

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ASOCIACION DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES TLR4 Y
LACTOFERRINA CON LA PRESENTACION DE MASTITIS EN
REBAÑOS LECHEROS DE LA REGION DE LOS LAGOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAOLO CESAR HUIRCAN HIDALGO

TEMUCO – CHILE
2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ASOCIACION DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES TLR4 Y
LACTOFERRINA CON LA PRESENTACION DE MASTITIS EN
REBAÑOS LECHEROS DE LA REGION DE LOS LAGOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

PAOLO CESAR HUIRCAN HIDALGO

PROFESOR GUIA: ANDRES MARCELO CARVAJAL ROMERO

TEMUCO – CHILE
2012

ASOCIACION DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES TLR4 Y LACTOFERRINA CON LA PRESENTACION DE MASTITIS EN REBAÑOS LECHEROS DE LA REGION DE LOS LAGOS.

PROFESOR GUIA

: Andrés Marcelo Carvajal Romero
Bioquímico, Doctor en Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biotecnología,
Centro Regional de Investigación Remehue,
Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

PROFESORES CONSEJEROS

: Néstor Gastón Sepúlveda Becker
Médico Veterinario, Mg. en Cs, Reproducción
Animal, Doctor en Medicina Veterinaria
Departamento de Producción Agropecuaria.
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales.
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Generalidades de la mastitis	3
2.2	Métodos de diagnóstico de mastitis	5
2.3	Inmunología de la glándula mamaria bovina	7
2.4	Genes candidatos para la resistencia o susceptibilidad a mastitis	10
3	HIPOTESIS	14
4	OBJETIVOS	15
4.1	Objetivo general	15
4.2	Objetivos específicos	15
5	MATERIALES Y METODOS	16
5.1	Diseño experimental	16
5.2	Material biológico	16
5.3	Extracción de DNA	17
5.4	Cuantificación de DNA	17
5.5	Diseño de primers e identificación de sitios de restricción	17
5.6	Genotipado mediante PCR-RFLP y qPCR-HRM	18
5.7	Análisis genético	20
5.8	Análisis estadístico	20
6	RESULTADOS	21
6.1	Parámetros productivos y sanitarios de los rebaños	21
6.2	Determinación de genotipos	21
6.2.1	PCR-RFLP	21
6.2.2	qPCR-HRM	22
6.3	Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas	28
6.4	Análisis estadístico	31

7	DISCUSION	42
8	CONCLUSION	48
9	RESUMEN	50
10	SUMMARY	51
11	LITERATURA CITADA	52
12	ANEXOS	60

1. INTRODUCCION

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, en donde se produce una inflamación de ésta como respuesta a la invasión de diversos patógenos. La mastitis se puede presentar en grado subclínico o clínico, con alteraciones macroscópicas de la leche y síntomas palpables de la ubre y, a veces, de tipo sistémico. A nivel mundial, esta enfermedad aún causa las mayores pérdidas económicas en la industria lechera debido a una menor producción de leche, menor entrega en plantas, aplicación de tratamientos y reposición de animales. Por otra parte, el diagnóstico clásico de la enfermedad basado en el cultivo de bacterias *in vitro*, es tardío y a veces no lo suficientemente preciso para iniciar un tratamiento adecuado, disminuyendo la efectividad de la terapia.

Factores celulares y/o moleculares que participan en la detección de patógenos son actores claves en la generación de la respuesta inmune que acompaña la mastitis. Por ejemplo, factores celulares como los neutrófilos, los cuales migran a los sitios de infección para fagocitar y eliminar las bacterias invasoras. Algunos investigadores han planteado que los genes asociados con la función neutrófila serían marcadores genéticos putativos para resistencia a mastitis. Uno de estos genes corresponde al receptor tipo Toll (TLR), el cual comprende una familia de proteínas de membrana que participan en el reconocimiento de componentes celulares de patógenos. Durante la mastitis, TLR4 aumenta su expresión y su activación induce la respuesta inmune innata, la cual también conduce a una respuesta inmune adaptativa. TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) conservados de bacterias gram-negativas, regulando el estado de la inmunidad innata durante periodos con riesgo de infección. En bovinos, el gen TLR4 es altamente polimórfico y su expresión se ha asociado con infecciones intramamarias, pudiendo ser candidato para ser usado en selección asistida por marcadores moleculares (MAS) para aumentar la resistencia a mastitis en ganado lechero.

Otro factor que participa en la respuesta inmune asociada a patógenos es la glicoproteína Lactoferrina (Lf). Con varias funciones, Lf tiene propiedades bacteriostáticas y anti-inflamatorias. Durante la inflamación, Lf es secretada desde la superficie mucosal mamaria y desde neutrófilos activados, estimulando la adhesión y acumulación de neutrófilos. De esta forma concentraciones bajas de Lf aumentan el riesgo de mastitis, sugiriendo un efecto protector, al promover la salud de la glándula mamaria y disminuyendo la severidad y/o incidencia de mastitis.

En base a estos antecedentes, proponemos que polimorfismos en los genes de TLR4 y Lf podrían estar asociados con el tipo de presentación de mastitis en el ganado lechero.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades de la mastitis.

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria la cual se inflama como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de patógenos, principalmente bacterias, pero también micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Hasta ahora, la mastitis es uno de los problemas más costosos de la industria lechera, debido a la reducción en producción de leche, eliminación de leche anormal, menor entrega a planta, gastos en tratamientos y honorarios por la atención veterinaria, y la reposición de animales. Así, las mastitis causan entre un 40 a 50% de disminución en los márgenes económicos netos por vaca (Concha, 2008). Por otra parte, las plantas procesadoras de lácteos también incurren en pérdidas debidas a cambios perjudiciales en la composición de la leche, los cuales están asociados con reducciones en la producción (rendimiento) de queso y en la vida útil de los productos lácteos (Kerr and Wellnitz, 2003).

La mastitis se presenta o cursa en forma clínica o subclínica y en episodios agudos o crónicos; en la forma clínica se evidencian alteraciones macroscópicas de la leche (presencia de grumos, sangre, cambio de color) y síntomas palpables de la ubre (eritema, inflamación) y, a veces, de tipo sistémico en todo el animal, mientras que en la forma subclínica no hay signos visibles de enfermedad, pudiendo haber un aumento del recuento de células somáticas (RCS) en leche (Barkema *et al.* 2006). Además, el riesgo de adquirir la enfermedad puede aumentar por factores químicos, físicos, o traumáticos. Por esta razón, la mastitis puede ser considerada como una enfermedad multifactorial que incluye: 1) el bovino como hospedero; 2) el microorganismo como agente causal; y 3) el ambiente, el cual afecta a ambos, la vaca y el organismo causal (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

La distribución de los patógenos puede ser diferente entre los dos tipos de mastitis. En los casos clínicos puede ser por bacterias que están presentes solamente por un corto periodo de tiempo (*Escherichia coli*), mientras que en las mastitis subclínicas los patógenos pueden estar presentes por largos periodos de tiempo y solamente produciendo signos leves en la ubre (*Staphylococcus aureus*) (Concha, 2008). La infección por *S. aureus* es típicamente crónica, siendo capaz de sobrevivir en los neutrófilos y macrófagos. Aunque las mastitis subclínicas causan una importante disminución en la producción de leche, en el presente no hay medidas de control terapéutico, esto debido al difícil diagnóstico. Además, este cuadro de la enfermedad puede transformarse en crónico, el cual es caracterizado por una duración extendida de la infección de la glándula mamaria el cual compromete la anatomía y fisiología de los cuartos. Interesantemente, las mastitis crónicas podrían permanecer indefinidamente en una fase subclínica o alternar entre la forma clínica o subclínica, complicando el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

Las mastitis causadas por microorganismos se caracterizan por tres etapas: invasión patogénica, infección e inflamación. En la etapa de invasión, los microorganismos patógenos se mueven a través del canal de pezón, mientras que en la etapa de infección las bacterias se establecen dentro de la cisterna de la glándula donde se multiplican y se esparcen a través de todo el tejido de la glándula mamaria, dependiendo de la susceptibilidad del animal. En la etapa final, el proceso inflamatorio producto del reclutamiento de células somáticas (principalmente neutrófilos polimorfonucleares, PMN) da lugar a un aumento considerable en el RCS y siendo evidentes los correspondientes signos clínicos (Oviedo-Boyso *et al.* 2006; Kerr and Wellnitz 2003).

Las mastitis contagiosas son producidas por microorganismos cuyo hábitat principal es el canal del pezón o la piel externa del mismo. En este caso los contagios se producen durante el ordeño, destacando bacterias como *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Por su parte, las mastitis ambientales se producen por gérmenes cuyo hábitat es el medio ambiente que rodea a los animales, por ejemplo las camas, y el contagio se produce principalmente en el periodo entre

los ordeños aunque después puedan comportarse también como contagiosas durante el ordeño. Dentro de estos patógenos están los coliformes (*E. coli*, *Klebsiella*) o *Streptococcus uberis* y *dysgalactiae*. Las mastitis subclínicas son el principal reservorio de patógenos infecciosos mamarios, razón que obliga a conocer y estudiar la distribución de los modelos de sensibilidad que presentan las bacterias causantes de mastitis (Concha, 2008). Además, esas bacterias sobreviven en diferentes nichos ecológicos, difiriendo por lo tanto en su mecanismo de transmisión e infección y en la facilidad con la cual pueden ser controladas. Las situaciones de estrés (climáticas, nutricionales, etc.) suelen agravar los casos subclínicos.

2.2 Métodos de diagnóstico de mastitis.

La idoneidad de un método de detección para el diagnóstico de rutina depende de varios factores, como especificidad, sensibilidad, costo, tiempo de ensayo, y aplicabilidad a un gran número de muestras de leche. Además, es importante identificar el agente patógeno no sólo con fines de la terapia antimicrobiana a utilizar, sino también para supervisar y controlar la tasa de infección en las explotaciones agrícolas (Riffon *et al.* 2001).

El método clásico para la identificación de patógenos causantes de mastitis es el cultivo de bacterias *in vitro*, el cual utiliza una batería de test bioquímicos específicos pudiendo discriminar las bacterias a nivel de género y especie. Sin embargo, es una técnica muy laboriosa y lenta que requiere instalaciones, y dependiendo de la observación a veces subjetiva del evaluador. En los países nórdicos donde hace años existen programas de evaluación y control de mastitis, se han desarrollado métodos de identificación “al pie de la vaca”, es decir, con pequeños laboratorios ubicados muy próximos o en las lecherías mismas donde el diagnóstico de la bacteria se hace sólo hasta nivel de género: *Staphylococci* (*S. aureus*, *S. coagulasa* negativo), *Streptococci* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*) y Coliformes (*E. coli*, *Klebsiella sp.*). Además, este cultivo selectivo incluye un test simplificado de resistencia a penicilina el cual permite tener un resultado completo a las 48 hrs. (Concha, 2008). El test de resistencia a la

penicilina tiene gran importancia en el tratamiento exitoso de la mastitis pues el uso frecuente de antibióticos de amplio espectro es considerado como un factor de riesgo para la aparición de *S. aureus* resistente a todos los antibióticos. Actualmente las terapias para mastitis dependen en gran medida del uso de antibióticos beta-lactámicos tales como penicilinas o cefalosporinas, agentes que han tenido un enorme impacto benéfico en la salud animal y producción de leche. Sin embargo, existe preocupación que la posible anafilaxis inducida por la droga, debido a una exposición accidental de consumidores susceptibles, ha hecho necesaria la imposición de un periodo de descarte de leche post-tratamiento y una vigilancia estricta de todos los envíos de leche (Kerr and Wellnitz, 2003).

S. aureus, el cual representa el 20 a 40% de las infecciones, ha demostrado ser el patógeno más difícil de controlar, siendo la tasa de curación por tratamiento con antibióticos menor al 15%. Las ubres de vacas infectadas son el principal reservorio de *S. aureus* desde donde es transmitido a otras vacas del rebaño durante la ordeña; se ha sugerido la piel del pezón como un importante reservorio para la infección intra-mamaria (IMI), así como para la transmisión humana a bovino. La susceptibilidad de la glándula mamaria para nuevas IMI es marcadamente aumentada durante la involución temprana y durante el periodo de parto.

En el último tiempo se ha estado utilizando la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como método para la identificación de patógenos causantes de la mastitis bovina. El PCR tiene alta precisión, especificidad, un adecuado límite de detección, y gran rapidez, pudiendo discriminar entre organismos estrechamente relacionados, tales como *S. parauberis* y *S. uberis*. Sin embargo, la limitante de esta técnica es el equipo sofisticado y el precultivo de las bacterias en medios de crecimiento para la obtención del ADN. Riffon *et al.* (2001) publicaron un estudio de una prueba de detección e identificación de patógenos causantes de mastitis bovina basado en PCR a partir de muestras de leche sin una etapa previa de cultivo, pudiendo discriminar cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* y *S. uberis*.

2.3 Inmunología de la glándula mamaria bovina.

El mecanismo de defensa del bovino incluye factores anatómicos, celulares y solubles los cuales a través de la interacción de la respuesta inmune innata y adquirida, detectan y eliminan patógenos determinando así la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria a la infección (Oviedo-Boyso *et al.* 2006). Dentro de los factores anatómicos el canal del pezón es la primera línea de defensa. Este canal está revestido con queratina evitando el avance de microorganismos hacia el interior de la glándula, además de ciertas proteínas asociadas a queratina que ligan microorganismos aumentando su susceptibilidad a cambios de osmoralidad. En la entrada al canal hay un músculo cuyo esfínter se cierra para mantener el interior de la glándula aislada. Cualquier daño de esta barrera física permite la entrada de bacterias que pueden causar una IMI.

