



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**VARIANTES GENÉTICAS RECESIVAS
ASOCIADAS A ABORTOS Y MORTALIDAD
DE TERNEROS EN GANADO LECHERO:
ESTUDIO SOBRE SU PRESENCIA E
IMPACTO EN EL DESEMPEÑO
REPRODUCTIVO Y PRODUCTIVO DE
VACAS HOLANDO DE URUGUAY**

Lic. Biol. Msc. Andrea BRANDA SICA

Doctora en Ciencias Agrarias

Noviembre 2022

**VARIANTES GENÉTICAS RECESIVAS
ASOCIADAS A ABORTOS Y MORTALIDAD
DE TERNEROS EN GANADO LECHERO:
ESTUDIO SOBRE SU PRESENCIA E
IMPACTO EN EL DESEMPEÑO
REPRODUCTIVO Y PRODUCTIVO DE
VACAS HOLANDO DE URUGUAY**

Lic. Biol. MSc. Andrea BRANDA SICA

Doctora en Ciencias Agrarias

Noviembre 2022

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ana Espasandín (presidenta),
Georget Banchemo (relatora) y María Montenegro (relatora) el 18 de
noviembre de 2022. Autora: Andrea Branda Sica. Directora: María Silvia
Llambí. Codirectora: María Paula Nicolini.

Dedico esta tesis a mi hijo Diego:

«Lo más bello y profundo que el Hombre puede experimentar
es el sentido del misterio.

Este es el principio que sustenta la religión,
y a toda la empresa artística y científica seria.

Aquel que no pueda experimentar eso,
si no está muerto, está ciego.

Aceptar que detrás de toda experiencia de la vida
hay algo que escapa a nuestro entendimiento,
donde la belleza y lo sublime
no nos alcanza más que indirectamente,
eso es la religiosidad.

En ese sentido yo soy religioso.

Para mí es maravillarse ante estos secretos,
e intentar humildemente captarlo mediante la inteligencia,
resultaría una imagen de la estructura grandiosa
de todo lo que existe.»

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mi directora de Tesis, la Dra. Silvia Llambí, por confiar en mí y recibirme abiertamente en la Unidad de Genética y Mejora Animal permitiéndome realizar este trabajo de investigación. Por su sensibilidad, empatía y apoyo tanto en lo académico como en lo personal. De ella me llevo muchos aprendizajes y recuerdos, la vida nos volvió a cruzar una vez más; la primera oportunidad fue cuando me recibí de bióloga, cuando también fue mi tutora de grado, y hoy en este nuevo desafío en que una vez más compartimos y celebramos los logros con el equipo de trabajo. Al igual que a la Dra. Paula Nicolini, por su excelente predisposición y participación como codirectora aportando su visión y experiencia en el tema de la optimización de la metodología PCR en tiempo real con la aplicación HRM. Me siento muy orgullosa de haber trabajado con esas excelentes personas y profesionales y haber contado con ellas en mi camino profesional y académico.

A todo el personal de la Unidad de Genética y Mejora Animal y del Laboratorio LEMA. Especialmente al Dr. Rody Artigas, por su compañerismo y por su incondicional colaboración técnica, y a Mariana Ramírez. A las Dras. Ana Meikle, Victoria Brun y Andrea Graña, y Claudia Menezes, por el apoyo, la atención, la paciencia en todo momento, y por permitirme el uso de los equipos del laboratorio.

A la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII), por confiar en mí y brindarme la beca de posgrado nacional (POS_NAC_2017_1_141239) y la oportunidad de hacer este doctorado de la Facultad de Agronomía, Udelar.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), que ha sido clave en mi crecimiento profesional y personal. Especialmente a la Junta Directiva, los directores de INIA, la Estación Experimental Las Brujas, la Unidad de Biotecnología y la Plataforma de Investigación en Salud Animal, por la oportunidad de hacerme parte de su equipo de trabajo y por haberme

facilitado las herramientas para lograr objetivos concretos y llenarme de satisfacciones por las metas logradas. A mis mentores de INIA, los Ings. Agrs. Marco Dalla Rizza y Gabriel Ciappesoni, por sus valiosos consejos y sus incondicionales apoyos. A los directores de INIA Las Brujas, los Ings. Agrs. Santiago Cayota y Alejandro Pizzolon. A mis compañeros de INIA que me acompañaron y me apoyaron: especialmente la Dra. María Teresa Federici, Dr. Federico Giannitti, Dr. Darío Caffarena, Lic. Beatriz Carracelas, Andrea Vergara, Akira Saito, Adriana Lenzi, María Belén Bonilla y Sara Murchio.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC-Udelar), que me apoyó para que no me faltara nada y pudiera presentar los resultados de la presente tesis.

A las Dras. Elena de Torres y Evangelina Kinley, del Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, que me facilitaron los datos reproductivos de las vacas a último momento.

A los Dres. Rubén Pérez y Ana Marandino, por recibirme abiertamente en el laboratorio de Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias con una pasantía, en la que he profundizado las técnicas de diagnóstico molecular de bronquitis aviar y de secuenciación usando la plataforma Illumina.

A los Drs. Fernando Dutra y Carolina Briano, del DILAVE Treinta y Tres, que siempre estuvieron presentes como equipo de trabajo en la temática de enfermedades hereditarias en bovinos.

A Isabel Pastor, Intérprete de LSU, por su incondicional apoyo en facilitarme la comunicación con el tribunal en la defensa de la Tesis.

A la Unidad de Posgrados y Educación Permanente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, por la excelente atención y el seguimiento del proceso de la entrega de la presente tesis: Berenice Levin, Elisabeth Carrega y Elisa Darré.

A Lorenzo Helguera, que ya no está, por alentarme desde siempre a ir más allá de un posgrado, y porque el privilegio de conocerlo me dio una gran enseñanza de vida.

A mis abuelos, mi papá y mi papá del corazón, que tampoco están, pero que siempre los llevo en mi corazón y me acompañan con sus ejemplos, enseñanzas y sabidurías.

A mi familia, mis hermanas Valentina y Guillermina, mi cuñado Rodrigo, mis sobrinos Camila, Lua, Federica, Agustina y Santiago, mis tíos, mis primos y mis amigos, por estar pendientes de una forma u otra muy particular.

A mi mamá, los días y las horas que me dedicó, me apoyó moral y afectivamente, me alentó constantemente a todo para seguir adelante con gran entereza y convicción.

De forma muy especial, darle las gracias a mi hijo Diego, con quien tengo la bendición de compartir mi vida, un desafío para los dos que nos hace querer y amar aún más, si es que eso es posible.

¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY.....	XV
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN LECHERA.....	15
1.2. AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CON BASE GENÉTICA ASOCIADA A PROBLEMAS REPRODUCTIVOS EN BOVINOS... 19	
1.2.1. <u>Evolución de la genómica</u>	19
1.2.2. <u>Genoma <i>Bos taurus</i></u>	22
1.2.3. <u>Análisis genético y genotipado para la identificación de variantes alélicas asociadas a enfermedades de herencia mendeliana</u>	24
1.2.3.1. Mutaciones casuales en las especies domésticas.....	24
1.2.3.2. Mutaciones casuales de herencia mendeliana asociadas a fertilidad y producción en el ganado bovino.....	25
1.2.3.3. Análisis genéticos de las características de fertilidad asociadas a diferentes mutaciones en el ganado bovino.....	27
1.2.3.4. Enfermedades de herencia mendeliana en el ganado bovino.....	38
1.2.4. <u>Metodologías de diagnóstico genético para el control de enfermedades hereditarias en ganado bovino</u>	42
1.2.4.1. Análisis de PCR-HRM.....	43
1.2.4.2. Análisis de PCR-melting.....	44
1.2.4.3. Ventajas y aplicaciones de la metodología PCR-HRM/melting.....	44

1.3. CARACTERIZACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	45
2. <u>HIPÓTESIS</u>	
2.1. Hipótesis I.....	48
2.2. Hipótesis II.....	48
2.3. Hipótesis III	48
3. <u>OBJETIVOS</u>	
3.1. OBJETIVOS GENERALES.....	49
3.1.1. <u>Objetivos específicos</u>	49
3.1.1.1. Experimento I.....	49
3.1.1.2. Experimento II.....	49
3.1.1.3. Experimento III.....	50
4. <u>IDENTIFICATION OF HOLSTEIN COWS CARRIERS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVES (HRM)</u>	51
4.1. RESUMEN.....	52
4.2. SUMMARY.....	52
4.3. INTRODUCTION.....	53
4.4. MATERIALS AND METHODS.....	55
4.4.1 <u>Samples and reference material</u>	55
4.4.2 <u>DNA extraction, concentration and quality</u>	55
4.4.3 <u>Optimization of genotyping by real-time PCR-HRM and data análisis</u>	55
4.5. RESULTS AND DISCUSSION.....	57
4.6. CONCLUSIONS.....	63
4.7. ACKNOWLEDGMENTS.....	63
4.8. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.....	64
5. <u>OPTIMIZATION OF REAL-TIME PCR-MELTING FOR DETECTION OF THE CHOLESTEROL-DEFICIENCY MUTATION IN HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE</u>	68
5.1. RESUMEN.....	69
5.2. SUMMARY.....	70

5.3. INTRODUCTION.....	71
5.4. MATERIALS AND METHODS.....	73
5.4.1. <u>DNA samples and reference population</u>	73
5.4.2. <u>Optimization of the genotyping of the <i>BoERVK_APOB</i> insertion with real-time PCR-melting</u>	74
5.4.3. <u>Confirmation of results by sequencing and multiple sequence alignment</u>	75
5.5. RESULTS AND DISCUSSION.....	75
5.6. CONCLUSIONS.....	80
5.7. ACKNOWLEDGMENTS.....	80
5.8. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.....	81
6. <u>MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES MONOGÉNICAS EN BOVINOS HOLANDO</u>	85
6.1. INTRODUCCIÓN.....	86
6.2. APLICACIONES DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR.....	88
6.3. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	90
6.4. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	91
7. <u>IDENTIFICATION OF ALLELIC VARIANTS ASSOCIATED WITH HEREDITARY DISEASES THAT AFFECT THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF DAIRY CATTLE IN URUGUAY</u>	92
7.1. SUMMARY.....	93
7.2. RESUMEN.....	94
7.3. INTRODUCTION.....	95
7.4. MATERIALS AND METHODS.....	97
7.4.1. <u>Analysis of the 2021 Holstein Friesian sire´s catalog</u>	97
7.4.2. <u>Sampling and genetic material</u>	97
7.4.3. <u>Genetics análisis of genomic data with the <i>GeneTitan</i>® bovine chip</u>	97
7.4.4. <u>Analysis of reproductive data reproductivos</u>	98
7.5. RESULTS.....	99
7.5.1. <u>Analysis of the 2021 Holstein Friesian sire´s catalog</u>	99
7.5.2. <u>Genotyping with the <i>GeneTitan</i>® bovine chip</u>	103

7.5.3. <u>Analysis of reproductive data of cows carrying the associated mutations</u>	104
7.6. DISCUSSION.....	105
7.7. CONCLUSIONS.....	112
7.8. ACKNOWLEDGMENTS.....	113
7.9. REFERENCES.....	113
8. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	121
8.1. RESULTADOS PRINCIPALES.....	121
8.1.1. <u>Experimento I</u>	121
8.1.1.1. Genotipado para detección de la mutación de CVM (c.538G>T_SLC35A3).....	121
8.1.1.2. Frecuencia alélica y prevalencia de portadores de CVM (c.538G>T_ SLC35A3).....	121
8.1.2. <u>Experimento II</u>	122
8.1.2.1. Genotipado para la detección del inserto mutante de CD (BoERV_APOB).....	122
8.1.2.2. Frecuencia alélica y prevalencia de portadores de CD (BoERV_APOB).....	122
8.1.3. <u>Experimento III</u>	122
8.1.3.1. Análisis del catálogo de padres Holando 2021.....	122
8.1.3.2. Genotipado con el chip bovino <i>GeneTitan</i> ®	123
8.1.3.3. Análisis de datos reproductivos de vacas portadoras de las mutaciones asociadas	123
8.2. DISCUSIÓN GENERAL.....	124
9. <u>CONCLUSIONES</u>	136
10. <u>PERSPECTIVAS</u>	138
11. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	140
12. <u>ANEXOS</u>	168

12.1. ANEXO 1: IDENTIFICATION OF HOLSTEIN COWS CARRIERS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVES (HRM)

12.2. ANEXO 2: OPTIMIZATION OF REAL-TIME PCR-MELTING FOR DETECTION OF THE CHOLESTEROL-DEFICIENCY MUTATION IN HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE

12.3. ANEXO 3: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES MONOGÉNICAS EN BOVINOS HOLANDO

12.4. ANEXO 4: REGISTROS REPRODUCTIVOS DE LAS VACAS DEL TAMBO DEL CAMPO EXPERIMENTAL N.º 2 DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

RESUMEN

Los experimentos I y II de la presente tesis consistieron en la optimización de las técnicas PCR-HRM/*melting* en tiempo real para la detección de la malformación vertebral compleja (CVM, OMIA 001340-9913) y la deficiencia de colesterol (CD, OMIA 001965-9913), así como para determinar su existencia en la muestra representativa de vacas Holando (n = 279 para CVM; n = 103 para CD) de Uruguay. Las amplificaciones de los productos PCR de 79 pb de CVM y de 170 y 146 pb de CD permitieron diferenciar claramente los dos genotipos. Se encontró que la prevalencia de CVM (6,45 %) fue alta. El inserto mutante *BoERVK* asociado con CD no fue detectado. El experimento III consistió en: (a) identificar toros (n = 3028) con información genética para haplotipos relacionados con problemas de fertilidad que causan abortos y mortalidad de terneros en ganado lechero (HH1, OMIA 000001-9913; HH3, OMIA 001824-9913; y HH4, OMIA 001826-9913) mediante análisis del catálogo de padres Holando 2021; y (b) determinar la presencia de estos haplotipos mencionados, JH1 (OMIA 001697-9913) y CVM con el chip bovino GeneTitan®, estimar sus frecuencias y evaluar su impacto en la fertilidad de las vacas Holando y cruza Holando con Jersey (n = 170) pertenecientes a un tambo experimental. De un total de 1468 toros con información genética para HH1 y de 1471 para HH3 y HH4, se encontraron 90 portadores para HH1, 60 para HH3 y 6 para HH4, respectivamente. Mediante genotipado con el chip se determinaron las prevalencias para HH1 y CVM que fueron de 0,59 y 4,3 % (*call rate* > 0,99), respectivamente. No se encontraron alelos mutantes para HH3, HH4 y JH1. Se evaluaron los datos reproductivos y se observó la presencia de los alelos mutantes de CVM y HH1 en vacas repetidoras, que parieron terneros muertos, con un promedio de 4 repeticiones del servicio para lograr la preñez.

Palabras clave: enfermedades hereditarias, fertilidad, ganado lechero

**RECESSIVE GENETIC VARIANTS ASSOCIATED WITH
MISCARRIAGES AND CALF MORTALITY IN DAIRY CATTLE:
ANALYSIS OF THEIR PRESENCE AND IMPACT ON THE
REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF HOLSTEIN FRIESIAN COWS IN
URUGUAY**

SUMMARY

Experiments I and II of this thesis consisted of the optimization of real-time PCR-HRM/Melting techniques for the detection of complex vertebral malformation (CVM, OMIA 001340-9913) and cholesterol deficiency (CD, OMIA 001965-9913), as well as to determine their existence in the representative sample of Holstein Friesian cows (n = 279 for CVM; n = 103 for CD) from Uruguay. The amplification of the PCR products of 79 bp of CVM and 170 and 146 bp of CD provided a clear differentiation between the two genotypes. CVM prevalence (6.45 %) was high. The *BoERVK* mutant insert associated with CD was not detected. Experiment III consisted of: (a) identification of bulls (n = 3028) with genetic information for haplotypes related to fertility problems causing abortions and calf mortality in dairy cattle (HH1, OMIA 000001-9913; HH3, OMIA 001824-9913; y HH4, OMIA 001826-9913) by analysis of the Holstein Friesian 2021 sire catalog; and (b) determine the presence of these haplotypes, JH1 (OMIA 001697-9913) and CVM with the GeneTitan® bovine chip; calculate their frequencies; and assess their impact on fertility in Holstein Friesian cows and Holstein Friesian-Jersey crosses (n = 170) of an experimental dairy farm. Of a total of 1468 bulls had genetic information for HH1, and 1471 for HH3 and HH4. Of these, 90, 60 and 6 were HH1, HH3 and HH4 carriers. Chip genotyping was performed to calculate HH1 and CVM prevalence, which were 0.59 and 4.3 %, respectively (call rate > 0.99). No mutant alleles were found for HH3, HH4, and JH1. We examined reproductive data by observing the presence of CVM and HH1 mutant alleles in repeat cows, which gave birth to dead calves, with an average of 4 services to achieve pregnancy.

Keywords: hereditary diseases, fertility, dairy cattle

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN LECHERA

En Uruguay, como en la mayoría de los países productores de leche del mundo, el progreso de la mejora genética del rodeo lechero ha sido el principal o uno de los principales factores que ha permitido el aumento del rendimiento individual por vaca en ordeño y la producción total de leche en las últimas décadas. El stock de vacunos lecheros se ha mantenido sin severas fluctuaciones desde el año 2012, totalizando 749 mil cabezas; dentro de ellas hay 316 mil vacas en ordeño, 104 mil vacas secas y 63 mil terneros (DIEA-MGAP, 2021). Se ha mantenido un proceso constante de crecimiento en la producción de leche comercial en el transcurso de casi 10 años, alcanzando máximos productivos a 2.205 millones de litros en el período 2019/2021 en relación con los 2.184 millones de litros en 2012/2013 (DIEA-MGAP, 2021). Un aspecto particular de la producción lechera es que se concentra en pocos establecimientos (2.700), principalmente de entre 50 y 500 hectáreas (70 % del total de tambos comerciales) (DIEA-MGAP, 2021).

La mayoría de las razas de ganado lechero se han formado a partir de un bajo número de animales fundadores. En los últimos 70 años, su acervo genético se ha reducido aún más, principalmente por dos factores: el uso masivo de un número limitado de toros de élite a través de la inseminación artificial y una fuerte selección a favor de unos pocos caracteres productivos (Liebig et al., 2022, Ma et al., 2019, Fritz et al., 2013, Rodríguez-Martínez et al., 2008, Zenger et al., 2007, Hansen, 2000). Como consecuencia, muestran una tasa de endogamia generacional promedio de 1 % correspondiente a un

tamaño efectivo poblacional de 50, y la mitad de su acervo genético es explicado por solo 10 a 20 ancestros (Fritz et al., 2013, Miglior, 2000, Boichard et al., 1996). La endogamia dentro de las poblaciones favorece el surgimiento de los defectos recesivos responsables de mortalidad embrionaria, fetal y perinatal, puesto que aumenta los niveles de homocigosis (Fritz et al., 2013, VanRaden et al., 2011b). En los últimos años, se ha observado que la consanguinidad se ha incrementado después de la reciente implementación de la selección genómica (Makanjuola et al., 2020). Dado que el tamaño efectivo de la población es mucho más pequeño, se acelera la disminución de la variación genética y el aumento de la consanguinidad (Zenger et al., 2007). Especialmente con las tecnologías reproductivas mejoradas que surgieron en el siglo pasado, el intercambio genómico en todo el mundo aumentó y condujo al uso de un número limitado de toros destacados en todo el mundo (Ma et al., 2019, Zenger et al., 2007, Hansen, 2000).

Los abortos causan una pérdida económica importante en la producción lechera y pueden deberse a causas, además del manejo ambiental, tóxicas, metabólicas y hereditarias que permanecen muchas veces indetectables. Norman et al. (2012) del departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) analizaron registros de 8,1 millones de lactaciones de vacas en el período de 2001 a 2009 con más de 151 días de preñez hasta el término de la lactación. La frecuencia de abortos registrados fue de 1,31 % y las de abortos para gestaciones tempranas (152 a 175 días) fue de 4,38 %; de la misma manera establecieron que la tasa de abortos producidos entre mayo y agosto fue más alto (1,42 a 1,53 %) y entre octubre a febrero, más bajo (1,09 a 1,21 %). Dentro de las razas, Holando reportó mayor incidencia de abortos (1,32 %) que Jersey (1,10 %), teniendo las demás razas un valor intermedio (1,27 %).

En Uruguay, no se han reportado estudios relacionados con las pérdidas económicas a consecuencia de los abortos y reabsorciones embrionarias ni las posibles causas genéticas que esto conlleva. Sin embargo, se ha observado que la tasa de preñez del ganado lechero de la raza Holando ha caído entre 20 y 30 %, y el intervalo parto-concepción ha aumentado de 131 a 150 días (Meikle et al., 2013).

La baja tasa en la eficiencia reproductiva puede ser consecuencia de muchos factores, pero también está asociada al nivel de producción de los rebaños. Así, Tiezzi et al. (2011), trabajando con una población de Pardo Suizo, de los Alpes italianos, estudiaron los indicadores de fertilidad como: intervalo de parto al primer servicio, intervalo del primer servicio a la concepción e intervalo del parto a la concepción, todos ellos expresados como días y tomando como referencia un número potencial de ciclo estral de 21 días; número de inseminaciones a la concepción; tasa de concepción al primer servicio y tasa de no retorno a los 56 días postservicio. Encontraron que las características de fertilidad mostraron correlaciones no favorables con los valores de producción, demostrando el antagonismo entre la eficiencia reproductiva y la producción de leche. Estas correlaciones desfavorables sugieren que la selección hacia alta producción podría haber llevado al deterioro de la fertilidad (Pryce et al., 2004, Royal et al., 2000). Se han registrado correlaciones genéticas positivas entre el nivel de producción de leche y el intervalo entre partos; estas correlaciones oscilan entre 0,22 y 0,59 (Zambianchi, 1999). Sin embargo, el incremento en la producción de leche se correlaciona desfavorablemente con un aumento en enfermedades como: cetosis (0,26-0,65), quistes ováricos (0,23-0,42), mastitis (0,15-0,68) y rengueras (0,24-0,48) (Oltenucu y Algers, 2005). Esto indica que la producción de leche como único criterio de selección conduce a una fertilidad

más pobre y a menor salud animal, afectando seriamente el bienestar de la vaca (Oltenacu y Algers, 2005).

Existen trabajos internacionales que han demostrado un descenso en la eficiencia reproductiva del ganado lechero de alta producción, principalmente en la raza Holando (Pryce et al., 2014, Walsh et al., 2011, Dobson et al., 2007, Rajala-Schultz y Frazer, 2003, Lucy, 2001, Royal et al., 2000), que podría ser debido a la selección artificial en los rasgos de producción, con poca consideración de la fertilidad. Dado que los problemas de fertilidad son una de las razones más comunes para el sacrificio de ganado (Rilanto et al., 2020, Seegers et al., 1998), los animales de la raza Holando tienen más probabilidades de ser sacrificados que los animales de otras razas (Rilanto et al., 2020).

El gran avance en las tecnologías de secuenciación del ADN y de las herramientas bioinformáticas para su análisis ha permitido identificar las mutaciones efectoras de múltiples defectos hereditarios en el ganado lechero y año tras año se suman nuevas enfermedades a la base de datos pública, disponible en internet, OMIA (Online Mendelin Inheritance in Animals, <https://www.omia.org/home/>). Holando es la raza de ganado más popular del mundo y criada por su alta producción de leche (Hansen, 2000). Las evaluaciones genéticas nacionales de la raza Holando indican que la genética del rodeo lechero uruguayo proviene predominantemente de América del Norte (Meikle et al., 2013, Pereira et al., 2010).

1.2. AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CON BASE GENÉTICA ASOCIADAS A PROBLEMAS REPRODUCTIVOS EN BOVINOS

1.2.1. Evolución de la genómica

La evolución de las herramientas para el estudio de la genómica se remonta a la invención de dos metodologías claves, diseñadas por F. Sanger y K.B. Mullis, en los años 1977 y 1985, respectivamente, las cuales permitieron secuenciar de manera relativamente sencilla las moléculas de ADN, así como amplificarlas a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Avances posteriores llevaron a un megaproyecto de colaboración internacional, con financiamiento de sectores públicos y privados por un costo de 3.000 millones de dólares, que permitió obtener la primera secuencia completa del genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004, Lander et al., 2001, Venter et al., 2001). Luego, con la finalización de este proyecto con un primer boceto del genoma humano, se puso en marcha un proyecto cuyo objetivo principal era la reducción del coste de la secuenciación del genoma humano a USD 1.000 en el período de diez años (Schloss, 2008). Este proyecto supuso el comienzo de una nueva era en la secuenciación del ADN que resultó en una mejora del desarrollo de las estrategias de secuenciación hacia metodologías de alto rendimiento, denominadas secuenciación de segunda generación, secuenciación masiva paralela (por sus siglas en inglés, *next generation sequencing*, NGS). Existen cuatro técnicas desarrolladas por diferentes laboratorios que han sido las más utilizadas en los últimos años: estas son las desarrolladas por Roche-454 (pirosecuenciación), Ion Torrent (secuenciación por semiconductores), Illumina/Solexa (secuenciación con

terminadores reversibles) y SOLiD (secuenciación por ligamiento), todas ellas revisadas en las siguientes referencias bibliográficas: Liu et al. (2012), Metzker (2010) y Schadt et al. (2010).

Las mejoras realizadas en los últimos años en las técnicas NGS y la reducción de los precios de secuenciación han permitido la obtención de genomas de otras especies de interés (Jiang et al., 2014, Dong et al., 2013, Dalloul et al., 2010, Li et al., 2010). El incremento de la utilización de las técnicas NGS también se ha debido, en parte, a los avances significativos en el manejo de los datos generados. El desarrollo de las técnicas NGS ha provocado la aparición de forma paralela de una nueva generación de herramientas bioinformáticas como requisito esencial para el manejo e interpretación de la gran cantidad de datos generados. Se han desarrollado algoritmos para el manejo específico de las lecturas cortas (Hattem et al., 2013), así como para el ensamblado *de novo* (Zhang et al., 2011), la detección de variantes (Li et al., 2013), los análisis ChIP-seq (Rougemont y Naef, 2012) y los análisis RNA-Seq (Kvam et al., 2012). Asimismo se han desarrollado algoritmos para corregir los posibles sesgos producidos durante la preparación de las genotecas (Hansen et al., 2010). Estas mejoras tanto técnicas como computacionales han favorecido el desarrollo de secuenciadores de mayor escala y más rápidos y el costo de la secuenciación (costo por base) se ha ido reduciendo (figura 1). Esta tendencia se ha desacelerado en los últimos años, aunque continúa descendiendo, lo que favorecería el acceso a este tipo de tecnologías alrededor del mundo.

Actualmente, Illumina con la adquisición de Solexa lidera el mercado de las tecnologías NGS ofreciendo el rendimiento más alto y el precio más bajo por base secuenciada (van Dijk et al., 2014), ya que desarrolló secuenciadores de mayor escala, más veloces y capaces de leer fragmentos

de mayor tamaño (Kchouk et al., 2017, Heather y Chain, 2016, Bentley et al., 2008).

Sin embargo, la secuenciación de tercera generación está empezando a aparecer. La principal característica de la secuenciación de tercera generación es la lectura directa de moléculas individuales de ácidos nucleicos (Schadt et al., 2010). Estas técnicas intentan solventar las flaquezas de las NGS utilizando una sola molécula de ADN, es decir, prescindiendo de una etapa de amplificación previa (PCR). Esto supone ventajas, ya que se aumenta la tasa de secuenciación, los rendimientos son más altos, las lecturas son más largas (aproximadamente, 10-30 Kb), disminuye la complejidad de la preparación de las muestras y se reducen los costes del análisis (Schadt et al., 2010).

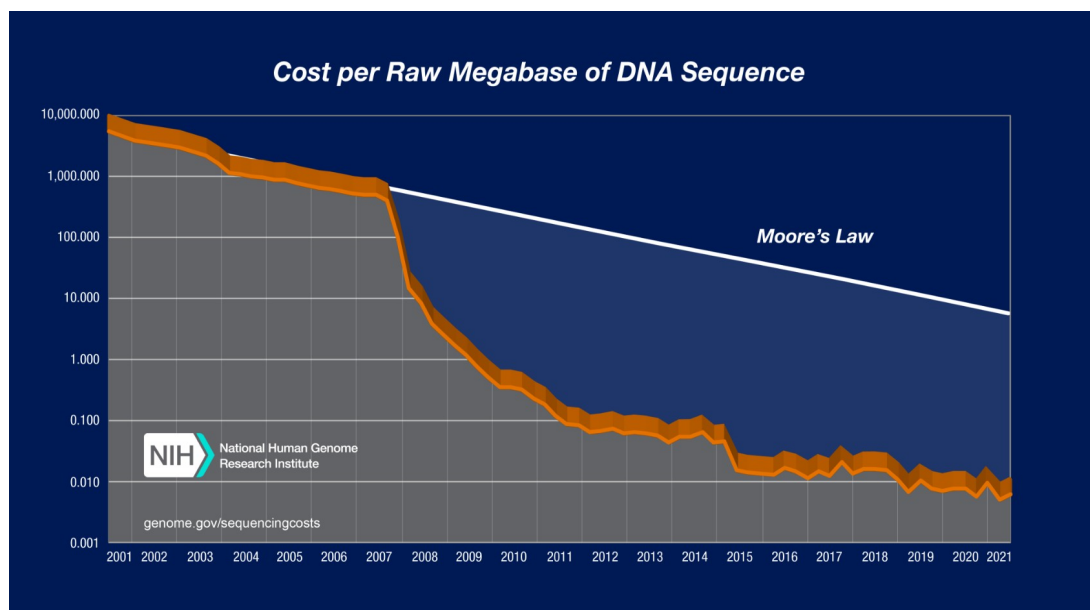


Figura 1. Costos de secuenciación cruda (por megabase). Extraído de NCBI, Wetterstrand KA. *DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)*. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>. Consultado el 3/06/2022.

Se han logrado importantes avances en el progreso de la selección para el ganado luego de la introducción de herramientas genómicas en los últimos 12 años. Estas herramientas dependían del genoma de referencia de *Bos taurus* (*Btau4.6* y *UMD3.1*), que se creó utilizando tecnologías ahora obsoletas y se ve obstaculizado por una variedad de deficiencias e imprecisiones. Sin embargo, Rosen et al. (2020) presentaron una versión nueva de la secuencia genómica de referencia, *ARS-UCD1.2*, más precisa y unificada para facilitar la transferencia e interpretación de los resultados obtenidos de las versiones anteriores. También ampliaron la compatibilidad con datos basados en ARN para anotaciones que identifican todo el genoma bovino. Este recurso es valioso a la hora de realizar estudios comparativos entre razas o poblaciones de ganado con mayor solidez y certeza. Esta secuencia de referencia es de acceso público y está disponible en línea en las bases de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?term=ARS-UCD1.2>, actualizado el 21/05/2022).

1.2.2. **Genoma *Bos taurus***

La secuenciación del genoma humano (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) fue un importante hito científico e histórico que abrió el camino para la secuenciación del genoma de otras especies de mamíferos. El elevado coste que suponía en aquel momento la secuenciación de un genoma (tres mil millones de dólares el genoma humano; van Dijk et al., 2014) hizo que únicamente surgiesen proyectos de secuenciación genómica para aquellas especies ganaderas con producciones de gran repercusión económica que justificasen la inversión del proyecto. Las primeras especies con un borrador secuenciado del genoma fueron la gallina (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004) y la vaca

(<https://www.hgsc.bcm.edu//other-mammals/bovine-genome-project>, Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009), ambos en el año 2004. El proyecto genoma bovino contó con la participación de más de 300 investigadores provenientes de 25 países y un presupuesto que superó los 50 millones de dólares (Llambí-Dellacasa y Arruga-Laviña, 2018). En este proyecto, se ha utilizado toda la plataforma de conocimiento y tecnología derivados de la secuenciación del genoma humano con el fin de obtener la secuencia completa de un prototipo del genoma bovino, además de describir el contenido de GC e identificar genes individuales y secuencias que regulan la recombinación genética. Para cumplir con dichos objetivos, se utilizaron diferentes estrategias metodológicas con las cuales se obtuvieron bloques de grandes secuencias del genoma, que fueron ensamblados, para, finalmente, proponer un borrador primario del genoma en cuestión.

