- Smith KL, Hogan JS. 1993. Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Ani Pract.* 9:489-498.
- Snelling WM, Casas E, Stone RT, Keele JW, Harhay GP, Bennett GL, Smith TP. 2005. Linkage mapping bovine EST-based SNP. *BMC Genomics.* 6:74.
- Sodeland M, Kent MP, Olsen HG, Opsal MA, Svendsen M, Sehested E, Hayes BJ, Lien S. 2011. Quantitative trait loci for clinical mastitis on chromosomes 2, 6, 14 and 20 in Norwegian Red cattle. *Anim Genet* 42, 457–465.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.* 80:1851-65. Review.
- Sørensen LP, Madsen P, Mark T, Lund MS. 2009. Genetic parameters for pathogen-specific mastitis resistance in Danish Holstein Cattle. *Anim.* 3:647-56.
- Stone RT, Casas E, Smith TP, Keele JW, Harhay G, Bennett GL, Koohmaraie M, Wheeler TL, Shackelford SD, Snelling WM. 2005. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J Anim Sci.* 83:2280-8.
- Storey JD, Tibshirani R. 2003. Statistical significance for genome-wide experiments. *Proc Nat Ac Sci USA.* 100:9440-9445.

Sugimoto M, Fujikawa A, Womack JE, Sugimoto Y. 2006. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(17):6454-9.

Sugimoto M, Itoh T, Gotoh Y, Kawahara T, Moriya H, Uchimura Y, Sugimoto Y. 2011. Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a FEZL p.Gly105(12_13) polymorphism. *J Dairy Sci*. 94:2103-7.

Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, Singh K. 2009. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J Dairy Sci*. 92:117-29.

Taub DD, Murphy WJ, Longo DL. 2010. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 10:408–24.

Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. 2005. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis*. 7:S408–415.

Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res* 16:97–105.

Timms LL, Schultz LH. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci*. 70:2648–2657.

Tirante L, Bas D, Po ML, Olivieri R, Vandoni R, Chaves J. 1998. Prevalencia y etiología de infecciones intramamarias en vacas de 38 rodeos lecheros en Argentina. En: Seminario Internacional Capacitagro. Obtención de leche de calidad. Pergamino, Argentina. 14-18 de Julio. Pp. 105-106.

Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, Wang Y, Spoonde AY, Koehler RT, Peyret N, Chen C, Broomer AJ, Ridzon DA, Zhou H, Hoo BS,

Hayashibara KC, Leong LN, Ma CN, Rosenblum BB, Day JP, Ziegle JS, De La Vega FM, Rhodes MD, Hennessy KM, Wenz HM. 2005. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech.* 16:398-406

Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. 1995. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 78:2366-2374.

Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. 1993. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol.* 151:2159-65.

Tunzi CR, Harper PA, Bar-Oz B, Valore EV, Semple JL, Watson-MacDonell J, Ganz T, Ito S. 2000. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr Res.* 48:30-5.

Uribe HA, Kennedy BW, Martin SW, Kelton DF. 1995. Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows. *J Dairy Sci.* 78:421-430.

Urioste JI, Franzén J, Strandberg E. 2010. Phenotypic and genetic characterization of novel somatic cell count traits from weekly or monthly observations. *J. Dairy Sci.* 93, 5930–5941.

Urioste JI, Franzén J, Windig JJ, Strandberg E. 2012. Genetic relationships among mastitis and alternative somatic cell count traits in the first lactations of Swedish Holsteins. *J Dairy Sci.* 95:3428–3434.

Van Dorp TE, Dekkers JCM, Martin SW, Noordhuizen JPTM. 1998. Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows. *J Dairy Sci.* 81:2264-2270.

Vandeputte-Van MG, Burvenich C, Roets E, Massart-Leen AM. 1993. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Res.* 60:19-29.

Verschoor CP, Pant SD, Schenkel FS, Sharma BS, Karrow NA. 2009. SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls. *Mamm Genome.* 20:447–54.