Una vez que las bacterias (o sus toxinas) superan la línea de defensa del canal del pezón y alcanzan los tejidos altos, comienza a operar la segunda línea de defensa, que incluye a factores humorales inespecíficos presentes en la leche o secreción de la ubre seca, y los mecanismos de defensa inmunológicos específicos, ya sea de tipo humoral (inmunoglobulinas y otros factores solubles) o de base celular, incluyendo el sistema fagocítico (macrófagos y polimorfonucleares) y el sistema linfóide (linfocitos T, B y sin clasificar). Macrófagos (65%), neutrófilos (15%), linfocitos (25%) y escasas células epiteliales se encuentran normalmente en la leche de cuartos mamarios sanos. Ellos constituyen las llamadas “células somáticas”, cuyo recuento (RCS) en la glándula mamaria sana es de 20.000-50.000/mL (Suriyasathaporn *et al.* 2000), mientras que durante la mastitis los neutrófilos pasan a ser el tipo celular predominante (95%). Otros factores que regulan el RCS son el número y estado de lactancia, estado nutricional y manejo animal, entre otros. Animales con neutrófilos funcionales exhiben un bajo RCS, menor frecuencia de mastitis clínica y menor tasa de IMI. A su vez, se ha observado que vacas con un menor RCS tienen menor riesgo de sufrir mastitis, sin embargo, se ha sugerido que un menor RCS no debiera ser considerado como un efecto causal en resistencia, pero sí un predictor indirecto (Rupp and Boichard 2003). Así, el RCS representa el estado inflamatorio y sanitario de la glándula mamaria, y la calidad de la leche cruda (Schukken *et al.* 2003). Por otro lado, la severidad de la

mastitis depende de la cepa bacteriana que infecta la glándula, y se ha descrito que la velocidad con la cual los neutrófilos son reclutados a la glándula mamaria depende de la severidad de mastitis (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

Sistema inmune innato. Llamado también segunda línea de defensa, genera una respuesta centrada en el órgano afectado, desencadenando una inflamación con lesiones tisulares y aumento del flujo sanguíneo, lo que produce acumulación de células capaces de destruir los microorganismos invasores. Estos factores celulares son neutrófilos (polimorfonucleares), macrófagos (monocitos) y también células NK (*natural killer*) capaces de fijar, ingerir y destruir a los gérmenes invasores. Por otro lado, las células epiteliales participan en la defensa de la ubre modulando la adhesión bacteriana, induciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y la quimioquina IL-8, y también con cierta habilidad fagocitaria, interactuando con el sistema inmune adquirido (Concha, 2009). La inmunidad innata predomina en la etapa temprana de infección reconociendo y respondiendo a diferentes patógenos, incluso si ellos están invadiendo la glándula mamaria por primera vez, siendo crucial para controlar la proliferación y erradicación de los microorganismos que invaden la glándula. Los macrófagos presentes en tejido o leche reconocen los patógenos e inician la respuesta inflamatoria secretando citoquinas pro inflamatorias (TNF- α y IL- β) las cuales actúan como señales para reclutar neutrófilos (PMN) que viajan desde el torrente sanguíneo hacia la glándula mamaria, y estimulando su actividad bactericida. Además, los macrófagos producen prostaglandinas y leucotrienos que aumentan la reacción inflamatoria local (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

Si la bacteria invasora sobrevive a la respuesta, la infiltración de neutrófilos es reemplazada después de un corto periodo con monocitos y linfocitos T y B, sin embargo, los neutrófilos permanecen como el tipo más importante de células encontradas en las mastitis crónicas. Los linfocitos pueden reconocer una variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen especificidad, diversidad y características de la memoria del sistema inmune. Los linfocitos B tienen como función producir anticuerpos contra los agentes patógenos mientras que los linfocitos T, principalmente CD8+ (supresores), actúan

eliminando células del hospedero dañadas o controlando la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Finalmente, las células NK pueden destruir bacterias gram + y gram – (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

Por su parte, los factores solubles además de promover el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de infección, inducen la maduración de las células dendríticas, y modulan la respuesta inmune adquirida. Una variedad de citoquinas tales como interleuquinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), factores estimulantes de colonias (CSF), interferon gamma (INF- γ), y TNF- α han sido encontrados en la glándula mamaria ya sea sana y/o infectada. TNF- α es la principal citoquina producida durante la etapa temprana de infección, siendo responsable del shock endotóxico causado por *E. coli*. Algunas bacterias son capaces de modular la producción de citoquinas en las células del sistema inmune de la glándula mamaria, los cuales modifican la respuesta inmune innata del hospedero, indicando que la interacción entre bacterias, epitelio y células del sistema inmune es compleja. Además, el sistema del complemento bovino está presente en suero y leche, y tiene una importante función en el mecanismo de defensa de la glándula mamaria contra la mastitis (Oviedo *et al.* 2006).

Sistema inmune adquirido. Tiene dos ramas principales, una que se dirige contra los invasores extracelulares, los cuales son destruidos con ayuda de los anticuerpos o inmunidad humoral, y la inmunidad mediada por células, principalmente linfocitos T (Concha 2009). Dentro de los factores humorales encontramos inmunoglobulinas, factores del complemento, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peroxidoso-hidrogeno, lactoferrina y lisozima (Wolter *et al.* 2001). Los anticuerpos o inmunoglobulinas son secretados por los linfocitos B, existiendo cuatro clases de inmunoglobulinas en la ubre bovina, IgG 1, IgG 2, IgM e IgA (Concha 2009). El entendimiento y caracterización de la respuesta inmune para diferentes agentes etiológicos, es crucial para entender la patofisiología de la mastitis y poder diseñar enfoques eficientes para el diagnóstico, tratamiento y control de esta enfermedad (Oviedo-Boyso *et al.* 2006).

2.4 Genes candidatos para la resistencia o susceptibilidad a mastitis

La resistencia a mastitis es una característica o rasgo complejo determinada por un componente genético pero también por factores fisiológicos y ambientales, incluyendo la presión de infección. Definida como la habilidad para evitar la infección o la rápida recuperación de ella, puede relacionarse a distintos patógenos y efectores del sistema inmune (Rupp and Boichard 2003). Diversos estudios enfocados en el RCS y la presentación de mastitis clínica han determinado que estas características fenotípicas tienen una heredabilidad moderada y baja, respectivamente; no obstante, la variabilidad genética ha permitido su inclusión como criterio de selección en diversos programas de mejoramiento genético, especialmente en los países escandinavos, los cuales se caracterizan por tener rebaños lecheros con una muy baja presentación de mastitis (Heringstad *et al.*, 2000).

Interesantemente, se ha observado que la resistencia a mastitis muestra diferencias entre razas y entre los animales que las conforman. Por ejemplo razas de Europa central (Montbeliarde, Brown Swiss o Simmental) son más resistentes que bovinos Holstein. Diversos experimentos han identificado muchas regiones genómicas o QTLs (*Quantitative Traits Loci*) asociadas a la mastitis bovina (Holmberg and Andersson-Eklund 2004; Khatkar *et al.* 2004; Klunghand *et al.* 2004; Ogorevc *et al.* 2009). Esto es esperable debido al gran número de genes que participan del reconocimiento de patógenos y generación de la respuesta inmune asociada a la mastitis (Fonseca *et al.* 2009). En promedio, los QTLs se extienden desde 10 a 40 cM, involucrando cientos o miles de genes y polimorfismos en casi todos los cromosomas. Un enfoque utilizado para acotar estos estudios es la identificación de “genes candidatos”, tomando como base las moléculas, vías de señalización y células que participan en el sistema inmune (Detilleux 2002; Rupp and Boichard 2003; Fonseca *et al.* 2009). En bovinos, la mayoría de los estudios se han centrado en el exón 2 del gen BoLA DRB3 clase II debido a asociaciones encontradas con RCS y mastitis (Dietz *et al.* 1997; Kelm *et al.*, 1997; Sharif *et al.* 1998; Rupp *et al.* 2007). Recientemente, otros polimorfismos se han descrito en los genes CD14, CD18, CXCR1 y 2, IL8, lisozima, lactoferrina y TLR4 (Detilleux 2002; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008).

Ogorevc *et al.* (2008) en un estudio que buscaba identificar regiones candidatas para resistencia o susceptibilidad a mastitis, identificaron polimorfismos en cuatro genes de función inmune: BoLA-DRB3, FEZF2, Lf y TLR4.

Los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia TLR-interleuquina 1. Expresados principalmente en macrófagos y células dendríticas, son parte de la primera línea de defensa en contra de patógenos. Estos receptores reconocen secuencias conservadas específicas denominadas PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) presentes en la pared celular de bacterias, gatillando la respuesta inmune innata, y relacionándola a la respuesta adquirida (De Schepper *et al.* 2008; Mariotti *et al.* 2009). La unión de TLR4 y PAMP induce la transcripción y secreción de citoquinas y quimioquinas que participan en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de infección (Lu *et al.* 2008). Hasta ahora, se han descrito 13 miembros en mamíferos, de los cuales 10 se han mapeado en el bovino, cada uno con distinta especificidad para PAMPs (Werling *et al.* 2006).

Uno de estos receptores es TLR4 el cual reconoce lipopolisacárido (LPS) y ácido lipoteico (LTA) de bacterias gram -, formando un complejo con las proteínas CD14 y MD-2 (De Schepper *et al.* 2008). TLR4 en bovinos se expresa en células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y células epiteliales, y su gen se localiza en el extremo distal del cromosoma BTA8 (Mariotti *et al.* 2009). De aprox. 11 Kb de longitud, posee tres exones con sitios de *splicing* similares a los descritos para TLR4 humano. Como en humano y ratón, TLR4 es un gen altamente polimórfico en la especie bovina, identificándose más de 40 polimorfismos tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (White *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008). Varias evidencias han propuesto este receptor como un marcador candidato para determinar en parte la resistencia a mastitis en bovinos: 1- Ratones mutantes que no expresan TLR4 son deficientes en la generación de la respuesta inmune al ser desafiados con LPS (Hoshino *et al.* 1999); 2- Mutaciones en TLR4 son asociadas con hiperreactividad y shock séptico en humanos (Lorenz *et al.* 2002); 3- Su expresión en la glándula mamaria aumenta de forma proporcional en cuartos de bovinos con mastitis subclínica severa o moderada; 4- Algunos polimorfismos han sido asociados al RCS en

bovinos (Sharma *et al.* 2006). La presencia de SNPs no sinónimos podría alterar la secuencia de aminoácidos, y afectar las características del promotor, o silenciarlos completamente (Schroder and Schumann 2005).

Otro importante factor inmune es Lactoferrina (Lf), una glicoproteína miembro de la familia de transferrinas que se encuentra en las secreciones de un amplio rango de especies de mamíferos, incluyendo humanos, cabras, porcinos y bovinos (Valenti and Antonini 2005). Con varias funciones descritas, destacan sus propiedades bacteriostáticas asociadas a la respuesta inmune innata. Lactoferrina es secretada desde células epiteliales mamarias (MEC) y desde neutrófilos y macrófagos durante la inflamación (Arnould *et al.* 2009). Su concentración en leche varía enormemente entre especies (O'Halloran *et al.* 2009). Por ejemplo, en bovinos varía entre 20 y 200 µg/ml, rango muy menor a lo determinado en leche humana. Sin embargo, tras el cese de la lactancia (período seco), la concentración de Lf empieza a aumentar después de 2 a 4 días, alcanzando los niveles máximos 14 a 21 días después, los cuales son 100 veces mayores que durante la lactancia (Kerr and Wellnitz 2003).

La principal función de Lf en la glándula mamaria es protegerla contra infecciones, por ejemplo la mastitis. La primera función descrita fue su habilidad de unir iones hierro libres, evitando su biodisponibilidad para las bacterias que lo requieren como factor de crecimiento, como *E. coli* y *S. aureus* (Kerr and Wellnitz 2003). Por otra parte, Lf puede interactuar con el lípido A del LPS induciendo la desestabilización de membranas de bacterias gram-negativas (Arnould *et al.* 2009). También muestra propiedades inmunomoduladores y anti-inflamatorias al actuar sinérgicamente con otros componentes del sistema inmune como el complemento y lisozima (Kai *et al.* 2002). Por otro lado, Lf puede clivarse generando fragmentos de su extremo N-terminal con actividad bactericida como lactoferricina, la cual rompe las membranas de bacterias (Tanaka *et al.* 2003). Se ha reportado que la terapia génica con Lf inhibe el crecimiento de bacterias en la glándula mamaria de cabras (Zhang *et al.* 2007), y que el tratamiento conjunto de Lf y penicilina reducen la infección por *S. aureus* (Lacasse *et al.* 2008).

En el bovino el gen de Lf se localiza en el cromosoma 22 abarcando aprox. 34,5 Kb (O'Halloran *et al.* 2009). Hasta ahora, la regulación de su expresión no ha sido completamente elucidada, pero se sabe que varios factores pueden participar tal como hormonas esteroidales y factores de crecimiento que activan la vía de las quinasas (Daly *et al.* 2006). Varios polimorfismos genéticos en la región regulatoria y codificante del gen Lf se han descrito en bovinos (y también en humanos), algunos relacionados a la resistencia a mastitis. Sin embargo, la significancia y efecto funcional de estos polimorfismos aún no se ha establecido (Li *et al.* 2004; O'Halloran *et al.* 2009). En humanos y cabras algunos polimorfismos se han asociado con un aumento en las propiedades antibactericidas (Lee *et al.* 1997; Velliyagounder *et al.* 2003). Un interesante polimorfismo tipo SNP en la posición -131/-132 del promotor de Lf fue descrito por Daly *et al.* (2006). Presente en varias razas, el polimorfismo está en una región putativa para la unión del factor nuclear de células T activadas (NF-ATc), sugiriendo un mecanismo de regulación para la expresión de Lf en condiciones de estimulación del sistema inmune. Algunas evidencias han propuesto a Lf como un candidato para determinar en parte la resistencia a mastitis en bovinos: 1- Su expresión a nivel de mRNA y proteína en la glándula mamaria aumenta fuertemente durante episodios de mastitis clínica y subclínica, con un aumento concomitante en el RCS (Hagiwara *et al.* 2003); 2- La infección *in vitro* de la glándula mamaria con bacterias causantes de mastitis aumenta el mRNA de lactoferrina (Griesbeck-Zilch *et al.* 2008; Swanson *et al.* 2009).