En los bovinos se conocen más de 700 razas con una alta variabilidad genética distribuidas alrededor del planeta (Llambí-Dellacasa y Arruga-Laviña, 2018). Las razas bovinas actuales pertenecen a las razas vacunas originales *Bos taurus indicus*, de origen asiático, o *Bos taurus taurus*, de origen europeo. Las diferencias existentes entre las distintas especies son tanto fenotípicas como genotípicas. La especie *Bos taurus indicus* incluye los bovinos con giba pertenecientes al grupo conocido como cebuínos, mientras que los bovinos *Bos taurus taurus* no presentan giba. A nivel genético, una diferencia cariológica entre las dos especies se encuentra en el cromosoma Y: en *Bos taurus indicus* este cromosoma es acrocéntrico, mientras que en *Bos taurus taurus* es submetacéntrico (Llambí-Dellacasa y Arruga-Laviña, 2018). Las principales razas productoras de leche (Holando, Jersey, Ayrshire y Pardo Suizo) pertenecen al grupo *Bos taurus taurus*.

El genoma *Bos taurus* se estima en 30.396 genes totales (21.039 proteínas codificantes) y está constituido por 29 pares de autosomas y un

par de cromosomas sexuales (NCBI: National Center for Biotechnology Information: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid9913\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid9913[orgn]), actualizado en 21/05/2022). El primer borrador de la secuencia del genoma bovino fue publicado en el año 2009 en la revista *Science* y generado a partir de una vaca de la raza Hereford (L1 DOMINETTE 01449), mientras que la base de datos para SNP (siglas en inglés, polimorfismos de nucleótido simple) ha sido generada a partir de seis razas diferentes de *Bos taurus taurus*: Holando, Angus, Jersey, Limousin Rojo Noruego, Ayrshire, y una *Bos indicus indicus*: Brahman (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009).

1.2.3. Análisis genético y genotipado para la identificación de variantes alélicas asociadas a enfermedades de herencia mendeliana

1.2.3.1. Mutaciones casuales en las especies domésticas

El uso de las herramientas de secuenciación del genoma bovino ha revolucionado la detección de mutaciones causales en las especies domésticas. En la figura 2, obtenida de la revisión bibliográfica realizada por Nicholas y Hobbs (2014), se puede observar el rápido incremento producido en la detección de mutaciones causales en las especies domésticas a partir del año 2005, coincidiendo con la aparición de los primeros chips de SNP en pollo (International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004), perro (Lindblad-Toh et al., 2005), gato (Pontius et al., 2007), vaca (Charlier et al., 2008), caballo (Wade et al., 2009) y cerdo (Amaral et al., 2009).

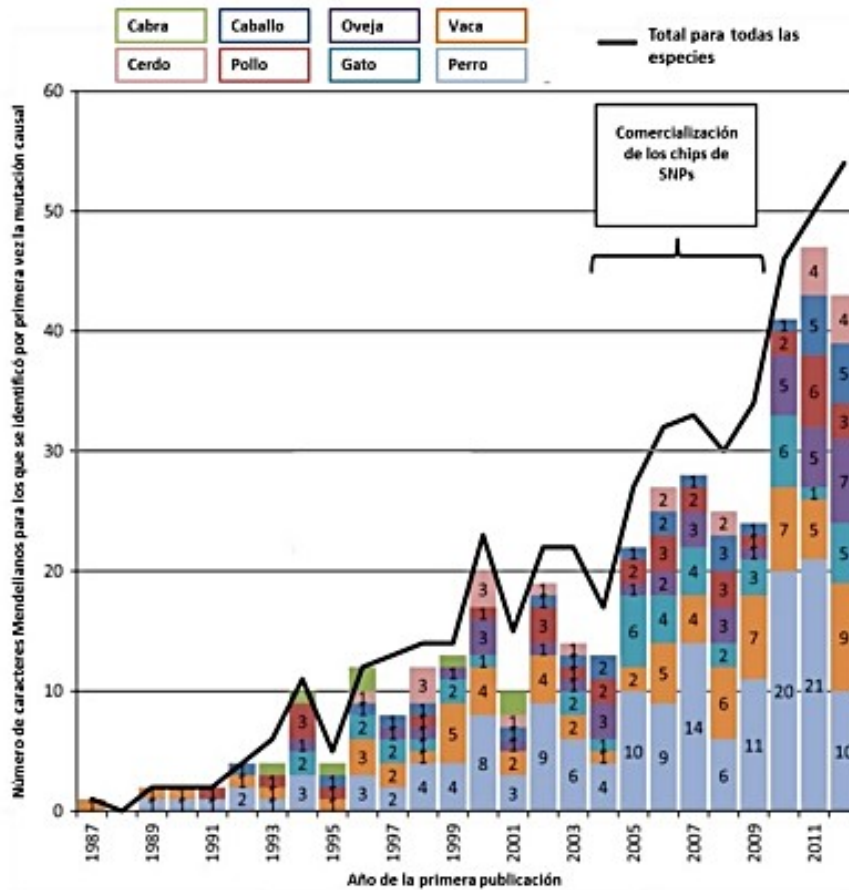


Figura 2. Cronología de la detección de mutaciones causales de caracteres de herencia mendeliana en las especies domésticas hasta el año 2012 (Tomado de Nicholas y Hobbs, 2014).

1.2.3.2. Mutaciones casuales de herencia mendeliana asociadas a fertilidad y producción en el ganado bovino

A partir del 2008, surgieron los chips de SNP de alta densidad para el genotipado de las razas bovinas (Angus, Pardo Suizo, Gelbvieh, Holando, Jersey, Limousin, Angus Rojo, Simmental y Wagyu). De ellos son los de la plataforma comercial Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA), el *ILMN-*

Bovine777K (con 777.962 SNP) que incluye todos los SNP del chip *ILMN-Bovine50Kv2* (54.609 SNP) y el de baja densidad, el *ILMN-BovineLD* (6.909 SNP). Dado que el costo de genotipar un animal en un chip de más de 50.000 SNP era demasiado alto para su uso masivo en la población, la empresa Illumina y USDA-ARS desarrollaron uno de baja densidad con 3.072 SNP, el *ILMN GoldenGate-Bovine3K*. Wiggans et al. (2013) informaron una versión mejorada de genotipado mediante chips de baja densidad de SNP utilizando el *GeneSeek Genomic Profiler* (siglas en inglés: GGP) (GeneSeek, Lincoln, NE) para ganado de leche que fue desarrollado con, aproximadamente, 9.000 SNP y se hizo disponible comercialmente en febrero de 2012. Este chip está basado en el *ILMN-BovineLD* con 6.909 SNP y 1.745 SNP adicionales para la selección genómica. Los testeos de SNP de un solo gen fueron incluidos para reducir al mínimo el número de testeos separados requeridos para aquellos genes, en particular para los toros. Este chip sustituyó al *ILMN GoldenGate-Bovine3K*, que ha estado disponible desde octubre de 2011. El genotipado con los chips de SNP, así como la utilización de diferentes marcadores, en combinación con las estructuras poblacionales típicas de animales domésticos permitió acelerar la localización e identificación de las mutaciones causales en enfermedades de herencia mendeliana (Charlier et al., 2008).

Las mutaciones han sido asociadas con las variaciones en la fertilidad de los mamíferos, a pesar de que al principio no se había considerado al ganado vacuno (*Bos taurus*). Se encontró una asociación de tres SNP en un gen receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina. Cuando se evaluó en términos de haplotipos, estos tres SNP fueron significativamente asociados con las variaciones en las características de fertilidad y producción, más notablemente en el intervalo entre partos, días al primer servicio e índice de producción (Hastings et al., 2006).

Pryce et al. (2010), estudiando las regiones genómicas para explicar las variaciones en producción de leche y características reproductivas, encontraron 39.048 marcadores SNP asociados a ellos; probaron su efecto en una población de 780 padres de la raza Holando y lo validaron en la progenie de 386 toros Holando y 364 toros Jersey. Adicionalmente, varias regiones nuevas fueron identificadas, incluyendo una característica putativa cuantitativa para fertilidad en el cromosoma 18.

1.2.3.3. **Análisis genéticos de las características de fertilidad asociadas a diferentes mutaciones en el ganado bovino**

A partir de 2011, se empezaron a incrementar los análisis genéticos de las características de fertilidad en bovinos asociadas a distintos tipos mutaciones detectadas mediante las técnicas de secuenciación NGS y análisis de asociación del genoma completo o GWAS (del inglés: *Genome-wide association study*). Los análisis genéticos de la fertilidad en vacas van desde estudios de asociación del genoma completo (GWAS) que identifican regiones genómicas asociadas con características de fertilidad (Mao et al., 2020, Rilanto et al., 2020, Cai et al., 2019, Jiang et al., 2019, Minozzi et al., 2013) hasta la identificación de regiones genómicas que muestran déficit de homocigosis debido a las variantes letales recesivas, en su mayoría embrionarias, con efectos en los genes asociados (Häfliger et al., 2022, McClure et al., 2014, Fritz et al., 2013, VanRaden et al., 2011b).

VanRaden et al. (2011b) fueron los primeros en proponer examinar los datos a partir del genotipado con el chip *BovineSNP50* de Illumina, para identificar las regiones genómicas en animales con déficit de homocigosis. En su artículo, identificaron y enumeraron cinco haplotipos de los 11 candidatos con efectos perjudiciales en el desarrollo del feto, y podrían producir aborto y

muerte fetal en las tres razas de ganado lechero, en 58.453 animales Holando (HH1, HH3 y HH4), 5.288 Jersey (JH1) y 1.991 Pardo Suizo (BH1) de la evaluación genómica estadounidense. Los efectos estimados de estos cinco nuevos haplotipos fueron ligeramente mayores que para los defectos previamente conocidos CVM y braquiespina. Las frecuencias de portadores para estos cinco haplotipos oscilaron entre el 2 y el 21 % en animales genotipados desde 2008. Se determinó que la frecuencia de portadores fue mayor a 20 % en el caso de Jersey, del 16 % en Pardo Suizo y de 2,7 a 6,4 % en Holando (VanRaden et al. 2011b). La clasificación de los haplotipos está dada por el número del segmento y el haplotipo dentro de dicho segmento; en el caso de Holando, los tres haplotipos descubiertos son el 133,74 (cromosoma 5), 21,337 (cromosoma 1) y 218,61 (cromosoma 8), cuyas frecuencias de los portadores determinadas fueron 4,5 (HH1), 4,6 (HH2) y 4,7 % (HH3) con efectos negativos sobre la tasa de concepción en el orden de -3,1, -3,0 y -3,2 %, respectivamente (VanRaden et al. 2011b). De los 11 haplotipos calificados como los más detectables e importantes para investigar usando sólo información de la base de datos de genotipos, se confirmaron grandes efectos dañinos en la tasa de concepción para 5 de los que usaron la base de datos de fenotipos. Estos cinco haplotipos tuvieron efectos sobre la tasa de concepción de -3,0 a -3,7 % en comparación con -2,9 % para CVM y -2,5 % para braquiespina. Los otros seis que no tuvieron grandes efectos sobre la fertilidad podrían explicarse por casualidad, problemas con el mapa de marcadores, un marcador con herencia no mendeliana (por ejemplo, debido a la variación del número de copias) o muertes ocurridas después del nacimiento (como para BLAD).

Weigel (2011) estimó el impacto de los haplotipos HH1 (con una frecuencia de 4,5 %), HH2 (4,6 %) y HH3 (4,7 %) con efectos negativos sobre la tasa de no retorno a 60 días (NR60) en el orden de -1,10, -1,70 y -

3,10 %. Asimismo, Norman et al. (2012) determinaron que los haplotipos HH2 y HH3 producen pérdidas embrionarias inmediatamente después de la concepción, pero el haplotipo HH1 produce pérdidas a través de toda la gestación.

Los haplotipos corresponden a regiones cromosómicas (fragmentos de ADN con combinaciones determinadas de alelos de genes cercanos y ligados) que, en la mayoría de los casos, se heredan como bloque y con ellos sus efectos en el fenotipo durante varias generaciones. Estas regiones se caracterizan por presentar un déficit de homocigosis, es decir, no se encuentran individuos vivos homocigotas para este haplotipo o se encuentran muy pocos. La ausencia de individuos homocigotas se debe a que los animales con dos copias iguales del haplotipo mueren durante el desarrollo embrionario producto de un efecto letal de este (Calderón et al., 2021).

VanRaden et al. (2012) realizaron el mapeo fino del genoma de vacunos lecheros, de las razas Holando, Jersey y Pardo Suizo, con la finalidad de localizar los haplotipos con significancia esperada de homocigotos, pero que no son observables, y determinaron cinco haplotipos que tienen efectos letales con una reducción de la tasa de concepción en un rango de 3,0 a 3,7 %; para el caso del HH3, la pérdida de la tasa de concepción ocurre antes de los 60 días, de HH2, antes de los 100 días y de HH1, a través de toda la gestación.

Larkin et al. (2012) realizaron un análisis del genoma completo utilizando el chip de *BovineSNP50* en dos toros famosos en la historia de la industria del ganado lechero, Pawnee Farm Arlinda Chief y su hijo Walkway Chief Mark, en donde se detectaron más de 1,3 millones de SNP y se determinaron las frecuencias alélicas de HH1 de Chief en 1.149 de sus

descendientes. Once genes candidatos fueron identificados con funciones relacionadas a producción de leche, fertilidad y resistencia a enfermedades.

Después de unos años, se reportaron los efectos de otros nuevos haplotipos letales en ganado Holando y Jersey (además de otras razas), mientras que algunos se resolvieron a nivel molecular, como HH1 (*APAF1*, Adams et al., 2016), HH3 (*SMC2*, Daetwyler et al., 2014, McClure et al., 2014, Hayes et al., 2013), HH4 (*GART*, Fritz et al., 2013), HH5 (*TFB1M*, Schütz et al., 2016), HCD (Charlier, 2016; Menzi et al., 2016), CVM (*SLC35A3*; Thomsen et al., 2006) y JH1 (*CWC15*, Sonstegard et al., 2013).

Adams et al. (2016, 2012) identificaron la mutación *APAF1* (factor activador de peptidasa apoptótica) dentro del HH1, que bloquea, aproximadamente, un tercio de la proteína codificada y causa pérdida fetal y embrionaria entre los 60 y 200 días de gestación y reducción de la tasa de concepción en vacas y, por consiguiente, la fertilidad se ve disminuida en los toros portadores de la raza Holando. Se estimó que esta mutación causó más de 500.000 abortos y una pérdida de 420 millones de dólares para la industria láctea.

Fritz et al. (2013) encontraron efectos recesivos letales asociados a braquiespina bífida (*FANCI*), CVM (*SLC35A3*), HH1 (*APAF1*), HH3 (*SMC2*) y HH4 (*GART*) que causan muerte embrionaria y disminución de fertilidad en 47.878 Holando, 16.833 Montbéliér y 11.466 Normando de la evaluación de selección genómica francesa. Por otro lado, McClure et al. (2014) estudiaron los efectos de ciertos haplotipos, BH1 en Pardo Suizo y HH2 y HH3 en Holando, e identificaron las causas de las mutaciones que afectan el desarrollo embrionario. Daetwyler et al. (2014) analizaron 1.000 genomas de toros para identificar la mutación en el gen *SMC2* caracterizada por una sustitución de timina a citosina en el exón 24 del gen 24 (Daetwyler et al., 2014, McClure et al., 2014, Hayes et al., 2013), a la que se le atribuye como

efecto negativo la pérdida embrionaria asociada al haplotipo HH3. Esta mutación puntual cambia el aminoácido 1135 de fenilalanina a serina (F1135S) y altera la función del dominio NTPasa de la proteína codificada. Asimismo, VanRaden et al. (2012) reportaron la frecuencia de vacas heterocigotas de HH3 (*SMC2*), que fue de 4,7 %, y la tasa de no retorno a 60 días (NR60), de -3,1 % para este haplotipo. Häfliger et al. (2022) confirmaron la posición del loci del haplotipo HH3 (*SMC2*) previamente identificado por Fritz et al. (2013) y se determinó con una frecuencia baja de 1,3 % en la población Holando suizo. Makanjuola et al. (2021) encontraron efectos negativos sobre el número de inseminaciones en novillas dentro de esta región genómica del HH3 que fueron demostrados en ganado Holando canadiense. En Alemania, Schütz et al. (2016) detectaron portadores de HH3 y HH4 con una frecuencia de 5,1 y 4 %, respectivamente. El efecto del haplotipo HH4 (*GART*) es una reducción del 3,0 % en la tasa de concepción, teniendo su origen en el toro Besne Buck, con una prevalencia de 0,70 % (Cooper et al., 2014). Fritz et al. (2013) reportaron frecuencias de 3,6 % para este haplotipo HH4, asociado a una pérdida en nacimientos en vacas Holando francés, en donde se observó una reducción de la tasa de parto de -5,8 % en vaquillonas y -1,74 % en vacas portadoras cuando se aparearon entre portadores e hijas de portadores de HH4.

Sonstegard et al. (2013) identificaron la mutación en el gen *CWC15*, localizada en el cromosoma 15, la cual está asociada con el haplotipo JH1 en Jersey y tiene efecto sobre la reproducción con fertilidad reducida. Esta enfermedad fue reportada por científicos del ARS-USDA de EE. UU. a partir del 2013 (Sonstegard et al., 2013) y su origen se rastreó al toro norteamericano de élite Observer Chocolate Soldier nacido en 1962 (VanRaden et al., 2011a). Este toro engendró 1.454 hijas para producción de leche y, como consecuencia, su impacto se magnificó aún más con 107 hijos

y 715 nietos utilizados en la inseminación artificial para generar > 50.000 nietas y > 200.000 bisnietas. Como resultado, la frecuencia de heterocigotos JH1 aumentó rápidamente en el inicio y se ha estabilizado en un 20 a 25 % desde 1980. VanRaden et al. (2004) examinaron 52.449 registros de fertilidad de toros heterocigotos JH1 apareados con hijas de toros heterocigotos JH1 y encontraron una tasa de éxito de concepción del 33,3 % frente al 37,0 % para 290.373 apareamientos contemporáneos de toros normales con hijas de toros normales. La reducción en la tasa de concepción de 3,7 % confirmó a JH1 como enfermedad recesiva letal, en concordancia aproximada con la reducción esperada de 4,6 %. La tasa de éxito de la concepción fue del 36,3 % en 57.523 montas de toros heterocigotos con hijas de toros normales, con una ligera reducción del 0,7 % potencialmente causada por madres heterocigotas con herencia materna JH1 (Sonstegard et al., 2013).

Cole et al. (2016) evaluaron los fenotipos de las evaluaciones genéticas de los Estados Unidos, donde evaluaron los efectos fenotípicos de 18 haplotipos recesivos en Ayrshire (n = 1), Pardo Suizo (n = 5), Holando (n = 10) y Jersey (n = 2), evaluando la producción de leche, grasa y proteína, *score* de células somáticas (SCS), vida productiva (PL), tasa de preñez de las hijas (DPR), tasa de concepción de las vaquillonas (HCR) y tasa de concepción en vacas (CCR). Muchas asociaciones fueron notadas para los haplotipos en Holando, producción de leche proteína, SCS, PL y fertilidad para haplotipo 1 (HH1); proteína, PL, CCR y HCR para haplotipo 2 (HH2); producción de leche, proteína y fertilidad para haplotipo 4 (HH4) y producción de proteína y DPR para haplotipo 5 (HH5).

Schütz et al. (2016), trabajando con una población de vacunos en Alemania, analizaron e identificaron desórdenes recesivos no conocidos, asociados al HH5 (*TFB1M*) y deficiencia de colesterol (HCD), quienes

describen las causas genéticas moleculares que ellas producen. El HH5 es causado por una eliminación de 138 kbp, que abarca una posición de 93.233 kb a 93.371 kb en el cromosoma 9, que alberga solo dimetiladenosina transferasa 1 (*TFB1M*). Asimismo se determinó una frecuencia alélica de 2,8 % para HH5 en la población de Holando alemán y 12,5 % de portadores de HCD entre toros Holando nacidos de 2012 a 2015. En otro estudio, Kipp et al. (2015) estimaron una frecuencia de, aproximadamente, 8,7 % de 3.400 terneros Holando alemán que nacieron homocigotos para el haplotipo CD cada año. Sin embargo, en otro estudio, Kipp et al. (2016) informaron una frecuencia máxima de portadores de 12,25 % en la población de ganado alemán durante 2012 que se redujo a 7,87 % en 2016 debido a las estrategias de detección durante el año. En este estudio, observaron una pronunciada hipocolesterolemia en terneros afectados de HCD, además de presentar diarrea severa y que, en general, se morían dentro de los primeros meses de vida. Algunos terneros heterocigotos de HCD mostraron concentraciones sanguíneas de colesterol reducidas, mientras que, en homocigotos recesivos, el nivel de colesterol en sangre y las concentraciones de triglicéridos fueron prácticamente cero. Los valores de colesterol en sangre de los animales fueron significativamente asociados con el estatus de portador indicando una herencia codominante. La frecuencia de dicho haplotipo fue estimada en 4,2 %. El origen de esta enfermedad se rastreó hasta el toro norteamericano Maughlin Storm, nacido en 1991 y utilizado ampliamente en la población Holando en todo el mundo.

Menzi et al. (2016) realizaron secuenciación del genoma completo de un animal afectado y otro portador de la mutación con pérdida de función en el gen de la apolipoproteína B (*APOB*), que es necesaria para el metabolismo de lípidos-hepático, la biosíntesis de esteroides y la absorción de colesterol en el intestino delgado. La variante causante de esta enfermedad es una

inserción de 1.299 pb de un elemento transponible de repetición larga (*LTR_ERV2-1*) entre los nucleótidos 24 y 25 del exón 5 del gen *APOB*. Esta inserción provoca un cambio de marco de lectura en el gen *APOB*, que determina el truncamiento del 97 % de la proteína *APOB* bovina. Estos hallazgos fueron confirmados de forma independiente por otros autores (Charlier, 2016, Schütz et al., 2016). Charlier (2016) confirmó este resultado, pero con una estimación diferente del tamaño de la inserción de un elemento retroviral endógeno bovino en el exón 5 del gen *APOB*, de una longitud total de 7,5 kb (*BoERV*), lo que resulta en una terminación de la transcripción del gen y pérdida de la función de la proteína, sintetizada solamente en un 3 % de su tamaño normal. Gross et al. (2016) analizaron la información y determinaron que la mutación *APOB* afecta la fertilidad, el crecimiento y la salud de los terneros. En otro estudio (Gross et al., 2019), se encontró que las bajas concentraciones de colesterol asociadas con la mutación *APOB* en los portadores heterocigotos no se deben a una deficiencia primaria de colesterol a nivel celular, como sugiere el término «deficiencia de colesterol», sino que son consecuencia de una capacidad reducida de transporte de colesterol en la circulación. Estos autores sugieren que, a pesar de la presencia de la mutación *APOB*, el colesterol no limita la adaptación metabólica de los animales ni el rendimiento en vacas Holando heterocigotas. Häfliger et al. (2022) demostraron y confirmaron que el haplotipo CDH está relacionado con una inserción retroviral patógena endógena en el gen *APOB* y, por lo tanto, conduce a una malabsorción del colesterol, lo que provoca un aumento de la mortalidad juvenil (Artesi et al., 2021, Kipp et al., 2016, Menzi et al., 2016, Schütz et al., 2016). Otros estudios mostraron que CDH no es una simple enfermedad mendeliana, porque los animales heterocigotos también pueden mostrar signos clínicos graves de deficiencia de colesterol (Häfliger et al., 2019). Häfliger et al.

(2022) determinaron un efecto aditivo en animales homocigotos (afectados) de CDH y recomiendan tener en cuenta este modelo para futuras evaluaciones fenotípicas de trastornos recesivos (Reynolds et al., 2021).

La enfermedad CVM es causada, principalmente, por una mutación determinante en la proteína transportadora de membrana UDP-N-acetil glucosamina del gen *SLC35A3* (Thomsen et al., 2006) y provoca la sustitución de valina por fenilalanina (V180F) en la posición 180 (Rusc y Kaminski, 2007). Esta enfermedad fue reportada por científicos daneses a partir del año 2000 (Agerholm et al., 2004, Agerholm et al., 2001) y su origen se rastreó al toro norteamericano de élite Carlin-M Ivanhoe Bell, que recibió la mutación recesiva letal de la enfermedad CVM de su padre Penstate Ivanhoe Star (Chu et al., 2008, Revell, 2001). Este toro fue utilizado ampliamente para la cría de ganado lechero a nivel mundial durante dos décadas debido al rendimiento superior de sus hijas en la lactancia (Windsor y Agerholm, 2009, Agerholm, 2007, Agerholm et al., 2004). Los animales portadores de CVM fueron identificados entre los toros utilizados para inseminación artificial con una prevalencia muy alta entre 10 y 30 % en varios países (Citek et al., 2006, Thomsen et al., 2006, Kearney et al., 2005). Desde entonces, la aparición de la enfermedad y la identificación de los portadores de CVM se ha reportado en otros países del mundo (Chu et al., 2008, Rusc y Kaminski, 2007, Berglund et al., 2004, Konersmann et al., 2003, Nagahata et al., 2002, Duncan et al., 2001, Revell, 2001).

Hasta hace poco, en Suiza, Häfliger et al. (2022) exploraron los datos genómicos y fenotípicos masivos acumulados de la población local de ganado Holando suizo para identificar las regiones genómicas que afectan la fertilidad y el éxito de la cría. Aplicaron una combinación de los métodos del genotipado masivo, la secuenciación del genoma completo (WGS) (o del exoma completo) y el análisis de asociación de los fenotipos, en donde se

detectaron 19 haplotipos nuevos: HH18, HH20, HH22 al HH38, y cinco previamente descritos por otros autores HH3 (Wu et al., 2019, McClure et al., 2014, Sahana et al., 2013, VanRaden et al., 2011b), HH5 (Fritz et al., 2018, Schütz et al., 2016), HH13 (Fritz et al. 2013), HH19 (Cole et al., 2018, Shuster et al., 1992), HH21 (Sahana et al., 2013, VanRaden et al., 2011b). Se identificaron las variantes causales candidatas para siete de estos haplotipos de Holando mediante secuenciación del genoma completo o del exoma completo que afectan a diferentes genes de importancia para la reproducción y/o el desarrollo: *APAF1* (HH1), *IFT80* (HH2), *SMC2* (HH3), *GART* (HH4), *TFB1M* (HH5), *SDE2* (HH6) y *CENPU* (HH7). Además, se detectaron cuatro variantes nuevas vinculadas a diferentes haplotipos homocigóticos deficientes que afectan a cuatro genes *NOTCH3* (HH21), *RIOX1* (HH25), *KIR2DS1* (HH13) y *PCDH15* (HH35). Se recomiendan estas variantes nuevas para ser agregadas al genotipado de ganado lechero. La variante *KIR2DS1* (HH13) se segrega dentro de la población Holando suizo con una frecuencia alélica del 5 % y muestra una desviación altamente significativa de HWE ($p = 0,0000007$) según una prueba de Chi-cuadrado. La variante *NOTCH3* (HH21) ocurre con una frecuencia alélica baja de 0,014 y nunca se observó en estado homocigoto en ninguno de los 4.000 genomas bovinos con datos WGS disponibles. Esta variante parece ser muy rara, y entre los 4.109 animales del proyecto *1.000 Bull Genomes*, se encontró solo en tres animales de diferentes razas. La variante *RIOX1* (HH25) fue detectada en un solo animal homocigoto y *PCDH15* (HH35) en las tres razas Holando, Ayrshire y Pardo Noruego. Se encontraron asociaciones significativas para: HH37 con seis rasgos diferentes de fertilidad y nacimiento; HH5 con la tasa de no retorno después de 56 días; HH24 con la tasa de no retorno de novillas; HH25 con el intervalo parto a primera

inseminación; HH32 con el intervalo primera a última inseminación, y HH32 y HH30 con una reducción en el peso al nacer, entre otros. Con respecto al HH3 (publicado previamente por McClure et al., 2014), se encontró una asociación significativa con la duración de la gestación, que se puede explicar con el ya conocido aborto de homocigotos relacionado con la mutación *SMC2*. Finalmente, para los otros dos haplotipos con variantes causales putativas conocidas, HH35 muestra un efecto negativo para el rasgo relacionado con el nacimiento (nacidos vivos), mientras que HH13 está asociado con el peso al nacer, así como el rasgo relacionado con la supervivencia P1 (supervivencia desde el día 3 hasta el día 30 de vida). Para este estudio utilizaron un chip personalizado de Axiom Microarray Genotyping Technology de la plataforma Affymetrix (Santa Clara, California, EE. UU.) para ganado Holando suizo con densidades que van desde 3 a 150K SNP. Las posiciones de los SNP de los haplotipos identificados previamente por los otros autores se actualizaron a partir de la nueva versión de secuencia completa de referencia para ganado *ARS-UCD1.2* (Rosen et al., 2020, NCBI, ensamblaje de *ARS-UCD1.2*, 2018). Además, utilizaron el software Fimpute v2.2 (Sargolzaei et al., 2014) para imputar los datos con el fin de corregir genotipos falsos, así como para aumentar los datos de SNP de animales con genotipos de menor densidad.

La plataforma Affymetrix consiste en pequeñas secuencias de ADN dispuestas puntualmente en el chip, que reconocen los alelos específicos de un SNP. Los distintos alelos o nucleótidos son detectados por hibridización diferencial de la muestra de ADN. Por otro lado, la plataforma Illumina utiliza una tecnología basada en cuentas o *beads* (esferas que contienen ADN unido a su superficie) que soportan secuencias de ADN algo más largas que las de Affymetrix para detectar los diferentes alelos de un SNP, lo que provee mayor especificidad a la reacción de hibridación (Bush y Moore, 2012).

Además de la tecnología utilizada, otros parámetros a tener en cuenta son la cantidad y el origen de los SNP que incluye cada plataforma. Esto puede ser de relevancia según la población de animales con la que se trabaje.

En consecuencia, el número de enfermedades hereditarias y predisposiciones genéticas en las que un ternero podría ser analizado está aumentando constantemente y, a su vez, ha disminuido los costes de la tecnología de secuenciación. Los avances en el análisis de ADN con el genotipado utilizando chips de SNP integrados a las evaluaciones genéticas mediante la selección genómica ayudarán a los médicos veterinarios y ganaderos/criadores a identificar qué animales darán las crías que generarán un mayor volumen de producción lechera y de carne a la vez de tener en cuenta otras características no deseables que afectan la producción y el bienestar animal.

1.2.3.4. **Enfermedades de herencia mendeliana en el ganado bovino**

La gran cantidad de información generada por el desarrollo de nuevas tecnologías en los campos de la genética molecular y la bioinformática, y el crecimiento exponencial de las publicaciones científicas relacionadas con mecanismos de herencia, características y/o enfermedades genéticas en especies domésticas ha sido depositada de forma accesible y actualizada en las bases de datos públicas como el catálogo en línea OMIA. La base de datos OMIA es una de las herramientas de gran utilidad para las ciencias veterinarias, la cual fue creada y organizada por el profesor Frank Nicholas y la profesora asociada Imke Tammen de la Universidad de Sídney, Australia. La información de OMIA contiene información textual sobre trastornos hereditarios y características con base genética en 346 especies animales y

referencias, así como enlaces a registros relevantes de *PubMed*, *Gene* y *dbSNP* en la base de datos *online* NCBI, OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <https://www.omim.org/>) y *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>).

En genética veterinaria, se denominan mutaciones patogénicas a las variantes de secuencia que causan enfermedad, las cuales, generalmente, se encuentran en una frecuencia con un rango del 1 % al 3 % en algunos rodeos. Según el catálogo OMIA, en la actualidad se conocen alrededor de 292 enfermedades genéticas relacionadas con todas las especialidades veterinarias en el ganado bovino, la mayoría de ellas del tipo monogénico. Se han identificado genes responsables de 199 enfermedades monogénicas con base genética conocida en bovinos de todas las razas (actualizada a la fecha 31/10/2022), lo que representa que para el 33 % de enfermedades no se ha demostrado la relación genotipo-fenotipo.