- Vignal A, Milan D, San Cristóbal M, Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34:275-305.
- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotech.* 27:486-493.
- Viitala S, Szyda J, Blott S, Schulman N, Lidauer M, Mäki-Tanila A, Georges M, Vilkki J. 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genet.* 173:2151–2164.
- Waage S, Sviland S, Odegaard SA. 1998. Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 81:1275-1284.
- Wang C, Liu M, Li Q, Ju Z, Huang J, Li J, Wang H, Zhong J. 2011. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. *Vet Immunol Immunopathol.* 139:229-36.
- Wang X, Xu S, Gao X, Ren H, Chen J. 2007. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *J Genet Genomics.* 34:406-12.
- Wang X, Maltecca C, Tal-Stein R, Lipkin E, Khatib H. 2008. Association of Bovine Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Gene with Milk Fat and Productive Life: An Example of the Ability of the Candidate Pathway Strategy to Identify Quantitative Trait Genes. *J Dairy Sci.* 91:2475–2480.
- Wang Z, Huang J, Zhong J, Wang G. 2012. Molecular cloning, promoter analysis, SNP detection of Clusterin gene and their associations with mastitis in Chinese Holstein cows. *Mol Biol Rep.* 39:2439-45.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. *Nature Rev Genet.* Vol. 10.
- Waters SM, McCabe MS, Howard DJ, Giblin L, Magee DA, MacHugh DE, Berry DP. 2010. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Anim Genet.* 42:39–49.

- Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S. 2002. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukocyte Biol.* 72:752-761.
- Weller JI, Saran A, Zeliger Y. 1992. Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 75:2532-40.
- Wiggans GR, Vanraden PM, Cooper TA. 2011. The genomic evaluation system in the United States: past, present, future. *J Dairy Sci.* 94:3202-11.
- Wijga S, Bastiaansen JW, Wall E, Strandberg E, de Haas Y, Giblin L, Bovenhuis H. 2012. Genomic associations with somatic cell score in first-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 95, 899–908.
- Wilson MR, Easterbrook-Smith SB. 1992. Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG. *Biochem Biophys Acta.* 1159:319–32.
- Wojdak-Maksymiec K, Kmiec M, Ziemak J. 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Vet Med.* 51: 14–20.
- Xu J, Wang B, Zhang Y, Li R, Wang Y, Zhang S. 2012. Clinical implications for BRCA gene mutation in breast cancer. *Mol Biol Rep.* 39:3097-102.
- Yang Y, Li Q, Ju Z, Huang J, Zhou L, Li R, Li J, Shi F, Zhong J, Wang C. 2012. Three novel single-nucleotide polymorphisms of complement component 4 gene (C4A) in Chinese Holstein cattle and their associations with milk performance traits and CH50. *Vet Immunol Immunopathol.* 145:223-32.
- Youngerman SM, Saxton AM, Oliver SP, Pighetti GM. 2004. Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 87:2442-8.
- Yu SP. 2003. Na⁺, K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66:1601-1609.

Yuan Z, Chu G, Dan Y, Li J, Zhang L, Gao X, Gao H, Li J, Xu S, Liu Z. 2012. BRCA1: a new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphisms and milk somatic cell score. *Mol Biol Rep.* 39:6625-31.

Yuan ZR, Li J, Liu L, Zhang LP, Zhang LM, Chen C, Chen XJ, Gao X, Li JY, Chen JB, Gao HJ, Xu SZ. 2011. Single nucleotide polymorphism of CACNA2D1 gene and its association with milk somatic cell score in cattle. *Mol Biol Rep.* 38:5179–5183.

Yue W, Fang X, Zhang C, Xu H, Gu C, Shao R, Chen H. 2010. Two novel SNPs of the ABCG2 gene and its associations with milk traits in Chinese Holsteins. *Mol Biol Rep.* 38:2927–2932.

Zhang LP, Gan QF, Ma TH, Li HD, Wang XP, Li JY, Gao X, Chen JB, Ren HY, Xu SZ. 2009. Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCS in dairy cattle. *Anim Biotechnol.* 20:87-95.

Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Ernst C, Eggen A, Murkve B, Pfister-Genskow M, Witte LA, Grignola FE, Uimari P, Thaller G, Bishop MD. 1998. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genet.* 149:1959–1973.

Zhang WC, Dekkers JCM, Banos G, Burnside EB. 1994. Adjustment of factors and genetic evaluation for somatic cell score and relationships with other traits of Canadian Holsteins. *J Dairy Sci.* 77:659-665.

Zhao HD, Nettleton JC, Dekkers M. 2007. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *Genet Res.* 89:1–6.

Zhu J, Paul WE. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 112:1557–69.

Zipfel PF, Reuter M. 2009. Complement activation products C3a and C4a as endogenous antimicrobial peptides. *Int J Pept Ther.* 15:87–95.