3. HIPÓTESIS

Polimorfismos en los genes TLR4 y lactoferrina están asociados al tipo de presentación de mastitis y/o a las bacterias causantes de la enfermedad en bovinos lecheros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Establecer si polimorfismos en los genes TLR4 y lactoferrina están asociados al tipo de presentación de mastitis y/o la presencia de bacterias causantes de la enfermedad.

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Genotipar marcadores moleculares del tipo SNP en los genes TLR4 y lactoferrina en bovinos lecheros sanos, y con mastitis clínica y/o subclínica.

4.2.2 Establecer la existencia de asociación de los polimorfismos en los genes TLR4 y lactoferrina con el tipo de presentación de mastitis y/o la presencia de bacterias identificadas causantes de la enfermedad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

El diseño consideró establecer la asociación entre polimorfismos en genes del sistema inmune y la presentación de mastitis clínica y/o subclínica en diferentes razas de bovinos lecheros. Los polimorfismos evaluados fueron P-28 para el promotor del gen lactoferrina; y P-226 (promotor) y 2021 (exón 3) para el gen TLR4. Se utilizaron bovinos de diferentes razas o biotipos los cuales fueron previamente clasificados como sanos o con mastitis clínica o subclínica, determinando el patógeno presente en leche asociado a la condición.

5.2 Material Biológico

Las muestras se obtuvieron de bovinos de cuatro biotipos lecheros: Holstein, Jersey, Montbeliarde y Overos Colorados, pertenecientes a predios comerciales ubicados en la comuna de Osorno, región de Los Lagos. Previamente, cada animal fue clasificado como sano o con mastitis clínica o subclínica según diagnóstico veterinario, mediante observación de la ubre y leche para el diagnóstico de mastitis clínica, test de california y RCS mensual (sano: 0 - 200.000/ml y mastitis subclínica: mayor a 250.000/ml). Además, de cada animal se obtuvo una muestra de leche justo antes del ordeño la que se utilizó para identificar bacterias causantes de mastitis, mediante cultivo *in vitro* en agar sangre diferencial, lo cual fue realizado en el laboratorio de la empresa Udder Health (Osorno). De cada animal se obtuvo una muestra de sangre (3 mL) mediante punción de la vena caudal utilizando un sistema venojet en tubos con anticoagulante EDTA. Las muestras fueron transportadas en hielo hasta el laboratorio, donde fueron mantenidas a -20°C hasta la extracción de DNA.

5.3 Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico bovino fue realizada a partir de 200 μ L de sangre total utilizando el kit comercial FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgene, USA), el cual se basa en una lisis celular, degradación de proteínas y purificación a través de membrana. La integridad del DNA extraído fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (SeaKem® LE Agarose Lonza, USA) teñidos con GelRed (Biotium, USA) utilizando buffer TBE 0,5X, y visualizados bajo luz UV en un transiluminador (Vilver Lourmat, Francia).

5.4 Cuantificación de DNA

Las muestras de DNA fueron cuantificadas mediante fluorescencia en una plataforma de PCR en tiempo real Rotorgene 6000 (Corbett, Australia) utilizando el kit comercial Quan-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, USA). La determinación de la concentración se realizó en triplicado según indicación del fabricante mediante una curva de concentración estándar (0-50 ng/ μ L) utilizando DNA del fago Lambda contenido en el kit.

5.5 Diseño de partidores e identificación de sitios de restricción

Los partidores (*primers*) fueron diseñados y enviados a sintetizar (Operon MWG Operon, Alemania) utilizando como secuencia molde las accesiones DQ839567.1 (TLR4) y L19985.1 (lactoferrina) reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de forma de amplificar productos específicos de un tamaño inferior a 150 bp los cuales contenían las regiones de los polimorfismos de interés (ver Tabla 1). Los putativos amplicones fueron evaluados mediante los programas libres BLAST, Primer 3 y AmplifX, con objeto de determinar la especificidad de secuencia y algunos

parámetros termodinámicos para estimar la probabilidad de formación de estructuras secundarias. Los putativos sitios de restricción presentes en los fragmentos a amplificar fueron identificados con el programa libre Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), teniendo como criterio de selección de la enzima la especificidad respecto a la región de corte y el número de fragmentos generados, de modo de poder discriminar los alelos correspondientes al polimorfismo mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.6 Genotipado mediante PCR-RFLP y qPCR-HRM.

El genotipado de los polimorfismos tipo SNP se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP y/o qPCR-HRM (*High Resolution Melting*). El HRM consiste en analizar el comportamiento melting del DNA, es decir, la transición de DNA de doble hebra (dsDNA) a DNA de simple hebra (ssDNA), midiendo la pérdida de fluorescencia de un fluoróforo que se intercala en el DNA doble hebra. Para la asignación y determinación de las variantes genotípicas se utilizaron como control positivo las muestras previamente genotipadas mediante PCR-RFLP.

Para la obtención de los genotipos a utilizar como controles positivos se utilizó la técnica de PCR-RFLP. El PCR se realizó en un volumen de 10 μ L conteniendo 10-20 ng DNA, primers 0,25 μ M, Mg^{2+} 3 mM, dNTP's 0,25 mM y 0,5 U Taq polimerasa (todos los reactivos de Fermentas, USA). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Maxi (ESCO, USA) con una denaturación inicial a 95°C por 5 min, y luego 40 ciclos a 95°C por 30 s, annealing a 30 s a las temperaturas descritas en la Tabla 1, 72°C por 30 s, y una extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación específica de los productos esperados fue verificada en geles de agarosa al 2% como se describió anteriormente. Luego, los productos amplificados fueron sometidos a digestión enzimática a 37°C toda la noche en un volumen de 20 μ L utilizando las enzimas descritas en la Tabla 1 según las indicaciones del fabricante (Fermentas, USA; NE BioLabs, USA). La verificación de los tamaños de los fragmentos luego de la digestión fue ensayada en geles de agarosa al 3% como se describió anteriormente.

Para el genotipado de las muestras mediante qPCR-HRM se utilizó la plataforma de tiempo real Rotorgen 6000 (Corbett, Australia) y el kit comercial SensiMix HRM (Bioline, UK). El PCR se realizó en un volumen de 15 μ L conteniendo 10-20 ng de DNA, primers 0,25 μ M, buffer SensiMix HRM 1x (conteniendo $MgCl_2$ 3 mM y dNTP's) y EvaGreen® 1,2x (Biotium, USA) . El programa incluyó 40 ciclos de amplificación según lo descrito en la Tabla 2.

Tabla 1: Condiciones para el análisis de polimorfismos mediante PCR-RFLP.

SNP	Primer	T° annealing	Tamaño amplicon	Enzima Restricción	Tamaño Digeridos
TLR4 P-226	F TGTTACTTCAGCCCCTGGTC	61,7°C	137 bp	<i>HpaII</i>	G: 137 bp
	R TCACTTCCTCTCCTCCCGTA				C: 80 y 57 bp
TLR4 2021	F GGTAGGGGTCCTAGTCTACAAGTT	64°C	111 bp	<i>Alw21I</i>	T: 111 bp
	R CCTTTGTCATCTACTCGAGCCA				C: 80 y 31 bp
Lf P-28	F GGCGCTTATAGGACCACAGG	63°C	103 bp	<i>CviKI-1</i>	A: 88 y 15 bp
	R AGAGCCTTCGTTCCGGAGT				C: 54, 34 y 15 bp

F, primer forward; R, primer reverse

Tabla 2: Resumen de las condiciones para el genotipado mediante qPCR-HRM.

Etapa		TLR4 P-226	TLR4 2021	Lf P-28
Denaturación inicial		95°C / 15 s	95°C / 15 s	95°C / 15 s
	Paso 1	95°C / 15 s	95°C / 15 s	95°C / 15 s
Cycling	Paso 2	61,7°C / 30 s	64°C / 30 s	63°C / 30 s
	Paso 3	72°C / 10 s	72°C / 10 s	72°C / 10 s
Melting (HRM)		74-85°C	74-85°C	75-90°C

5.7 Análisis genético

Una vez obtenidos los genotipos se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas mediante conteo simple, las cuales fueron comparadas con las frecuencias esperadas asumiendo el estado de equilibrio de Hardy-Weinberg. Para establecer significancia en la desviación de las frecuencias se realizó un test de Chi-cuadrado (χ^2), con un grado de libertad.

5.8 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los genotipos se realizó un análisis de regresión logística ordinal para establecer la existencia de asociación entre la condición de los animales y los genotipos y bacterias identificadas. El análisis fue llevado a cabo mediante el software estadístico JMP[®] 8 (SAS Institute Inc., USA) donde se asignó la condición de los bovinos como la variable dependiente y los patógenos, genotipos y raza como factores o variables independientes.

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros productivos y sanitarios de los rebaños

Durante este trabajo se muestrearon un total 188 animales de raza Holstein, Jersey, Montbeliarde y Overo colorado, los cuales fueron clasificados como sanos (control) o enfermos con mastitis clínica (CM) o subclínica (SCM) según se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de animales muestreados por condición y raza.

RAZA	CONTROL	SCM	CM	SIN CONDICION	TOTAL
Holstein	22	24	18	2	68
Jersey	20	6	2	-	28
Montbeliarde	19	19	10	1	48
O. Colorado	17	10	17	1	44
Total	78	59	47	4	188

6.2 Determinación de genotipos

Los genotipos de los polimorfismos TLR4 P-226, TLR4 2021 y Lf P-28 fueron obtenidos mediante PCR-RFLP y qPCR-HRM.

6.2.1 PCR-RFLP

La figura 1 muestra geles de agarosa donde se observa el patrón de fragmentos luego del ensayo de PCR-RFLP. Para TLR4 P-226 se amplificó un fragmento específico de 137 bp el cual luego de la digestión con la enzima *HpaII* generó un patrón de fragmentos específico para las

tres variantes genotípicas, obteniendo dos bandas de 80 y 57 bp para la variante genotípica homocigota *wild-type* “CC”, tres bandas de 137, 80 y 57 bp para el heterocigoto “CG”, y una banda de 137 bp para el homocigoto mutante “GG”, el cual no presenta sitio de corte (figura 1A). Para evaluar el polimorfismo TLR4 2021 se amplificó un fragmento específico de 111 bp el cual luego de la digestión con la enzima *Alw21I* generó un patrón de fragmentos específico para las tres variantes genotípicas: dos bandas de 80 y 31 bp para la variante genotípica homocigota *wild-type* “CC”, tres bandas de 111, 80 y 31 bp para el heterocigoto “CT”, y una banda de 111 bp para el homocigoto mutante “TT”, el cual no presenta el sitio de corte para la enzima *Alw21I* (figura 1B).

Para el polimorfismo Lf P-28 se amplificó un fragmento específico de 103 bp el cual presentaba 2 sitios de restricción reconocidos por la enzima *CviKI1*, el primero de ellos en la posición 54 que permitió genotipar el polimorfismo de interés, y el segundo en la posición 88 el cual fue escindido en todos los amplicones. Así, amplicones con la variante homocigota *wild-type* “CC” en el primer sitio generaron fragmentos de 54, 34 y 15 bp, mientras que para la variante heterocigoto “CA” los fragmentos fueron de 103, 54, 34 y 15 bp. Para la variante homocigota mutante “AA” se generaron 2 fragmentos de 88 y 15 bp (figura 1C).

6.2.2 qPCR-HRM

Una vez identificadas las muestras para las 3 variantes genotípicas de cada polimorfismo, éstas fueron utilizadas como controles positivos para generar curvas de *melting* mediante qPCR-HRM, pudiendo determinar exitosamente solamente los polimorfismos TLR4 2021 y Lf P-28. La figura 2A muestra la amplificación del fragmento de 111 bp para el marcador TLR4 2021, observándose una C_T promedio de 22,5 y todas las muestras alcanzando el *plateau* en el ciclo 34. El análisis de *melting* mostró la amplificación específica de un único fragmento (figura 2B) observándose 3 tipos de curvas dependiendo del genotipo: una curva central con una T_M de 79,50°C (Bin C, homodúplex), otra curva desplazada a la derecha con una T_M de 79,85 (Bin A,

homodúplex), y otra curva con 2 peaks, 78,73°C (Bin B) y 79,85°C (Bin A) correspondiente al heterodúplex. El análisis por HRM mostró nuevamente 3 tipos de curvas con distinta T_M (figura 2C) las que mediante la diferencia de fluorescencia logró discriminar claramente los 3 genotipos (CC, CT y TT) con una confiabilidad mayor al 95% (figura 2D).