Las enfermedades monogénicas se heredan de forma mendeliana, siguiendo diversos patrones hereditarios conocidos: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligados a los cromosomas X e Y, y errores de la impronta genética. Las enfermedades monogénicas conocidas en bovinos son, en su mayoría, causadas por un solo gen autosómico recesivo. Tienen un origen genético específico de la raza y se transmiten de sus progenitores heterocigotas portadores a su descendencia. La mayoría de estas enfermedades son causadas por mutaciones localizadas preferentemente en las regiones codificantes e intrónicas adyacentes de los genes, lo que produce alteraciones de la proteína y modifica su función, lo que provoca el fenotipo patológico.

Para todas las razas bovinas, se han reportado 54 haplotipos recesivos con déficit de homocigotas; en 25 de ellos se han identificado las mutaciones asociadas a los genes responsables (OMIA, 2010; actualizado en

31/10/2022). Dentro de los 20 haplotipos reportados en la raza Holando se conocieron las bases genéticas de los genes responsables que están asociados a 11 haplotipos, en donde se ha observado que esas mutaciones afectan el desempeño reproductivo (tabla 1). En la raza Jersey se ha identificado un gen responsable asociado a uno de los dos haplotipos que causa una reducción de fertilidad (JH1, *CWC15*). La denominación de las siglas de los haplotipos para todas las razas bovinas fue realizada por VanRaden et al. (2011b), en este caso, Holando, donde la primera H significa la raza y la segunda, haplotipo, seguido de un número secuencial (HH1, HH2, HH3, etc.). Estos haplotipos recesivos letales están muy bien detallados en el catálogo OMIA.

La presente tesis se enfocará, principalmente, en las mutaciones previamente identificadas que están asociadas a HH1 (*APAF1*, *c.1702C > T*, Adams et al., 2016), HH3 (*SMC2*, *c.3404T > C*, McClure et al., 2014), HH4 (*GART*, *c.869A > C*, Fritz et al., 2013), JH1 (*CWC15*, *c.163C > T*, Sonstegard et al., 2013), CVM (HHC, *SLC35A3*, *c.538G > T*, Thomsen et al., 2006) y CD (HCD, *BoERVK_LTR_APOB*, Charlier, 2016).

Tabla 1. Principales enfermedades monogénicas de la raza Holando con la abreviatura, la identificación de OMIA, el ancestro en común, el tipo de mutación, la posición genómica y cromosómica.

ENFERMEDAD MONOGÉNICA	ABREVIATURA	ID OMIA	MODO DE HERENCIA	ANCESTRO COMÚN	GEN/CROMOSOMA	POSICIÓN ^a	TIPO DE MUTACIÓN
Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina	HHB (BLAD)	000595-9913	autosómica recesiva	<i>Osbornedale Ivanhoe</i>	ITGB2 (<i>Integrin Beta 2</i> , también llamado CD18). BTA1	144,770,078	Mutación puntual no sinónima de Adenina a Guanina (A/G), c.383A > G (Shuster <i>et al.</i> , 1992)
Malformación Vertebral Compleja	HHC (CVM)	001340-9913	autosómica recesiva	<i>Carlin-M Ivanhoe</i> , <i>Penstate Ivanhoe</i>	SLC35A3 [<i>Solute Carrier Family 35 (UDP-N-acetylglucosamine transporter), member 3</i>]. BTA3	43,261,945	Mutación puntual no sinónima de Guanina por Timina (G/T), c.538G > T (Thomsen <i>et al.</i> 2006)
Deficiencia de Colesterol	HCD (CD)	001965-9913	autosómica codominante	<i>Maughlin Storm</i>	APOB (<i>Apolipoprotein B</i>). BTA11	77,891,733	Inserción larga de ERV (BoERVK_LTR_APOB) (Charlier, 2016; Menzi <i>et al.</i> , 2016)
Deficiencia de Uridina Monofosfato Sintasa	HHD (DUMPS)	000262-9913	autosómica recesiva	<i>Happy Herd Beautician</i>	UMPS (<i>Uridine Monophosphate Synthetase</i>). BTA1	69,151,931	Mutación puntual sin sentido de Citosina por Timina (C/T), c.1213C > T (Schwenger <i>et al.</i> 1993)
Braquiespina	HH0 (BY)	000151-9913	autosómica recesiva	<i>Sweet Haven Tradition</i> , <i>Bis-May Tradition</i> , <i>Cleitus</i> , <i>Rothrock Tradition</i> , <i>Leadman</i>	FANCI (<i>Fanconi anemia complementation group I</i>). BTA21	21,184,869–21,188,198	Delección de 3,3 Kb (Charlier <i>et al.</i> , 2012)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 1	HH1	000001-9913	autosómica recesiva	<i>Pawnee Farm</i> , <i>Arlinda Chief (Chief)</i>	APAF1 (<i>apoptotic protease activating factor 1</i>). BTA5	62,810,245	Mutación puntual sin sentido de Citosina por Timina (C/T), c.1702C > T (Adams <i>et al.</i> , 2016)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 2	HH2	001823-9913	autosómica recesiva		IFT80 (<i>intraflagellar transport 80</i>). BTA1	107,172,616	Delección de una Timina (T), c.747delT (Yang <i>et al.</i> , 2021)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 3	HH3	001824-9913	autosómica recesiva	<i>Glendell</i> , <i>Arlinda Chief</i> , <i>Gray View Skyline</i> , <i>Oman</i>	SMC2 (<i>Structural Maintenance of Chromosomes 2</i>). BTA8	93,753,358	Mutación puntual no sinónima de Timina por Citosina (T/C), c.3404T > C (Fritz <i>et al.</i> , 2013; McClure <i>et al.</i> , 2014)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 4	HH4	001826-9913	autosómica recesiva	<i>Besne Buck</i>	GART (<i>glycinamide ribonucleotide transformylase</i>). BTA1	1,997,582	Mutación puntual no sinónima de Adenina por Citosina (A/C), c.869A > C (Fritz <i>et al.</i> , 2013)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 5	HH5	001941-9913	autosómica recesiva	<i>Thornlea Texal Supreme</i>	TFB1M (<i>transcription factor B1 mitochondrial</i>). BTA9	93,223,651–93,370,998	Delección de 139 Kb (Schütz <i>et al.</i> , 2016)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 6	HH6	002149-9913	autosómica recesiva	<i>Mountain</i>	SDE2 [telomere maintenance homolog (<i>S. pombe</i>)]. BTA16	29,020,700	Mutación puntual <i>start-lost</i> de Timina por Citosina, c.2T > C (Fritz <i>et al.</i> , 2018)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 7	HH7	001830-9913	autosómica recesiva		CENPU (<i>centromere protein U</i>). BTA27	15,123,636	Delección en la posición +3 a +6 bp después del sitio donador <i>splicing</i> , c.15123637_15123640delTTACT (Hozé <i>et al.</i> , 2019)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 13	HH13	001836-9913	autosómica recesiva		KIR2DS1 (<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1</i>). BTA18		Mutación puntual sin sentido de C/T, c.475C>T (Häfliger <i>et al.</i> 2022)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 21	HH21	001908-9913	autosómica recesiva		NOTCH3 (<i>neurogenic locus notch homolog protein 3</i>). BTA7		Delección de 3 pb, c.129_131delTTG (Häfliger <i>et al.</i> 2022)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 25	HH25	002547-9913	autosómica recesiva		RIOX1 (<i>ribosomal oxygenase 1</i>). BTA10		delección de 30 pb, c.396_425del (Häfliger <i>et al.</i> 2022)
Haplotipo Holando con déficit de homocigota 35	HH35	002548-9913	autosómica recesiva		PCDH15 (<i>protocadherin-related 15</i>). BTA26		Mutación puntual no sinónima de C/G, c.2599C>G (Häfliger <i>et al.</i> 2022)

1.2.4. **Metodologías de diagnóstico genético para el control de enfermedades hereditarias en ganado bovino**

La identificación de bovinos portadores de enfermedades hereditarias es esencial para controlar las variantes alélicas potencialmente letales en el ganado y se puede realizar con la ausencia de haplotipos homocigóticos (VanRaden et al., 2011b). Las metodologías que se utilizan para el diagnóstico genético de enfermedades hereditarias son muy variadas, lo que permite desde el estudio de cromosomas mediante estudio citogenético (cariotipo) (Gustavsson y Rockborn, 1964) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Baumann et al., 1980) hasta el análisis del cambio de una o más bases nucleotídicas de la secuencia de ADN (Li et al., 2013). El que se aplique un método u otro dependerá del tipo de mutación y de las características del gen en estudio. Actualmente, la secuenciación del ADN es la técnica más utilizada para el análisis directo y se considera el método de referencia. Las técnicas de secuenciación han avanzado espectacularmente durante los últimos 20 años. Aunque existen distintas estrategias, la mayoría de los laboratorios utilizan la secuenciación basada en el método Sanger (Sanger et al., 1977).

A continuación, se describen brevemente las metodologías de análisis directo de la PCR en tiempo real con análisis HRM y *melting*, basadas en el análisis específico de la secuencia de nucleótidos de un gen para confirmar, identificar o descartar una mutación patogénica asociada a enfermedades hereditarias en bovinos.

1.2.4.1 Análisis de PCR-HRM

El análisis de las curvas de disociación de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés) es un método simple y económico en tubos cerrados para analizar los fragmentos de ADN amplificados por PCR (Wittwer et al., 2003) en presencia de un intercalante fluorescente que permite un monitoreo continuo en cada ciclo de amplificación. Dicha metodología está basada en el comportamiento de la curva de disociación de la muestra de ADN (Reed et al., 2007) mediante el registro de la disminución de la fluorescencia durante la desnaturalización de doble (*dsDNA*, por sus siglas en inglés) a simple cadena (*ssDNA*, por sus siglas en inglés) al aumentar la temperatura (Bass et al., 2007). Esto se visualiza en una curva de disociación de alta resolución HRM característica (figura 3).

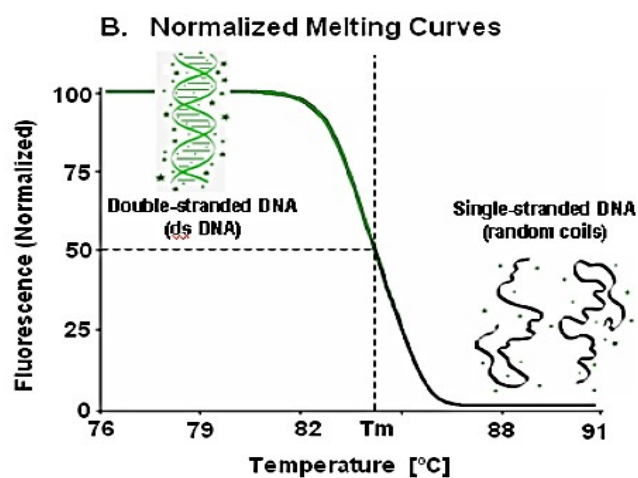


Figura 3. El colorante fluorescente se une al *dsDNA*, cuando la temperatura aumenta el ADN se desnaturaliza en *ssDNA* dando como resultado una liberación del colorante. Esto puede ser visualizado midiendo la emisión de fluorescencia, que genera una curva de disociación (tomado del manual *Sample & Assay Technologies*, Rotor Gene Q, QIAGEN; www.qiagen.com).

1.2.4.2. **Análisis de PCR-*melting***

El análisis de la curva de *melting* se obtiene por la derivación de la curva de desnaturalización (fluorescencia vs. temperatura), que también se genera a partir de los datos sin procesar del análisis HRM, donde durante el calentamiento hay un aumento de la absorbancia, la intensidad y la hipercromía. La forma de esta curva se relaciona con el contenido de bases GC y el tamaño del fragmento de los amplicones. El valor de temperatura a la que se desnaturaliza el 50 % del ADN_g se denomina temperatura de disociación (T_m) (Chien et al., 1976). La gran mayoría de los termocicladores de PCR en tiempo real están programados para interpretar los resultados mediante gráficos con la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura (ordenadas) vs. la temperatura (abscisas). Lo que se observa es un pico máximo correspondiente a la T_m para cada una de las muestras. El gráfico de las curvas de fusión de derivadas negativas ($-dF/dT$) representa la tasa de cambio de fluorescencia durante el proceso de disociación del ADN_g y permite identificar el valor de T_m a través de los picos de temperatura (Ansevin et al., 1976).

1.2.4.3. **Ventajas y aplicaciones de la metodología PCR-HRM/*melting***

Sus principales ventajas en comparación con los métodos basados en gel incluyen el ahorro en costos, mano de obra mínima y menor tiempo, así como la disminución del riesgo de contaminación de la reacción PCR. Esto último se debe a que el análisis HRM no requiere una manipulación de la muestra posterior a la PCR, como la digestión con enzimas de restricción o la visualización en geles (Tindall et al., 2009). Sin embargo, se requieren

muestras limpias con concentraciones iguales de ADN entre sí y con bajo contenido de GC (Garritano et al., 2009). Su sensibilidad y especificidad es alta cuando los productos de PCR son menores de 400 pb de longitud (Reed et al., 2007). Los cambios generales en la intensidad de la fluorescencia son pequeños y deben monitorearse de manera eficiente sobre una rampa de temperatura estrictamente controlada. Por lo tanto, es necesario utilizar instrumentación específicamente diseñada para análisis de disociación de alta resolución para garantizar la máxima sensibilidad y especificidad (Herrmann et al., 2006). White y Potts (2006) investigaron los sistemas de instrumentos desarrollados disponibles en la actualidad específicamente para el análisis HRM.

Existen estudios que sugieren que HRM tiene alta sensibilidad para la detección de mutaciones que es comparable o superior a las técnicas de escaneo actualmente disponibles (Wittwer et al., 2004). HRM se ha utilizado ampliamente para *screening* (o detección) de mutaciones y genotipado tanto para salud humana (Vorkas et al., 2010, Vossen et al., 2009, Hung et al., 2008, Montgomery et al., 2004) como animal y, en particular, en bovinos (Federici et al., 2018, Gabor et al., 2012a y 2012b, Santos et al., 2012).

1.3. **CARACTERIZACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Como se ha mencionado con anterioridad, la producción lechera del ganado Holando se ha visto enfocando sus esfuerzos a favor de unos pocos caracteres productivos; especialmente con las tecnologías reproductivas mejoradas que surgieron en el siglo pasado, el intercambio genómico en todo el mundo aumentó y condujo al uso de un número limitado de toros destacados a través de la inseminación artificial. Esto ha tenido la desafortunada consecuencia de reducir la diversidad genética de la raza y la

aparición de las variantes recesivas con aumentos de los niveles de homocigosis que están asociadas a problemas reproductivos. En los últimos años, se ha observado que la consanguinidad ha aumentado después de la implementación de la selección genómica.

Actualmente, se está considerando la importancia del conocimiento sobre las variantes alélicas recesivas, por sus efectos sobre la fertilidad, ya que se han detectado variantes haplotípicas que, sin llegar a ser letales, causan una reducción en la tasa de concepción y un aumento de los costos por el atraso en la ciclicidad posparto y las dificultades que se generan por no obtener suficientes terneros para realizar una reposición adecuada de las vacas.

Existe un creciente interés en la rápida identificación de animales portadores de haplotipos y alelos recesivos utilizando chips de SNP en los rodeos lecheros como control para prevención y monitoreo de los alelos recesivos en relación con las técnicas moleculares, como el PCR y sus variantes, dada la gran cantidad de información aportada por los chips, por la reciente actualización de las herramientas del ensamblado de las secuencias genómicas de referencia del *NCI_ARS-UCD1.2*, la alta precisión en el genotipado de SNP vinculados a enfermedades monogénicas y la actual tendencia a la disminución de los costos por animal.

Se debe tener en cuenta que en la presente tesis se ha trabajado, principalmente, con las mutaciones que afectan CVM y CD porque, en este momento, no estaban incluidas, pero sí tenían costo extra, en los chips comerciales internacionales como GeneSeek de 50K (versión del año 2019). Tampoco estaban incluidas en el panel irlandés IDB de 60K, pero sí para CVM, aunque también con costo extra. En el caso de los haplotipos HH1, HH3 y HH4, están incorporados junto a los caracteres productivos en la mayoría de todos los tipos de chips, aunque, recientemente, surgieron otras

nuevas variantes haplotípicas recesivas con base genética conocida. Sin embargo, se van incorporando en las nuevas versiones de los chips, los que se pueden aplicar en los estudios poblacionales de mejoramiento y a nivel comercial en la erradicación de estos haplotipos recesivos y mantener bajo control las frecuencias de los alelos recesivos asociados a problemas reproductivos/productivos.

Esta propuesta de investigación generará información crítica para que los productores puedan tomar decisiones informadas al momento de inseminar las vacas de sus rodeos, realizando apareamientos selectivos y eligiendo el toro idóneo que más se adecúe a la realidad genética de su establecimiento. Esto permitiría mejorar, en parte, la performance reproductiva de sus vacas, lo que disminuiría los sacrificios del ganado y aumentaría la rentabilidad de la empresa. Para el caso de las variantes alélicas, CVM y CD, se optimizarán dos técnicas de genotipado para identificar animales portadores y, por otro lado, se evaluará el impacto en el desempeño reproductivo de las vacas Holando y cruza Holando con Jersey mediante genotipado con un chip comercial con la actualización de los 2.500 SNP. Esto contribuirá a un mejor conocimiento de los factores genéticos que puedan estar impactando en la fertilidad de las poblaciones Holando del Uruguay.

2. HIPÓTESIS

2.1. HIPÓTESIS I

La mutación causal de CVM (c.538G >T *SLC35A3*) está presente en bovinos Holando del Uruguay, lo que afecta su desempeño reproductivo, y se puede detectar mediante la técnica de *real time*-PCR/HRM.

2.2. HIPÓTESIS II

La mutación causal de CD (inserto mutante *BoERVK_APOB*) está presente en bovinos Holando del Uruguay, lo que afecta su desempeño reproductivo, y se puede detectar mediante la técnica de *real time* PCR/*melting*.

2.3. HIPÓTESIS III

Los haplotipos causantes de abortos HH1, HH3, HH4, CVM y JH1 están presentes en bovinos Holando y cruza Holando con Jersey del Uruguay, lo que afecta su desempeño reproductivo, y el análisis del catálogo de padres actualizado de la evaluación genética lechera de Uruguay y el genotipado mediante chip de SNP permiten identificarlos.

3. **OBJETIVOS**

3.1. **OBJETIVOS GENERALES**

En la presente tesis se pretende detectar, mediante distintas estrategias de genotipado, la presencia de variantes alélicas y haplotipos recesivos asociados a abortos y mortalidad de terneros en ganado lechero (CVM, CD, HH1, HH3, HH4 y JH1), estimar sus frecuencias y evaluar su impacto en el desempeño reproductivo de vacas Holando y cruza Holando con Jersey pertenecientes a predios comerciales y experimentales del Uruguay.

3.1.1. **Objetivos específicos**

3.1.1.1. **Experimento I**

OE1 (a): Optimizar la técnica de *real time*-PCR/HRM para la detección de la mutación causal de CVM (c.538G >T *SLC35A3*).

OE1 (b): Estimar la frecuencia alélica y prevalencia de portadores del SNP c.538G >T *SLC35A3* en vacas Holando de rodeos comerciales de distintas regiones del país.

3.1.1.2. **Experimento II**

OE2 (a): Optimizar la técnica de *real time*-PCR/*melting* para la detección de la mutación causal de CD (inserto mutante *BoERVK_APOB*).

OE2 (b): Estimar la frecuencia alélica y prevalencia de la inserción *BoERVK_APOB* en vacas Holando de rodeos comerciales de distintas regiones del país.

3.1.1.3. **Experimento III**

OE3 (a): identificar toros con información genética para los haplotipos HH1, HH3 y HH4, que están asociados con una baja eficiencia reproductiva mediante análisis del catálogo de padres Holando 2021 de la evaluación genética lechera de Uruguay.

OE3 (b): Determinar la presencia de las variantes alélicas de HH1, HH3, HH4, JH1 y CVM con el chip bovino GeneTitan® de 2.500 SNP de plataforma Affymetrix, estimar sus frecuencias prediales y evaluar su impacto en la fertilidad de las vacas Holando y cruza Holando con Jersey pertenecientes a un tambo del campo experimental de la Facultad de Veterinaria.

4. **IDENTIFICATION OF HOLSTEIN COWS CARRIERS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVES (HRM)**

(Identificação de vacas holandesas portadoras da malformação vertebral complexa através de curvas de dissociação de alta resolução – HRM)

Andrea Branda Sica¹, Paula Nicolini², María Teresa Federici¹, Silvia Llambí³

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología;

²Universidad de La República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular;

³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Sección Genética

Aceptado el 28 de agosto de 2019 y publicado a partir del 30 de diciembre de 2019 en *Archives of Veterinary Science* (v.24, n.4, p.62-70, 2019; ISSN 1517-784X e-ISSN 2317-6822). *Archives of Veterinary Science* es la revista científica del Programa de Posgrado en Ciencias Veterinarias de la Universidad Federal de Paraná, Brasil. La revista está destinada a la publicación de artículos y notas científicas en las áreas de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El régimen de publicación es un volumen anual, dividido en cuatro números trimestrales. Se envió una notificación con Fe de erratas a la Revista.

Fe de erratas: En el resumen y contenido del artículo, donde se menciona "homocigota, tipo silvestre: GG" debe decir "homocigota, tipo silvestre: TT"; y "alelo mutante (T)" debe decir "alelo mutante (G)".

4.1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue optimizar e implementar un *screening* molecular confiable y económico para la detección del alelo mutante de CVM (malformación vertebral compleja; c.559G>T; *SLC35A3*) mediante el análisis HRM, así como analizar su presencia en una muestra representativa de vacas Holando del Banco de ADN Genómico Lechero de Uruguay. La optimización de la metodología HRM en el equipo *RotorGene™ 6000* (Corbett Life Science, Australia) mediante la amplificación de los productos PCR de 79 pb permitió diferenciar claramente los dos genotipos, homocigota, tipo silvestre: GG, y heterocigota, portadora para la mutación de CVM: GT (c.559G>T; *SLC35A3*). Se encontró que la frecuencia del alelo mutante (T) para CVM en esta muestra analizada fue alta, de $q = 0.032$, y la prevalencia de vacas portadoras, 6.45%. Se concluye que el análisis PCR-HRM es una técnica rápida, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente precisa para la detección de esta mutación en bovinos Holando, el cual podría ser implementado en programas de selección genética.

Palabras clave: Holando, CVM, curvas de disociación de alta resolución.

4.2. SUMMARY

The objective of this study was the optimization and implementation of a reliable and economical molecular screening method for the detection of the mutant allele of CVM (complex vertebral malformation, c.559G>T, *SLC35A3*) by HRM analysis, as well as analyzing its existence in a representative sample of Holstein cows from the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay. The optimization of the HRM methodology in the *RotorGene™ 6000*

equipment (*Corbett Life Science*, Australia) by amplification of the 79 bp PCR products clearly differentiated the two genotypes: homozygous, wild type: GG; and heterozygous, carrier for the mutation CVM: GT (c.559G>T; *SLC35A3*). In the analyzed sample, the frequency of the mutant allele (T) for CVM was high ($q = 0.032$), with a prevalence of carrier cows of 6.45%. It is concluded that the PCR-HRM analysis is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for the detection of this mutation in Holstein cattle, which may be implemented in genetic selection programs.

Keywords: CVM; high-resolution dissociation curve; Holstein.

4.3. INTRODUCTION

Complex vertebral malformation (CVM, OMIA 001340-9913) is a recessive autosomal disease that causes miscarriages and perinatal problems. The single site mutation causing this disease is a substitution of Guanine (G) by Thymine (T) in the position 559 of exon 4 of gene *SCL35A3* (c.559G>T; Thomsen *et al.*, 2006), which plays an essential role in the development of the axial skeleton. This gene codes the UDP-Nacetylglucosamine transporter, and the mutation replaces a valine with a phenylalanine (V180F) at position 180 (Rusc and Kaminski, 2007). Thereof, the defective transporter molecule leads to vertebral malformations (Thomsen *et al.*, 2006). VanRaden *et al.* (2011) confirmed that this mutation is located in position 43.412.427 bp of chromosome 3.

This disease was reported by Danish scientists as from 2000 (Agerholm *et al.*, 2001; 2004), and its origin could be traced to the elite American bull *Carlin-M Ivanhoe Bell*, who received the lethal recessive mutation of the CVM disease from his father, *Penstate Ivanhoe Star* (Revell,

2001; Chu *et al.*, 2008). Due to the superior performance of his daughters at lactation, this bull was worldwide widely used for the raising of dairy cattle (Agerholm, 2007; Windsor and Agerholm, 2009; Agerholm *et al.*, 2004). Among the bulls used for artificial insemination, CVM carrier animals were identified with a very high prevalence (10-30 %) in several countries (Kearney *et al.*, 2005; Citek *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 2006). Since then, the disease and several CVM carriers have been identified in other countries (Revell, 2001; Duncan *et al.*, 2001; Nagahata *et al.*, 2002; Konersmann *et al.*, 2003; Berglund *et al.*, 2004; Rusc and Kaminski, 2007; Chu *et al.*, 2008).

The high resolution melting curves analysis (HRM) is a simple and economic method, performed in closed tubes, for the analysis of PCR products (Wittwer *et al.*, 2003). This method is based in the melting behavior of PCR products (Reed *et al.*, 2007). It shows a high sensitivity and specificity with PCR products smaller than 400 bp long (Reed *et al.*, 2007). HRM has been widely used for genotyping and screening of mutations, both in humans (Montgomery *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2008; Vossen *et al.*, 2009; Vorkas *et al.*, 2010) and animal health, particularly in cattle (Gabor *et al.*, 2012a and 2012b; Santos *et al.*, 2012; Federici *et al.*, 2018).

In Uruguay, the disease has not been diagnosed, and the mutant allele has not been reported in the general cattle herd. Hence, the purpose of this study consisted in the optimization and implementation of a reliable and economic molecular screening method for detection of the mutant CVM allele (c.559G>T; *SLC35A3*) by HRM analysis, as well as analyzing its presence in a representative sample of Holstein cows of the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay.

4.4. MATERIALS AND METHODS

4.4.1. Samples and reference material

The analyzed cattle consisted in a representative sample of 279 second-lactation Holstein cows of 6 commercial dairy farms from different regions of Uruguay. The DNA of these samples is stored in the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay of the Biotechnology Unit of the INIA Las Brujas as reference material for future investigation projects (INMLUdelaR-INIA agreement).

4.4.2. DNA extraction, concentration and quality

Genomic DNA extraction and purification from fresh blood samples was performed in 2008 in the Laboratory of Nuclear Techniques (Faculty of Veterinary, UdelaR) according to the salting-out and proteinase K digestion protocol described by Miller *et al.* (1988). DNA concentration was assessed with nanodrop at 260 nm (*NanoDrop 8000 spectrophotometer, Thermo Scientific*), and DNA quality was assessed by means of the OD260/OD280 relationship, between 1.8 and 2.0.

4.4.3. Optimization of genotyping by real-time PCR-HRM and data analysis

In order to identify the mutant allele of the CVM disease (c.559G>T; *SLC35A3*), optimization of genotyping was performed by real-time PCR applying HRM in the *RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science, Australia)* equipment. 79 bp PCR products were amplified with the primers described by

ZhiLing *et al.* (2015). PCR reactions were carried out on a final volume of 25 μ l with 50 ng of genomic DNA, 1X *HRMPCR Master Mix* (kit *Type-it® HRMPCR*, *QIAGEN*, Hilden, Germany), and 0.7 μ l of each primer (forward and reverse). The cycling program consisted in an initial denaturation of 10 min at 95°C, 40 cycles of 5 s at 95°C, 25 s at 60°C and 20 s at 72°C, and two holds of 10 s at 95°C and 1 min at 45°C, respectively. The annealing temperature was adjusted to 60°C with the activation of the fluorescence data in the green channel (excitation: 470 nm; detection: 510 nm). The HRM phase was adjusted with 0.1 °C increments, with a 2 s retention in each increment from 74.5 to 84.5°C, with the acquisition of the fluorescence data in the green channel of HRM (excitation: 460 nm; detection: 510 nm). Analyses of the HRM curve were performed with the *Rotor-Gene Q* vers. 2.3.1 (Build 49) software and the provided HRM algorithm. The predetermined normalization regions for the CVM single site mutation (c.559G>T; *SLC35A3*) were applied. HRM data were viewed as normalized HRM curves and normalized difference graphs for the GG genotypes (homozygous, wild type) and GT (homozygous, carrier of the mutation). Genotypes of unknown samples were automatically assigned by the *Rotor-Gene* HRM software. The confidence threshold for accepting the genotype assigned by the software was 90%. In addition, in order to confirm the precision of genotypes by HRM, 25 DNA samples were selected at random and sent to the Instituto de Genética Veterinaria of the Universidad Nacional de la Plata (IGEVET-CONICET, UNLP, La Plata, Argentina) to be genotyped with the low density panel microarray *ArBos1 50K* of the *Affymetrix* platform. Allelic and genotypic frequencies were calculated by direct counting according to the method of Nei (1989).

4.5. RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1 and **2** show the results of the HRM analysis of gene *SLC35A3*. The *Rotor-Gene* HRM software automatically assigned the genotypes for the mutant CVM allele (c.559G>T; *SLC35A3*) according to the differences in the pattern of the melting curve and the melting temperature (T_m) of heterozygous and wild type homozygous. **Figure 1** shows the different patterns of the single site mutation G for T, showing the two genotypes. Violet curves correspond to the wild type homozygous, and the green one to the heterozygous for the mutation (that is, a normal G allele, and a mutated T allele). The HRM methodology permitted to clearly differentiate the two genotypes of the mutant CVM allele (c.559G>T; *SLC35A3*). **Figure 2** shows the difference curves obtained with the HRM analysis; these curves can be differentiated by comparing the shape of the difference curves based in the genotypes with those of the CVM (c.559G>T; *SLC35A3*) carriers, which are taken as reference, clearly identifying the two genotypes: wild type homozygous (GG, violet), and heterozygous CVM carriers (GT, green). **Figure 3** shows the melting curves of the negative derivatives ($-dF/dT$) generated from unprocessed data of the HRM analysis. The peak values were 78.75°C for allele G, and 77.05 °C for allele T. The melting curves of the negative derivatives ($-dF/dT$) of the heterozygous genotype were identified by peaks with a value of 78.75 °C (**Figure 3**).

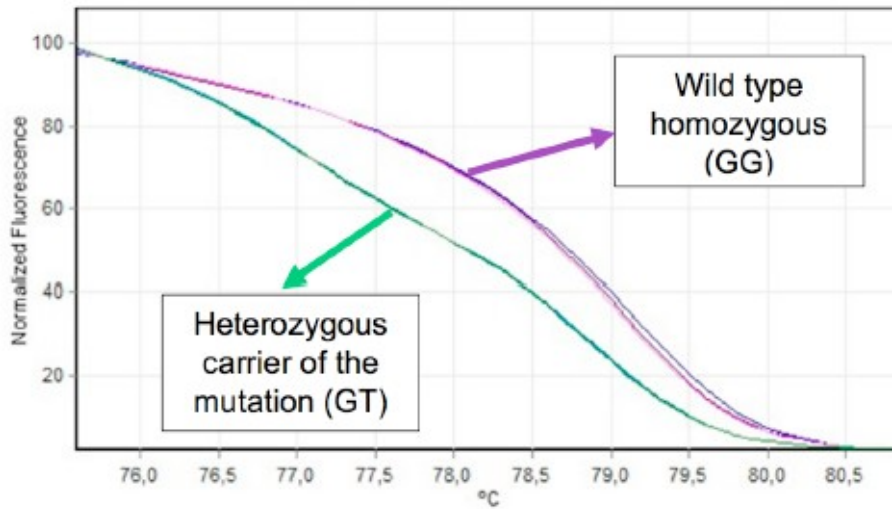


Figure 1. Graph with the normalization of the high resolution melting pattern: normalized denaturation curves obtained with the HRM analysis. Y-axis: normalized fluorescence; X-axis: temperature (°C). The graph shows three genetic materials of each genotype.

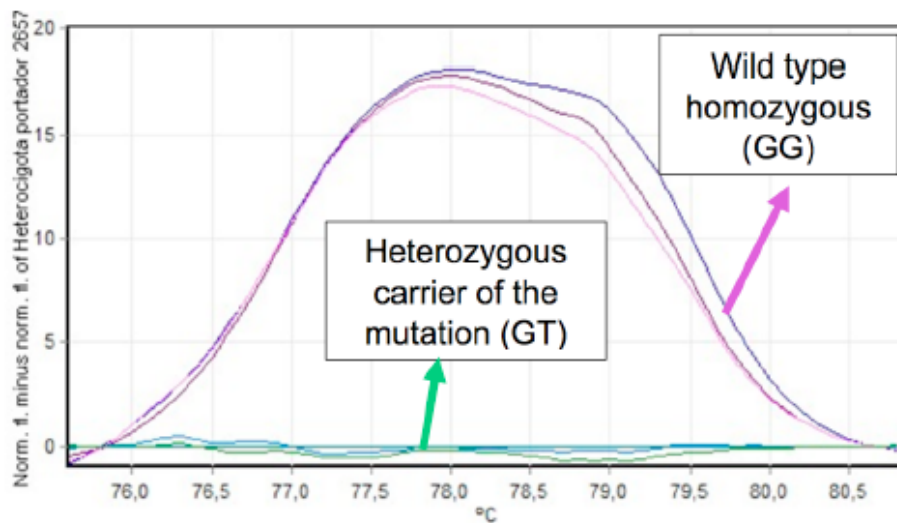


Figure 2. Graph of differences between genotypes: difference curves obtained with the HRM analysis. Y-axis: normalized fluorescence; X-axis: temperature (°C). The graph shows three genetic materials of each genotype.

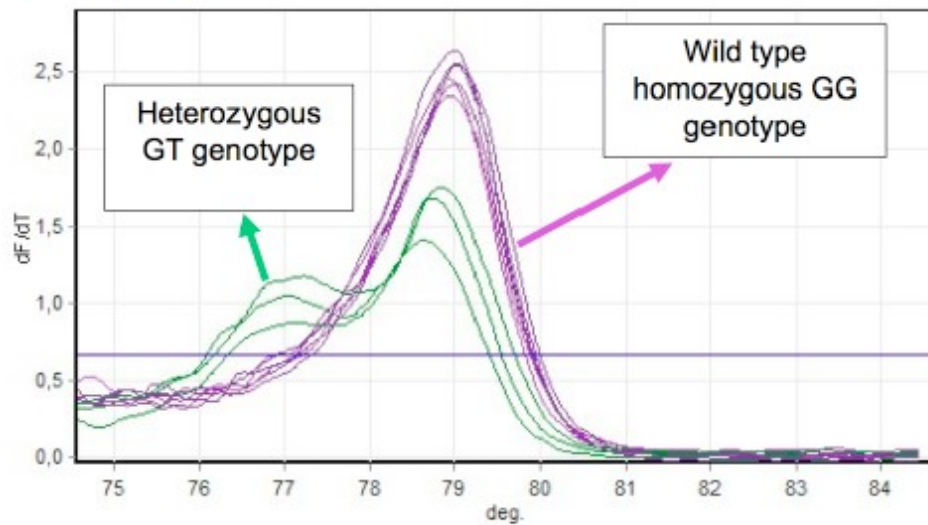


Figure 3. Negative derivative of the fluorescence melting curves at temperature ($- dF/dT$) for the homozygous wild type (GG) and heterozygous (GT) genotypes. The graph shows the material of three heterozygous (GT) and six homozygous (GG) genotypes.

The HRM analysis has the disadvantage of its sensitivity to the residues of different DNA extraction methods, which may lead to melting curves with subtle differences that, in some cases, may cause an increase in the number of false positives (White and Potts, 2006). This was seen in the 6 groups from different dairy farms, maybe due to the fact that DNA was extracted by different operators or laboratories. Nevertheless, low quality samples can be easily identified and excluded from subsequent analyses if the PCR reaction is subjected to real time monitoring. Hence, for a HRM reaction, it is necessary to use the same bleeding (for fresh or coagulated blood) and DNA extraction procedures for all the samples.

The comparisons of the shapes and difference graphs of the melting curves of negative derivatives ($- dT/dF$) allowed the detection of two different CVM genotypes. CVM carriers (GT genotypes) were detected by two peaks for each G and T allele (78.75 and 77.05°C respectively). In Gabor *et al.* (2012a), the melting point of the CVM carriers was lower than that of

non-carrier animals (78.15 °C and 79.42 °C, respectively). HRM analysis permits to detect single base variations by comparing the melting curves of PCR products with the selection curve of a reference or control sample. The main advantages of HRM analysis when compared with gel-based methods are its lower cost, minimal labor, lesser time, and reduction of the risk of contamination of the PCR reaction, the latter due to the fact that, unlike digestion with restriction enzymes or gel visualization, in HRM analysis it is not necessary to manipulate the sample after PCR (Tindall *et al.*, 2009).

This study optimized the HRM analysis protocol as a simple, fast, and reliable genotyping method for CVM disease in Holstein cattle. The first step consisted in finding the control samples for the CVM mutation in the *SLC35A3* gene. A preliminary HRM analysis with 25 DNA samples detected 3 control samples carriers of the mutation for the corresponding gene. As there were no CVM positive controls (sick homozygous), we used the *ArBos1* genotyping service for identification and isolation of control samples carriers of the CVM mutation, these samples with known genotypes were used as controls for the HRM analysis. The need of using an alternative genotyping method before HRM is one of the main limitations of the PCR-HRM technique. In addition, primers were selected from those amplicons with the smallest possible size. For this study we used the primers used in ZhiLing *et al.* (2015) for real-time PCR with TaqMan probes: the 79 bp long amplicon amplified for the HRM analysis described in this study. The GC content of the forward and reverse primers used in this study ranged between 40 and 60 %; this was a proper content (45.5 and 47.8 %, respectively), as neither non-specific amplifications nor primer dimers were observed; thus validating the primer design of ZhiLing *et al.* (2015) for HRM analysis. The reduction of amplicon size increases the difference of the signal emitted at a given temperature between two sequences differing in just one nucleotide position. Genotypic

differences are more clearly visible with smaller amplicons (Gundry *et al.*, 2003). Heterozygotes can be identified by a modification in the shape of the melting curve, while homozygotes are identified by a modification in the melting temperature (T_m) (Liew *et al.*, 2004).

Both the 3 DNAs of the heterozygous genotype (carrier of the mutation) and the 22 DNAs of the wild type homozygous genotype were confirmed by genotyping with the *ArBos1* 50K SNP panel; these were used as controls for carriers of the mutant allele for assignment of genotypes in HRM analyses with the *Rotor-Gene Q* program. Both the genotyping data of *ArBos1* and the HRM analyses of the *SLC35A3* gene confirmed the assigned genotype for all samples. The single site mutation of gene *SLC35A3* influences the melting pattern (T_m) of PCR products, generating different high resolution melting curves that permit genotype differentiation and identification by HRM analysis.

In 18 cows of the analyzed sample, it was detected a mutant CVM allele (T) (c.559G>T; *SLC35A3*), with a confidence interval greater than 90 %. These results obtained are shown in **Table 1**. As a first report for molecular diagnosis of CVM, this study found a high frequency ($q = 0.032$) of the mutant CVM allele (c.559G>T; *SLC35A3*) in the analyzed sample, with a prevalence of 6.45 % of carrier cows. Both the frequency of the mutant allele and the prevalence of CVM carriers of this study were high when compared with those of the cows of Turkey ($q = 0.01$ and 3.4%, respectively, Meydan *et al.*, 2010). Nevertheless, the prevalence was low when compared with other countries, such as Denmark (31.0%, Thomsen *et al.*, 2006), Poland (24.8%, Rusc and Kaminski, 2007), Japan (32.5%, Nagahata *et al.*, 2002), Sweden (23.0%, Berglund *et al.*, 2004), and Germany (13.2%, Konersmann *et al.*, 2003). The reason for these differences may be due to the fact that there are samples from different

populations, that is, cattle from different regions, although it may also be influenced by the use, over time, of semen from bulls carriers of the mutation. Approximately since the turn of the century, most countries have developed improvement programs to decrease the frequency of CVM carriers in the cattle population (Rusc and Kaminski, 2007). Nevertheless, In Japan, Ghanem *et al.* (2008) found 26 CVM carriers in 200 Holstein cows (13.0%). Hence, the frequency of CVM carriers seems to continue to be high in some Holstein populations.

Table 1. Number of carriers, distributions of mutant allele frequency, and prevalence of complex vertebral malformation carriers in the six sampled farms of different regions of Uruguay.

Farm	Sample size (call rate >0.90)	Number of carriers	Prevalence of carriers (%)	Mutant allele frequency (q)
"A"	56	7	12.5	0,063
"V"	63	7	11.11	0,056
"L"	63	1	1.59	0,008
"G"	16	2	12.5	0,063
"M"	28	0	0	0,000
"B"	53	1	1.89	0,009
TOTAL	279	18	6.45	0,032

In this study, the first report on CVM in Uruguay, it was possible to clearly identify two different genotypes for the CVM mutation (c.559G>T; *SLC35A3*) with the PCR-HRM procedure, thus validating it for genotyping in cattle.

4.6. **CONCLUSIONS**

The PCR-HRM analysis here in described provides an alternative approach for genotyping of mutant alleles in cattle. The HRM application is a fast, easily interpretable, low-cost, and highly precise procedure for the detection of the mutant allele (T) of gene *SLC35A3*, allowing the genotyping of great volumes of cattle for the CVM disease. The high prevalence of CVM carriers observed in the reference population of Uruguayan Holstein cattle justifies the need of implementing strategies for a gradual elimination of the mutant disease in dairy herd.

4.7. **ACKNOWLEDGMENTS**

The results of this publication are part of the research funded by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación of Uruguay under code POS_NAC_2017_1_141239. Genotyping of the *ArBos1* was financed by the Unidad de Biotecnología of INIA Las Brujas (through Marco Dalla Rizza, PhD) and the Plataforma de Salud Animal of INIA La Estanzuela (Federico Giannitti, PhD). To BS Beatriz Carracelas, of the Banco de ADN Genómico Animal of INIA Las Brujas, for assisting with the access and supply of the DNA samples of the Holstein cows. To Pablo Mones, B.S. in Biology & BA in Translation, for the translation into English.

4.8. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Agerholm, J.S. Inherited disorders in Danish cattle. **APMIS Supplementum**, v.115, n.122, p.1-76, 2007.
- Agerholm, J.S.; Bendixen, C.; Andersen, O. et al. Complex vertebral malformation in Holstein calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.283-289, 2001.
- Agerholm, J.S.; Bendixen, C.; Arnbjerg, J. et al. Morphological variation of "complex vertebral malformation" in Holstein calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.548–553, 2004.
- Berglund, B.; Persson, A.; Stalhammar, H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p.161-165, 2004.
- Chu, Q.; Sun, D.; Yu, Y. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.228–230, 2008.
- Citek, J.; Rehout, V.; Hajkova J. et al. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. **Veterinární medicína**, v.51, p.333-339, 2006.
- Duncan, R.B.; Carrig, C.B.; Agerholm, J.S. et al. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: Report of a case in the USA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.333-336, 2001.
- Federici, M.T.; Branda Sica, A.; Artigas, R. et al. High-resolution melting (HRM) curve análisis: New approach used to BLAD and DUMPS in Uruguayan Holstein breed. **Archives of Veterinary Science**, v.23, n.4, p.01-09, 2018.

- Gabor, M.; Miluchova, M.; Anna, T. et al. Detection of complex vertebral malformation carriers in Slovak Holstein cattle by high resolution melting analysis. **Acta Veterinaria**, v.62, p.239-248, 2012a.
- Gabor, M.; Trakovicka, A.; Miluchova, M. et al. The use of high resolution melting for detection of the CAPN530 polymorphism in slovak simental bulls. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.45, p.155-159, 2012b.
- Ghanem, M.E.; Akita, M.; Suzuki, T. et al. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.348-354, 2008.
- Gundry, C.N.; Vandersteen, J.G.; Reed, G.H. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clinical Chemistry**, v.49, p.396-406, 2003.
- Hung, C.C.; Lee, C.N.; Chang, C.H. et al. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. **Clinical Biochemistry**, v.41, p.162-166, 2008.
- Kearney, J.F.; Amer, P.R.; Villanueva, B. Cumulative discounted expressions of sire genotypes for the complex vertebral malformation and beta-casein loci in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4426–4433, 2005.
- Konersmann, Y.; Wemheuer, W.; Brenig, B. Herkunft, verbreitung und bedeutung des CVM gendefekts in der Holstein Friesian population. **Züchtungskd**, v.75, p.9-15, 2003.
- Liew, M.; Pryor, R.; Palais, R. et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. **Clinical Chemistry**, v.50, p.1156–1164, 2004.

- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.319-325, 1988.
- Montgomery, J.; Wittwer, C.T.; Palais, R. et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution melting analysis. **Clinical Chemistry**, v.50, p.1748-1754, 2004.
- Nagahata, H.; Oota, H.; Nitnai, A. et al. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.1107-1112, 2002.
- Nei, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Nueva York, Columbia University Press, 1987. 512 p.
- Online Mendelian Inheritance in Animals. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2011. Available in: <http://omia.angis.org.au/>
- Reed, G.H.; Kent, J.O.; Wittwer, C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v.8, p.597-608, 2007.
- Revell, S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. **Veterinary Record**, v.149, p.659-660, 2001.
- Rusc, A.; Kaminski, S. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein Friesian bulls. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.247-252, 2007.
- Santos, S.; Marques, V.; Pires, M. et al. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. **BMC Medical Genetics**, v.13, n.17, p.1.13, 2012.
- Thomsen, B.; Horn, P.; Panitz F. et al. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter,

- causes complex vertebral malformation. **Genome Research**, v.16, p.97-105, 2006.
- Tindall, E.; Petersen, D.; Woodbridge, P. et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. **Human Mutation**, v.30, p.876–883, 2009.
- VanRaden, P.M.; Olson, K.M.; Null D.J. et al. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.6153-6161, 2011.
- Vorkas, P.A.; Christopoulos, K.; Kroupis, C. et al. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. **Clinical Biochemistry**, v.43, p.178-185, 2010.
- Vossen, R.H.; Aten, E.; Roos, A. et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. **Human Mutation**, v.30, p.860-866, 2009.
- White, H; Potts, G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). **National Genetics Reference Laboratory** (Wessex, 2006). (<http://www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm>)
- Windsor, P.A.; Agerholm, J.S. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.87, p.5, 2009.
- Wittwer, C.T.; Reed, G.H.; Gundry, C.N. et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v.49, p.853-860, 2003.
- ZhiLing, L.; XiaoWei, W.; Wei, K. et al. Establishment and application of *TaqMan* real-time PCR to detect the complex vertebral malformation in Holstein cattle. **Journal of South China Agricultural University**, v.36, n.5, p.26-30, 2015.

5. **OPTIMIZATION OF REAL-TIME PCR-MELTING FOR DETECTION OF THE CHOLESTEROL-DEFICIENCY MUTATION IN HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE**

OPTIMIZACIÓN DE *REAL TIME PCR-MELTING* PARA LA DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN CAUSANTE DE DEFICIENCIA DE COLESTEROL EN BOVINOS HOLANDO

REAL TIME PCR-MELTING FOR CD IN HOLSTEIN FRIESIAN

Andrea Branda-Sica^{1*}

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4919-2563>

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Canelones, Uruguay.

*Corresponding author: abranda@inia.org.uy

Paula Nicolini²

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7678-6204>

²Universidad de La República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular, Tacuarembó, Uruguay.

Rody Artigas³

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9173-5752>

³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Sección Genética, Montevideo, Uruguay.

María Teresa Federici¹

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2795-4635>

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Canelones, Uruguay.

Silvia Llambí³

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-9338>

³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Sección Genética, Montevideo, Uruguay.

Aceptado y publicado el 21 de junio de 2022 en REVISTA CIENTÍFICA (volumen 32 del 2022, e-ISSN 2521-9715, p-ISSN: 0798-2259, l-ISSN: 2477-944X, y su dirección electrónica: <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica>). La REVISTA CIENTÍFICA de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia es una revista internacional que recibe trabajos para publicación en las formas de artículos científicos originales no publicados, notas técnicas, cartas al editor y revisiones bibliográficas. El régimen de publicación es continuo.

Para citar el artículo:

Branda-Sica, A., Nicolini, P., Artigas, R., Federici, M. T., & Llambi, S. (2022). Optimización de PCR en tiempo real con curvas de disociación para la detección de la mutación causante de deficiencia de colesterol en bovinos Holando. *Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia*, 32, 1-5. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32137>

5.1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue optimizar un análisis por *real time PCR-Melting* para la detección confiable y económica del inserto mutante de 7.5 Kb del elemento transponible bovino *BoERVK* en el exón 5 del gen de la Apolipoproteína B (*APOB*), determinante de la deficiencia de colesterol (*CD, OMIA 001965-9913*). Asimismo, aplicando esta técnica se realizó un

screening molecular preliminar para determinar la presencia de esta mutación en una muestra de ADN de vacas Holando pertenecientes a seis tambos comerciales de diferentes regiones del Uruguay. A partir de la amplificación de los productos de *PCR* de 170 y 146 pb se logró distinguir claramente dos genotipos: homocigota (tipo silvestre *wt/wt*) y heterocigota (portador de la mutación *CD*: *MUT/wt*). El genotipo homocigota para la mutación asociada con la deficiencia de colesterol no fue detectado. Se concluye que el análisis *real time PCR-Melting* es una técnica rápida, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente precisa para la detección de esta mutación, el cual puede ser implementado en programas de selección genética para evitar la propagación de la enfermedad en bovinos Holando de Uruguay.

Palabras clave: Curvas de disociación; deficiencia de colesterol; Holando.

5.2. SUMMARY

The purpose of this study was to optimize a real-time PCR-melting analysis for reliable and economical detection of the 7.5 Kb mutant insert of the *BoERVK* bovine transposable element in exon 5 of the Apolipoprotein B (*APOB*) gene, which causes cholesterol deficiency -*CD*- (*OMIA* 001965-9913). This technique was also used to perform a preliminary molecular screening to detect this mutation in a DNA sample of Holstein Friesian cows (HFc) of six commercial dairy farms from different regions of Uruguay. By amplifying the 170 and 146 bp PCR products, two genotypes were clearly identified: homozygote (wild type *wt/wt*) and heterozygote (carrier of the *CD* mutation: *MUT/wt*). The homozygous *wt/wt* genotype was detected in the representative sample of 103 HFc. It is concluded that Real-Time PCR-

melting analysis is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for detecting this mutation, which can be implemented in genetic selection programs to prevent the spread of the disease in HFc.

Key words: Cholesterol deficiency; Holstein Friesian; real-time PCR-melting.

5.3. INTRODUCTION

Cholesterol deficiency -*CD*- (*OMIA* 001965-9913) [19] is caused by a loss-of-function mutation in the Apolipoprotein B (*APOB*) gene, which is necessary for liver lipid metabolism, steroid biosynthesis, and cholesterol absorption in the small intestine [17]. The *APOB* mutation influences cattle (*Bos taurus*) fertility, growth, and health [9]. *CD* disease is usually confused with other types of neonatal diarrhea [14]. The economic impact of *CD* is very important. A study in Germany calculated that 3,400 recessive homozygous calves were born per year, resulting in an annual economic loss of approximately € 1.3 million [13]. Furthermore, in the United States of America (USA), annual losses due to that disease were calculated at USA\$ 1.7 million [3]. In addition to severe diarrhea, affected calves have hypocholesterolemia and usually die within the first weeks (wk) to 6 months (mon) of life [14]. Some heterozygous calves showed reduced blood cholesterol concentrations, whereas in recessive homozygous blood cholesterol levels and triglyceride concentrations were virtually zero [9, 14, 21]. Gross *et al.* [8] found that low cholesterol concentrations associated with the *APOB* mutation in carriers are not due to primary *CD* at the cellular level, as the term "CD" suggests, but a consequence of decreased cholesterol transport capacity in blood. These authors suggest that, despite the presence of the *APOB* mutation, cholesterol does not limit metabolic adaptation or

yield in heterozygous Holstein Friesian cows (HFc) [8]. The origin of this disease was traced to the American sire *Maughlin Storm*, born in 1991 and widely used in the HF population worldwide [14, 23].

This disease is caused by a 1,299 base pairs (bp) insertion of a long transposable element (*LTR_ERV2-1*) between nucleotides 24 and 25 of exon 5 of the *APOB* gene [17]. This insertion causes a shift in the reading frame of the *APOB* gene that leads to the truncation of 97% of the bovine *APOB* protein [17]. These findings were independently confirmed by other authors [4, 22]. This result was confirmed by Charlier [4], albeit he estimated the size of the insertion of the bovine endogenous retroviral element in exon 5 of the *APOB* gene in 7.5 Kb (*BoERV*); this leads to transcriptional termination and loss of protein function. Due to this, the protein was synthesized to only 3% of its normal size.

Although molecular methods such as Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variants are currently applied to diagnose the *CD*-causing mutation [5, 12, 17, 22], there are no published studies in Uruguay on the application of these techniques for the accurate and effective detection of these transposable elements. The design of molecular diagnostic strategies for this mutation would be important for this Country, in order to achieve immediate results regarding the control of this disease, since Briano-Rodriguez *et al.* [2] reported a prevalence of *CD* carriers of 2.61% in a population sample of HF calves using the GeneSeek Genomic Profiler -GGP-Bovine 50K genotyping panel. Hence, the purpose of this study was to optimize and implement a reliable and economical molecular screening procedure for the detection of the 7.5 Kb mutant insert (*BoERVK*) of the *APOB* gene through real-time PCR analysis with melting curve analysis (real-time PCR-melting), as well as to obtain preliminary results on its presence in

a representative sample of HFc from the Dairy Cattle deoxyribonucleic acid (DNA) Genomic Bank of Uruguay.

5.4. MATERIALS AND METHODS

5.4.1. DNA samples and reference population

It worked with a representative sample of 103 second lactation HFc of six commercial dairy farms from different Regions of Uruguay. Genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) from these samples was stored in the Dairy Cattle DNA Genomic Bank of the Biotechnology Unit (INIA Las Brujas) as reference material for research projects (INML-UdelaR-INIA agreement). The extraction of these gDNA samples was initially performed from fresh blood samples at the Nuclear Techniques Laboratory (Facultad de Veterinaria, UdelaR) in 2008 using a digestion procedure with proteinase K and salting-out [18].

For optimization of the real-time PCR-melting, two gDNA samples were used as reference controls for comparison with the patterns of the melting curves to be analyzed. These control samples corresponded to: (1) gDNA of a bull (*ALTALeap* 011HO12336) diagnosed as a carrier of the *CD* mutation, and (2) gDNA of a bull (*ALTABolero* 011HO11572) free of the disease; both from *AltaGenetics* company (Montevideo, Uruguay). These gDNA samples were extracted from semen with the QIAamp DNA mini kit, according to the manufacturer's protocol #2.

gDNA was quantified in the NanoDrop equipment (NanoDrop 8000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA), obtaining a range between 1.8 and 2.0 for the *OD260/OD280* ratio. The quality of the gDNA

samples was assessed by 1% agarose gel electrophoresis in TBE 0.5X buffer [7].

5.4.2. **Optimization of the genotyping of the *BoERVK_APOB* insertion with real-time PCR-melting**

Real-time PCR reactions were performed in a RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science, Australia) on a final volume of 25 microliters (μl) per sample containing 50 nanograms (ng) of genomic DNA, 1X NZY qPCR Green Master Mix (NZYTech Genes & Enzymes, Portugal), and 0.5 micro Mol (μM) of each primer. A combination of three allele-specific primers designed by Charlier *et al.* [5] was used. This combination of primers discriminates the wild type from the mutated sequence and corresponds to a forward primer (F1: 5' AAG GAG GCT GCA AAG CCA CCT AG 3') and two reverse primers (mutant R1: 5' CCT TTG TCA CGA GTG GAA TGC CT 3'; and R2: 5' CCT CTT GAT GTT GAG GAT GTG TT 3').

Dip tubes without gDNA were used as a negative control to identify the possible contamination of reagents and the possible formation of primer dimers in each PCR reaction mix.

The cycling program consisted of a 5 minutes (min) pre-hold at 95°C; and 40 cycles of 45 seconds (s) at 95°C, 40s at 55°C, and 40s at 72°C; with a 5 min stop-hold at 72°C. The annealing temperature was adjusted to 55°C, with activation of fluorescence data in the green channel (excitation 470; detection 510 nanometers -nm-). The melting peak was adjusted using 1°C increments with a 5s retention for each increase from 75 to 95°C. Melting curve analyses were performed with the Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) of the RotorGene™ 6000 thermal cycler.

Electrophoresis was performed on a 3% agarose gel in 0.5X TBE buffer [7] in order to assess primer function and specificity; upon completion of the PCR reaction, the PCR products had the expected fragment size. The expected fragment sizes for each amplicon are 170 bp for the wild-type allele, and 146 bp and 120 bp for mutant alleles A and B, respectively.

5.4.3. Confirmation of results by sequencing and multiple sequence alignment

To confirm the sequence identity of the amplicons identified by real-time PCR-melting, 23 PCR samples were selected and sent for sequencing (Humanizing Genomics Macrogen, Seoul, Korea). Sequencing was performed using the primers of Charlier *et al.* [5]. The obtained sequences were analyzed by multiple alignment with a reference sequence for the *APOB* bovine gene (GeneID 494004, GenBank), using BioEdit free software [11].

5.5. RESULTS AND DISCUSSION

The **Fig. 1** shows the denaturation curve ($-dF/dT$ vs. temperature) of the amplicons obtained by real-time PCR for the *BoERVK_APOB* insertion in the analyzed genetic materials of each genotype. A peak was observed at 86.8°C for the homozygous wild type (*wt/wt*), and at 88°C for the heterozygous control, carrier of the *CD* mutation (*MUT/wt*). The homozygous *wt/wt* genotype was detected in the representative sample of 103 HFc.

Specialized real-time PCR thermal cyclers, such as the RotorGene™ 6000 used in this study was programmed to produce the melting curve after the amplification cycles have been completed. As the temperature increases, the double-stranded gDNA denatures to single-stranded gDNA, and the

fluorophore molecules that had intercalated within the double-stranded gDNA at the end of amplification begin to separate from it as the temperature increases, leading to a decrease in fluorescence. The melting curve is obtained by derivation of the denaturation curve (fluorescence vs. temperature), which shows an increase in absorbance, intensity, and hyperchromicity during heating. The shape of this curve is related to the guanine-cytosine (GC) base content and the fragment size of the amplicons. The temperature value at which 50% of the gDNA is denatured is called melting temperature (T_m) [6]. The Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) plots the derivative of fluorescence as a function of fluorescence (ordinates) vs. temperature (abscissae). In the plot, it can be seen a maximum peak corresponding to the T_m for each of the samples. The negative derivative plot of melting curves ($-dF/dT$) represents the rate of fluorescence change during the gDNA melting process and allows the identification of the T_m value by means of the temperature peaks [1].

For the samples analyzed in this work, the observation of a single temperature peak in the melting curve of each sample confirmed the specificity of the primers chosen to amplify the 146 bp mutant allele with a peak at 88°C, and the 170 bp wild type at 86.8°C. In this study, the primers of the mutant and wild type alleles had a GC content between 40 and 60%, which was an adequate one (43.48 and 56.52%, respectively) since no nonspecific amplifications or primer dimers were observed in the negative reaction control. Differences in the biological origin of the gDNA samples (blood vs. semen, in this case) caused the use of different DNA extraction protocols. This means that there may be differences in the chemical solutions used during the extraction process for each protocol, as well as in the contaminating residues that could remain in the final gDNA solution. Since real-time PCR equipment is highly sensitive to these differences in the

conditions of the gDNA samples, differences could potentially be observed in the melting curves of amplicons that, despite having the same genotype, could be detected as different because their gDNA was extracted following different protocols [24].

However, in this work, it was not detected any effect of the gDNA extraction procedure on the melting dynamics of the amplicons, since the melting peak pattern ($-dF/dT$) of the disease-free control bull matched that of wild-type homozygous cows (**Fig. 1**). Furthermore, at the end of the PCR reaction, i.e., when the reaction reached the plateau phase, an inflection point was observed in the denaturation curve of the amplified product of the heterozygous control bull when compared with the curves of the disease-free control bull and wild type homozygous cows. Obtaining small amplicons increases the difference in the signals at a given temperature between two sequences differing in their nucleotide position from the start site of the *BoERVK* insertion element. Differences between genotypes are more clearly visible when amplicons are smaller in size [10]. The temperature and fluorescence resolution of the RotorGene™ 6000 equipment used in this study demonstrated the accuracy of the melting curves and their ability to differentiate different genotypes. Therefore, the primer design of Charlier *et al.* [5] was validated for the detection of the 7.5 Kb *CD* mutant insert (*BoERVK*) in exon 5 of the *APOB* gene by real-time PCR-melting on the RotorGene™ 6000.

By analyzing the electropherogram and multiple alignments of the sequences obtained with the reference sequence, the location of the insertion start point was determined at position 468 (26593) of the *APOB-UP1-F1* sequence of the HF bull control carrier of the *CD* mutation (*MUT/wt* or *indel_BoERVK_APOB*) after the GTTCCTGAAGG fragment on the left and before CAAGCAAGTTC, as reported by Charlier *et al.* [5]. The mutant

BoERVK APOB insert was not found in the sequences of HFc and, therefore, those DNA samples corresponded to cows free of the *CD* disease and with a wild-type homozygous genotype (*wt/wt*, **Fig. 2**).

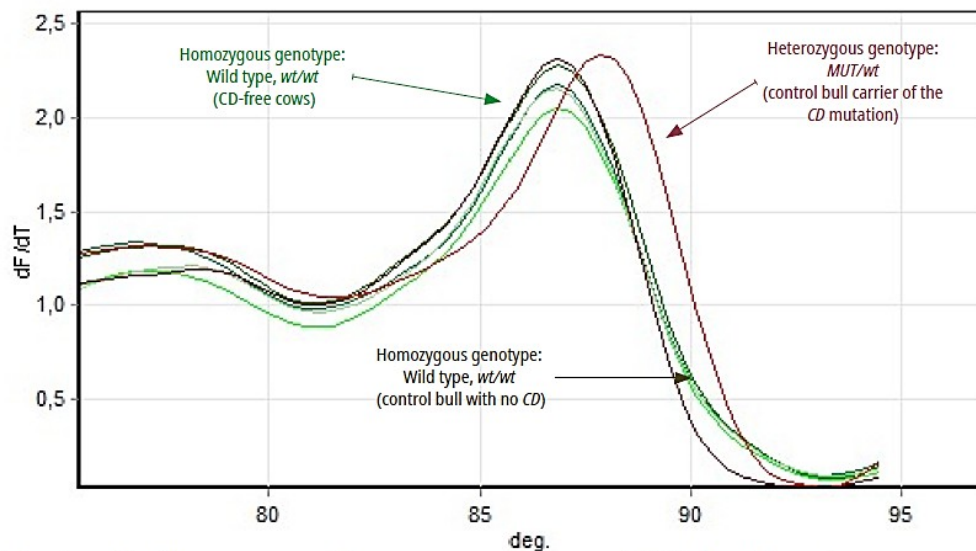


Figure 1. Negative derivative of the fluorescence melting curves at temperature ($-dF/dT$) for wild-type homozygous *wt/wt* and heterozygous *MUT/wt* genotypes. The graph shows the genetic materials of each genotype. Four homozygous *wt/wt* genotypes (four cows free of the disease -green curve-) were observed. Two controls were used, one heterozygous *MUT/wt* genotype (bull carrier of the *CD* mutation -red curve-) and one homozygous *wt/wt* genotype (bull free of the disease -black curve-).