Para el polimorfismo Lf P-28 la amplificación generó un fragmento de 103 bp observándose una C_T promedio de 24,62 y todas las muestras alcanzando el *plateau* en el ciclo 35 (figura 3A). El análisis de *melting* al igual que para el amplicón de TLR4 2021, mostró la amplificación específica de un único fragmento (figura 3B) observándose 3 tipos de curvas dependiendo del genotipo: una curva central con una T_M de 83,74°C (Bin C, homodúplex), otra desplazada a la derecha con una de T_M de 84,32 (Bin A, homodúplex), y otra curva con 2 peaks, 83,01°C (Bin B) y 83,74°C (Bin A) correspondiente al heterodúplex. El análisis por HRM mostró nuevamente 3 tipos de curvas (figura 3C) las que mediante la diferencia de fluorescencia logró discriminar claramente los 3 genotipos (CC, CA y AA) con una confiabilidad mayor al 95% (figura 3D). Sin embargo, para un número reducido de muestras (8) se observó que las curvas correspondientes para el genotipo heterocigoto tenían una forma distinta a la del control positivo (figura 3E vs 3B), razón por la que fueron genotipadas mediante PCR-RFLP. Como resultado se determinó que las 8 muestras correspondían a muestras heterocigotas.

Para genotipar el polimorfismo TLR4 P-226, se utilizó un amplicón de 137 bp el cual amplificaba a los 24,38 ciclos promedio, alcanzando el *plateau* a los 35 ciclos (figura 4A). Las muestras homocigotas tanto *wild-type* como mutantes generaron curvas con un único peak, el Bin A con una T_M de 80,53°C y el Bin C con una T_M de 80,59°C; también se observó una tercera curva con dos peaks correspondientes a las muestras heterocigotas con una T_M de 79,74°C para el Bin B y de 80,53°C para el Bin A (figura 4B). Sin embargo, para las muestras de genotipo homocigoto no se pudo discriminar claramente las *wild-type* de las mutantes, observándose variabilidad entre los replicados por muestra (confiabilidad menor a 90%; figura 4B, C y D). Por lo tanto, se optó por genotipar las muestras en su totalidad mediante PCR-RFLP.

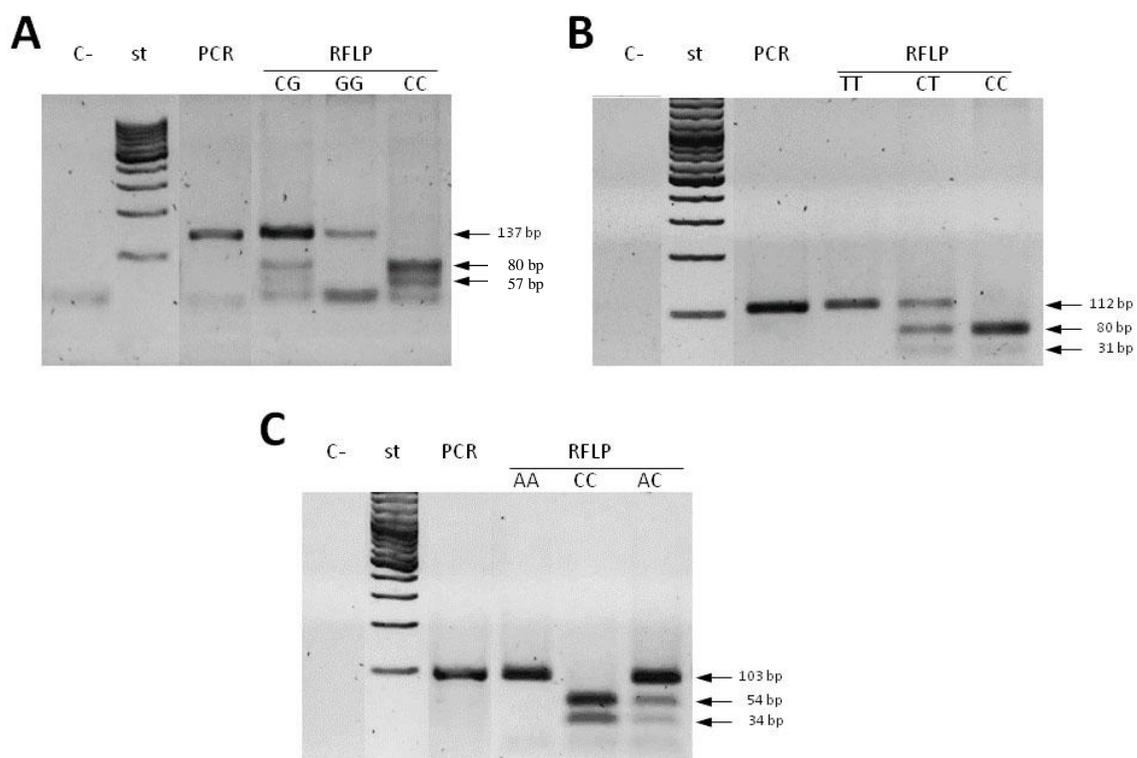


Figura 1. Geles de agarosa mostrando el patrón de fragmentos obtenido mediante PCR-RFLP. A: genotipado del marcador TLR4 P-226; B: genotipado del marcador TLR4 2021; C: genotipado del marcador Lf P-28. C-, control negativo; st, estándar DNA.

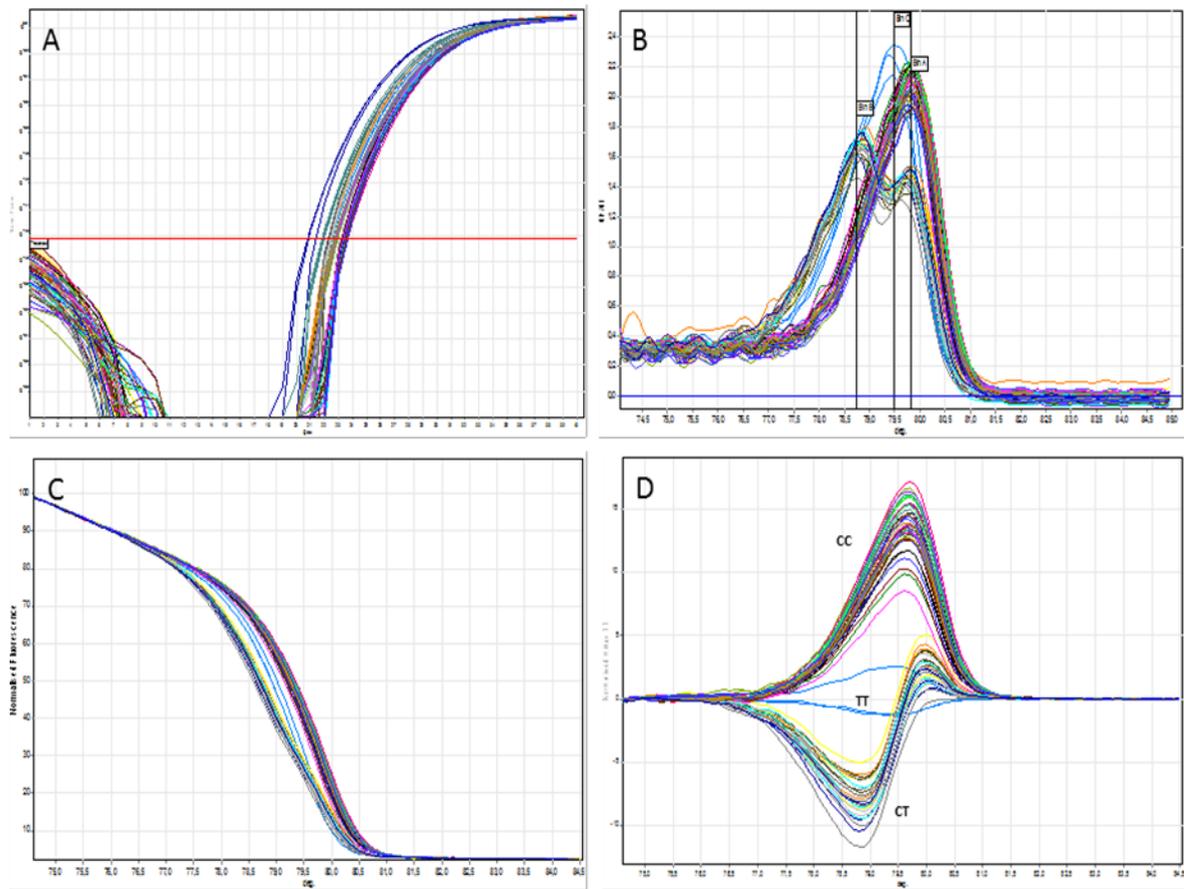


Figura 2. Determinación de genotipos para el polimorfismo 2021 del gen TLR4 mediante qPCR-HRM. Curvas de amplificación (A), Melting (B), HRM (C) y diferencia de fluorescencia (D). CC, CT y TT: genotipos.

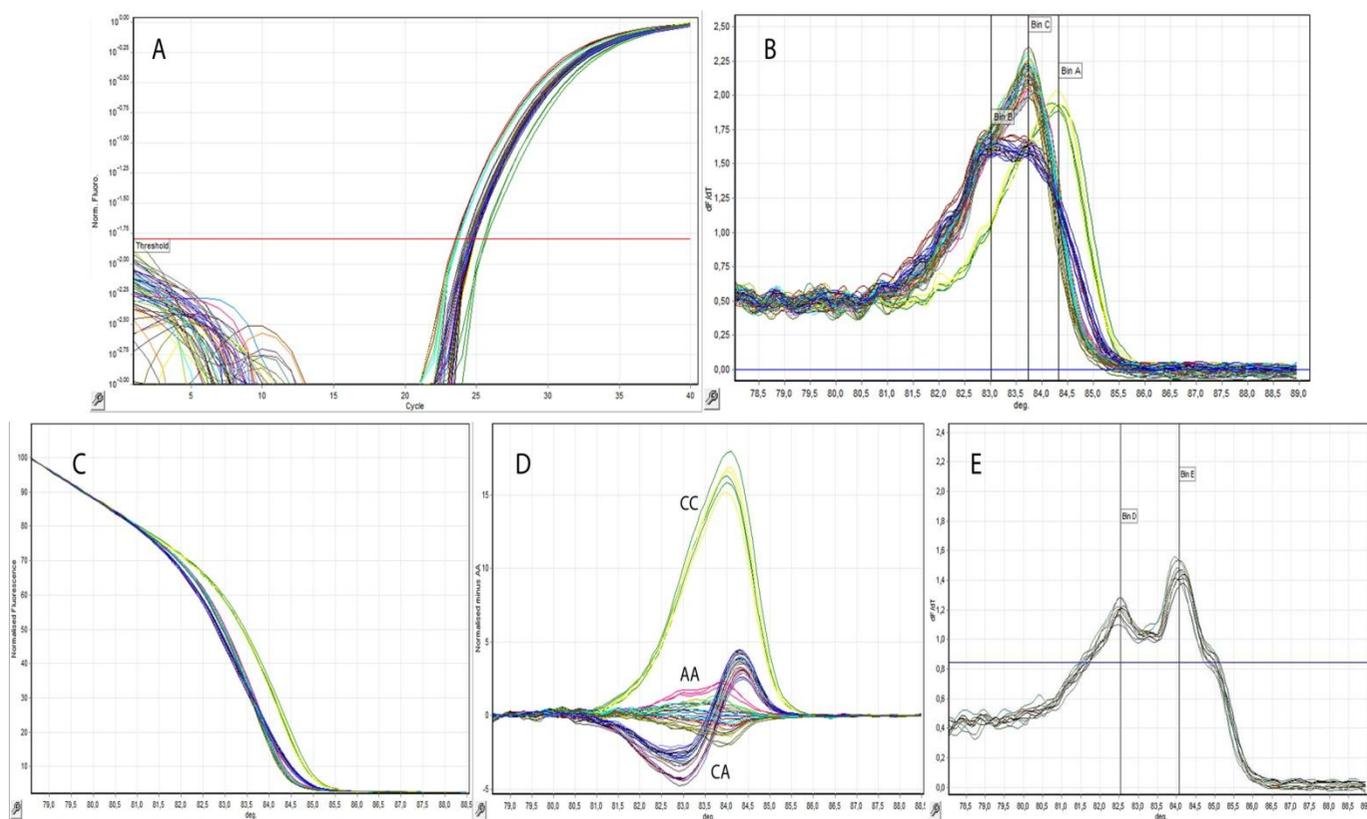


Figura 3. Determinación de genotipos para el polimorfismo P-28 del gen lactoferrina mediante qPCR-HRM. Curvas de amplificación (A), Melting (B), HRM (C) y diferencia de fluorescencia (D), Curva de melting con diferente forma (E), CC, CA y AA: genotipos.