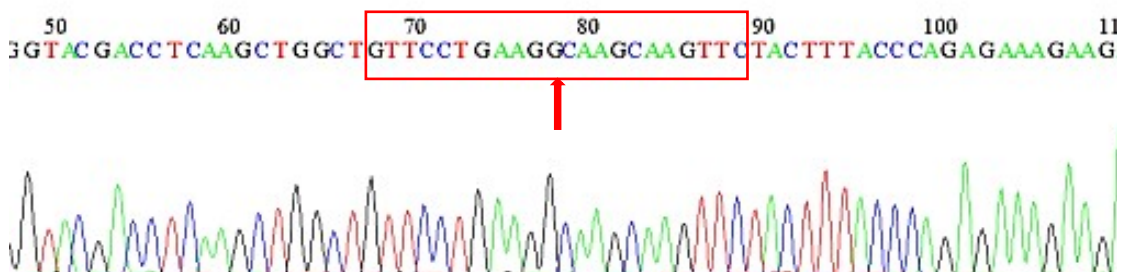


Figure 2. Electropherogram of the forward sequence (*APOB-UP1-F1*) of a *CD* disease-free cow showing the absent insertion start site.

Based on these results, no cows carrying the *CD* mutation were found in the six dairy farms sampled from different regions of Uruguay. However, as reported by Briano-Rodriguez *et al.* [2] a prevalence of 2.61% of *CD* carriers was found in a population sample of HF calves from different Regions of Uruguay. These results were similar to those observed for India (1.67%, [15]) and the USA (2.6%, [3]), but lower than those reported for other Countries. For example, in Germany, Kipp *et al.* [13] calculated the frequency of HF calves born homozygous for the *CD* haplotype in approximately 8.7% of 3,400 calves born each year. However, Kipp *et al.* [14] reported a maximum carrier frequency of 12.25% in the German livestock population in 2012, which was reduced to 7.87% in 2016 due to the genetic identification strategies applied. In another study in Germany, Schütz *et al.* [22] found 12.5% of carriers among HF bulls born between 2012 and 2015. Kamiński and Ruoeæ [12] reported a much higher *CD* carrier frequency (33.33%) in Polish HFc. In Chinese HFc, a carrier prevalence of 5.07 and 1.11% was found for bulls and cows, respectively [16]. Pozovnikova *et al.* [20] reported *CD* carrier frequencies in two groups of Russian HFc, where 23.26% were found in the offspring born between 2016 and 2019 of *CD* carrier cows, and 8.09% in the offspring born between 2010 and 2017 of *CD* carrier bulls.

Therefore, before taking mating decisions (to produce disease-free calves), it is recommended to perform strict monitoring and control by means of testing for the detection of the *CD* mutation, thus preventing the spread of this disease in Uruguayan dairy farms. It is also recommended the introduction of disease-free bulls into the HF genetic improvement and semen production programs.

In this study, real-time PCR-melting made possible the clear identification of two different genotypes, wild type homozygote *wt/wt*; and carrier *MUT/wt* (or *InDel_BoERVK_APOB*), for the *CD* mutation using *CD* disease-free controls and confirmed carriers for the *CD* disease mutation, validating the use of this technique for genotyping of Hfc.

5.6. CONCLUSIONS

The real-time PCR-melting analysis herein described provides an alternative approach for genotyping of mutant alleles in cattle. Real-time PCR testing with the melting application is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for the detection of the *BoERVK* mutant insert of the *APOB* gene, allowing the genotyping of great volumes of HFc for the *CD* disease.

5.7. ACKNOWLEDGMENTS

The results of this publication are part of the research funded by the National Agency for Research and Innovation of Uruguay (ANII) under code POS_NAC_2017_1_141239, the National Institute of Agricultural Research (INIA, Projects PL_27 N-23398 and BT_21 N-23330) and the Sectorial Commission for Scientific Research of the University of the Republic (CSIC-UdelaR). To the translation agency DNA Translations for the translation into English.

5.8. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] Ansevin, A.T.; Vizard, D.L.; Brown, B.W.; McConathy, J. High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransitions. **Biopolym.** 15:153-174. 1976.
- [2] Briano-Rodríguez, C.; Romero, A.; Llambí, S.; Branda-Sica, A.; Federici, M.; Giannitti, F.; Caffarena, D.; Schild, C.; Casaux, M.L.; Dutra, F. Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay. [Mutações letais e semi-letais em bezerros da raça Holandesa no Uruguai.] **Anim. Prod. Cien. Rural.** 51(7): e20200734. 2021. doi:org/10.1590/0103-8478cr20200734.
- [3] Cole, J.B.; Null, D.J.; VanRaden, P.M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. **J. Dairy Sci.** 99(9): 7274–88. 2016.
- [4] Charlier, C. The Role of Mobile Genetic Elements in the Bovine Genome. **Plant and Animal Genome Conference XXIV**, San Diego, CA, January 9-13, USA, Abstract W636. 2016. Online: <https://pag.confex.com/pag/xxiv/meetingapp.cgi/Paper/19428>. 15/03/2022.
- [5] Charlier, C.; Georges, M.; Harland, C.; Coppieters, W. Detecting cholesterol deficiency mutation in cattle. **European Patent Application N° EP 3 181697 A1**. European Patent Office. 19pp. 2017. Online: <https://patents.google.com/patent/EP3181697A1/en>. 15/03/2022.
- [6] Chien, A.; Edgar, D.B.; Trela, J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **J. Bacteriol.** 127(3): 1550–1557. 1976.

- [7] Green, M.R.; Sambrook, J. Agarose Gel Electrophoresis. Chapter 2. In: Green, M.R.; Sambrook, J. (Eds.) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Pp 94-99. 2012.
- [8] Gross, J.J.; Schwinn, A.C.; Schmitz-Hsu, F.; Barenco, A.; Neuenschwander, T.F.; Drögemüller, C.; Bruckmaier, R.M.; Gross, J.J.; Schwinn, A.C.; Schmitz-Hsu, F.; Barenco, A.; Neuenschwander, T.F.; Drögemüller, C.; Bruckmaier, R.M. The APOB loss-of-function mutation of Holstein dairy cattle does not cause a deficiency of cholesterol but decreases the capacity for cholesterol transport in circulation. **J. Dairy Sci.** 102:10564-10572. 2019. DOI: 10.3168/jds.2019-16852.
- [9] Gross, J.J.; Schwinn, A.C.; Schmitz-Hsu, F.; Menzi, F.; Drögemüller, C.; Albrecht, C.; Bruckmaier, R.M. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls. **J. Anim. Sci.** 94:1761-1766. 2016. DOI: 10.2527/jas.2016-0439.
- [10] Gundry, C.N.; Vandersteen, J.G.; Reed, G.H. Pryor, R.J.; Chen, J.; Wittwer, C.T. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clin. Chemistry.** 49:396-406. 2003.
- [11] Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98. 1999.
- [12] Kamiński, S.; Ruoeæ, A. Cholesterol Deficiency–new genetic defect transmitted to Polish Holstein-Friesian cattle. **Polish J. Vet. Sci.** 19(4): 885–87. 2016.
- [13] Kipp, S.; Segelke, D.; Schierenbeck, S.; Reinhardt, F.; Reents, R.; Wurmser, C.; Pausch, H.; Fries, R.; Thaller, G.; Tetens, J.; Pott, J.;

- Piechotta, M.; Grünberg, W. A new Holstein haplotype affecting calf survival. **Interbull Annual Meet.** 49:49–53. 2015.
- [14] Kipp, S.; Segelke, D.; Schierenbeck, S.; Reinhardt, F.; Reents, R.; Wurmser, C.; Pausch, H.; Fries, R.; Thaller, G.; Tetens, J.; Pott, J.; Haas, D.; Raddatz, B.B.; Hewicker-Trautwein, M.; Proios, I.; Schmicke, M.; Grünberg, W. Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and increased juvenile mortality in Holstein cattle. **J. Dairy Sci.** 99:8915-8931. 2016. DOI: 10.3168/jds.2016-11118.
- [15] Kumar, A.; Gupta, I.D.; Kumar, S.; Vineeth, M.R; Kumar, D.; Mohan, G.; Jayakumar, S.; Kumar-Niranjana, S. First report of cholesterol deficiency associated APOB mutation causing calf mortality in Indian Holstein Friesian population. **Indian J. Anim. Sci.** 91(2):148-150. 2021.
- [16] Li, Y.; Fang, L.; Liu, L.; Zhang, S.; Ma, Z.; Sun, D. The cholesterol-deficiency associated mutation in APOB segregates at low frequency in Chinese Holstein cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 99(2): 332–35. 2018.
- [17] Menzi, F.; Besuchet-Schmutz, N.; Fragnière, M.; Hofstetter, S.; Jagannathan, V.; Mock, T.; Raemy, A.; Studer, E.; Mehinagic, K.; Regenscheit, N.; Meylan, M.; Schmitz-Hsu, F.; Drögemüller, C. A Transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. **Anim. Genet.** 47(2):253-257. 2016. doi: 10.1111/age.12410.
- [18] Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** 12:319-325. 1988.

- [19] ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS (OMIA). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2011. Online: <https://omia.org/OMIA001965/9913/>. 28/03/2022.
- [20] Pozovnikova, M.V.; Gladyr, E.A.; Romanenkova, O.S.; Vasileva, O.K.; Leibova, V.B.; Tyshchenko, V.I.; Dementeva, N.V. Screening of haplotype for cholesterol deficiency genetic defect in the Russian Holstein cattle population. **Pol. J. Vet. Sci.** 23(2):313-315. 2020. doi: 10.24425/pjvs.2020.133647. PMID: 32627987.
- [21] Saleem, S.; Heuer, C.; Sun, C.; Kendall, D.; Moreno, J.; Vishwanath, R. Technical Note: The role of circulating low-density lipoprotein levels as a phenotypic marker for Holstein cholesterol deficiency in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 99(7):5545-5550. 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10805.
- [22] Schütz, E.; Wehrhahn, C.; Wanjek, M.; Bortfeld, R.; Wemheuer, W.E.; Beck, J.; Brenig, B. The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TFB1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. **PLoS One** 11(6): e0154602. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154602.
- [23] VanRaden, P.; Null, D. Holstein haplotype for cholesterol deficiency (HCD). 2015. Online: https://queries.uscdcb.com/reference/changes/HCD_inheritance.pdf. 29/03/2022.
- [24] White, H; Potts, G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). 2006. National Genetics Reference Laboratory. Wessex. On Line: <http://www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm>. 29/03/2022.

6. **MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES MONOGÉNICAS EN BOVINOS HOLANDO**

Lic. Biol. MSc. Andrea Branda Sica¹, Dra. Lic. Biol. MSc. María Teresa Federici¹, Dra. M. Vet. MSc. Carolina Briano², Dr. M. Vet. MSc. Fernando Dutra², Dr. M. Vet. MSc. Rody Artigas³, Lic. Biol. PhD. Paula Nicolini⁴, Dr. M. Vet. PhD. Darío Caffarena⁵, Dr. M. Vet. Federico Giannitti⁵, Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza¹, Dra. M. Vet. PhD. Silvia Llambí³

¹Unidad de Biotecnología - INIA

²División Laboratorios Veterinarios, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres - MGAP

³Instituto de Producción Animal y Salud de Sistemas Productivos, Unidad de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria - Udelar

⁴Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular - Udelar

⁵Plataforma de Investigación en Salud Animal - INIA

Artículo publicado en la Revista INIA Uruguay en la sección de Biotecnología. Dicha revista es una publicación trimestral de distribución gratuita del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

Citación del artículo y enlaces de acceso:

BRANDA-SICA, A.; FEDERICI, M.; BRIANO, C.; DUTRA, F.; ARTIGAS, R.; NICOLINI, P.; CAFFARENA, D.; GIANNITTI, F.; DALLA RIZZA, M.; LLAMBÍ, S. Métodos de diagnóstico genético-molecular para identificar enfermedades

monogénicas en bovinos Holando. *Biotecnología*. Revista INIA Uruguay, Junio 2022, no.69, p.47-50. (Revista INIA; 69).

PDF:

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/Revista-INIA-69-Junio-2022-12.pdf>

Ficha del artículo:

<http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacionAINFO-63384.aspx>

6.1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético consiste en analizar el material genético (ADN) obtenido de una muestra del bovino (sangre, semen y otros) con el fin de detectar las variantes de secuencia del ADN asociadas a una enfermedad. El ADN está conformado por un código de 4 letras: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) que lleva toda la información que el organismo necesita para su desarrollo. Se encuentra repartido en los diferentes cromosomas e incluye a los genes y secuencias asociadas, que son necesarios para el desarrollo y diferenciación celular de los órganos y tejidos, así como para su correcto funcionamiento. El genoma de un mamífero tiene varios miles de millones de bases y contiene alrededor de 30 mil genes.

En genética veterinaria se denominan mutaciones patogénicas a las variantes de secuencia que causan enfermedad, las cuales generalmente se encuentran en una frecuencia con un rango del 1% al 3% en algunos rodeos. Hasta el día de hoy se han identificado genes responsables de 192 enfermedades monogénicas con mutaciones conocidas en bovinos de todas las razas (OMIA, <https://www.omia.org/home/>). Las enfermedades hereditarias conocidas en bovinos son en la mayoría causadas por un solo gen autosómico recesivo (monogénico). Tienen un origen genético específico

de la raza y se transmiten de sus progenitores heterocigotas portadores a su descendencia. Cuando apareamos un toro padre (portador) con un vientre o vaquillona (portadoras), es decir ambos portadores (heterocigotas para la enfermedad o mutación), se obtiene una progenie con el siguiente resultado promedio: un 25% con el defecto genético (homocigota recesivo o afectado), un 50% serán "portadores nuevos" y un 25% estará libre del gen recesivo.

Las metodologías que se utilizan para el diagnóstico genético son muy variadas, permitiendo desde el estudio de cromosomas hasta el análisis del cambio de una o más bases nucleotídicas de la secuencia de ADN. Para las enfermedades monogénicas el diagnóstico genético-molecular se puede realizar mediante dos aproximaciones: 1) análisis directo, y 2) análisis indirecto.

1.- Análisis directo: Tiene por objetivo identificar o descartar una mutación patogénica en un determinado gen. Se basa en el análisis específico de la secuencia de nucleótidos de un gen para determinar si es normal o mutada. Existen dos tipos de análisis directo: 1) confirmación de una variante de secuencia conocida (genotipado), y 2) análisis completo de la secuencia codificadora de un gen (secuenciación).

2.- Análisis indirecto: Dentro de este, el análisis de ligamiento, que fue el primer tipo de diagnóstico genético-molecular, es ampliamente usado para el estudio de las enfermedades hereditarias. Se trata de un estudio genético familiar que se basa en el análisis de los haplotipos y marcadores genéticos (por ejemplo, microsatélites). Solo se aplica a los casos de familias con diagnóstico clínico certero de la enfermedad.

6.2. APLICACIONES DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR

Las principales aplicaciones clínicas de diagnóstico genético-molecular que se han optimizado en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología de INIA junto con el equipo de la Unidad de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria y DILAVE Treinta y Tres son:

- 1.- el diagnóstico presintomático mediante PCR con análisis de restricción de los fragmentos de longitud polimórfica (*PCR-RFLPs*), PCR en tiempo real con análisis de las curvas de fusión (*PCR-Melting*) y con la aplicación de curvas de alta resolución (*PCR-HRM*) y confirmación mediante secuenciación para detectar las diferentes mutaciones que causan enfermedades monogénicas en bovinos Holando;
- 2.- la confirmación diagnóstica para casos sospechosos; y
- 3.- el estudio de los portadores para descartar el riesgo de tener descendencia afectada por alguna enfermedad hereditaria.

El objetivo de este artículo es informar y resaltar la importancia del diseño de estrategias de diagnóstico genético-molecular de las enfermedades hereditarias en nuestro país con resultados inmediatos, así como también ayudar a los criadores y productores lecheros a erradicar los animales portadores. En un reporte reciente de nuestro grupo de trabajo (Briano *et al.*, 2021) se detectó la presencia del alelo mutante de las principales enfermedades monogénicas en una muestra poblacional de terneros Holando utilizando un panel de genotipado comercial disponible a nivel internacional (*GeneSeek® Genomic Profiler™ Bovine 50K BeadChip*).

Cuadro 1 - Principales enfermedades monogénicas y prevalencia de portadores en bovinos Holando.

ENFERMEDAD MONOGENICA	ABREVIATURA	ID OMIA	MODO DE HERENCIA	ANCESTRO COMÚN	GEN/ CROMOSOMA	TIPO DE MUTACIÓN	SÍNTOMAS CLÍNICOS	SIMBOLOGÍA EN CATÁLOGOS	EXISTENCIA DE ENFERMEDAD EN URUGUAY (PREVALENCIA DE PORTADORES, %) ¹	MÉTODO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR
Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina	BLAD	000595-9913	autosómica recesiva	<i>Osbornadal e Ivanhoe</i>	ITGB2 (<i>Integrin Beta 2</i> , también llamado CD18). BTA1	puntual, cambio de Adenina a Guanina [A/G] (Shuster et al., 1992)	Bajas defensas inmunitarias. Fiebre alta. Diarrea crónica. Enteritis. Neumonías. Gingivitis. Infecciones bacterianas recurrentes. Mueren a los 2-8 meses de nacidos.	BL: Portador; TL: Libre de enfermedad	SI (1.04%) ¹	PCR-RFLPs; PCR-HRM; Secuenciación (Brandasica et al., 2016; 2018; Federici et al., 2018)
Malformación Vertebral Compleja	CVM	001340-9913	autosómica recesiva	<i>Carlin-M Ivanhoe, Penstate Ivanhoe</i>	SLC35A3(<i>Solute Carrier Family 35 (UDP-N-acetylglucosamin e transporter), member 3</i>). BTA3	puntual, transición de Guanina por Timina [G/T] (Thomsen et al. 2006).	Malformación vertebral y de extremidades. Retraso en crecimiento. Artrogriposis. Malformación del trato digestivo y corazón. Abortos y nacimientos prematuros.	CV: Portador; TV: Libre de enfermedad	SI (2.09%) ¹	PCR-HRM; PCR-Melting; Secuenciación (Brandasica et al., 2019)
Deficiencia de Colesterol	CD	001965-9913	autosómica codominante	<i>Maughlin Storm</i>	APOB (<i>Apolipoprotein B</i>). BTA11	Inserción de ~ 7kb (BoERVK_LTR_APOB) (Charlier et al., 2017)	Hipocolesterolemia. Acumulación lipídica en vacas portadoras. Mueren dentro de 3 semanas a 6 meses de vida.		SI (2.61%) ¹	PCR-Melting; Secuenciación (Brandasica et al., 2022)
Deficiencia de Uridina Monofosfato Sintasa	DUMPS	000262-9913	autosómica recesiva	<i>Happy Herd Beautician</i>	UMPS (<i>Uridine Monophosphate Synthetase</i>). BTA1	puntual,cambio de Citosina por Timina [C/T] (Schwenger et al. 1993).	Disminución de la fertilidad al aumentar la tasa de retorno al servicio por mortalidad embrionaria temprana. Disminución de la actividad de la enzima uridina monofosfato sintasa que lleva a la muerte embrionaria en los primeros dos meses de gestación.	DP: Portador; TD: Libre de enfermedad	NO	PCR-RFLPs; PCR-HRM (Brandasica et al., 2018; Federici et al., 2018)
Citrulinemia	CT	000194-9913	autosómica recesiva	<i>Linmarkr Kriss King</i>	ASS1 (<i>Argininosuccinat e Synthase 1</i>). BTA11	puntual,cambio de Citosina por Timina [C/T] (Dennis et al. 1989).	Altos niveles de amonio en el cerebro y depresión del sistema nervioso. Mueren a las 1-2 semanas de nacidos.	CN: Portador; TC: Libre de enfermedad	NO	PCR-RFLPs, PCR-HRM; Secuenciación (Brandasica et al., 2016; 2018)
Braquiespina	BS	000151-9913	autosómica recesiva	<i>Sweet Haven Tradition, Bis-May Tradition Cleitus, Rothrock Tradition Leadman</i>	FANCI (<i>Fanconi anemia complementation group I</i>). BTA21	delección de 3,3 Kb (Charlier et al., 2012).	Nacimiento de terneros muertos con marcadas malformaciones: retraso del crecimiento, braquignatismo inferior, acortamiento de la columna y miembros desproporcionadamente largos.	BY o HH0: Portador; TY: Libre de enfermedad	SI (3.39%) ¹	PCR punto final; PCR-Melting (Artigas et al., 2020; Federici et al., 2021)
Aborto debido a Haplotipo Holando 1	HH1	000001-9913	autosómica recesiva	<i>Pawnee Farm Arlinda Chief (Chief)</i>	APAF1 (<i>apoptotic protease activating factor 1</i>). BTA5	puntual, transición de Citosina por Timina [C/T] (Adams et al., 2016)	Desarrollo embrionario incompleto. Aborto espontáneo en el 1° trimestre. Fertilidad reducida en portadores.		SI (4.44%) ¹	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 3	HH3	001824-9913	autosómica recesiva	<i>Glendell Arlinda Chief, Gray View Skyline, Oman</i>	SMC2 (<i>Structural Maintenance of Chromosomes 2</i>). BTA8	puntual, transición de Timina por Citosina [T/C] (McClure et al., 2014)	Aborto en el día 60 de gestación. Problemas de producción de leche en vacas portadoras.		SI (3.13%) ¹	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 4	HH4	001826-9913	autosómica recesiva	<i>Besne Buck</i>	GART (<i>glycinamide ribonucleotide transformylase</i>). BTA1	puntual, transición de Adenina por Citosina [A/C] (Fritz et al., 2013)	Aborto en el 1° mes de gestación. Reducción de la tasa de parto en vacas portadoras.		SI (1.04%) ¹	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo 5	HH5	001941-9913	autosómica recesiva	<i>Thornlea Texal Supreme</i>	TFB1M (<i>transcription factor B1 mitochondrial</i>). BTA9	delección de 138 Kb (Schütz et al., 2016)	Muerte fetal. Reducción de la tasa de fertilidad en portadores.		SI (0.26%) ¹	En desarrollo

¹Briano et al., 2021

En el **Cuadro 1**, se describen brevemente las principales enfermedades monogénicas y la prevalencia de portadores en bovinos Holando, identificadas por esa metodología. En base a las enfermedades detectadas, se trabajó para poner a punto localmente técnicas de diagnóstico genético-molecular que permiten detectar los animales portadores, así como también confirmar el diagnóstico en los animales afectados por estas enfermedades. A medida que la realidad así lo requiera, se irán incorporando nuevas técnicas, por ejemplo, para el caso de los haplotipos asociados con abortos.

6.3. **CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

Las enfermedades monogénicas hereditarias descritas se deben a genes recesivos y solo se expresan en los animales que son homocigotas recesivos con la posibilidad de reconocerlos clínicamente o por diagnóstico genético-molecular. Muchos de estos defectos genéticos son letales al nacer, o a los pocos días o meses del nacimiento, por lo cual en la mayoría de los casos no son identificados. También existe la posibilidad de reconocerlos mediante estudios de probabilidades, si se conociera su genealogía y se supiera que algunos de sus ancestros fueron portadores (o heterocigotas) para la enfermedad. Si usamos estudios de probabilidades, se espera que el animal sea libre de la mutación basada en la información del pedigrí. Sin embargo, si no está testeado mediante diagnóstico genético-molecular, no puede garantizarse que un animal tenga estatus de "libre" de enfermedades. La identificación de animales portadores de enfermedades hereditarias es importante, porque ocasionan impactos negativos en las poblaciones de bovinos Holando a nivel mundial, tanto por los abortos, las pérdidas directas por muertes de terneros, el aumento de los costos de tratamiento médico,

así como por las dificultades que se generan al no obtener suficientes terneras para realizar una reposición adecuada de las vacas.

Por tanto, se recomienda realizar un estricto seguimiento y control para evitar la propagación del alelo mutante mediante la aplicación del diagnóstico genético-molecular para identificar con precisión animales portadores de mutaciones asociadas antes de tomar decisiones en los apareamientos (para producir terneros/as libres de la enfermedad), e introducir toros en los programas de mejora genética y producción de semen bovino Holando.

6.4. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS (OMIA). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2011. En línea: <https://www.omia.org/home/>

7. IDENTIFICATION OF ALLELIC VARIANTS ASSOCIATED WITH HEREDITARY DISEASES THAT AFFECT THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF DAIRY CATTLE IN URUGUAY

Andrea Branda-Sica^{1*}, Rody Artigas², Elena de Torres³, Evangelina Kinley³, Mariana Ramírez², Paula Nicolini⁴, María Teresa Federici¹, Federico Giannitti⁵, Silva Llambí²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Canelones, Uruguay. *Corresponding author: abranda@inia.org.uy.

²Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Veterinaria, Unidad Académica de Genética y Mejora Animal, Montevideo, Uruguay.

³Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Veterinaria, Campo Experimental N°2, Libertad-San José, Uruguay.

⁴Universidad de la República (UdelaR), Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular, Tacuarembó, Uruguay.

⁵Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma Nacional de Investigación de Salud Animal, Colonia, Uruguay.

Artículo enviado a la Revista *Chilean Journal of Agricultural Research* (<https://www.chileanjar.cl/>). Dicha revista es la revista científica del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Ministerio de Agricultura, Chile. Se publica trimestralmente en inglés (marzo, junio, setiembre y diciembre). Está indexado en Science Citation Index Expanded de Clarivate Analytics (ex ISI), SCOPUS, SciELO y otros.

7.1. SUMMARY

Most dairy cattle breeds originate from a few founder animals and, as a consequence, show an average generational inbreeding rate of 1% which favors the occurrence of recessive defects associated with low reproductive efficiency. The objectives of the study were: (a) to identify bulls carrying the HH1, HH3 and HH4 haplotypes by análisis of the 2021 Holstein Friesian sire catalog (n=3,028); and (b) to determine the presence of allelic variants of these mentioned haplotypes, as well as JH1 and CVM with the GeneTitan® 2,500 SNP bovine chip, estimate their frequencies and evaluate their impact on the fertility of Holland cows and Holland-Jersey crosses belonging to a experimental dairy (n=170). From a total of 1,468 (48.5%) bulls with genetic information from the sire catalog for the HH1 haplotype and 1,471 (48.6%) bulls for HH3 and HH4, we found 90 (6.1%) carriers for HH1, 60 (4.1%) for HH3 and 6 (0.4%) for HH4, respectively. By genotyping with the chip, we calculated the herd frequency of the mutant alleles and prevalence of heterozygotes for HH1 and CVM as $q=0.003$ and 0.022 ; 0.59% and 4.3% (call rate >0.99), respectively. No mutant alleles were found for HH3, HH4 and JH1 in the analyzed population. We examined reproductive data by observing the presence of CVM and HH1 mutant alleles in repeat cows with an average of 4 service to achieve pregnancy. The presence of mutant alleles in carrier animals demonstrates the need to implement strategies to eliminate the defect from the population.

Keywords:

Artificial insemination, *Bos taurus*, fertility, hereditary diseases.

7.2. RESUMEN

La mayoría de las razas de ganado lechero se ha formado a partir de pocos animales fundadores y, como consecuencia, muestran una tasa de endogamia generacional promedio de 1% que favorece el surgimiento de los defectos hereditarios asociados con baja eficiencia reproductiva. Los objetivos del estudio fueron: (a) identificar toros portadores de los haplotipos: HH1, HH3 y HH4 mediante análisis del catálogo de padres Holando 2021 (n=3028); y (b) determinar la presencia de variantes alélicas de estos haplotipos mencionados, JH1 y CVM con el chip bovino GeneTitan® de 2500 SNP, estimar sus frecuencias y evaluar su impacto en la fertilidad de las vacas Holando y cruza Holando con Jersey pertenecientes a un tambo experimental (n=170). De un total de 1468 (48.5%) toros con información genética del catálogo de padres para el haplotipo HH1 y de 1471 (48.6%) toros para HH3 y HH4, se encontraron 90 (6.1%) portadores para HH1, 60 (4.1%) para HH3 y 6 (0.4%) para HH4, respectivamente. Mediante genotipado con el chip se determinaron las frecuencias prediales de los alelos mutantes y las prevalencias de vacas heterocigotas para HH1 y CVM que fueron de $q=0.003$ y 0.022 ; de 0.59% y 4.3% (call rate >0.99), respectivamente. No se encontraron alelos mutantes para HH3, HH4 y JH1 en la población analizada. Se evaluaron los datos reproductivos observándose la presencia de alelos mutantes de CVM y HH1 en vacas con un promedio de 4 repeticiones del servicio para lograr la preñez. La presencia de alelos mutantes en animales portadores evidencia la necesidad de implementar estrategias para eliminar el defecto de la población.

Palabras clave:

Bos taurus, enfermedades hereditarias, fertilidad, inseminación artificial

7.3. INTRODUCTION

Most dairy cattle breeds originate from a small number of founder animals through artificial insemination with a strong selection for a few productive traits (Fritz et al., 2013; Liebig et al., 2022). Consequently, these breeds shows an average generational inbreeding rate of 1% that favors the appearance of recessive defects responsible for embryonic, fetal, and perinatal mortality, because it increases homozygosity levels (VanRaden et al., 2011b; Fritz et al., 2013).

The implementation of routine genotyping hundreds of thousands of animals within popular US dairy breeds using single nucleotide polymorphism (SNP) chips has provided comprehensive genomic data for all current breeding populations (VanRaden et al., 2011b; Howard et al., 2017). VanRaden et al. (2011b) were the first to propose examining this type of data to identify genomic regions in homozygosity-deficient animals. In their work, they identified and listed five haplotypes out of 11 candidates with detrimental effects on fetal development which could lead to miscarriage and fetal death in three dairy cattle breeds: Holstein Friesian (HH1, HH3, and HH4), Jersey (JH1), and Brown Swiss (BH1). After two years, other new lethal haplotypes were reported in Holstein Friesian cattle, and in the meantime, some were solved at the molecular level, such as HH1 (*APAF1*, Adams et al., 2016), HH3 (*SMC2*, Daetwyler et al., 2014, McClure et al., 2014), HH4 (*GART*, Fritz et al., 2013) and HH5 (*TFB1M*, Schütz et al., 2016). Sonstegard et al. (2013) identified the mutation in the *CWC15* gene that is associated with the JH1 haplotype and impacts reproduction in Jersey cattle. Recently, Häfliger et al. (2022) updated the SNP positions from the new *Bos*

taurus genome version *ARS-UCD1.2* (NCBI, *ARS-UCD1.2* assembly, 2018; Rosen et al., 2020) in the genomic regions of the haplotypes previously identified by other authors.

For all bovine breeds, 54 haplotypes with homozygous deficits have been reported; in 25 of them, the mutations associated with the responsible genes have been identified (OMIA, 2022; updated on July 29, 2022). In the Holstein Friesian breed, 11 haplotypes have been identified, where these mutations have been observed to affect the pregnancy rate and produce an increase in stillbirths and spontaneous miscarriages that aggravate the already critical situation of fertility loss (VanRaden et al., 2011b; Fritz et al., 2013; McClure et al., 2014; Adams et al., 2016; Schütz et al., 2016; Fritz et al., 2018; Hozé et al., 2020; Häfliger et al., 2022).

Given the economic importance to produce offspring for the selection of breeders and generate genetic influence of the resulting cows, the main objectives of this study were: (a) identify bulls with genetic information for the haplotypes HH1, HH3, and HH4, which are associated with low reproductive efficiency by analyzing the 2021 Holstein Friesian sire catalog; and (b) to determine the presence of the mutant alleles of these haplotypes, as well as JH1 and CVM, with the GeneTitan® 2,500 SNP bovine chip of Affymetrix platform, and to calculate their frequencies and evaluate their impact on fertility in Holstein Friesian cows and Holstein Friesian-Jersey crosses from a dairy farm of the experimental field N°2 of the Veterinary Faculty of the "Universidad de la República" (Libertad, San José, Uruguay).

7.4. MATERIALS AND METHODS

7.4.1. **Analysis of the 2021 Holstein Friesian sires' catalog**

We analyzed the records of 3,028 national and imported Holstein Friesian bulls, born between 1964 and 2016, from the 2021 updated sire catalog published by "Evaluaciones Genéticas Lecheras", available at www.geneticalechera.com.uy. Each record was evaluated using the following national and international databases: (a) *ABS Global*: <https://absbullsearch.absglobal.com/>; (b) *DairyNZ*: <https://www.dairynz.co.nz/animal/animal-evaluation/bull-team/>; and (c) "Evaluaciones Genéticas Lecheras" (Uruguay).