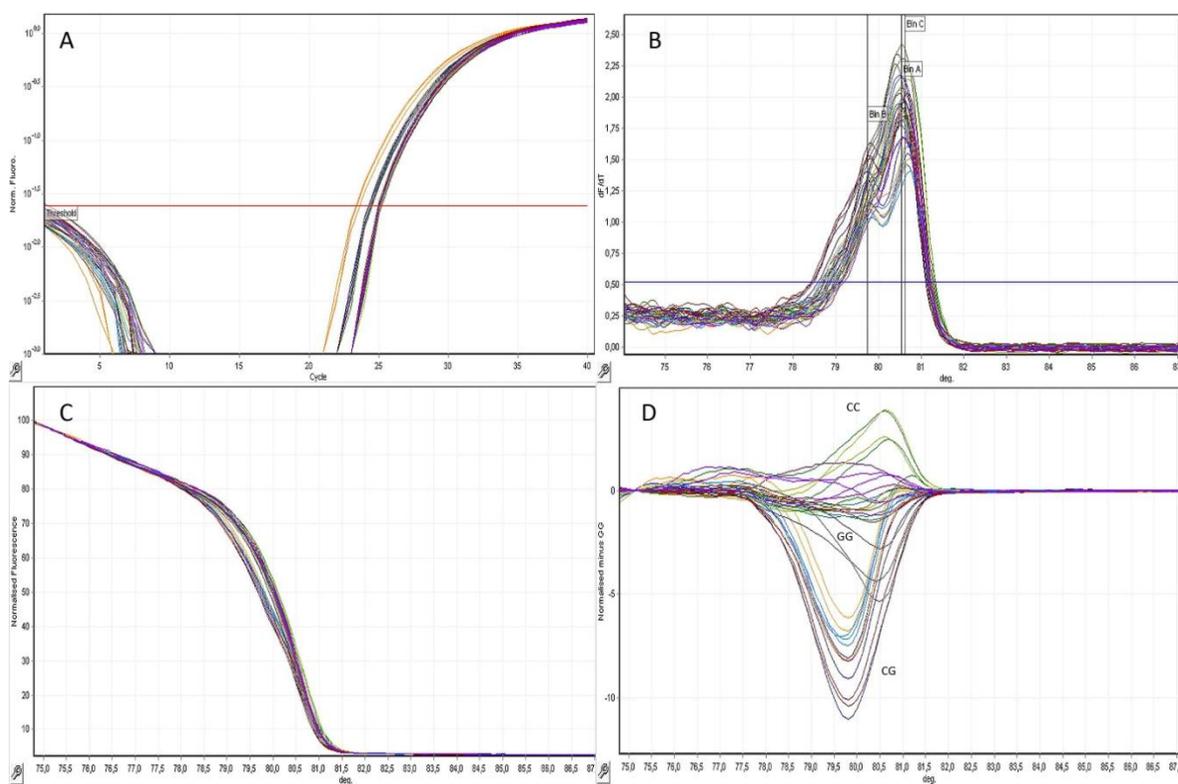


Figura 4. Determinación de genotipos del polimorfismo P-226 del gen TLR4 mediante qPCR-HRM. Curvas de amplificación (A), Melting (B), HRM (C) y diferencia de fluorescencia (D). CC, CG y GG: genotipos.

6.3 Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas

Una vez obtenidos los genotipos para cada polimorfismo se procedió a determinar las frecuencias genotípicas y alélicas mediante conteo simple asumiendo una condición de equilibrio génico. La Tabla 4 muestra las frecuencias observadas y esperadas para el polimorfismo TLR4 P-226 en la población total y por raza. Para este polimorfismo se encontraron las tres variantes genotípicas con frecuencias de 65 (CC), 81 (CG) y 42 (GG), siendo el alelo “C” predominante en la población total excepto en bovinos Holstein donde estuvo más representado el alelo “G”. Debido a la desviación entre las frecuencias observadas y esperadas se realizó una prueba de Pearson, determinando que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las frecuencias, por lo tanto la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).

Para el polimorfismo TLR4 2021 se encontraron las 3 variantes genotípicas cuyas frecuencias fueron 126 (CC), 54 (CT) y 8 (TT), siendo el alelo “C” prevalente en la población total, a excepción del rebaño Jersey en el cual predominó el alelo “T”. Este rebaño, además, fue el único en donde se encontró la variante TT (Tabla 5). Al igual que para TLR4 P-226 las diferencias entre las frecuencias observadas y estimadas evaluadas mediante el test de Pearson no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), indicando que los rebaños están en equilibrio H-W.

El polimorfismo P-28 del gen lactoferrina mostró las 3 variantes genotípicas en la población total, con excepción del rebaño de overos colorados donde no se encontró el genotipo CC. Las frecuencias observadas fueron 22 (CC), 85 (CA) y 81 (AA), predominando el alelo “A” con excepción de la población Jersey (Tabla 6). Al igual que para los otros polimorfismos las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas no fueron significativas ($p > 0,05$), indicando que la población se encuentra en equilibrio génico.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TLR4 P-226.

Biotipo	N		Fx Genotípicas			Fx Alélicas		χ^2
			CC	CG	GG	C	G	
Hol	68	Fx Obs	13	33	22	0,43	0,57	0,0183
		Fx Esp	12,6	33,3	22,1			
Jer	28	Fx Obs	17	10	1	0,79	0,21	0,1139
		Fx Esp	17,5	9,3	1,2			
Mon	48	Fx Obs	15	22	11	0,54	0,46	0,2859
		Fx Esp	14,0	23,9	10,2			
O col	44	Fx Obs	20	16	8	0,64	0,36	2,0489
		Fx Esp	18,0	20,3	5,7			
Total	188	Fx Obs	65	81	42	0,56	0,44	

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TLR4 2021.

Biotipo	n		Fx Genotípicas			Fx Alélicas		χ^2
			CC	CT	TT	C	T	
Hol	68	Fx Obs	50	18	0	0,87	0,13	1,6327
		Fx Esp	51,5	15,4	1,2			
Jer	28	Fx Obs	4	16	8	0,42	0,57	0,8855
		Fx Esp	5,0	13,4	9,2			
Mon	48	Fx Obs	38	10	0	0,9	0,1	0,7149
		Fx Esp	38,9	8,6	0,5			
O col	44	Fx Obs	34	10	0	0,89	0,11	0,7918
		Fx Esp	35,2	8,6	0,5			
Total	188		126	54	8	0,81	0,19	

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Lact P-28.

Biotipo	n		Fx Genotípicas			Fx Alélicas		χ^2
			CC	CA	AA	C	A	
Hol	68	Fx Obs	7	34	27	0,35	0,65	0,6192
		Fx Esp	8,3	30,9	28,7			
Jer	28	Fx Obs	8	15	5	0,55	0,45	0,199
		Fx Esp	8,5	13,9	5,7			
Mon	48	Fx Obs	7	21	20	0,36	0,64	0,1591
		Fx Esp	6,2	22,1	19,7			
O col	44	Fx Obs	0	15	29	0,17	0,83	1,8704
		Fx Esp	1,3	12,4	30,4			
Total	188	Fx Obs	22	85	81	0,34	0,66	

Fx Obs, frecuencia observada; Fx Esp, frecuencia esperada; χ^2 , test chi-cuadrado, $p > 0,05$.

6.4 Análisis Estadístico

Con objeto de estudiar el efecto de los genotipos sobre la condición de mastitis y el tipo de patógeno identificado en las muestras de leche se realizó un modelo de regresión logística el cual se utiliza para estudiar el efecto de múltiples variables explicatorias sobre una variable de respuesta categórica (Taucher, E., 1999).

La Tabla 7 muestra la descripción de las variables utilizadas en el análisis. Para el desarrollo del estudio la condición de los animales fue presentada en tres categorías medidas en escala ordinal, estos son “Sano o control (1)”, “Mastitis Subclínica (SCM) (2)” y “Mastitis clínica (CM) (3)”. Para la interpretación de los resultados, un valor positivo en la columna de valores estimados (a excepción de las filas Interceptos) indica que los valores más altos de la variable se asocian con una mayor probabilidad de encontrar un efecto de la variable explicativa sobre la variable de respuesta, por lo tanto serán tomadas en cuenta sólo aquellas variables explicativas que tengan valores estimados más altos y positivos, el nivel de significancia para la interpretación de los resultados fue definido en 0,05. Los análisis se llevaron a cabo mediante el software estadístico JMP 8 obteniendo los siguientes resultados: de un total de 188 observaciones, 184 fueron analizadas, ya que 4 se excluyeron por ajuste del modelo ya que no presentaban datos en la variable *Status*.

Los parámetros estimados para *Status vs Breed* (Tabla 8), no entregaron un efecto significativo para bovinos de raza Holstein, Montbeliarde y Overo Colorado sobre la condición de los animales ($p > 0,05$), por lo tanto conservamos la hipótesis nula, excepto para bovinos de raza Jersey que presenta significancia ($p = 0,0009$) y como se estableció anteriormente, con un valor estimado alto y positivo de 1,10827799 a diferencia de las otras razas que poseen valores estimados negativos. En el Gráfico 1 se observa que los mayores niveles de animales sanos los presenta la raza Jersey correspondiente a un 71,43% (*Ver tablas en Anexo) y un porcentaje del

10, 87% del total de los datos. Además, sólo dos animales de raza Jersey en el análisis fueron reportados presentando mastitis clínica.

El análisis para *Status* vs M1 (Tabla 9, n=184), no arrojó un efecto significativo de los genotipos sobre la condición de los animales ($p > 0,05$), por ende conservamos la hipótesis nula. Cabe destacar que el análisis de contingencia (Gráfico 2) nos muestra que el 50,77% de los animales con el genotipo CC (M1) se encuentran sanos, y al contrario para mastitis subclínica y mastitis clínica presentan sólo un 24,62% (row%, Tabla Anexo 2), sin embargo sólo el 17,93% del total de la población en estudio presenta este genotipo, si bien es el mayor porcentaje, sigue sin tener significancia ya que la población total tiene una distribución de los tres genotipos bastante homogénea (Gráfico 2) con respecto a la condición de los animales.

Para *Status* vs M2, el genotipo CC (M2) resultó tener un *p-value* significativo ($p = 0,0065$), sin embargo este presenta un valor estimado negativo (Tabla 10) a diferencia del genotipo TT (M2) que posee un valor estimado positivo, sin embargo, este posee un valor de significancia mayor a 0,05, por lo tanto se conserva la hipótesis nula para los tres genotipos CC, CT y TT. En los análisis podemos apreciar que sólo un 4,35% del N total analizado presentó el genotipo TT y de estos el 75% correspondía a animales sanos. El genotipo CT también se presenta con un porcentaje alto (53,85%) en los animales de condición sanos. Aunque el genotipo TT comparado con los genotipos CC y CT presente un porcentaje menor del total de los datos claramente tiene una tendencia a estar asociado con animales sanos.

De acuerdo a los resultados arrojados por el análisis de regresión para *Status* vs M3 (Tabla 11, n=184), sólo el genotipo AA (M3) tuvo un *p-value* significativo ($p = 0,0473$), en primera instancia deberíamos rechazar nuestra hipótesis nula para este genotipo y conservarla para CA y CC. Sin embargo, el genotipo AA al tener un valor estimado negativo es probable que no encontremos un efecto significativo sobre la variable Y (*Status*). Además, este presenta una distribución bastante homogénea entre el estado de los animales. El genotipo CA tiene un porcentaje mayor de animales sanos (22,28%) con respecto al total de los datos analizados, pero

como ya se revisó en los parámetros estimados este no posee un *p-value* significativo. El genotipo CC evidenció un menor porcentaje en las observaciones analizadas 11,96% (Tabla 15; Gráfico 4).

La variable *Pathogen* correspondiente a 8 de las bacterias patogénicas causantes de la enfermedad se utilizó agrupando de acuerdo a sus frecuencias (Gráfico 5) aquellas que presentaron un número menor a 11, el grupo tenía que tener una frecuencia igual o mayor al número establecido como base (11), los patógenos *S. dysgalactiae*, *Bacillus spp.* y *E. coli* fueron agrupados como 4 teniendo un total de 11 observaciones (Tabla 12), el patógeno *Streptococcus spp.* (6) fue excluido, ya que no se encontró en ninguna de las muestras analizadas, además se descartaron 5 muestras del modelo total ya que no presentaban datos de bacterias encontradas en las muestras.

De acuerdo a los parámetros estimados los patógenos definidos como 0 (sin patógeno), 2 (*S. coagulasa negativa*), 3 (*S. uberis*), 4 (*S. dysgalactiae*, *Bacillus spp.* y *E. coli*) y 5 (*C. bovis*) presentaron *p-values* significantes 0,0001; 0,0019; 0,0008; 0,0004 y 0,0012 respectivamente, rechazando nuestra hipótesis nula, sin embargo sólo los patógenos 0 (sin patógeno), *S. coagulasa negativa* (2) y *C. bovis* (5) es probable que tengan un efecto sobre la variable *Status*, ya que como se mencionó anteriormente sólo aquellos con valores estimados altos, positivos fueron considerados (Tabla 13).

De un total de 183 datos analizados, 48 (26,23%) no presentaron patógeno (0) de los cuales 33 (68,75%) fueron encontrados en animales sanos. *S. aureus* (1) con un N de 57 (31,15%) del total, el mayor porcentaje, 31(54,39%) se observaron en animales con mastitis subclínica. *S. coagulasa negativa* (2) con 44 (24,04%) observaciones del N total 24 (54,55%) se encuentran en animales sanos. Las observaciones pertenecientes a *S. uberis* (3) fueron 12 (6,56%), de los cuales se encontraron en 9 (75%) animales con mastitis clínica. Para los patógenos *S. dysgalactiae*, *Bacillus spp.* y *E. coli* agrupados como 4, tenemos que de las 11 (6,01%) observaciones del total, 9 (81,82%) presentaron animales con mastitis clínica. Por

último el patógeno *C. bovis* (5) se presentó en 11 observaciones de los cuales 8 (72.73%) correspondieron a animales sanos (Gráfico 6).

De estos datos analizados podemos observar que los patógenos 0 (sin patógeno), 2 (*S. coagulasa negativa*) y 5 (*C. bovis*) se encuentran mayoritariamente en animales sanos, patógenos con mayor probabilidad de efecto sobre el estado de los animales. El patógeno *S. aureus* (1) lo encontramos mayoritariamente en animales con mastitis subclínica y los patógenos *S. uberis* (3) y *S. dysgalactiae*, *Bacillus spp.* y *E. coli* (4) en animales con mastitis subclínica, sin embargo de acuerdo a los parámetros entregados (tabla 13) no presentan asociación.

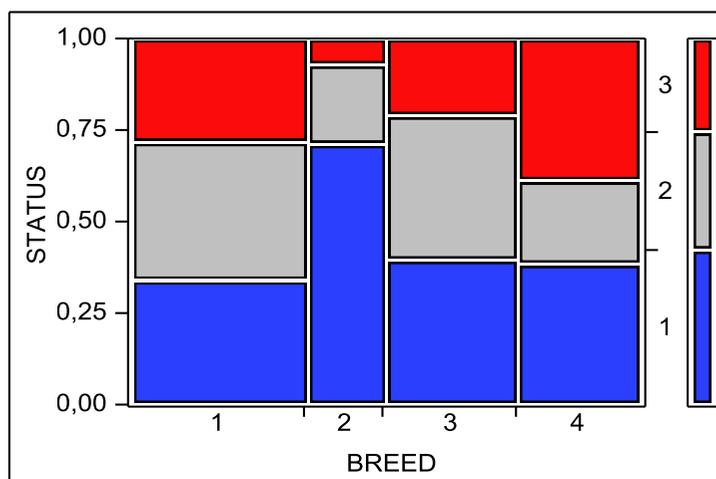
Tabla 7. Definición de variables dependiente e independientes para el modelo de regresión logístico ordinal.

Variables	Categoría	Código (Valores)	Definición (Etiqueta)
Variable dependiente			
Status (Estado o Condición)	Ordinal	1	Sano o Control
		2	SCM
		3	CM
Variable independiente			
Breed (Raza)*	Nominal	1	Holstein
		2	Jersey
		3	Montbeliarde
		4	Overo colorado
M1 (Marcador 1 TLR4 P-226)	Nominal	CC	CC
		CG	CG
		GG	GG
M2 (Marcador 2 TLR4 2021)	Nominal	CC	CC
		CT	CT
		TT	TT
M3 (Marcador 3 Lact P-28)	Nominal	CC	CC
		CA	CA
		AA	AA
Pathogen (Patógeno)	Nominal	0	Sin patógeno
		1	<i>S. aureus</i>
		2	<i>S. coagulasa negativa</i>
		3	<i>S. uberis</i>
		4	<i>S. dysgalactiae</i>
		5	<i>C. bovis</i>
		6	<i>Streptococcus spp.</i>
		7	<i>Bacillus spp.</i>
8	<i>E. coli</i>		

Breed (Raza)*: Esta variable no forma parte de los objetivos propuestos.

Tabla 8. Parámetros estimados para Status vs Breed

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq
Intercept[1]	-0,1727323	0,1641289	1,11	0,2926
Intercept[2]	1,27900914	0,187361	46,60	<,0001*
BREED[1]	-0,4137601	0,223723	3,42	0,0644
BREED[2]	1,10827799	0,3337235	11,03	0,0009*
BREED[3]	-0,1414014	0,2432262	0,34	0,5610

Gráfico 1. Distribución de la variable explicativa *Breed* sobre la variable de respuesta *Status*.**Tabla 9.** Parámetros estimados para *Status* vs M1 (TLR4 P-226)

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq
Intercept[1]	-0,3261169	0,1545078	4,45	0,0348*
Intercept[2]	1,06116033	0,1731555	37,56	<,0001*
M1[CC]	0,26282691	0,1958803	1,80	0,1797
M1[CG]	-0,0589956	0,1861749	0,10	0,7513

Gráfico 2. Distribución de la variable explicativa M1 sobre la variable de respuesta *Status*.

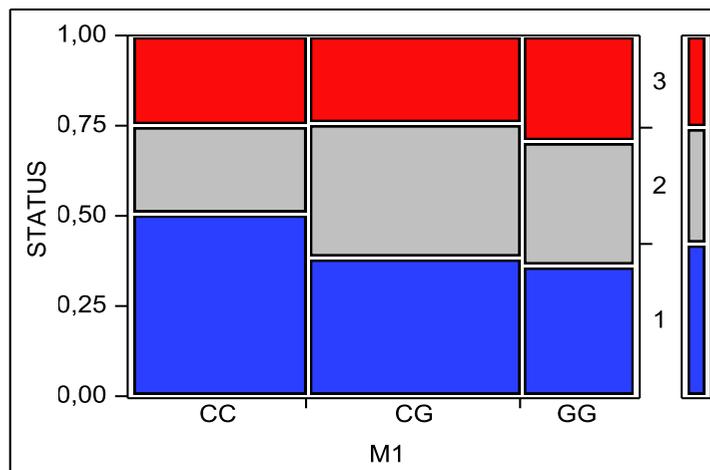


Tabla 10. Parámetros estimados para *Status* vs M2 (TLR4 2021)

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq
Intercept[1]	0,24389309	0,2989371	0,67	0,4146
Intercept[2]	1,67871462	0,3202885	27,47	<,0001*
M2[CC]	-0,8510982	0,3125326	7,42	0,0065*
M2[CT]	-0,0957931	0,3332695	0,08	0,7738

Gráfico 3. Distribución de la variable explicativa M2 sobre la variable de respuesta *Status*.

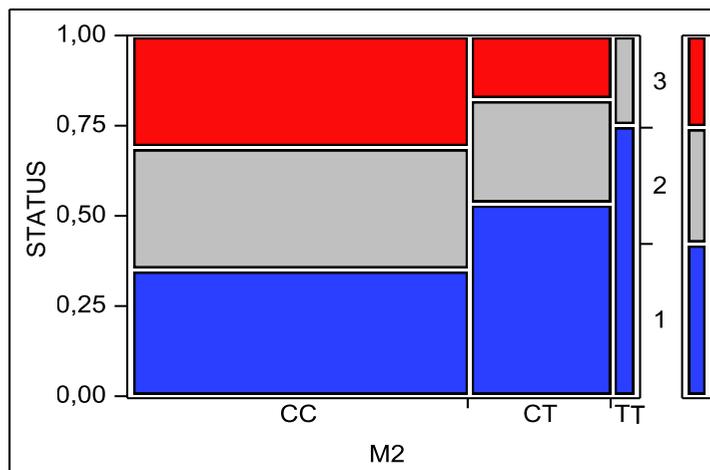


Tabla 11. Parámetros estimados para *Status* vs M3 (Lact P-28)

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq
Intercept[1]	-0,269017	0,1755483	2,35	0,1254
Intercept[2]	1,13922437	0,1952979	34,03	<,0001*
M3[AA]	-0,4063223	0,2048155	3,94	0,0473*
M3[CA]	0,23683245	0,2041871	1,35	0,2461

Gráfico 4. Distribución de la variable explicativa M3 sobre la variable de respuesta *Status*.

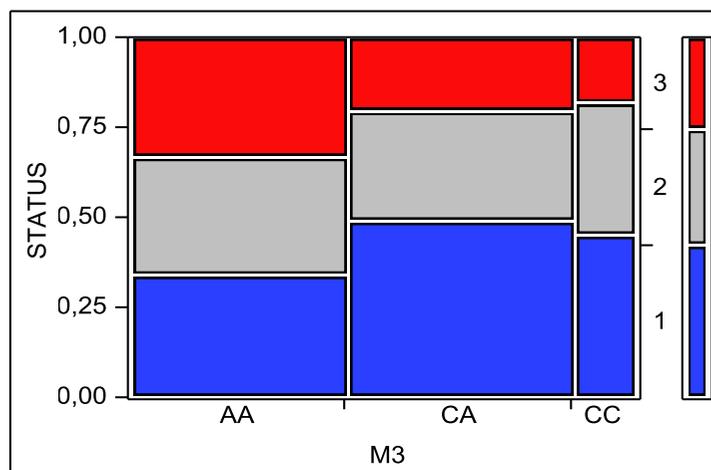
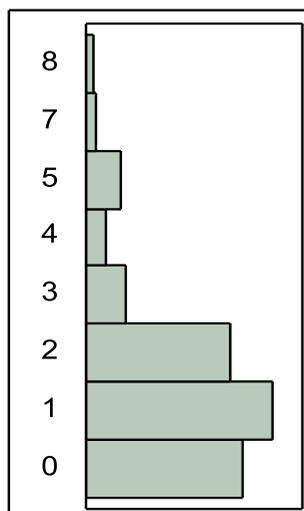


Tabla 12. Frecuencias de patógenos.

Level	Count	Prob
0	48	0,26230
1	57	0,31148
2	44	0,24044
3	12	0,06557
4	6	0,03279
5	11	0,06011
7	3	0,01639
8	2	0,01093
Total	183	1,00000

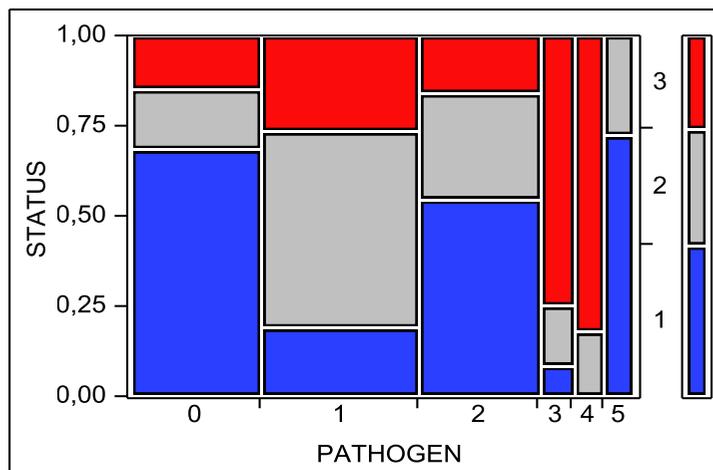
N Missing 5
8 Levels

Agrupados = Patógenos 4, 7, 8 = 4
Excluidos = Patógeno 6

Gráfico 5. Distribución de patógenos.**Tabla 13.** Parámetros estimados para *Status* vs *Pathogen*.

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq
Intercept[1]	-0,9163246	0,2437711	14,13	0,0002*
Intercept[2]	0,91378799	0,2499031	13,37	0,0003*
PATHOGEN[0]	1,58788828	0,3398677	21,83	<,0001*
PATHOGEN[1]	-0,1575902	0,2988083	0,28	0,5979
PATHOGEN[2]	1,02599413	0,3295563	9,69	0,0019*
PATHOGEN[3]	-1,9686134	0,5873926	11,23	0,0008*
PATHOGEN[4]	-2,4588313	0,6902334	12,69	0,0004*

Gráfico 6. Distribución de la variable explicativa *Pathogen* sobre la variable de respuesta *Status*.



7. DISCUSIÓN

La mastitis bovina continua siendo una de las enfermedades que más pérdidas produce a la industria lechera a nivel mundial. Teniendo en cuenta que en la resistencia y/o susceptibilidad a la enfermedad están involucrados muchos genes, en este estudio se llevó a cabo el análisis de polimorfismos de tipo SNP en los genes TLR4 y Lactoferrina en bovinos de diferentes razas, mediante técnicas de biología molecular y estadísticas, entregándonos un primer enfoque de la asociación existente entre la presentación de mastitis, distribución de patógenos y los marcadores.

Para obtener los genotipos se utilizaron dos técnicas basadas en PCR pero con distintas características. El primer método de genotipado fue el PCR-RFLP el cual consiste en la amplificación de una secuencia de interés y su posterior corte mediante enzimas de restricción que reconocen sitios específicos dependiendo de la presencia de un alelo u otro, generando fragmentos cuyo tamaño permite inferir el genotipo. Si bien esta técnica se ha utilizado ampliamente para genotipar diferentes polimorfismos, podría no ser completamente de confianza, especialmente por casos indescifrables en heterocigotos (Yoshida *et al.* 2008). El segundo método utilizado fue el PCR-HRM, el cual consiste en analizar el comportamiento melting del DNA, es decir, la transición de DNA de doble hebra (dsDNA) a DNA de simple hebra (ssDNA), midiendo la pérdida de fluorescencia de un fluoróforo que se intercala en el DNA doble hebra. Las curvas de diferencia de fluorescencia pueden identificar polimorfismos y variantes genóticas en base a diferencias en su secuencia, contenido G-C, longitud y cambios de base, incluyendo polimorfismos tipo SNP. Sin embargo, la asignación y determinación de las variantes genóticas requiere de controles positivos, es decir, de muestras con genotipo conocido. El análisis mediante HRM es más rápido y requiere una menor expertiz comparado con métodos basado en gel como PCR-RFLP, lo que hace este método una herramienta ideal, permitiendo genotipar una gran cantidad de muestras en poco tiempo comparado con las 12 horas aproximadas para la mayoría de métodos basados en gel (Abdolmohammadi *et al.*, 2011).

Así, las diferencias entre genotipos son más fáciles de ver si los amplicones son fragmentos más pequeños y estos permiten la utilización de protocolos más rápidos (Liew *et al.* 2004), optimizando la reacción. Una importante ventaja del HRM sobre otros métodos es que el análisis se realiza en el mismo tubo y a continuación de la amplificación no requiriendo ninguna manipulación de las muestras post-PCR, sondas etiquetadas, enzimas de restricción o separación en gel, siendo particularmente adecuado para aplicaciones de alto rendimiento (Wittwer *et al.* 2003; Abdolmohammadi *et al.*, 2011). Sin embargo, el análisis mediante PCR-HRM requiere un instrumental específico que permita el análisis de *melting* en condiciones específicas y de alta sensibilidad. Así, todos los métodos de genotipado tienen sus ventajas y desventajas en términos de simplicidad, rendimiento, sensibilidad, tiempo y costo (Abdolmohammadi *et al.*, 2011).

El primer marcador estudiado correspondió al SNP P-226 el cual se localiza en la región putativa del promotor del gen TLR4. El genotipado de las muestras para este polimorfismo, inicialmente, fue realizado mediante qPCR-HRM. Las muestras homocigotas pudieron ser genotipadas por un cambio absoluto en la T_M , mientras que muestras heterocigotas debieran ser identificadas a través de cambios en la forma de las curvas de *melting* (Abdolmohammadi *et al.* 2011), sin embargo la diferencia de T_M de este polimorfismo fue despreciable por lo que se dificultó la discriminación de los homocigotos (figura 4), no pudiendo discriminar eficientemente los distintos genotipos. Esto confirma la dificultad para distinguir los homocigotos de SNPs clase 4, en donde, el par de bases (C-G) está simplemente invertido, la base solo cambia de hebra, permaneciendo el mismo par de bases, con lo cual casi no se detectan las alteraciones de las propiedades termodinámicas y físico-químicas de la doble hebra (Liew *et al.* 2004). Es por esto que para este marcador las muestras fueron genotipadas, en su totalidad, mediante PCR-RFLP.