7.4.2. **Sampling and genetic material**

DNA from the 170 Holstein Friesian cows and Holstein Friesian-Jersey crosses was extracted from blood using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) following manufacturer's specifications. DNA concentration, quality and purity were assessed with Quant-iT™ PicoGreen at 260 nm (Thermo Scientific, USA), considering an OD260/OD280 ratio between 1.8 and 2.0, and an OD260/OD230 greater than 1.5.

7.4.3. **Genetic analysis of genomic data with the GeneTitan® bovine chip**

These DNA samples were genotyped at "Genexa ADN Evolutivo" (Montevideo, Uruguay) with the 2,500 SNP GeneTitan® bovine chip, with Axiom Microarray Genotyping Technology platform from Affymetrix. With

these DNA samples, Axiom technology was fine-tuned using the *Bos taurus* reference genome sequence version, *ARS-UCD1.2* (NCBI, UCSC *bosTau9* version, *ARS-UCD1.2* assembly, 2018; Rosen et al., 2020; Häfliger et al., 2022), which is more accurate and has been unified for more effortless transfer and interpretation of results. The Affymetrix platform consists of small DNA molecules attached to fixed locations on the chip, which recognize the specific alleles of an SNP. The different alleles or nucleotides are detected by differential hybridization of the DNA sample. In order to identify those Holstein Friesian cows and Holstein Friesian-Jersey crosses carriers of the hereditary diseases: HH1 (rs448942533), HH3 (rs456206907), HH4 (rs465495560), JH1 (rs1115118696), and CVM (rs438228855), we classified as carriers those genotypes with a call rate greater than 99 %, thus ensuring the high quality of the genomic data of the analyzed population. Allelic and genotypic frequencies were calculated by direct counting according to the method of Nei (1987).

7.4.4. Analysis of reproductive data

We analyzed reproductive data for Holstein Friesian and Holstein Friesian-Jersey crossbred cows carrying the allelic variants previously identified by genotyping with the GeneTitan® bovine chip. These cows have had conventional reproductive management with predominant artificial insemination, gestation diagnosis no later than 70 days post-insemination, and no hormonal treatments during the experimental period. Data was provided through the dairy of the experimental field N°2 of the Veterinary Faculty.

7.5. RESULTS

7.5.1. Analysis of the 2021 Holstein Friesian sires' catalog

We analyzed the Holstein Friesian sire catalog of the genetic evaluations updated to 2021, observing that 87.12% (n=2,638) of the genetic contribution came mainly from the United States, Canada, and Uruguay for haplotypes HH1 (**Table 1**), HH3 (**Table 2**), and HH4 (**Table 3**). Of the 3,028 bulls analyzed, only 48.5% (n=1,468) had a recorded genetic test for the HH1 haplotype (**Table 1**), and another 48.6% (n=1,471) for the HH3 (**Table 2**) and HH4 (**Table 3**) haplotypes. Of these, 6.1% (n=90) were carriers for haplotype HH1 (HH1C) from the United States, Canada, the Netherlands, and Italy; 4.1% (n=60) for HH3 (HH3C) from the United States, Canada; the Netherlands, Italy, and other countries; and 0.4% (n=6) for HH4 (HH4C) from the Netherlands and other countries. When evaluating the progeny of HH1C bulls for dairy production in Uruguay, we observed there were 10,788 daughters included in the national genetic evaluation system (**Table 1**). We also observed them for HH3C and HH4C bulls, with 6,317 (**Table 2**) and 573 daughters (**Table 3**), respectively.

Table 1. Genetic status for the HH1 haplotype of bulls used as sires in Uruguayan dairy genetic evaluation systems until 2021 according to country of origin.

Country	Total bulls (n)	N/D bulls* (n)	Genetic test (% , n)	HH1T ^a (n)	HH1C ^b (n)	Offspring of HH1C bulls for milk production (n)
United States	1603	581	63.8 (1022)	960	62	6971
Canada	375	65	82.7 (310)	288	22	3632
Netherlands	93	55	40.9 (38)	33	5	169
Uruguay	660	657	0.5 (3)	3	0	0
Italy	29	6	79.3 (23)	22	1	16
New Zealand	126	122	3.8 (4)	4	0	0
Other ^c	142	74	47.9 (68)	68	0	0
Total	3028	1560	48.5 (1468)	1378	90	10788

^aOther: Argentina, Australia, Belgium, Denmark, France, Germany, Italy, Poland, Spain, Sweden, United Kingdom, and United States. ^bND: No data. ^cDisease-free individuals. ^dCarrier individuals.

Table 2. Genetic status for the HH3 haplotype of bulls used as sires in Uruguayan dairy genetic evaluation systems until 2021 according to country of origin.

Country	Total bulls (n)	N/D bulls ⁻ (n)	Genetic test (% ^a , n)	HH3T ^a (n)	HH3C ^b (n)	Offspring of HH3C bulls for milk production (n)
United States	1601	580	63.8 (1021)	967	54	5935
Canada	377	64	83 (313)	311	2	146
Netherlands	93	55	40.9 (38)	37	1	38
Italy	29	6	79.3 (23)	22	1	48
Uruguay	660	657	0.5 (3)	3	0	0
New Zealand	126	122	3.2 (4)	4	0	0
Other ^c	142	73	12 (69)	67	2	150
Total	3028	1557	48.6 (1471)	1411	60	6317

^aOther: Argentina, Australia, Belgium, Denmark, France, Germany, Italy, Poland, Spain, Sweden, United Kingdom, and United States. ^bSD: ^c**ND: No data. ^aDisease-free individuals. ^bCarrier individuals.

Table 3. Genetic status for the HH4 haplotype of bulls used as sires in Uruguayan dairy genetic evaluation systems until 2021 according to country of origin.

Country	Total bulls (n)	N/D bulls ^a (n)	Genetic test (% , n)	HH4T ^b (n)	HH4C ^b (n)	Offspring of HH4C bulls for milk production (n)
United States	1601	580	63.8 (1021)	1021	0	0
Canada	377	64	83 (313)	313	0	0
Netherlands	93	55	40.9 (38)	37	1	86
Italy	29	6	79.3 (23)	23	0	0
Uruguay	660	657	0.5 (3)	3	0	0
New Zealand	126	122	3.2 (4)	4	0	0
Other ^c	142	73	12 (69)	64	5	487
Total	3028	1557	48.6 (1471)	1465	6	573

^aOther: Argentina, Australia, Belgium, Denmark, France, Germany, Italy, Poland, Spain, Sweden, United Kingdom, and United States. ^bSD: ^cND: No data. ^dDisease-free individuals. ^eCarrier individuals.

7.5.2. Genotyping with the GeneTitan® bovine chip

Genotyping detected the following variants: for HH1 in a single Holstein Friesian-Jersey cross cow; and CVM in 7 Holstein Friesian cows in a total of 170 genotyped cows (call rate >0.99) (**Table 4**).

The frequency of the mutant allele for HH1 in the population analyzed was low, $q=0.003$; and the prevalence of carriers was 0.59% (call rate >0.99). For CVM, it was $q=0.022$ and 4.3% (call rate >0.99). No mutant alleles were found for HH3, HH4, and JH1 in the analyzed population.

Table 4. Number of individuals genotyped free and carriers of lethal hereditary diseases using the GeneTitan® bovine chip; the genes associated with their identification in NCBI, and their location in the genome.

Hereditary lethal disease (OMIA ID and variant) ¹	Gen (dbSNP) ²	Chromosome: Genomic location ³	Number of genotyped individuals (call rate > 0.99)	Number of individuals for each genotype	
				Non-carriers	Carriers
HH1 (000001-9913; 286)	APAF1 (rs448942533)	5: g.62810245C>T	170	169	1
HH3 (001824-9913; 211)	SMC2 (rs456206907)	8: g.93753358T>C	169	169	0
HH4 (001826-9913; 182)	GART (rs465495560)	1: g.1997582A>C	170	170	0
JH1 (001697-9913; 287)	CWC15 (rs1115118696)	15: g.15449431C>T	170	170	0
CVM (001340-9913; 187)	SLC35A3 (rs438228855)	3: g.43261945C>A	170	163	7

¹OMIA: *Online Mendelian Inheritance in Animals*, <https://www.omia.org/home/>, updated on 06/21/2022. HH1: Holstein Friesian-Haplotype with homozygous deficit 1; HH3: Holstein Friesian-Haplotype with homozygous deficit 3; HH4: Holstein Friesian-Haplotype with homozygous deficit 4; Jersey-Haplotype with homozygous deficit 1; CVM: Complex vertebral malformation. ²dbSNP: *National Center for Biotechnology Information*, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, updated on 06/21/2022. ³*National Center for Biotechnology Information*, NCBI, ARS-UCD1.2 assembly, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>, updated on 06/21/2022.

7.5.3. Analysis of reproductive data of cows carrying the associated mutations

We analyzed the reproductive data using the number of inseminations in cows carrying the mutations that had been genotyped with the GeneTitan® bovine chip. Two cows, CVM and HH1 carriers, gave birth to dead calves; these cows had an average of 4 service repeats to achieve pregnancy (**Table 5**).

Table 5. Number of service repeats and calving in cows carrying the associated mutations previously identified with the GeneTitan® bovine chip.

Cow ID	Breed	No. of calvings	Service repeat	Lethal hereditary disease (associated gene)	
97	Holstein Friesian	Multiparous (2015-2022)	6 calvings (2 stillbirths) In 2019 (4 services to get pregnant) In 2020 (4 services to get pregnant)	CVM (SLC35A3)	
636	Holstein Friesian	Multiparous (2019-2022)	4 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
531	Holstein Friesian	Multiparous (2017--2022)	4 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
724	Holstein Friesian	Multiparous (2019--2020)	4 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
830	Holstein Friesian	Multiparous (2020--2022)	2 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
32	Holstein Friesian	Multiparous (2018--2022)	3 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
311	Holstein Friesian	Multiparous (2015--2022)	8 calvings	No service repeat	CVM (SLC35A3)
605	Holstein Friesian-Jersey cross	Multiparous (2018--2022)	4 calvings (2 stillbirths) In 2019 (4 services to get pregnant)	HH1 (APAF1)	

7.6. DISCUSSION

The sire catalog of the dairy genetic evaluations includes bulls with at least one daughter included in the genetic evaluation system for the Holstein Friesian breed in Uruguay. After analysis of the catalog, it appears a strong component of genetic material mainly from the US and Canada (**Tables 1 and 2**); these had been already found in other investigations (Artigas et al., 2020) that showed a predominance of these countries, where presumably the founding mutations of the HH1 and HH3 haplotypes originated (VanRaden et al., 2011b; VanRaden et al., 2012; Fritz et al., 2013; Fritz et al., 2018; Häfliger et al., 2022). It has been noted that the HH4 mutation came from Europe (Fritz et al., 2013; Cole et al., 2016), as it was not found in the bulls from the US and Canada from the dairy genetic evaluation (**Table 3**).

After analyzing all the bulls with genetic information in the Holstein Friesian breed gene pool, we detected 90 animals carrying the HH1 haplotype (HH1C=6.1%), 60 carrying HH3 (HH3C=4.1%), and 6 carrying HH4 (HH4C=0.4%). The number of bulls carrying these haplotypes could be higher, given the low number of animals with genetic information available in public databases regarding their genetic status for the disease, including 99.5% of Uruguayan Holstein Friesian bulls (**Tables 1, 2, and 3**). A similar pattern was observed for brachyspina inherited disease (Artigas et al., 2020). The high proportion of bulls without molecular diagnostic test in the sire catalog can be explained by the fact that this analysis includes bulls before diagnostic tests for mutations in the *APAF1* (HH1), *SCM2* (HH3) and *GART* (HH4) genes were published (Fritz et al., 2013; McClure et al., 2014; Adams et al., 2016; Cole et al., 2016).

Bulls' carriers of the HH1C mutation from the 2021 sire' catalog contributed genetically to Holstein Friesian breed improvement programs, having many daughters (n=10,788) in national dairy genetic evaluation systems (**Table 1**). The same happened with the daughters of HH3C (n=6,317) and HH4C (n=573) bulls. Since the inheritance mechanism is autosomal recessive, we must assume that at least 50% of the daughters (n=5,394) were HH1C carriers, just as for HH3C (n=3,158) and HH4C (n=286), thus indicating the presence of the mutant alleles in the Uruguayan selection nucleus. Since all daughters (n=10,788 for HH1C; n=6,317 for HH3C; n=573 for HH4C) were evaluated for milk production traits, they left offspring at the national level.

Among the 26 HH1C bulls used in Uruguay, stand out O-BEE MANFRED JUSTICE (HOLUSAM000122358313), TESK HOLM VALIANT ROCKIE (HOLUSAM000001841366), LEMAX PAWNEE MEMORIAL (HOLUSAM000001765326), END-ROAD PVF BOLIVER (HOLUSAM000123586443) and MJR BLACKSTAR EMORY (HOLUSAM000002114601), direct descendants of WALKWAY CHIEF MARK (HOLUSAM000001773417), MILU BETTY IVANHOE CHIEF (HOLUSAM000001578139), S W D VALIANT (HOLUSAM000001650414) and PAWNEE FARM ARLINDA CHIEF (HOLUSAM000001427381), which are the main disseminators of the mutation in the *APAF1* (apoptotic peptidase activating factor) gene that blocks approximately one-third of the encoded protein (Larkin et al., 2012; VanRaden et al., 2012; Adams et al., 2016; Cole et al., 2016). A substitution of a thymine for a cytosine (c.1741C>T) characterizes this mutation (Adams et al., 2016). This mutation causes fetal and embryonic loss between 60 and 200 days of gestation and a reduced conception rate in cows; consequently, fertility is reduced in carrier bulls (Adams et al., 2016).

Of the HH3C bulls used in Uruguay, stands out ARLINDA MELWOOD (HOLUSAM000001879149), a direct descendant of GLENDELL ARLINDA CHIEF (HOLUSAM000001556373), another major disseminator of the *SMC2* mutation (McClure et al., 2014; Cole et al., 2016). This mutation in the *SMC2* (structural maintenance of chromosomes) gene is characterized by a thymine-to-cytosine substitution (*c.3404T>C*) in exon 24 (Daetwyler et al., 2014; McClure et al., 2014). Häfliger et al. (2022) updated the position of the SNP responsible for this mutation (rs45206907) on chromosome 8 (93,753,358) according to the new version of the reference genomic sequence assembly (NCBI, *ARS-UCD1.2* assembly, 2018). The *SMC2* gene plays an essential role in DNA repair, and chromosome condensation and segregation during cell division. This point mutation changes amino acid 1135 from phenylalanine to serine (F1135S) and alters the function of the NTPase domain of the encoded protein. Daetwyler et al. (2014) analyzed 1,000 bull genomes to identify the *SMC2* mutation, to which embryonic loss was ascribed as a negative effect.

Of the HH4C used in Uruguay, JOCKO BESN (HOLFRAM005694028588) is a son of BESNE BUCK (HOLFRAM004486041658) from Europe, from which he inherited the *GART* mutation (Fritz et al., 2013; Cole et al., 2016). The *GART* enzyme phosphoribosylglycinamide synthetase is required for purine nucleotide synthesis. The *GART* mutation is associated with decreased fertility and embryonic mortality in the first month of gestation (Fritz et al., 2013).

Bulls carrying haplotypes HH1 (*APAF1*), HH3 (*SMC2*), and HH4 (*GART*) have been used to produce offspring for the selection of sires to be used in artificial insemination, thus having a substantial genetic influence on the resulting cow population in the different dairy farms in Uruguay.

Although the mutations associated with haplotypes HH1 (*APAF1*), HH3 (SMC2), HH4 (*GART*), JH1 (*CWC15*), and CVM (*SLC35A3*) were identified 10 years ago, this study is the first report in Uruguay that evaluates reproductive data genomic data from genotyping with the GeneTitan® chip, which allowed a much more accurate imputation compared to that of other commercial chip brands. This technology permitted the detection of two mutations associated with the *APAF1* (HH1) and *SLC35A3* (CVM) genes, which affect fetal development and may cause miscarriage and fetal death in Holstein Friesian cows and Holstein Friesian-Jersey crosses (**Tables 4 and 5**). In the case of the *APAF1* (HH1) mutation, we obtained a herd prevalence (0.59%, with a call rate close to 100%. This value was low compared to that reported by Briano-Rodríguez et al. (2021) (4.4%), who performed genotyping with the commercial GeneSeek Genomic Profiler -GGP- Bovine 50K chip, with which they detected 16 Holstein Friesian calves carrying the *APAF1* (HH1) mutation in 8 dairy farms in Uruguay. Therefore, the *APAF1* (HH1) mutation is still dispersed in Uruguay's Holstein Friesian dairy herd. The prevalence of *APAF1* (HH1) carrier cows in Germany was similar to that of this study (1.8%, Schütz et al., 2016). In the USA, Holstein Friesian cows carrying the *APAF1* (HH1) mutation were found at a higher frequency of 4.5 and 2.25% (VanRaden et al., 2011b; Adams et al., 2016, respectively). Although it had been observed that between 1980 and 1990, the frequency of carrier cows was 0.08, with a subsequent decrease to approximately 0.03 in 2010 (VanRaden et al. 2011b). VanRaden et al. (2011a) determined the negative effect of this haplotype on reproduction, estimating an impact on conception rate of -0.35%, and evaluated the 60-day non-return rate (NR60), which was -1.1. It was estimated that this mutation caused more than 500,000 miscarriages and a loss of \$ 420 million to the dairy industry (Adams et al., 2016).

The *SLC35A3* (CVM) mutation was reported in the OMIA catalog (001340-9913), and has been studied in cattle of the Holstein Friesian breed since 2006 (Thomsen et al., 2006; Rusc and Kaminski, 2007; Meydan et al., 2010) and traced back to the elite North American sire CARLIN-M IVANHOE BELL (HOUSA000001667366), who received the lethal recessive mutation from his sire, PENSTATE IVANHOE STAR (HOUSA000001667366) (Chu et al., 2008). CVM disease is primarily caused by a defining mutation in the membrane transporter protein UDP-N-acetyl glucosamine of the *SLC35A3* gene (Thomsen et al., 2006), and results in the substitution of valine for phenylalanine (V180F) at position 180 (Rusc and Kaminski, 2007). Genotyping of the SNP responsible for this disease (rs438228855, located at position 43,261,945 of bovine chromosome 3) was performed with the GeneTitan® bovine chip. The genotyping was highly accurate and efficient, with a herd prevalence of carrier cows of 4.3% (with a call rate of 100%). This prevalence is intermediate compared to other reports made in Uruguay using other genotyping PCR-HRM/Melting methodologies (6.45%, Branda-Sica et al., 2019) and GeneSeek Genomic Profiler -GGP- Bovine 50K chip (2.09%, Briano-Rodriguez et al., 2021). Internationally, this study found that herd prevalence of CVM carriers was similar to that of cows in Turkey (3.4%, Meydan et al., 2010). Nevertheless, the prevalence was low when compared with other countries, such as Denmark (31.0%, Thomsen et al. 2006), Poland (24.8%, Rusc and Kaminski, 2007), Japan (13.0%, Ghanem et al., 2008). The reason for these differences may be due to the fact that there are samples from different populations, that is, cattle from different regions, although it may also be influenced by the use of semen from bulls' carriers of the mutation over time. Approximately since the turn of the century, most countries have developed improvement programs to decrease the frequency of CVM carriers in the cattle population (Rusc and Kaminski, 2007). Hence, in

some Holstein Friesian populations in Uruguay, the frequency of CVM carriers still seems to be high regarding the other autosomal recessive mutations.

Obtaining repeat breeder cows carriers of CVM and HH1 (**Table 5**) may be due to ovarian dysfunction (Ghanem et al., 2017). In a previous study, Ghanem et al. (2010) found that progesterone concentration tended to decrease during the estrous cycle in CVM carrier cows due to luteal dysfunctions, which could reduce the conception rate and increase the frequency of repeat cow syndrome. Due to the above reasons, Ghanem et al. (2017) studied fertility in *APAF1* mutation (HH1) carrier cows by measuring progesterone concentration in skim milk as a tool to indicate an ovarian function in cows, finding that progesterone concentrations did not differ significantly ($p=0.8$) between HH1 carrier and non-carrier cows at the first 45 days after artificial insemination. Therefore, it is necessary to carry out studies to quantify the economic losses in dairy farms with the presence of Holstein Friesian haplotypes, as well as to carry out pedigree and genotyping studies of animals as a tool to avoid mating between carriers of some of these haplotypes. It is necessary to know the effects of these haplotypes on reproductive performance characteristics to rule out if there are ovarian dysfunctions due to progesterone concentration in carrier cows or a decrease in conception rate. Progesterone measurement values should also be considered in statistical analyses to analyze any effects of mutations of these haplotypes of associations with miscarriages.

All cows validated in this study had a normal homozygous genotype for the diseases associated with haplotypes HH3 (*SMC2*), HH4 (*GART*), and JH1 (*CWC15*), with no mutant alleles identified in the population analyzed. However, some studies associated the lethal effects of HH3 (*SMC2*), HH4 (*GART*), and JH1 (*CWC15*) haplotypes with embryonic losses immediately

after conception, which are not phenotypically observable; nevertheless, the reduction of conception rate associated to these mutations occurs before 60 days, while embryonic losses associated to HH1 (*APAF1*) and CVM occur throughout the entire gestation (VanRaden et al., 2011a; VanRaden et al., 2012; Norman et al., 2012; Fritz et al., 2013). VanRaden et al. (2012) reported an HH3 heterozygous cows (*SMC2*) frequency of 4.7%, and a 60-day non-return rate (NR60) of -3.1% for this haplotype. Häfliger et al. (2022) detected a purely recessive embryonic lethal effect of this *SMC2* mutation that allows indirect detection in the non-return rate in Canadian Holstein Friesian heifers. In Germany, Schütz et al. (2016) detected HH3 and HH4 carriers with frequencies of 5.1 and 4%, respectively. Fritz et al. (2013) reported frequencies of 3.6% for this HH4 haplotype, which is associated with a loss in births in French Holstein Friesian cows, where they observed a reduction in calving rate of -5.8% in heifers and -1.74% in carrier cows when mated to carrier males and daughters of HH4 carrier males. In Uruguay, Briano-Rodriguez et al. (2021) found mutant alleles of HH3 (3.13%) and HH4 (1.04%) haplotypes in a population of Holstein Friesian calves born in 2016. Today, these calves would have become breeders with genetic information and should have been registered in the catalog of parents of the Dairy Genetic Evaluation of the Holstein Friesian breed. In any case, the female calves could have remained as replacements for the farm. For the Jersey breed, there are no reports on the presence of JH1 (*CWC15*) disease carriers in Uruguay. To avoid the spreading of this disease, it is recommended to perform an analysis of the few 90 records of domestic and imported Jersey bulls born between 1978 and 2012 (Dairy Genetic Evaluations, available at www.geneticalechera.com.uy, updated on July 2022) from the Jersey 2022 sires' catalog for the presence of the mutant allele. This disease was reported by US ARS-USDA scientists in 2013 (Sonstegard et al., 2013), and

its origin was traced to the elite North American bull OBSERVER CHOCOLATE SOLDIER (JERUSAM000000596832), born in 1962 (VanRaden et al., 2011a). This bull sired 1,454 daughters for milk production, and, as a consequence, its impact was further magnified with 107 sons and 715 grandsires used in artificial insemination to generate >50,000 granddaughters and >200,000 great-granddaughters. As a result, the frequency of JH1 heterozygotes experienced an initial rapid increase, remaining stable at 20 to 25% since 1980. VanRaden et al. (2004) examined 52,449 fertility records of JH1 heterozygous bulls mated to daughters of JH1 heterozygous bulls and found a conception success rate of 33.3% versus 37.0% for 290,373 recent matings of normal bulls to daughters of normal bulls. The reduction in conception rate of 3.7% confirmed JH1 as a recessive lethal disease, in rough agreement with the expected reduction of 4.6%. The conception success rate was 36.3% in 57,523 matings of heterozygous bulls to daughters of normal bulls, with a slight reduction of 0.7% potentially caused by heterozygous dams with JH1 maternal inheritance (Sonstegard et al., 2013).

7.7. CONCLUSIONS

The presence of mutant alleles in carrier animals demonstrates the needed implement strategies to eliminate the defect from the population. We recommend screening with low-density chips, such as the GeneTitan® bovine chip, in breeding cows and bulls, as a control for prevention and monitoring of mutant alleles due to the large amount of information provided by this chip; its high accuracy, with a call rate higher than 99% in genotyping SNPs linked to hereditary diseases; and the current trend

towards lower costs per sample/animal. Given the genomic information and the number of disease-linked SNPs that are being added to the reproductive and productive traits usually genotyped in DNA genetic tests, this input can be very useful, firstly, in decision-making and establishing breeding strategies; secondly, in supporting the maintenance of cow and bull health; and finally, in the introduction of bulls in breeding programs for the production of Holstein-Friesian and Jersey bovine semen.

7.8. ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to the results presented in this publication received funding from the National Agency for Research and Innovation (ANII, POS_NAC_2017_1_141239, from the National Institute for Agricultural Research (INIA, projects PL_027 N-23398 and BT_21 N-23330), and from the Sectorial Commission for Scientific Research of the University of the Republic (CSIC-UdelaR). To the translation agency DNA Translations for the translation into English.

7.9. REFERENCES

- ABS Global. 2022. ABS Bull Search, Wisconsin, US. Available at: <https://absbullsearch.absglobal.com/> (accessed July 2022).
- Adams, H.A., Sonstegard, T.S., VanRaden, P.M., Null, D.J., Van Tassell, C.P., Larkin, D.M., and Lewin, H.A. 2016. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive

efficiency in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 99(8):6693-6701. doi:[10.3168/jds.2015-10517](https://doi.org/10.3168/jds.2015-10517).

Artigas, R., Federici, M.T., Vázquez, N., Alcántara, M., Ramírez, M., Guerra, S., Dutra, F., and Llambí, S. 2020. Identificación por catálogo y detección molecular de bovinos Holstein portadores de braquiespina en Uruguay. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias* 19(2):50-54. doi:[10.14409/favecv.v19i2.9523](https://doi.org/10.14409/favecv.v19i2.9523).

Branda-Sica, A., Nicolini, P., Federici, M.T., and Llambí, S. 2019. Identification of Holstein cow carriers of complex vertebral malformation by high resolution melting curves (HRM). *Archives of Veterinary Science* 24(4):62-70. doi:[10.5380/avs.v24i4.65494](https://doi.org/10.5380/avs.v24i4.65494).

Briano-Rodríguez, C., Romero, A., Llambí, S., Branda-Sica, A., Federici, M., Giannitti, F., Caffarena, D., Schild, C., Casaux, M.L., and Dutra, F. 2021. Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay. [Mutações letais e semi-letais em bezerros da raça Holandesa no Uruguai]. *Animal Production, Ciencia Rural* 51(7):e20200734. doi:[10.1590/0103-8478cr20200734](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200734).

Chu, Q., Sun, D., and Yu, Y. 2008. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:228–230. doi:[10.1177/104063870802000215](https://doi.org/10.1177/104063870802000215).

Cole, J.B., Null, D.J., and VanRaden, P.M. 2016. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *Journal of Dairy Science* 99(9):7274–7288. doi:[10.3168/jds.2015-10777](https://doi.org/10.3168/jds.2015-10777).

Daetwyler, H.D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brondum, R., Liao, X., Djari, A., Rodriguez, S.C., Grohs, C., Esquerré,

D., Bouchez, O., Rossignol, M.N., Klopp, C., Rocha, D., Fritz, S., Eggen, A., Bowman, A., Coote, D., Chamberlain, A.J., Anderson, C., VanTassell, C.P., Hulsegge, I., Goddard, M.E., Guldbbrandtsen, B., Lund, M.S., Veerkamp, R.F., Boichard, D.A., Fries, R., and Hayes, B.J. 2014. Whole genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature Genetics* 46(8):858-865. doi:10.1038/ng.3034.

DairyNZ. 2022. DairyNZ Bull Search, New Zealand. Available at: <https://www.dairynz.co.nz/animal/animal-evaluation/bull-team/> (accessed July 2022).

Evaluaciones Genéticas Lecheras. 2022. Evaluación Genética de Ganado Lechero, INIA, Uruguay. Available at: www.geneticalechera.com.uy (accessed July 2022).

Fritz, S., Hoze, C., Rebours, E., Barbat, A., Bizard, M., Chamberlain, A., Escouflaire, C., Vander Jagt, C., Boussaha, M., Grohs, C., Allais-Bonnet, A., Philippe, M., Vallée, A., Amigues, Y., Hayes, B. J., Boichard, D., and Capitan, A. 2018. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 101(7):6220–6231. doi:10.3168/jds.2017-14119.

Fritz, S., Capitan, A., Djari, A., Rodriguez, S.C., Barbat, A., Baur, A., Grohs, C., Weiss, B., Boussaha, M., Esquerré, D., Klopp, C., Rocha, D., and Boichard, D. 2013. Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS ONE* 8(6):e65550. doi: 10.1371/journal.pone.0065550.

- Ghanem, M.E., Nishibori, M., Isobe, N., and Hisaeda, K. 2017. Detection of the APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals* 53(Suppl 1). doi:10.1111/rda.13081.
- Ghanem, M.E., Suzuki, T., Kasuga, A., and Nishibori, M. 2010. Effect of complex vertebral malformation on luteal function in Holstein cows during oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals* 45:729-733. doi:[10.1111/j.1439-0531.2009.01343.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01343.x).
- Ghanem, M.E., Akita, M., Suzuki, T., Kasuga, A., and Nishibori, M. 2008. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. *Animal Reproduction Science* 103:348-354. doi:[10.1016/j.anireprosci.2007.05.006](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.006).
- Häfliger, I.M., Spengeler, M., Seefried, F.R., and Drögemüller, C. 2022. Four novel candidate causal variants for deficient homozygous haplotypes in Holstein cattle. *Scientific Reports* 12(1):5435. doi:10.1038/s41598-022-09403-6.
- Howard, J. T., Pryce, J. E., Baes, C., and Maltecca, C. 2017. Invited review: inbreeding in the genomics era: inbreeding, inbreeding depression, and management of genomic variability. *Journal of Dairy Science* 100:6009–24. doi:10.3168/jds.2017-12787.
- Hozé, C., Escouflaire, C., Mesbah-Uddin, M., Barbat, A., Boussaha, M., Deloche, M. C., Boichard, D., Fritz, S., and Capitan, A. 2020. Short communication: A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Journal of dairy science* 103(1):607–612. doi:10.3168/jds.2019-17056.

- Kearney, J.F., Amer, P.R., and Villanueva, B. 2005. Cumulative discounted expressions of sire genotypes for the complex vertebral malformation and beta-casein loci in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science* 88:4426–4433. doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73129-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73129-5).
- Larkin, D.M., Daetwyler, H.D., Hernandez, A.G., Wright, C., Hetrick, L.A., Boucek, L., Bachman, S.L., Band, M.R., Akraiko, T.V., Cohen-Zinder, M., Thimmapuram, J., Macleod, I.M., Harkins, T.T., McCague, J.E., Goddard, M.E., Hayes, B.J., and Lewin, H.A. 2012. Wholegenome resequencing of two elite sires for the detection of haplotypes under selection in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(20):7693-7698. doi:10.1073/pnas.1114546109.
- Liebig, B.E., Bishop, J.V., McSweeney, K.D., Van Campen, H., González-Berrios, C.L., Hansen, TR; and Thomas, M.G. 2022. Direct genomic value daughter pregnancy rate and services per conception are associated with characteristics of day-16 conceptuses and hormone signaling for maternal recognition of pregnancy in lactating Holstein cows. *Applied Animal Science* 38:157–169. doi:[10.15232/aas.2021-02225](https://doi.org/10.15232/aas.2021-02225).
- McClure, M., Bickhart, D., Null, D., VanRaden, P., Xu, L., Wiggans, G., Liu, G., Schroeder, S., Glasscock, J., Armstrong, J., Cole, J.B., Van Tassell, C.P., and Sonstegard, T.S. 2014. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive defects BH1, HH2 and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3. *PLoS ONE* 9(3):e92769. doi: 10.1371/journal.pone.0092769.
- Meydan, H., Yildiz, M.A., and Agerholm, J.S. 2010. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and

factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52:56. doi:10.1186/1751-0147-52-56.