Una vez completado el genotipado de las muestras se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas mediante conteo simple, encontrándose la población total en equilibrio génico. Respecto a la población Holstein, la variante predominante fue el alelo G (0,57), igual a lo descrito por Sharma *et al.* 2006 (0,6) y Ruiz-Larrañaga *et al.* 2011 (0,57).

El SNP P-226 de TLR4 corresponde a una transversión C > G, y se ha sugerido que sea probablemente una variante causal (Ruiz-Larrañaga *et al.* 2011). De acuerdo a esto, se ha reportado que el alelo G está asociado con una mayor persistencia de lactancia y como haplotipo junto con otro SNP, se ha asociado con un mayor número o recuento de células somáticas, pudiendo ser indicativo de una mayor susceptibilidad a mastitis en bovinos Holstein (Sharma *et al.* 2006). Este polimorfismo fue evaluado individualmente en este trabajo, presentando ningún tipo de asociación. Se ha demostrado que este SNP afecta la expresión del gen TLR4, individuos portadores del genotipo GG exhiben mayores niveles de expresión, comparado con los genotipos CC y CG, lo que pudiera ser resultado de una alteración del sitio de unión de factores de transcripción que regulan la expresión del gen (Sharma *et al.* 2008; Ruiz-Larrañaga *et al.* 2011). De hecho, el polimorfismo está cercano a una región que presenta posibles sitios de unión de factores de transcripción como c-Ets-1, MZF1 y ADR1 (Sharma *et al.* 2006; Beecher *et al.* 2007).

El segundo SNP estudiado se encuentra en el exón 3 del gen TLR4, localizado en la posición 2021. Al igual que el polimorfismo anterior fue detectado en un estudio llevado a cabo por Sharma *et al.* 2006, y corresponde a una transición C > T. Este polimorfismo resulta en una sustitución de treonina (alelo C) con isoleucina (T), aminoácido en la posición 674, localizado dentro del dominio de transmembrana/citoplasmático (White *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2006).

En dos estudios que incluyeron bovinos Holstein, Jersey y cruza Brahman-Angus, se ha obtenido como alelo predominante la variante C (Sharma *et al.* 2006; Pinedo *et al.* 2009). Sin embargo, en 2009 Beecher *et al.* reportaron en una población de diferentes razas (Holstein, Jersey, Montbeliarde y Rojo noruego) como predominante al alelo T (0,62), el cual fue asociado a mayor porcentaje de grasa en leche. En el estudio de 2006, Sharma *et al.* reportaron una asociación del alelo C, de mayor frecuencia (0,93), con un menor *score* de células somáticas (SCS) y mayor persistencia lactacional. A diferencia del este estudio de Sharma *et al.* 2006, ningún genotipo TT fue detectado en los animales Holstein de nuestro estudio, lo que podría deberse al tamaño de nuestra muestra animal. Similar a nuestros resultados, Beecher *et al.* 2010

reportaron que los bovinos Jersey tienen una menor proporción del genotipo CC (0,38), y de la misma manera el genotipo TT estuvo ausente en bovinos Montbeliarde.

El tercer polimorfismo genotipado fue un SNP localizado en la posición 28 de la región promotora del gen lactoferrina (Lf), inmediatamente después de la caja TATA (Daly *et al.* 2006; O'Halloran *et al.* 2008), correspondiente a una transición C > A, siendo el SNP más frecuentemente encontrado en este gen, Daly *et al.* 2006. Así, su presencia en varias razas sugiere que es improbable que este SNP tenga algún efecto significativo, particularmente un efecto perjudicial en la expresión del gen lactoferrina, dada la amplia distribución aparente. O por el contrario el que sea encontrado en una mayor frecuencia, pueda indicar que alguna de sus variantes alélicas tenga un efecto significativo en la expresión de lactoferrina.

El genotipado de este marcador mediante qPCR-HRM fue desarrollado con una excelente confiabilidad, sin embargo, durante el transcurso de los análisis se detectaron algunas muestras (8) mostraban un cuarto tipo de curva de *melting* con dos peaks, como ocurre con la curva correspondiente a muestras heterocigotas, pero ésta presentaba una forma distinta (Figura 3E). Dado que las curvas entregadas por el HRM se basan en el contenido G-C, longitud o cambio de base, este resultado sugiere la posibilidad de existencia de un polimorfismo adicional dentro de la secuencia del amplicón, distinto al SNP en estudio (P-28), por lo tanto, para corroborar el genotipo de estas muestras se realizó un PCR-RFLP, mediante el cual se corroboró que estas muestras correspondían a animales heterocigotos. Además, estas muestras fueron purificadas para su posterior secuenciación.

Similarmente a las frecuencias alélicas observadas en nuestro trabajo (A, 66%), O'Halloran *et al.* 2009 reportaron que en bovinos Holstein, Jersey y Montbeliarde el alelo A fue predominante con una frecuencia de 72%. El mismo autor y colaboradores (2010) reportaron una tendencia de asociación entre el alelo C presente en machos Holstein y una mayor sobrevivencia

de las vacas hijas, y con un mayor SCS, éste último, resultado contrastante con el efecto de sustitución alélica.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis genético de los marcadores SNPs (TLR4 P-226; 2021 y Lact P-28), para cada biotipo, los rebaños utilizados en este estudio se encuentran en equilibrio génico, esto según los valores de χ^2 cotejados en una tabla de distribución de chi-cuadrado, y utilizando 1 grado de libertad, debido a que las frecuencias alélicas fueron estimadas de los datos, de modo que los valores observados y esperados deben estar de acuerdo con sus frecuencias alélicas así como en sus totales (Smith 1970).

Los análisis estadísticos para determinar el efecto de los genotipos sobre el tipo de presentación de la mastitis se realizaron mediante un modelo de regresión logística el cual se utiliza para estudiar el efecto de múltiples variables explicatorias sobre una variable de respuesta categórica, ya sea dicotómica o de más de dos categorías en escala ordinal (Taucher, E., 1999). La regresión logística ordinal corresponde a una técnica estadística que permite describir la relación entre una respuesta y una o varias covariables (Bender, R. & grouven, U., 1997), durante un intervalo de tiempo específico, como una función de las variables explicatorias, proporcionando una representación más sucinta y una prueba más poderosa de las asociaciones en el trabajo (Warner, P., 2008). Estos métodos ordinales tienen un gran poder para detectar tendencias relevantes para la hipótesis nula “sin efecto” de una variable explicatoria sobre una variable de respuesta (Agresti, A., 2010), y se utilizan cuando la detección de la asociación entre la variable explicativa y la variable de respuesta se lleve a cabo de manera uniforme en toda la gama de sus valores posibles (Warner, P., 2008), esto debido a que la regresión logística ordinal ajusta sólo un parámetro por asociación, independiente del número de niveles que tiene la variable de respuesta, reduce el número de parámetros que tiene para ser fijados, aumentando así el poder y simplificando reportes e interpretación (Warner, P., 2008).

Un análisis ordinal puede dar resultados bastante diferentes y más poderosos que un análisis que ignora la ordinalidad (Agresti, A., 2010). Para una variable de respuesta ordinal, hay

una pequeña variabilidad en los valores predictores para que las observaciones caigan principalmente en las categorías mayores (o principalmente en las categorías más bajas), pero hay una variabilidad considerable en los valores predictores para que las observaciones tiendan a ser extendidas entre las categorías (Agresti, A., 2010). La regresión ordinal, está orientada a las variables de respuesta con efectos ordinal, ya que trabaja con la distribución acumulada de la variable de respuesta, y el parámetro se ajusta para que cada asociación represente la tendencia general en los valores ordinales de la variable de respuesta (Warner, P., 2008). En el caso de nuestras variables aquellas categorías con valores mayores fueron las seleccionadas como probables de tener asociación entre las variables, ya que idealmente se debe aumentar el tamaño de muestra para tener un tamaño muestral (n) similar entre las distintas razas.

Los resultados obtenidos del análisis *Status vs Breed* son de cuidado, ya que el n correspondiente al biotipo Jersey es muy bajo lo cual impide hacer una asociación real, sin embargo nos entrega un primer enfoque, el cual está sujeto a cambiar o no al subir el tamaño poblacional. En cuanto para el análisis de *Status vs M2*, el genotipo TT, en el gráfico 3 se puede observar que está presente en mayor porcentaje en animales sanos. Sin embargo, los análisis muestran que no existe una asociación significativa, por lo tanto, se asume que lo observado es atribuido a ciertas muestras y no extrapolable a la población total.

De lo observado en los análisis de *Status vs Pathogen*, uno de los patógenos con resultados positivos de asociación (*S. coagulasa negativa*), interesantemente fue asociado a animales sanos, sin embargo, generalmente este patógeno se encuentra en animales con mastitis subclínica. Esta bacterias son de elevado interés, debido a que hoy en día son los microorganismos más frecuentemente aislados en vacas y novillas de los rebaños y en la actualidad se consideran patógenos emergentes de la mastitis bovina (Pyörälä *et al.* 2009). Generalmente las infecciones por *S. coagulasa negativa* suelen ser leves o de tipo subclínico, se ha demostrado también que pueden causar procesos más graves y persistentes y provoca un aumento en el RCS y una disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado al tejido mamario (Taponen *et al.* 2009).

8. CONCLUSIÓN

La mastitis bovina sigue siendo la principal enfermedad de los rebaños lecheros a nivel mundial, incluyendo la zona sur de nuestro país. La resistencia y/o susceptibilidad a mastitis es afectada por muchos genes, y se ha descrito que entre distintas razas de bovinos y dentro de ellas, hay una mayor o menor tasa de infección. En base a lo anterior, se optimizaron e implementaron protocolos para realizar análisis de biología molecular, genética y estadísticos para la evaluación de polimorfismos en dos genes del sistema inmune bovino, TLR4 y lactoferrina de los cuales se obtuvieron las siguientes conclusiones.

El genotipado de las muestras fue realizado exitosamente, mediante qPCR-HRM, que resultó ser una herramienta bastante útil para lograr los objetivos propuestos, esto debido a que requiere menos tiempo que otras técnicas ya que no necesita tratamientos post-PCR, como lo es por ejemplo PCR-RFLP, se pueden realizar múltiples muestras a la vez, e identifica con gran precisión las distintas variantes genotípicas, si los parámetros de la técnica están bien ajustados no hay necesidad repetir los análisis de las muestras. La técnica de PCR-RFLP, además, de ser utilizada para la determinación de los controles positivos para el qPCR-HRM, resultó ser una alternativa adecuada para la obtención de los genotipos de aquellas muestras dificultosas de realizar en el equipo de HRM, como fue el caso del SNP TLR4 P-226, aunque probablemente faltó mejorar la estandarización del protocolo para esta clase de SNPs (clase 4), ya que los fabricantes del equipo proponen una dificultosa labor, sin embargo, es posible identificar las variantes genotípicas de esta clase de SNPs.

Los marcadores evaluados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en los rebaños del estudio, lo que fue determinado mediante pruebas de Chi-cuadrado χ^2 . Similar a los resultados reportados en otros estudios.

Los análisis estadísticos no arrojaron resultados positivos de asociación para los marcadores con la presentación de la enfermedad, sin embargo, si se obtuvieron resultados positivos de asociación entre bovinos sanos y los patógenos *S. coagulasa negativa* (2) y *C. bovis* (5) y aquellas que no presentaban patógeno (0). Sin embargo, estos resultados son de cuidado, ya que el tamaño muestral es muy bajo. Los análisis debieran ser realizados con un “N” total de observaciones superior y similar entre las distintas razas en evaluación, para que los datos obtenidos sean representativos de la población, por lo tanto deben tomarse como resultados prometedores, no definitivos.

Más estudios son necesarios para la confirmación y validación de estos resultados, además de agregar más variables a los análisis y evaluar los marcadores como haplotipos.

9. RESUMEN

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes de la industria lechera a nivel mundial, incluyendo a Chile. Se caracteriza como una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, donde se produce una respuesta inflamatoria de ésta ante la invasión de diversos patógenos, pudiendo presentarse en grado subclínico o clínico. En la respuesta inmune asociada participan factores anatómicos, celulares y/o humorales que facilitan el reclutamiento de neutrófilos desde el torrente sanguíneo a los sitios de infección para eliminar las bacterias invasoras. Por otra parte, la resistencia y/o susceptibilidad a mastitis es afectada por muchos genes, y se ha descrito que entre distintas razas de bovinos y también dentro de ellas, hay una mayor o menor tasa de infección. Así, genes asociados con la función neutrófila podrán ser utilizados como marcadores genéticos putativos para resistencia a mastitis. El receptor tipo Toll 4 (TLR) y lactoferrina, son putativos marcadores de resistencia a mastitis debido a su importante rol en la respuesta inmune.

En base a estos antecedentes, proponemos que polimorfismos en los genes de TLR4 (P-226; 2021) y lactoferrina (P-28) podrían estar asociados con el tipo de presentación de mastitis en el ganado lechero y/o los patógenos involucrados de la enfermedad. Bovinos de diversas razas fueron genotipados mediante PCR-RFLP y qPCR-HRM y el cálculo de sus frecuencias genotípicas y alélicas por conteo simple, permitió estimar el equilibrio de H-W a través de una prueba de Chi-cuadrado. Mediante un modelo de regresión logística ordinal se estableció un efecto preliminar de patógenos asociados sobre la condición de bovinos pertenecientes a la región de Los Lagos.