National Center for Biotechnology Information. 2018. ARS-UCD1.2 Assembly, National Center for Biotechnology Information, US. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.2/ (accessed July 2022).

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Nueva York, Columbia University Press 512 p.

Norman, H.D., Miller, R.H., Wright, J.R., Hutchison, J.L., and Olson, K.M. (2012). Factors associated with frequency of abortions recorded through Dairy Herd Improvement test plan. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 4074-4084. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4998>

OMIA. 2011. *Online Mendelian Inheritance in Animals*, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Australia. Available at: <https://www.omia.org/home/> (accessed July 2022).

Rosen, B.D., Bickhart, D.M., Schnabel, R.D., Koren, S., Elsik, C.G., Tseng, E., Rowan, T.N., Low, W.Y., Zimin, A., Couldrey, C., Hall, R., Li, W., Rhie, A., Ghurye, J., McKay, S.D., Thibaud-Nissen, F., Hoffman, J., Murdoch, B.M., Snelling, W.M., McDanel, T.G., Hammond, J.A., Schwartz, J.C., Nandolo, W., Hagen, D.E., Dreischer, C., Schultheiss, S.J., Schroeder, S.G., Phillippy, A.M., Cole, J.B., Van Tassell, C.P., Liu, G., Smith, T.P.L., and Medrano, J.F. 2020. De novo assembly of the cattle reference genome with single-molecule sequencing. *Gigascience* 9(3):giaa021. doi:10.1093/gigascience/giaa021.

- Ruść, A., and Kamiński, S. 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics* 48:247-252. doi:[10.1007/BF03195219](https://doi.org/10.1007/BF03195219).
- Schütz, E., Wehrhahn, C., Wanjek, M., Bortfeld, R., Wemheuer, W.E., Beck, J., and Brenig, B. 2016. The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TFB1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *PLoS One* 11(6):e0154602. doi:10.1371/journal.pone.0154602.
- Sonstegard, T.S., Cole, J.B., VanRaden, P.M., Van Tassell, C.P., Null, D.J., Schroeder, S.G., Bickhart, D., and McClure, M.C. 2013. Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PLoS ONE* 8:e54872. doi:[10.1371/journal.pone.0054872](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054872).
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A.H., Holm, L.E., Nielsen, V.H., Agerholm, J.S., Arnbjerg, J., and Bendixen, C. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research* 16(1):97-105. doi:10.1101/gr.3690506.
- VanRaden, P.M., Null, D.J., Sonstegard, T.S., Adams, H.A., Van Tassell, C.P., and Olson, K.M. 2012. Fine mapping and discovery of recessive mutations that cause abortions in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95(Suppl 2): ii-iii, abstract LB6.

- VanRaden, P.M., Null, D.J., Olson, K.M., and Hutchison, J.L. 2011a. Reporting of haplotypes with recessive effects on fertility. *Interbull Bulletin* 44:117–121.
- VanRaden, P.M., Null D.J., Olson, K.M., and Hutchison, J.L. 2011b. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science* 94:6153-6161. doi:10.3168/jds.2011-4624.

8. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

8.1. **RESULTADOS PRINCIPALES**

8.1.1. **Experimento I**

8.1.1.1. **Genotipado para detección de la mutación de CVM (c.538G >T_ *SLC35A3*)**

La optimización de un protocolo de genotipado de la mutación *SLC35A3* (c.538G > T) que afecta CVM mediante PCR-HRM en tiempo real, a través de la amplificación del producto de PCR de 79 pb permitió discriminar claramente los dos genotipos, homocigota tipo silvestre: TT, y heterocigota para la mutación CVM: GT. Se observó que el valor de los picos para el alelo T fue de 78,75 °C y para el alelo G fue de 77,05 °C. Las curvas de disociación de derivadas negativas ($-dF/dT$) del genotipo heterocigota fueron identificadas por picos con valor de 78,75 °C.

8.1.1.2. **Frecuencia alélica y prevalencia de portadores de CVM (c.538G > T_ *SLC35A3*)**

Se detectó la presencia del alelo mutante para CVM (c.538G > T; *SLC35A3*) con un umbral de confianza mayor a 90 % en 18 vacas Holando de la muestra analizada. Como primer reporte de diagnóstico genético-molecular de CVM en Uruguay, se encontró que la frecuencia del alelo mutante para CVM (c.538G > T; *SLC35A3*) en esta muestra analizada fue alta, de $q = 0.032$, y la prevalencia de vacas portadoras, 6.45 % (18/279).

8.1.2. **Experimento II**

8.1.2.1. **Genotipado para la detección del inserto mutante de CD (*BoERV_APOB*)**

La optimización de un protocolo de genotipado del inserto mutante (*BoERV_APOB*) que afecta CD mediante PCR-*melting* en tiempo real, permitió discriminar claramente los dos genotipos, homocigota tipo silvestre: *wt/wt*, y heterocigota para la mutación CD: *MUT/wt*. Se observó un pico a los 86,8 °C (alelo normal de 170 pb) para el genotipo homocigota, tipo silvestre (*wt/wt*) y otro a los 88 °C (alelo mutante de 146 pb) para el control heterocigota, portador de la mutación CD (*MUT/wt*).

8.1.2.2. **Frecuencia alélica y prevalencia de portadores de CD (*BoERV_APOB*)**

No se encontraron vacas portadoras de la mutación CD. Todas las vacas validadas (n = 103) en este estudio presentaron genotipo homocigota tipo silvestre: *wt/wt*.

8.1.3. **Experimento III**

8.1.3.1. **Análisis del catálogo de padres Holando 2021**

Se realizó el análisis del catálogo de padres Holando de las evaluaciones genéticas actualizado a 2021 y se observó que el 87,12 % (n = 2.638) de la contribución genética provino, principalmente, de Estados

Unidos, Canadá y Uruguay para los haplotipos HH1, HH3 y HH4. De los 3.028 toros analizados, solamente 48,5 % (n = 1.468) contaba con test genético registrado para el haplotipo HH1, y otros 48,6 % (n = 1.471) para los haplotipos HH3 y HH4. De estos, 6,1 % (n = 90) fueron portadores para el haplotipo HH1 (HH1C), procedentes de Estados Unidos, Canadá, Holanda e Italia; 4,1 % (n = 60) para HH3 (HH3C) de Estados Unidos, Canadá, Holanda, Italia y otros países; y 0,4 % (n = 6) para HH4 (HH4C) de Holanda y otros países. Al evaluar la descendencia de los toros HH1C para producción lechera en Uruguay, se observaron 10.788 hijas incluidas en el sistema de evaluación genética nacional. También se observaron en la de los toros HH3C y HH4C, con 6.317 y 573 hijas respectivas.

8.1.3.2. **Genotipado con el chip bovino GeneTitan®**

Mediante genotipado con el chip bovino GeneTitan® de 2.500 SNP se detectó la presencia de las variantes alélicas: para HH1 en una sola vaca cruza Holando con Jersey y para CVM en 7 vacas Holando, en un total de 170 de vacas genotipadas (*call rate* > 0,99). Se observó que la frecuencia predial del alelo mutante para HH1 en la población analizada fue baja, de $q = 0,003$, y la prevalencia de portadoras, 0,59 % (*call rate* > 0,99). Para CVM, fue de $q = 0,022$ y 4,3 % (*call rate* > 0,99). No se encontraron alelos mutantes para HH3, HH4 y JH1 en la población analizada.

8.1.3.3. **Análisis de datos reproductivos de vacas portadoras de las mutaciones asociadas**

Se realizó el análisis de los datos reproductivos con base en el número de las inseminaciones realizadas en vacas portadoras de la mutación que

fueron genotipadas con el chip bovino GeneTitan®. Se observaron 2 vacas portadoras de CVM y HH1 que dieron terneros muertos con un número promedio de 4 repeticiones del servicio para lograr la preñez.

8.2. **DISCUSIÓN GENERAL**

La optimización de los protocolos de diagnóstico genético-molecular de los experimentos I y II, PCR en tiempo real con las aplicaciones HRM y curvas de disociación (*melting*), permitieron realizar el genotipado del alelo mutante del gen *SLC35A3* (c.538G > T) para la enfermedad CVM e inserto mutante (*BoERV*) del gen *APOB* para CD en forma rápida, específica, fácilmente interpretable y de bajo costo, lo que facilitó el análisis simultáneo de un gran número de bovinos Holando.

En una primera ejecución del procedimiento en el experimento I, para confirmar la precisión en los genotipos a través de HRM, se seleccionaron al azar 25 muestras de ADN y se enviaron al Instituto de Genética Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata (IGEVET-CONICET, UNLP, La Plata, Argentina) a genotipar con el chip ArBos1 50K de plataforma Affymetrix, en donde se detectaron 3 muestras de control portadora para la mutación en el gen *SLC35A3* (c.538G>T, CVM). Estas muestras de genotipo conocido se usaron como controles para el análisis HRM. La necesidad de utilizar un método de genotipado alternativo antes de usar HRM es una de las principales limitaciones de HRM en sí. Sin embargo, en este estudio del experimento I, como primer reporte en Uruguay de diagnóstico genético-molecular de CVM, mediante PCR-HRM utilizando un par de *primers* de ZhiLing et al. (2015) para amplificar el producto de PCR de 79 pb, se pudo detectar la presencia del alelo mutante (G) con un umbral de confianza mayor a 90 % en 18 vacas de la muestra analizada y se pudo identificar

claramente 2 genotipos diferentes (homocigotas tipo silvestre: TT y heterocigotas para la mutación: GT) de la enfermedad CVM (c.538G > T; *SLC35A3*), lo que valida el uso de esta técnica para el genotipado en ganado Holando. Por tanto, se ha determinado que el valor de los picos para el alelo T fue de 78,75 °C y para el alelo G fue de 77,05 °C. Las curvas de disociación de derivadas negativas ($-dF/dT$) del genotipo heterocigota fueron identificadas por picos con valor de 78,75 °C.

La mutación *SLC35A3* (c.538G > T, CVM) fue informada en el catálogo OMIA (001340-9913) y ha sido estudiada en bovinos de la raza Holando desde el año 2006 (Meydan et al., 2010, Rusc y Kaminski, 2007, Thomsen et al., 2006) y su origen se rastreó al toro norteamericano de élite Carlin-M Ivanhoe Bell (HOUSA000001667366), que recibió la mutación recesiva letal de la enfermedad CVM de su padre Penstate Ivanhoe Star (HOLUSAM000001441440) (Chu et al., 2008, Revell, 2001). La mutación no sinónima determinante de esta enfermedad es una sustitución de guanina por timina en la posición 538 del exón 4 del gen *SCL35A3* (Thomsen et al., 2006), que desempeña un papel esencial en el desarrollo del esqueleto axial. La posición de esta mutación (rs438228855) en el gen *SCL35A3* fue actualizada con la versión nueva de la secuencia bovina de referencia, *ARS-UCD1.2*. (Rosen et al., 2020, NCBI, ensamblaje de *ARS-UCD1.2*, 2018), puesto que con la versión anterior estaba en 559 (c.559G > T). Este gen codifica para el transportador de la UDP-N-acetil-glucosamina y la mutación causa la sustitución de una valina por fenilalanina (V180F) en la posición 180 (Rusc y Kaminski, 2007). Por consiguiente, la molécula del transportador defectuosa conduce a malformaciones vertebrales (Thomsen et al., 2006).

Las prevalencias de vacas portadoras observadas para la mutación *SLC35A3* (rs438228855; c.538G > T, CVM) en los experimentos I y III fueron similares en un rango de 2,09 a 6,45 % para ganado Holando en la

bibliografía internacional (Meydan et al., 2010) y nacional (Briano-Rodríguez et al., 2021). Sin embargo, en otros países del mundo, se observaron que las prevalencias de CVM fueron más altas (Rusc y Kaminski, 2007, Thomsen et al. 2006, Berglund et al., 2004, Konersmann et al., 2003, Nagahata et al., 2002). El motivo de estas diferencias es, probablemente, el muestreo de diferentes poblaciones, es decir, el ganado en diferentes regiones, aunque también puede ser influenciado por el uso de semen de toros portadores de la mutación en el tiempo. Desde principios de la década de 2000, la mayoría de los países ha desarrollado programas de mejoramiento para disminuir la prevalencia de animales portadores de CVM (Rusc y Kaminski, 2007).

Con respecto a la optimización del protocolo mediante análisis PCR-*melting* en tiempo real para la detección del inserto mutante de 7,5 Kb del elemento transponible bovino *BoERVK* en el gen *APOB* del experimento II, se utilizaron dos muestras de ADN de un toro diagnosticado como portador de la mutación CD (*ALTA Leap* 011HO12336) y otro libre de esta enfermedad (*ALTA Bolero* 011HO11572) como controles de referencia para comparar los patrones de las curvas de disociación a analizar. A partir de la amplificación de los productos de PCR de 170 y 146 pb utilizando los *primers* de Charlier et al. (2017), se logró distinguir claramente dos genotipos: homocigota (tipo silvestre: *wt/wt*) y heterocigota (portador de la mutación CD: *MUT/wt*).

La variante causante de deficiencia de colesterol también fue informada en el catálogo OMIA (001965-9913) y ha sido estudiada en bovinos de raza Holando desde el año 2016 (Häfliger et al., 2022, Artesi et al., 2021, Gross et al., 2019, Häfliger et al., 2019, Charlier, 2016, Gross et al., 2016, Kipp et al., 2016, Menzi et al., 2016, Schütz et al., 2016) y su origen se rastreó al toro norteamericano Maughlin Storm (073HO02012) (Kipp et al., 2016, VanRaden y Null, 2015). Esta mutación es una inserción de 1.299 pb de un elemento transponible de repetición larga (*LTR_ERV2-1*)

entre los nucleótidos 24 y 25 del exón 5 del gen *APOB*, que provoca un cambio de marco de lectura, que determina el truncamiento del 97 % de la proteína *APOB* bovina (Menzi et al., 2016). Estos hallazgos fueron confirmados de forma independiente por otros autores (Häfliger et al., 2022, Charlier, 2016, Schütz et al., 2016). Charlier (2016) confirmó este resultado, pero con una estimación diferente del tamaño de la inserción de un elemento retroviral endógeno bovino en el exón 5 del gen *APOB*, de una longitud total de 7,5 kb (*BoERV*).

En el experimento II, no se observó la presencia del inserto mutante *BoERVK_APOB* en la población de vacas Holando analizada y están libres de la enfermedad CD. Además, se confirmó el genotipo de las vacas analizadas que eran homocigotas libres de la mutación (*wt/wt*) mediante el análisis del electroferograma y alineamiento múltiple con el software libre BioEdit (Hall, 1999) de las secuencias obtenidas con la secuencia genómica bovina de referencia (*GeneID* 494004, *GenBank*). En este análisis, se determinó la ubicación del punto de inicio de la inserción en la posición 468 (26593) de la secuencia *APOB-UP1-F1* del toro Holando control portador de la mutación CD (*MUT/wt* o *InDel_BoERVK_APOB*) después del fragmento GTTCTGAAGG a la izquierda y antes de CAAGCAAGTTC, de acuerdo con lo reportado por Charlier et al. (2017).

Además, se tuvieron en cuenta los amplicones con menor tamaño posible para seleccionar los *primers* de los experimentos I y II. Para el estudio del experimento I, se seleccionó el par de *primers* de ZhiLing et al. (2015) utilizados para PCR en tiempo real con sondas TaqMan, el amplicón de 79 pb amplificó para el análisis HRM descrito en nuestro estudio. Los *primers forward* y *reverse* utilizados en este estudio presentaron un contenido de GC de entre 40 y 60 %, que fue adecuado (45,5 y 57,8 %, respectivamente), ya que no se observaron amplificaciones inespecíficas ni

presencia de dímeros de *primer*. De esta forma, se valida el diseño de los *primers* de ZhiLing et al. (2015) para los análisis HRM. La reducción del tamaño de los amplicones aumenta la diferencia en la señal a una temperatura dada entre dos secuencias que difieren en una sola posición del nucleótido. Las diferencias entre los genotipos son más fáciles de ver cuando los amplicones son de menor tamaño (Gundry et al., 2003). Los heterocigotas se identifican por un cambio en la forma de la curva de disociación, y los homocigotas se distinguen por un cambio en la temperatura de disociación (T_m) (Liew et al., 2004). La mutación puntual localizada en el gen *SLC35A3* afecta el comportamiento de disociación (T_m) de los productos PCR y, por lo tanto, genera diferentes curvas de disociación de alta resolución que permiten la discriminación e identificación de los genotipos por análisis HRM. El análisis HRM es un método simple y económico en tubos cerrados para analizar los productos PCR (Wittwer et al., 2003). Su sensibilidad y especificidad son altas cuando los productos PCR presentan menos de 400 pb de longitud (Reed et al., 2007). HRM se ha utilizado ampliamente para *screening* (o detección) de mutaciones y genotipado (Federici et al., 2018, Gabor et al., 2012a y 2012b, Santos et al., 2012, Vorkas et al., 2010, Vossen et al., 2009, Hung et al., 2008, Montgomery et al., 2004).

Al igual que para las muestras analizadas en este estudio del experimento II, la observación de un único pico de temperatura en la curva de disociación de cada muestra confirmó la especificidad de los *primers* elegidos (Charlier et al., 2017) para amplificar el alelo mutante de 146 pb con un pico a 88 °C, y tipo salvaje de 170 pb con 86,8 °C. En este estudio, los *primers* del alelo mutante y tipo salvaje presentaron un contenido de GC de entre 40 y 60 %, que fue adecuado (43,48 y 56,52 %, respectivamente), ya que no se observaron amplificaciones inespecíficas ni presencia de

dímeros de *primer* en el control negativo de reacción. La temperatura y la resolución de la fluorescencia del equipo *RotorGene™* 6000 utilizado en este estudio demostraron la precisión de las curvas de disociación y la capacidad de distinguir diferentes genotipos. De esta forma, se validó el diseño de los *primers* de Charlier et al. (2017) para detectar el inserto mutante de CD (*BoERVK*) de 7.5 Kb en el exón 5 del gen *APOB* mediante *real time PCR-melting* en el *RotorGene™* 6000.

Con respecto a las diferencias en el origen biológico de las muestras de ADN (sangre de las vacas vs. semen de los toros, en este caso) del experimento II, determinan el uso de diferentes protocolos de extracción de ADN. Esto hace que pueda haber diferencias en las soluciones químicas utilizadas durante el proceso de extracción para cada protocolo, así como en los residuos contaminantes que podrían quedar en la solución final de ADN. Dado que los equipos de PCR en tiempo real son altamente sensibles a estas diferencias en las condiciones de las muestras de ADN, potencialmente podrían observarse diferencias en las curvas de disociación de amplicones que, a pesar de tener el mismo genotipo, se detectan como diferentes debido a que su ADN fue extraído con protocolos con química diferencial (Gabor et al., 2012a). Sin embargo, en este estudio del experimento II, no se detectó que el método de extracción de ADN afectará la dinámica de disociación de los amplicones, ya que el patrón del pico de disociación ($-dF/dT$) del toro control libre de la enfermedad coincidió con el de las vacas homocigotas de tipo silvestre. Además, al finalizar la reacción de PCR, es decir, cuando la reacción alcanza la fase *plateau* se observó un punto de inflexión en la curva de desnaturalización del producto amplificado del toro control heterocigoto con las curvas del toro control libre de la enfermedad y vacas homocigotas de tipo silvestre.

La mutación *APAF1* (c.1741C > T; HH1), al igual que las otras, fue informada en el catálogo OMIA (000001-9913) y ha sido estudiada en bovinos de raza Holando desde el año 2012 (Häfliger et al., 2022, Cole et al., 2016, Adams et al., 2016, Adams et al., 2012) y su origen se rastreó a los toros norteamericanos Walkway Chief Mark (HOLUSAM000001773417), Milu Betty Ivanhoe Chief (HOLUSAM000001578139), S W D Valiant (HOLUSAM000001650414) y Pawnee Farm Arlinda Chief (HOLUSAM000001427381) (Adams et al., 2016, Cole et al., 2016, Larkin et al., 2012, VanRaden et al., 2012). Esta mutación está caracterizada por una sustitución de timina por citosina (Adams et al., 2016). La proteína APAF1 es una molécula importante en el proceso de apoptosis celular (Müller et al., 2005) y el desarrollo del sistema nervioso central durante la embriogénesis (Yoshida et al., 1998). Esta mutación causa pérdida fetal y embrionaria, entre los 60 y 200 días de gestación, y reducción de la tasa de concepción en vacas y, por consiguiente, la fertilidad se ve reducida en los toros portadores (Adams et al., 2016).

La mutación *SMC2* (c.3404T > C; HH3) también fue informada en el catálogo OMIA (001824-9913) y ha sido estudiada en bovinos de raza Holando desde el año 2013 (Häfliger et al., 2022, Cole et al., 2016, Daetwyler et al., 2014, McClure et al., 2014, Hayes et al., 2013) y su origen se rastreó al toro Glendell Arlind Chief (HOLUSAM000001556373) (Cole et al., 2016, McClure et al., 2014). Esta mutación está caracterizada por una sustitución de citosina por timina en el exón 24 (Daetwyler et al., 2014, McClure et al., 2014, Hayes et al., 2013). Häfliger et al. (2022) actualizaron la posición del SNP responsable de esta mutación (rs45206907) en el cromosoma 8 (93.753.358) según la versión nueva del ensamblaje de la secuencia genómica de referencia (NCBI, ensamblaje de *ARS-UCD1.2*, 2018). El gen *SMC2* tiene un papel esencial en la reparación del ADN, la

condensación cromosómica y la segregación durante la división celular. Esta mutación puntual cambia el aminoácido 1135 de fenilalanina a serina (F1135S) y altera la función del dominio NTPasa de la proteína codificada.

El toro Besne Buck (HOLFRAM004486041658), proveniente de Europa, heredó la mutación *GART* (c.869A > C; HH4) (Cole et al., 2016, Fritz et al., 2013). Esta mutación también fue informada en el catálogo OMIA (001826-9913) y ha sido estudiada en bovinos de la raza Holando desde el año 2013 (Häfliger et al., 2022, Cole et al., 2016, Fritz et al., 2013). La enzima fosforibosilglicinamida sintetasa de *GART* es necesaria para la síntesis de nucleótidos purina. La mutación *GART* está asociada con una disminución de fertilidad y mortalidad embrionaria en el primer mes de gestación (Fritz et al., 2013).

En el experimento III, se observó la contribución genética de los alelos mutantes asociados a los haplotipos HH1 (APAF1), HH3 (SMC2) y HH4 (*GART*) de la mayoría de los toros Holando utilizados como padres en los sistemas de evaluación genética lechera de Uruguay actualizado a 2021 (disponible en www.geneticalechera.com.uy) que son descendientes directos de los ancestros fundadores mencionados anteriormente. Dado que el mecanismo de herencia es autosómico recesivo, debemos asumir que al menos el 50 % de las hijas (n = 5.394) fueron portadoras de HH1C, al igual que para HH3C (n = 3.158) y HH4C (n = 286), lo que indicaría la presencia de los alelos mutantes en el núcleo de selección uruguayo. Dado que la totalidad de hijas (n = 10.788 para HH1C; n = 6.317 para HH3C; n = 573 para HH4C) fueron evaluadas para características de producción de leche y dejaron descendencia a nivel nacional.

Del análisis del experimento III se revela un fuerte componente de material genético proveniente, principalmente, de Estados Unidos y Canadá, como fue observado anteriormente en otros trabajos (Artigas et al., 2020),

donde, presumiblemente, se originaron las mutaciones fundadoras de los haplotipos HH1 y HH3 (Häfliger et al., 2022, Fritz et al., 2018, Fritz et al., 2013, VanRaden et al., 2012, VanRaden et al., 2011b). Se ha observado que la mutación HH4 provino de Europa (Cole et al., 2016, Fritz et al., 2013), ya que no fue encontrada en los toros americanos y canadienses de la evaluación genética lechera nacional.

De la totalidad de toros con información genética del experimento III que conforman parte del acervo genético de la raza Holando, se detectaron 90 animales portadores del haplotipo HH1 (HH1C = 6,1 %), 60 (HH3C = 4,1 %) del HH3 y 6 (HH4C = 0,4 %) del HH4. El número de toros portadores de estos haplotipos podría ser mayor, dado el bajo número de animales con información genética disponible en las bases de datos públicas respecto a su estatus genético para la enfermedad, incluyendo el 99,5 % de los toros Holando uruguayos. En este aspecto, el comportamiento similar fue observado para la enfermedad hereditaria braquiespina (Artigas et al., 2020). La alta proporción de toros sin test de diagnóstico molecular en el catálogo de padres puede ser explicada por el hecho de que este análisis incluye toros anteriores a que se publicaran los tests de diagnóstico para las mutaciones en los genes *APAF1* (HH1), *SCM2* (HH3) y *GART* (HH4) (Adams et al., 2016, Cole et al., 2016, McClure et al., 2014, Fritz et al., 2013).

A pesar de que las mutaciones asociadas a los haplotipos HH1 (*APAF1*), HH3 (*SCM2*), HH4 (*GART*), JH1 (*CWC15*) y CVM (*SLC35A3*) han sido identificadas hace 10 años, este estudio del experimento III es el primer reporte realizado en Uruguay por el cual se evaluaron los datos reproductivos con los datos genómicos del genotipado utilizando el chip GeneTitan® de 2.500 SNP con una imputación muy precisa, en donde se logró detectar la presencia de los alelos mutantes asociados a los genes *APAF1* (c.1741C > T; rs448942533; HH1) y *SLC35A3* (c.538G > T; rs438228855; CVM), lo que

facilitó el monitoreo y análisis simultáneo de un gran número de vacas Holando y cruza Holando con Jersey. Se observó la presencia de los mencionados alelos mutantes en vacas repetidoras que dieron terneros muertos y se consideró la necesidad de profundizar el conocimiento sobre sus efectos en el desempeño reproductivo con un mayor número poblacional para los análisis estadísticos de asociación. Ghanem et al. (2017) han observado vacas portadoras de CVM y HH1 que eran repetidoras, lo que podría deberse a una disfunción ovárica. En un estudio previo, Ghanem et al. (2010) encontraron que la concentración de progesterona tendía a disminuir durante el ciclo estral en las vacas portadoras de CVM debido a disfunciones lúteas, lo que podría reducir la tasa de concepción y aumentar la frecuencia del síndrome de reproducción repetida en estas vacas. Debido a las razones anteriores, Ghanem et al. (2017) estudiaron la fertilidad en vacas portadoras de la mutación *APAF1* (HH1) mediante la medición de la concentración de progesterona en la leche descremada como una herramienta para indicar la función ovárica en las vacas y encontraron que las concentraciones de progesterona no difirieron significativamente ($p = 0.8$) entre las vacas portadoras de HH1 y no portadoras a los primeros 45 días después de la inseminación artificial. Por tanto, se hace necesario realizar estudios para cuantificar las pérdidas económicas en los predios lecheros con presencia de los haplotipos de Holando, así como también realizar estudios de pedigrí y genotipado de los animales como herramienta para evitar los apareamientos entre portadores de algunos de estos haplotipos. A su vez, conocer los efectos de estos haplotipos sobre las características de desempeño reproductivo, descartar si existen disfunciones ováricas por la concentración de la progesterona en las vacas portadoras o disminución en la tasa de concepción. Habría que considerar también los valores de medición de la progesterona en los análisis estadísticos para analizar si existen efectos de la

mutación de los haplotipos asociados a abortos. La prevalencia de vacas portadoras observadas para la mutación *APAF1* (HH1) en este estudio del experimento III fue similar en un rango de 1,8 al 4,5 % para ganado Holando en la bibliografía internacional (Adams et al., 2016, Schütz et al., 2016, VanRaden et al., 2011b) y nacional (Briano-Rodríguez et al., 2021).

Todas las vacas validadas en este estudio del experimento III presentaron un genotipo homocigota tipo silvestre y, por tanto, están libres de las enfermedades asociadas a los haplotipos: HH3 (*SMC2*), HH4 (*GART*) y JH1 (*CWC15*), y no se identificaron alelos mutantes en la población analizada. Sin embargo, existen estudios internacionales que determinaron las prevalencias en un rango de 0,7 y 5,1 % (Schütz et al., 2016, Cooper et al., 2014, Fritz et al., 2013, VanRaden et al., 2012) y los efectos letales de los haplotipos HH3 (*SMC2*) y HH4 (*GART*) con pérdidas embrionarias inmediatamente después de la concepción, que no son observables fenotípicamente y, sin embargo, la reducción de la tasa de concepción ocurre antes de los 60 días, y mientras HH1 (*APAF1*) y CVM a través de toda la gestación (Häfliger et al., 2022, Schütz et al., 2016, Cooper et al., 2014, Fritz et al., 2013, Norman et al., 2012, VanRaden et al., 2012, VanRaden et al., 2011a). En Uruguay, se encontraron alelos mutantes de los haplotipos HH3 (3,13 %) y HH4 (1,04 %) en una población de terneros Holando nacidos en 2016 (Briano-Rodríguez et al., 2021). Estos terneros, hoy en día, pasarían a ser reproductores con información genética y deberían estar registrados en el catálogo de padres de la Evaluación Genética Lechera de la raza Holando. Para la raza Jersey, no existen reportes sobre la presencia de portadores de la enfermedad JH1 (*CWC15*) en Uruguay. Para evitar la propagación de esta enfermedad, se recomienda realizar un análisis de los pocos 90 registros de toros Jersey nacionales e importados, nacidos entre 1978 y 2012 (Evaluaciones Genéticas Lecheras, disponible en

www.geneticalechera.com.uy, actualizado en 01/07/2022), del catálogo de padres Jersey 2022 para detectar la presencia del alelo mutante. Esta enfermedad fue reportada por científicos del ARS-USDA de EE. UU. a partir del 2013 (Sonstegard et al., 2013) y su origen se rastreó al toro norteamericano de élite Observer Chocolate Soldier (JERUSAM000000596832) nacido en 1962 (VanRaden et al., 2011a). Este toro engendró 1.454 hijas para producción de leche y, como consecuencia, su impacto se magnificó aún más con 107 hijos y 715 nietos utilizados en la inseminación artificial para generar >50.000 nietas y > 200.000 bisnietas. Como resultado, la frecuencia de heterocigotos JH1 aumentó rápidamente al inicio y se ha estabilizado en un 20 a 25 % desde 1980. VanRaden et al. (2004) examinaron 52.449 registros de fertilidad de toros heterocigotos JH1 apareados con hijas de toros heterocigotos JH1 y encontraron una tasa de éxito de concepción del 33,3 % frente al 37,0 % para 290.373 apareamientos contemporáneos de toros normales con hijas de toros normales. La reducción en la tasa de concepción de 3,7 % confirmó a JH1 como enfermedad recesiva letal, en concordancia aproximada con la reducción esperada de 4,6 %. La tasa de éxito de la concepción fue del 36,3 % en 57.523 montas de toros heterocigotos con hijas de toros normales, con una ligera reducción del 0,7 % potencialmente causada por madres heterocigotas con herencia materna JH1 (Sonstegard et al., 2013).