Palabras Claves: Genes del sistema inmune, Lactoferrina, TLR4, SNPs, PCR - RFLP, qPCR-HRM, Regresión logística ordinal.

10. SUMMARY

Bovine mastitis is one of the most important diseases of the dairy industry worldwide, involving Chile. It is an infecto-contagious disease of mammary gland, where produce an inflammatory response, face to various pathogens invasion, may can occur in subclinical or clinical grade. The associated immune response involving anatomical, cellular and/or humoral factors, in order to induce the neutrophils recruitment from the bloodstream to infection sites to eliminate invading bacteria. On the other hand, the resistance and/or susceptibility to mastitis is affected by many genes, and has been described, between different breeds of cattle and also inside them, there is a greater or less rate of infection. Genes associated with neutrophil function would be putative genetic markers for resistance to mastitis, such as Toll-like receptor 4 (TLR) and lactoferrin, are putative markers of mastitis resistance, due to its important role in the immune response.

Based on background, we propose that polymorphisms in the TLR4 (P-226, 2021) and lactoferrin (P-28) genes may be associated with the type of presentation of mastitis in dairy cattle, the somatic cell score and/or the pathogens involved in disease. Genotypes in several breeds were assessed by RFLP-PCR and HRM-qPCR and the calculated genotypic and allelic frequencies by simple counting, allow to estimate the H-W equilibrium through a Chi-square test. Using an ordinal logistic regression model was established a preliminary effect of associated pathogens on the status cattle belonging to Los Lagos region.

Keywords: Immune system genes, Lactoferrin, TLR4, SNPs, RFLP-PCR, HRM-qPCR, Ordinal logistic regression.

11. LITERATURA CITADA

Abdolmohammadi A, Atashi H, Zamani P and Bottema C. (2011) “High resolution melting as an alternative method to genotype diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in cattle”. *Czech. J. Anim. Sci.* 56(8):370-376.

Agresti, A. (2010) “Analysis of Ordinal Categorical Data”. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Arnould VMR, Soyeurt H, Gengler N, Colinet FG, Georges MV, Bertozzi C, Portetelle D and Renaville R. (2009) “Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk”. *J. Dairy Sci.* 92:2151-2158.

Barkema HW, Schukken YH and Zadoks RN. (2006) “Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis”. *J. Dairy Sci.* 89:1877-1895.

Beecher C, Daly M, Meaney WJ, McCarthy TV, Ross RP and Giblin L. (2007) “Genotyping dairy cows for polymorphisms associated with mastitis”.

Beecher C, Daly M, Childs S, Berry D, Magee D, McCarthy T and Giblin L. (2010) “Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle”. *BMC Genetics.* 1-9.

Bender, R. and Grouven, U. (1997) “Ordinal logistic regression in medical research”. *J. of the royal College of Physicians of London* 31(5): 546-551.

Concha C. (2008) “Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control”. Universidad de Chile.

Concha C. (2009) “Incrementar la inmunidad mamaria e introducir diagnósticos bacteriológicos al secado”. Universidad de Chile.

Daly M, Ross P, Giblin L and Buckley F. (2006) “Polymorphisms within the lactoferrin gene promoter in various cattle breeds”. *Animal Biotech.* 17:33-42.

De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, Paape MJ, Peelman L and Burvenich C. (2008) “The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle”. *Vet. Res.* 39:05.

Detilleux JC. (2002) “Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens”. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88:103-110.

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.* 80:406-412.

Fonseca I, Vendramini P, Lange CC, Guimaraes M, Amaral MM, Silva KR, Sávio P, Guimaraes JD and Guimaraes S. (2009) “Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle”. *Genetics and Molecular Biology.* 32(4):776-781.

Griesbeck-Zilch B, Meyer HH, Kuhn CH, Schwerin M and Wellnitz O. (2008) “*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells”. *J. Dairy Sci.* 91:2215-2224.

Hagiwara S, Kawai K, Anri A and Nagahata H. (2003) “Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitis cows”. *J. Vet. Med. Sci.* 65:319-323.

Holmberg M and Andersson-Eklind L. (2004) “Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle”. *J. Dairy Sci.* 87:2653-2659.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K and Akira S. (1999) “Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product”. *J. Immunol.* 162:3749-3752.

Ibeagha-Awemu, Kgwatalala P, Ibeagha A and Zhao X. (2008) “A critical analyses of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig”. *Mamm. Genome.* 19:226-245.

Kai K, Komine Y, Komine K, Asai K, Kuroishi T, Kozutsumi T, Itagaki M, Ohta M and Kumagai K. (2002) “Effects of bovine Lactoferrin by the intramammary infusion in cows with *Staphylococcal* mastitis during the early non-lactating period”. *J. Vet. Med. Sci.* 64(10):873-878.

Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrli ME, Dietz AB et al. (1997) “Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle”. *J. Dairy Sci.* 80:1767-1775.

Kerr DE and Wellnitz O. (2003) “Mammary expression of new genes to combat mastitis”. *J. Anim. Sci.* 81(3):38-47.

Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I and Raadsma HW. (2004) “Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and metanalyses”. *Gen. Sel. Evol.* 36:163-190.

Lacasse P, Lauzon K, Diarra MS and Petiiclere D. (2008) “Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens”. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl 13)66-71.

Lee TH, Shimazaki K, Yu SL, Nam MS, Kim SJ, Lee KK and Yu DY. (1997) “Polymorphic sequence of Korean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity”. *Anim. Genetics.* 28:367-369.

Li GH, Zhang Y, Sun DX and Li N. (2004) “Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis”. *Animal Biotechnol.* 15:67-76.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E and Wittwer C. (2004) “Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons”. *Clinical Chemistry* 50(7):1156-1164.

Lorenz E, Mira JP, Frees KL, and Schwartz DA. (2002) “Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram negative septic shock”. *Arch Intern Med.* 162:1028-1032.

Lu YC, Yeh WC and Ohashi PS. (2008) “LPS/TLR4 signal transduction pathway”. *Cytokine.* 42:145-151.

Mariotti M, Williams JL, Dunner S, Valentini A and Pariset L. (2009) “Polymorphisms within the Toll-Like Receptor (TLR)-2, -4, and -6 genes in cattle”. *Diversity.* 1:7-18.

Ogorevc J, Kunej T and Dovc P. (2008) “An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: A step forward to new genetic markers”. *Acta Agriculturae Slovenica.* 2: 85-91.

Ogorevc J, Kunej T, Razpet A and Dovc P. (2009) “Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis”. *Animal Genetics.* 40: 832-851

O’Haloran F, Bahar B, Buckley F, O’Sullivan O, Sweeney T and Giblin L. (2009) “Characterization of single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy breeds”. *Biochimie*. 91:68-75.

Osteras O, Solverod L and Reksen O. (2006) “Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering”. *J. Dairy Sci.* 89:1010-1023.

Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A and Baizabal- Aguirre VM. (2007) “Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis”. *J. Infection*. 54:399-709.

Pinedo P, Buergelt C, Donovan G, Melendez P, Morel L, Wu R, Langae T and Rae D. (2009) “Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle”. *Prev. Vet. Med.* 1-8.

Pyörälä S, Taponen S. (2009) “Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens”. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):1-8.

Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M and Lagacé J. (2001) “Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR”. *J. Clin. Microbiol.* 39(7): 2584-2589.

Ruiz-Larrañaga O, Manzano C, Iriondo M, Garrido JM, Molina E, Vasquez P, Juste R and Estonba A. (2011) “Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle”. *J. Dairy Sci.* 94:3635-3641.

Rupp R and Boichard D. (2003) “Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle”. *Vet. Res.* 34:671-688.

Rupp R., Hernandez A. and Mallard B.A. (2007) Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90, 1029–38.

Schröder N and Schumann R. (2005) “Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease”. *Lancet. Infect. Dis.* 5:156-164.

Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC and Leslie KE. (1998) “Associations of bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle”. *Anim. Genetics.* 29:185-193.

Sharma BS, Leyva I, Schenkel F and Karrow NA. (2006) “Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls”. *J. Dairy Sci.* 89:3626-3625.

Sharma BS, Mount J and Karrow NA. (2008) “Functional characterization of a single nucleotide polymorphism in the 5' UTR region of the bovine toll-like receptor 4 gene”. *Dev. Biol.* 132:331-336.

Smith C. (1970) “A note on testing the Hardy weinberg law”. *Ann. Hum. Genet.*, 33:377-383.

Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC and 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.* 92:117-129.

Tanaka T, Nakamura I, Lee NY, Kumura H and Shimazaki K. (2003) “Expression of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe by recombinant baculovirus and its antimicrobial activity against *Prototheca zopfii*”. *Biochem. Cell Biol.* 81:349-354.

Taponen S, Pyörälä S. (2009) “Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from staphylococcus aureus?”. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):29-36.

Taucher, E. 1999. Bioestadística “Regresión logística”. Editorial Universitaria, 2ª edición: 241-248.

Valenti P and Antonini G. (2005) “Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack”. *Cell Mol. Life Sci.* 62:2576–2587.

Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE and Fine DH. (2003) “One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis”. *Infect Immun.* 71:6141-6147.

Wang X, Xu S, Gao X, Li J, Ren H and Luoren Z. (2008) “Cloning and SNP screening of the TLR4 gene and the association between its polymorphism and somatic cell score in dairy cattle”. *South African J. Anim. Sci.* 38(2):101-109.

Warner, P. (2008) “Ordinal logistic regression”. *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care.* 34(3): 169-170

Werling D, Piercy J and Coffey TJ. (2006) “Expression of toll-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cell potential role in pathogen discrimination?”. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112:2-11.

Wittwer C, Reed G, Gundry C, Vandersteen J and Pryor R. (2003) “High-resolution Genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen”. *Clinical Chemistry* 49(6):853-860.

White SN, Taylor KH, Abbey CA, Gill CA, and Womack JE. (2003) “Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain”. *PNAS*. 100:10364-10369.

Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B y Zschoeck M. (2001) “La mastitis bovina”. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Univ. De Guadalajara. 1-68

Yoshida T, Mukoyama H, Furuta H, Holmes C, Kosugiyama M and Tomogane H. (2008) “Allelic frequency of PCR-RFLP type of the BoLA-DRB3 in Japanese Holstein herds and the relation to mastitis”. *Animal Science Journal*. 79:409-416.

Zhang JX, Zhang SF, Wang TD, Guo XJ and Hu RL. (2007) “Mammary gland expression of antibacterial peptide genes to inhibit bacterial pathogens causing mastitis”. *J. Dairy Sci.* 90:5218-5225.

12. ANEXOS

Tabla Anexo 1. Tabla de contingencia de *Breed vs Status*.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	
1	22 11,96 28,21 34,38	24 13,04 40,68 37,50	18 9,78 38,30 28,13	64 34,78
2	20 10,87 25,64 71,43	6 3,26 10,17 21,43	2 1,09 4,26 7,14	28 15,22
3	19 10,33 24,36 39,58	19 10,33 32,20 39,58	10 5,43 21,28 20,83	48 26,09
4	17 9,24 21,79 38,64	10 5,43 16,95 22,73	17 9,24 36,17 38,64	44 23,91
	78 42,39	59 32,07	47 25,54	184

Tabla Anexo 2. Tabla de contingencia de M1 vs *Status*.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	
CC	33 17,93 42,31 50,77	16 8,70 27,12 24,62	16 8,70 34,04 24,62	65 35,33
CG	30 16,30 38,46 38,46	29 15,76 49,15 37,18	19 10,33 40,43 24,36	78 42,39
GG	15 8,15 19,23 36,59	14 7,61 23,73 34,15	12 6,52 25,53 29,27	41 22,28
	78 42,39	59 32,07	47 25,54	184

Tabla Anexo 3. Tabla de contingencia de M2 vs *Status*.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	
CC	44 23,91 56,41 35,48	42 22,83 71,19 33,87	38 20,65 80,85 30,65	124 67,39
CT	28 15,22 35,90 53,85	15 8,15 25,42 28,85	9 4,89 19,15 17,31	52 28,26
TT	6 3,26 7,69 75,00	2 1,09 3,39 25,00	0 0,00 0,00 0,00	8 4,35
	78 42,39	59 32,07	47 25,54	184

Tabla Anexo 4. Tabla de contingencia de M3 vs *Status*.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	
AA	27 14,67 34,62 34,18	26 14,13 44,07 32,91	26 14,13 55,32 32,91	79 42,93
CA	41 22,28 52,56 49,40	25 13,59 42,37 30,12	17 9,24 36,17 20,48	83 45,11
CC	10 5,43 12,82 45,45	8 4,35 13,56 36,36	4 2,17 8,51 18,18	22 11,96
	78 42,39	59 32,07	47 25,54	184

Tabla Anexo 5. Tabla de contingencia de *Pathogen* vs *Status*.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	
0	33 18,03 42,86 68,75	8 4,37 13,56 16,67	7 3,83 14,89 14,58	48 26,23
1	11 6,01 14,29 19,30	31 16,94 52,54 54,39	15 8,20 31,91 26,32	57 31,15
2	24 13,11 31,17 54,55	13 7,10 22,03 29,55	7 3,83 14,89 15,91	44 24,04
3	1 0,55 1,30 8,33	2 1,09 3,39 16,67	9 4,92 19,15 75,00	12 6,56
4	0 0,00 0,00 0,00	2 1,09 3,39 18,18	9 4,92 19,15 81,82	11 6,01
5	8 4,37 10,39 72,73	3 1,64 5,08 27,27	0 0,00 0,00 0,00	11 6,01
	77 42,08	59 32,24	47 25,68	183