9. **CONCLUSIONES**

En esta tesis doctoral se logró:

- ✓ Optimización de la técnica de PCR-HRM en tiempo real para la detección del alelo mutante del gen *SLC35A3* (c.538G > T) asociado con la enfermedad CVM, en forma rápida, específica, fácilmente interpretable y de bajo costo, lo que facilita el análisis simultáneo de un gran número de bovinos Holando.
- ✓ Optimización de la técnica de PCR-*melting* en tiempo real para la detección del inserto mutante *BoERVK* del gen *APOB* asociado con la enfermedad CD, en forma rápida, específica, fácilmente interpretable y de bajo costo, lo que facilita el análisis simultáneo de un gran número de bovinos Holando.
- ✓ Monitoreo de los SNP asociados a los genes *SLC35A3* (rs438228855; CVM), *APAF1* (rs448942533, HH1), *SMC2* (rs456206907, HH3), *GART* (rs465495560, HH4) y *CWC15* (rs1115118696, JH1) utilizando el chip GeneTitan® y los registros reproductivos tradicionales, en forma rápida, altamente precisa e informativa, lo que facilita el análisis simultáneo de un gran número de vacas Holando y cruza Holando con Jersey.
- ✓ Conocimiento sobre la contribución genética de los alelos mutantes asociados a los haplotipos HH1, HH3 y HH4 de los toros internacionales y nacionales utilizados como padres en los sistemas de evaluación genética lechera de Uruguay.

- ✓ Generación del banco de ADN con controles portadores (CVM, CD y HH1) y libres de enfermedades (CVM, CD, HH1, HH3, HH4 y JH1).

10. **PERSPECTIVAS**

La presente tesis doctoral pone de relieve la necesidad de llevar a cabo futuros proyectos de investigación en el campo de la genética y salud animal. Sugerimos profundizar el estudio del efecto de *SLC35A3* (c.538G > T; CVM) y *APAF1* (c.1741C > T; HH1) (así como de otras mutaciones) sobre el desempeño reproductivo de la población lechera Holando y Jersey de nuestro país. Para eso, consideramos necesario y recomendamos ampliar los registros fenotípicos con la determinación endócrino-metabólica para concentración de progesterona (P4) en la leche descremada como una herramienta para indicar la función ovárica en las vacas, además de los reproductivos tradicionales (número de servicios por concepción, tasa de no retorno, tasa de preñez, etc.), para los análisis estadísticos de asociación.

Por tanto, el número de enfermedades hereditarias y predisposiciones genéticas en la que un ternero podría ser analizado está aumentando constantemente en el catálogo de la OMIA y, a su vez, ha disminuido los costes de la tecnología de secuenciación. Consideramos que realizar otros análisis con la optimización de nuevos protocolos de diagnóstico genético-molecular para el análisis de las variantes alélicas utilizando chips de SNP integrados a las evaluaciones genéticas lecheras mediante selección genómica ayudarán a los médicos veterinarios y ganaderos/criadores a identificar qué animales darán las crías que generarán un mayor volumen de producción lechera y de carne a la vez de tener en cuenta otras características no deseables que afectan la producción y el bienestar animal.

Durante el desarrollo del trabajo experimental que dio origen a la presente tesis también se obtuvo un banco de ADN con controles portadores y libres de enfermedades estudiados que podrán emplearse en nuevos protocolos de diagnóstico genético-molecular para su optimización aplicando

otras variantes de la PCR para la interpretación y confirmación de los genotipos de bovinos.

Se espera que estos materiales genéticos y datos sean utilizados por diferentes investigadores y estudiantes y que su uso contribuya en la formación de recursos humanos en diferentes áreas. Asimismo, se pretende que las técnicas PCR-HRM/*melting* en tiempo real puedan ser transferidas a los veterinarios y ganaderos/criadores al momento de tomar decisiones y establecer las estrategias de cría, apoyando el mantenimiento de la salud de las vacas y toros de la raza Holando.

11. **BIBLIOGRAFÍA**

- Adams HA, Sonstegard TS, VanRaden PM, Null DJ, Van Tassell CP, Larkin DM, Lewin HA. 2016. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 99(8):6693-6701.
- Adams HA, Sonstegard T, VanRaden PM, Null DJ, Van Tassell C, Lewin H. 2012. Identification of a Nonsense Mutation in APAF1 that is Causal for a Decrease in Reproductive Efficiency in Dairy Cattle. In *Proceedings Plant and Animal Genome XX Conference*, January 14–18 2012, San Diego, CA, USA. (Abstract P0555). [En línea]. 6 de setiembre de 2022. Disponible en:
<https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper3932.html>.
- Agerholm JS. 2007. Inherited disorders in Danish cattle. *APMIS Supplementum*, 115(122):1-76.
- Agerholm JS, Bendixen C, Arnbjerg J, Andersen O. 2004. Morphological variation of "complex vertebral malformation" in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16:548–553.
- Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg JC. 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:283-289.
- Amaral AJ, Megens HJ, Kerstens HH, Heuven H, Dibbits B, Crooijmans R, den Dunnen JR, Groenen M. 2009. Application of massive parallel sequencing to whole genome SNP discovery in the porcine genome. *BMC Genomics*, 10:374. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-374>.
- Ansevin AT, Vizard DL, Brown BW, McConathy J. 1976. High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical

considerations for the resolution of thermal subtransitions.

Biopolymers, 15:153-174.

Artesi M, Hahaut V, Cole B, Lambrechts L, Ashrafi F, Marçais A, Hermine O, Griebel P, Arsic N, van der Meer F, Burny A, Bron D, Bianchi E, Delvenne P, Bours V, Charlier C, Georges M, Vandekerckhove L, Van den Broeke A, Durkin K. 2021. PCIP-seq: simultaneous sequencing of integrated viral genomes and their insertion sites with long reads. *Genome Biology*, 22(1):97. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02307-0>.

Artigas R, Federici MT, Vázquez N, Alcántara M, Ramírez M, Guerra S, Dutra F, Llambí S. 2020. Identificación por catálogo y detección molecular de bovinos Holstein portadores de braquiespina en Uruguay. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 19(2):50-54. <https://doi.org/10.14409/favecv.v19i2.9523>.

Bass TM, Grandison RC, Wong R, Martinez P, Partridge L, Piper MD. 2007. Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila*. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 62(10):1071–1081. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.10.1071>.

Baumann JGJ, Wiegant J, Borst P, Van Duijn P. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Experimental cell research*, 138:485–490.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR,

Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DM, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara E, Catenazzi M, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang GD, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Raczy C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovsky Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles

- ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456:53- 59.
- Berglund B, Persson A, Stalhammar H. 2004. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45:161-165.
- Boichard D, Maignel L, Verrier E. 1996. Analyse généalogique des races bovines laitières françaises. *INRA Productions Animales*, 5(9):323–335.
- Bovine Genome sequencing and Analysis Consortium. 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science*; 324:522-527.
- Briano-Rodríguez C, Romero A, Llambí S, Branda-Sica A, Federici M, Giannitti F, Caffarena D, Schild C, Casaux ML, Dutra F. 2021. Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay. [Mutações letais e semi-letais em bezerros da raça Holandesa no Uruguai.] *Animal Production, Ciencia Rural*, 51(7):e20200734.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200734>.
- Bush WS, Moore JH. 2012. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Computational Biology*, 8(12): e1002822.
- Cai Z, Guldbbrandtsen B, Lund MS, Sahana G. 2019. Prioritizing candidate genes for fertility in dairy cows using gene-based analysis, functional annotation and differential gene expression. *BMC Genomics*, 20, 1–9.
- Calderón JP, Gutiérrez GA, Garay GL. 2021. Presencia de haplotipos reproductivos y su efecto en una población de vacunos lecheros en la costa central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(3):e16215. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i3.16215>

- Charlier C, Georges M, Harland C, Coppieters W. 2017. Detecting cholesterol deficiency mutation in cattle. European Patent Application N° EP 3 181697 A1. European Patent Office. 19 pp. [En línea]. 15 de marzo 2022. Disponible en:
<https://patents.google.com/patent/EP3181697A1/en>.
- Charlier C. 2016. The Role of Mobile Genetic Elements in the Bovine Genome. Plant and Animal Genome Conference XXIV, San Diego, CA, January 9-13, USA, Abstract W636. [En línea]. 15 de marzo 2022. Disponible en:
<https://pag.confex.com/pag/xxiv/meetingapp.cgi/Paper/19428>.
- Charlier C, Coppieters W, Rollin F, Desmecht D, Agerholm JS, Cambisano N, Carta E, Dardano S, Dive M, Fasquelle C, Frennet JC, Hanset R, Hubin X, Jorgensen C, Karim L, Kent M, Harvey K, Pearce BR, Simon P, Tama N, Nie H, Vandeputte S, Lien S, Longeri M, Fredholm M, Harvey RJ, Georges M. 2008. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature Genetics*, 40(4):449-54. doi:10.1038/ng.96.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*, 127(3): 1550–1557.
- Chu Q, Sun D, Yu Y. 2008. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20:228–230.
- Citek J, Rehout V, Hajkova J, Pavkova J. 2006. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Veterinární medicína*, v.51, p.333-339.
- Cole JB, VanRaden PM, Null DJ, Hutchison JL, Cooper TA, Hubbard SM. 2018. Haplotype tests for recessive disorders that affect fertility and other

traits. Animal Improvement Program Research Report 2018. [En línea]. 7 de agosto 2022. Disponible en:
https://www.aipl.arsusda.gov/reference/recessive_haplotypes_ARR-G3.html.

- Cole JB, Null DJ, VanRaden PM. 2016. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *Journal of Dairy Science*, 99(9):7274–88.
- Cooper TA, Wiggans GR, Null DJ, Hutchison JL, Cole JB. 2014. Genomic evaluation, breed identification, and discovery of a haplotype affecting fertility for Ayrshire dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3878–3882. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7427>.
- Daetwyler HD, Capitan A, Pausch H, Stothard P, van Binsbergen R, Brondum R, Liao X, Djari A, Rodriguez SC, Grohs C, Esquerré D, Bouchez O, Rossignol MN, Klopp C, Rocha D, Fritz S, Eggen A, Bowman A, Coote D, Chamberlain AJ, Anderson C, VanTassell CP, Hulsegge I, Goddard ME, Guldbbrandtsen B, Lund MS, Veerkamp RF, Boichard DA, Fries R, Hayes BJ. 2014. Whole genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature Genetics*, 46(8), 858-865. DOI:10.1038/ng.3034.
- Dalloul RA, Long JA, Zimin AV, Aslam L, Beal K, Blomberg Le Ann, Bouffard P, Burt DW, Crasta O, Crooijmans RP, Cooper K, Coulombe RA, De S, Delany ME, Dodgson JB, Dong JJ, Evans C, Frederickson KM, Flicek P, Florea L, Folkerts O, Groenen MA, Harkins TT, Herrero J, Hoffmann S, Megens HJ, Jiang A, de Jong P, Kaiser P, Kim H, Kim KW, Kim S, Langenberger D, Lee MK, Lee T, Mane S, Marcais G, Marz M, McElroy AP, Modise T, Nefedov M, Notredame C, Paton IR, Payne WS, Pertea G, Prickett D, Puiu D, Qioa D, Raineri E, Ruffier M, Salzberg SL, Schatz MC, Scheuring C, Schmidt CJ, Schroeder S, Searle SM, Smith EJ, Smith

J, Sonstegard TS, Stadler PF, Tafer H, Tu ZJ, Van Tassell CP, Vilella AJ, Williams KP, Yorke JA, Zhang L, Zhang HB, Zhang X, Zhang Y, Reed KM. 2010. Multi-platform nextgeneration sequencing of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*): genome assembly and analysis. *PLoS biology*, 8, 10.1371/journal.pbio.1000475.

DIEA-MGAP (Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2021. [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2021. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 30 de setiembre 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/diea>. Descarga del Anuario 2021 en pdf: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>.

Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM. 2007. The high producing dairy cows and its reproductive performance. *Reproduction in domestic animals*, 42:17-23.

Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W, Tosser-Klopp G, Wang J, Yang S, Liang J, Chen W, JChen J, Zeng P, Hou Y, Bian C, Pan S, Li Y, Liu X, Wang W, Servin B, Sayre B, Zhu B, Sweeney D, Moore R, Nie W, Shen Y, Zhao R, Zhang G, Li J, Faraut T, Womack J, Zhang Y, Kijas J, Cockett N, Xu X, Zhao S, Wang J, Wang W. 2013. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature biotechnology*, 31:135-141.

Duncan RB, Carrig CB, Agerholm JS, Bendixen, C. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: Report of a case in the USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:333-336.

Federici MT, Branda-Sica A, Artigas R, Briano C, Dutra F, Llambí S. 2018. High-resolution melting (HRM) curve análisis: New approach used to

- BLAD and DUMPS in Uruguayan Holstein breed. *Archives of Veterinary Science*, 23(4):1-9.
- Fritz S, Hoze C, Rebours E, Barbat A, Bizard M, Chamberlain A, Escoufflaire C, Vander Jagt C, Boussaha M, Grohs C, Allais-Bonnet A, Philippe M, Vallée A, Amigues Y, Hayes BJ, Boichard D, Capitan A. 2018. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 6220–6231. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14119>.
- Fritz S, Capitan A, Djari A, Rodriguez SC, Barbat A, Baur A, Grohs C, Weiss B, Boussaha M, Esquerré D, Klopp C, Rocha D, Boichard D. 2013. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS One*, 8:e65550. Pubmed reference: 23762392. DOI: 10.1371/journal.pone.0065550.
- Gabor M, Miluchova M, Trakovicka A, Riecka Z, Candrak J, Vavrisinova K. 2012a. Detection of complex vertebral malformation carriers in Slovak Holstein cattle by high resolution melting analysis. *Acta Veterinaria*, 62:239-248.
- Gabor M, Trakovicka A, Miluchova M, Kleknerová N. 2012b. The use of high resolution mlting for detection of the CAPN530 polymorphism in slovak simental bulls. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 45:155-159.
- Garritano S, Gemignani F, Voegle C, Nguyen-Dumont T, Le Calvez-Kelm F, De Silva D, Lesueur F, Landi S, Tavtigian SV. 2009. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics*, 10(5).
- Ghanem ME, Nishibori M, Isobe N, Hisaeda K. 2017. Detection of the APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy

herds. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1).

<https://doi.org/10.1111/rda.13081>.

Ghanem ME, Suzuki T, Kasuga A, Nishibori M. 2010. Effect of complex vertebral malformation on luteal function in Holstein cows during oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 729-733.

Gross JJ, Schwinn AC, Schmitz-Hsu F, Barenco A Neuenschwander TF, Drögemüller C, Bruckmaier RM. 2019. The APOB loss-of-function mutation of Holstein dairy cattle does not cause a deficiency of cholesterol but decreases the capacity for cholesterol transport in circulation. *Journal of Dairy Science*, 102:10564-10572. DOI: 10.3168/jds.2019-16852.

Gross JJ, Schwinn AC, Schmitz-Hsu F, Menzi F, Drögemüller C, Albrecht C, Bruckmaier RM. 2016. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls. *Journal of Animal Science*, 94:1761-1766. DOI: 10.2527/jas.2016-0439.

Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry*, 49:396-406.

Gustavsson I, Rockborn G. 1964. Chromosome Abnormality in Three Cases of Lymphatic Leukæmia in Cattle. *Nature*, 203:990.
<https://doi.org/10.1038/203990a0>.

Häfliger IM, Spengeler M, Seefried FR, Drögemüller C. 2022. Four novel candidate causal variants for deficient homozygous haplotypes in Holstein cattle. *Scientific Reports*, 12(1), 5435. doi: 10.1038/s41598-022-09403-6.

- Häfliger IM, Hofstetter S, Mock T, Stettler MH, Meylan M, Mehinagic K, Stokar-Regenscheit N, Drögemüller C. 2019. APOB-associated cholesterol deficiency in Holstein cattle is not a simple recessive disease. *Animal Genetics*, 50(4):372-375. doi: 10.1111/age.12801.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41:95-98.
- Hansen KD, Brenner SE, Dudoit S. 2010. Bases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic acids research* 38:e131.
- Hansen LB. 2000. Consequences of selection for milk yield from a Geneticist's viewpoint. *Journal of Dairy Science*, 83:1145–1150.
- Hastings N, Donn S, Derecka K, Flint AP, Woolliams JA. 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal Genetics*, 37:583-585.
- Hatem A, Bozdog D, Toland AE, Catalyurek UV. 2013. Benchmarking short sequence mapping tools. *BMC bioinformatics*, 14:184.
- Hayes BJ, Daetwyler HD, Fries R, Guldbbrandtsen B, Lund MS, Boichard DA, Stothard P, Veerkamp RF, Hulsege I, Rocha D, Van Tassell C, Mullaart E, Gredler B, Druet T, Bagnato A, Goddard M, Chamberlain A, 1000 Bull Genomes Consortium. 2013. The 1000 Bull Genomes Project - Toward Genomic Selection From Whole Genome Sequence Data In Dairy and Beef Cattle Plant Animal Genome XXI Conference. San Diego, CA (Abstract W150).
- Heather JM, Chain B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107:1-8.

- Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry*, 52, 494–503.
- Hung CC, Lee CN, Chang CH, Jong YJ, Chen CP, Hsieh WS, Su YN, Lin WL. 2008. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry*, 41:162-166.
- International Chicken Polymorphism Map Consortium. 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432, 717–722.
<https://doi.org/10.1038/nature03156>.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431:931-945.
- Jiang J, Ma L, Prakapenka D, VanRaden PM, Cole JB, Da Y. 2019. A large-scale genome-wide association study in U.S. Holstein cattle. *Frontiers in genetics*, 10, 412. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00412>.
- Jiang Y, Xie M, Chen W, Talbot R, Maddox JF, Faraut T, Wu C, Muzny DM, Li Y, Zhang W, Stanton JA, Brauning R, Barris WC, Hourlier T, Aken BL, Searle SMJ, Adelson DL, Bian C, Cam GR, Chen Y, Cheng S, DeSilva U, Dixen K, Dong Y, Fan G, Franklin IR, Fu S, Guan R, Highland MA, Holder ME, Huang G, Ingham AB, Jhangiani SN, Kalra D, Kovar CL, Lee SL, Liu W, Liu X, Lu C, Lv T, Mathew T, McWilliam S, Menzies M, Pan S, Robelin D, Servin B, Townley D, Wang W, Wei B, White SN, Yang X, Ye C, Yue Y, Zeng P, Zhou Q, Hansen JB, Kristensen K, Gibbs RA, Flicek P, Warkup CC, Jones HE, Oddy VH, Nicholas FW, McEwan JC, Kijas J, Wang J, Worley KC, Archibald AL, Cockett N, Xu X, Wang

- W, Dalrymple BP. 2014. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science* 344, 1168-1173.
- Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. 2017. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09:3.
- Kearney JF, Amer PR, Villanueva B. 2005. Cumulative discounted expressions of sire genotypes for the complex vertebral malformation and beta-casein loci in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 88:4426–4433.
- Kipp S, Segelke D, Schierenbeck S, Reinhardt F, Reents R, Wurmser C, Pausch H, Fries R, Thaller G, Tetens J, Pott J, Haas D, Raddatz BB, Hewicker-Trautwein M, Proios I, Schmicke M, Grünberg W. 2016. Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and increased juvenile mortality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 99:8915-8931. DOI: 10.3168/jds.2016-11118.
- Kipp S, Segelke D, Schierenbeck S, Reinhardt F, Reents R, Wurmser C, Pausch H, Fries R, Thaller G, Tetens J, Pott J, Piechotta M, Grünberg W. 2015. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Interbull Bull*, 49:49–53.
- Konersmann Y, Wemheuer W, Brenig B. 2003. Herkunft, verbreitung und bedeutung des CVM gendefekts in der Holstein Friesian population. *Züchtungskd*, 75:9-15.
- Kvam VM, Liu P, Si Y. 2012. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. *American Journal of Botany*, 99:248- 256.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K,

Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman

A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J, International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860-921.

Larkin DM, Daetwyler HD, Hernandez AG, Wright CL, Hetrick LA, Boucek L, Bachman SL, Band MR, Akraiko TV, Cohen-Zinder M, Thimmapuram J, Macleod IM, Harkins TT, McCague JE, Goddard ME, Hayes BJ, Lewin HA. 2012. Whole-genome resequencing of two elite sires for the detection of haplotypes under selection in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7693–7698.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1114546109>.

Li R, Fan W, Tian G, Zhu H, He L, Cai J, Huang Q, Cai Q, Li B, Bai Y, Zhang Z, Zhang Y, Wang W, Li J, Wei F, Li H, Jian M, Li J, Zhang Z, Nielsen R, Li D, Gu W, Yang Z, Xuan Z, Ryder OA, Leung FC, Zhou Y, Cao J, Sun X, Fu Y, Fang X, Guo X, Wang B, Hou R, Shen F, Mu B, Ni P, Lin R, Qian W, Wang G, Yu C, Nie W, Wang J, Wu Z, Liang H, Min J, Wu Q, Cheng S, Ruan J, Wang M, Shi Z, Wen M, Liu B, Ren X, Zheng H,

Dong D, Cook K, Shan G, Zhang H, Kosiol C, Xie X, Lu Z, Zheng H, Li Y, Steiner CC, Lam TT, Lin S, Zhang Q, Li G, Tian J, Gong T, Liu H, Zhang D, Fang L, Ye C, Zhang J, Hu W, Xu A, Ren Y, Zhang G, Bruford MW, Li Q, Ma L, Guo Y, An N, Hu Y, Zheng Y, Shi Y, Li Z, Liu Q, Chen Y, Zhao J, Qu N, Zhao S, Tian F, Wang X, Wang H, Xu L, Liu X, Vinar T, Wang Y, Lam TW, Yiu SM, Liu S, Zhang H, Li D, Huang Y, Wang X, Yang G, Jiang Z, Wang J, Qin N, Li L, Li J, Bolund L, Kristiansen K, Wong GK, Olson M, Zhang X, Li S, Yang H, Wang J, Wang J. 2010. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. *Nature*, 463:311-317.

Li Y, Chen W, Liu EY, Zhou YH. 2013. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection and Genotype Calling from Massively Parallel Sequencing (MPS) Data. *Statistics in biosciences*, 5:3-25.

Liebig BE, Bishop JV, McSweeney KD, Van Campen H, González-Berrios CL, Hansen TR, Thomas MG. 2022. Direct genomic value daughter pregnancy rate and services per conception are associated with characteristics of day-16 conceptuses and hormone signaling for maternal recognition of pregnancy in lactating Holstein cows. *Applied Animal Science*, 38:2.

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

Lindblad-Toh K, Wade C, Mikkelsen T, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L,

Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltsen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y,

- Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803–819. <https://doi.org/10.1038/nature04338>.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Llambí Dellacasa S, Arruga Laviña M. 2018. Selecciones de genética veterinaria I. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria: Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. ISBN 978-84-697-9330-5. [En línea] 7 de agosto 2022. Disponible en: https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23919/1/Selecciones_Genetica_Veterinaria.pdf.
- Lucy MC. 2001. Reproductive loss in highproducing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84:1277-1293.
- Ma L, Sonstegard TS, Cole JB, VanTassell CP, Wiggans GR, Crooker BA, Tan C, Prakapenka D, Liu GE, Da Y. 2019. Genome changes due to artificial selection in U.S. Holstein cattle. *BMC Genomics*, 20:1–14.
- Makanjuola BO, Maltecca C, Miglior F, Marras G, Abdalla EA, Schenkel FS, Baes CF. 2021. Identification of unique ROH regions with unfavorable effects on production and fertility traits in Canadian Holsteins. *Genetics, selection, evolution*, 30;53(1):68. doi: 10.1186/s12711-021-00660-z. PMID: 34461820; PMCID: PMC8406729.
- Makanjuola BO, Miglior F, Abdalla EA, Maltecca C, Schenkel FS, Baes CF. 2020. Effect of genomic selection on rate of inbreeding and

- coancestry and effective population size of Holstein and Jersey cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 103:5183–5199.
- Mao X, Sahana G, Johansson AM, Liu A, Ismael A, Løvendahl P, De Koning D, Guldbbrandtsen B. 2020. Genome-wide association mapping for dominance effects in female fertility using real and simulated data from Danish Holstein cattle. *Scientific Reports*, 10:1–9.
- McClure M, Bickhart D, Null D, VanRaden P, Xu L, Wiggans G, Liu G, Schroeder S, Glasscock J, Armstrong J, Cole JB, Van Tassell CP, Sonstegard TS. 2014. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive defects BH1, HH2 and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3. *PLoS ONE*, 9(3):e92769. doi: 10.1371/journal.pone.0092769.
- Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Ruprecht G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilbroste Pablo. 2013. Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*, 17, 1:141-152.
- Menzi F, Besuchet-Schmutz N, Fragnière M, Hofstetter S, Jagannathan V, Mock T, Raemy A, Studer E, Mehinagic K, Regenscheit N, Meylan M, Schmitz-Hsu F, Drögemüller C. 2016. A Transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 47(2):253-257. doi: 10.1111/age.12410.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*, 11:31-46.
- Meydan H, Yildiz MA, Agerholm JS. 2010. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase,

- complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:56.
- Miglior F. 2000. Impact of inbreeding – Managing a declining Holstein gene pool. In Proceedings of the 10th World Holstein Friesian Federation Conference, Sydney, Australia, 108–113.
- Minozzi G, Nicolazzi EL, Stella A, Biffani S, Negrini R, Lazzari B, Ajmone-Marsan P, Williams JL. 2013. Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle. *PLoS ONE*, 8:1–10.
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. 2004. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 50:1748-1754.
- Müller M, Berger J, Gersdorff N, Cecconi F, Herken R, Quondamatteo F. 2005. Localization of APAF1 gene expression in the early development of the mouse by means of in situ reverse transcriptase polymerase chain. *Developmental Dynamics*, 234:215–21. doi: 10.1002/dvdy.20534.
- Nagahata H, Oota H, Nitani A, Oikawa S, Higuchi H, Nakade T, Kurosawa T, Morita M, Ogawa H. 2002. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64:1107-1112.
- National Center for Biotechnology Information. *ARS-UCD1.2 Assembly* (National Center for Biotechnology Information, 2018). [En línea]. 12 de agosto 2022. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.1/
- Nicholas FW, Hobbs M. 2014. Mutation discovery for Mendelian traits in nonlaboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Animal Genetics*, 45:157- 170.

- Norman HD, Miller RH, Wright JR, Hutchison JL, Olson KM. 2012. Factors associated with frequency of abortions recorded through Dairy Herd Improvement test plan. *Journal of Dairy Science*, 95(7):4074-4084.
- Oltenacu PA, Algers B. 2005. Selection for increased production and the welfare of dairy cows. *Ambio*, 34:311-315.
- Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). 2011. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. [En línea]. 6 de agosto 2022.
<https://www.omia.org/home/>.
- Pereira I, Laborde D, Carriquiry M, López Villalobos, N, Meikle A. 2010. Productive and reproductive performance of Uruguayan Holstein and Uruguayan Holstein x New Zealand Holstein Friesian cows in a predominantly pasture based system. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production*, 70: 306-310.
- Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR; Agencourt Sequencing Team, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schäffer AA, Agarwala R, Narfström K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G; NISC Comparative Sequencing Program, O'Brien SJ. 2007. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Research*, 7(11):1675-89.
doi:10.1101/gr.6380007.
- Pryce JE, Woolaston R, Berry DP, Wall E, Winters M, Butler R, Shaffer M. 2014. World trends in dairy cow fertility. In *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, 10:6.
- Pryce JE, Bolormaa S, Chamberlain AJ, Bowman PJ, Savin K, Goddard ME, Hayes BJ. 2010. A validate genome-wide association study in 2 dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. *Journal of Dairy Science*, 93(7):3331-3345.

- Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL. 2004. Fertility in the high producing dairy cow. *Livestock Production Science*, 86:125-135.
- Rajala-Schultz PJ, Frazer GS. 2003. Reproductive performance in Ohio dairy herd in the 1990s. *Animal Reproduction Science*, 76:127-142.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8:597-608.
- Revell S. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Veterinary Record*, 149:659-660.
- Reynolds EGM, Neeley C, Lopdell TJ, Keehan M, Dittmer K, Harland CS, Couldrey C, Johnson TJJ, Tiplady K, Worth G, Walker M, Davis SR, Sherlock RG, Carnie K, Harris BL, Charlier C, Georges M, Spelman RJ, Garrick DJ, Littlejohn MD. 2021. Non-additive association analysis using proxy phenotypes identifies novel cattle syndromes. *Nature Genetics*, 53(7):949-954. doi:10.1038/s41588-021-00872-5.
- Rilanto T, Reimus K, Orro T, Emanuelson U, Viltrop A, Mõtus K. 2020. Culling reasons and risk factors in Estonian dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 16:173.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña FJ. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70(8):1242-50. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.007.
- Rosen BD, Bickhart DM, Schnabel RD, Koren S, Elsik CG, Tseng E, Rowan TN, Low WY, Zimin A, Couldrey C, Hall R, Li W, Rhie A, Ghurye J, McKay SD, Thibaud-Nissen F, Hoffman J, Murdoch BM, Snelling WM, McDanel TG, Hammond JA, Schwartz JC, Nandolo W, Hagen DE, Dreischer C, Schultheiss SJ, Schroeder SG, Phillippy AM, Cole JB, Van Tassell CP, Liu G, Smith TPL, Medrano JF. 2020. De novo

- assembly of the cattle reference genome with single-molecule sequencing. *Gigascience*, 9(3), giaa021.
doi:10.1093/gigascience/giaa021.
- Rougemont J, Naef F. 2012. Computational analysis of protein-DNA interactions from ChIP-seq data. *Methods in molecular biology*, 786:263-273.
- Royal M, Mann GE, Flint APF. 2000. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 160:53-60.
- Rusc A, Kaminski S. 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 48:247-252.
- Sahana G, Guldbbrandtsen B, Thomsen B, Lund MS. 2013. Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle. *Animal Genetics*, 44:620-626.
<https://doi.org/10.1111/age.12053>.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463-5467.
- Santos S, Marques V, Pires M, Silveira L, Oliveira H, Lança V, Brito D, Madeira H, Esteves JF, Freitas A, Carreira IM, Gaspar IM, Monteiro C, Fernandes AR. 2012. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Medical Genetics*, 13(17):1.13.
- Sargolzaei M, Chesnais JP, Schenkel FS. 2014. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. *BMC Genomics*, 15:478.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19: R227-40.

- Schloss JA. 2008. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nature biotechnology*, 26:1113-1115.
- Schütz E, Wehrhahn C, Wanjek M, Bortfeld R, Wemheuer WE, Beck J, Brenig B. 2016. The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TFB1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *PLoS One*, 11(6): e0154602. DOI: 10.1371/journal.pone.0154602.
- Seegers H, Beaudeau F, Fourichon C, Bareille N. 1998. Reasons for culling in French Holstein cows. *Preventive veterinary medicine*, 36:257–271.
- Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME. 1992. Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA - Comparison with the Human and Murine Glycoproteins Gene 114:267-271. Pubmed reference:1351021.
- Sonstegard TS, Cole JB, VanRaden PM, Van Tassell CP, Null DJ, Schroeder SG, Bickhart D, McClure MC. 2013. Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PLoS ONE*, 8:e54872.
- Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research*, 16:97-105.
- Tiezzi F, Maltecca C, Penasa M, Cecchinato A, Chang YM, Bittante G. 2011. Genetic analysis of fertility in the Italian Brown Swiss population using different models and traits definitions. *Journal of Dairy Science*, 94(12):6162-6172.
- Tindall E, Petersen D, Woodbridge P, Schipany K, Hayes VM. 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Human Mutation*, 30:876–883.

- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of nextgeneration sequencing technology. *Trends in genetics*, 30:418-426.
- VanRaden P, Null D. 2015. Holstein haplotype for cholesterol deficiency (HCD). [En línea]. 12 de Agosto 2022. Disponible en: https://queries.uscdcb.com/reference/changes/HCD_inheritance.pdf.
- VanRaden PM, Null DJ, Sonstegard TS, Adams HA, Van Tassell CP, Olson KM. 2012. Fine mapping and discovery of recessive mutations that cause abortions in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(2): Abstract.
- VanRaden PM, Null DJ, Olson KM, Hutchison JL. 2011a. Reporting of haplotypes with recessive effects on fertility. *Interbull Bulletin*, 44: 117–121.
- VanRaden PM, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL. 2011b. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*, 94:6153–6161.
- VanRaden PM, Sanders AH, Tooker ME, Miller RH, Norman HD, Kuhn MT, Wiggans GR. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87(7):2285–2292. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70049-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70049-1).
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M,

Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Deslattes Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C,

- Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291:1304-1351.
- Vorkas PA, Christopoulos K, Kroupis C, Lianidou ES. 2010. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. *Clinical Biochemistry*, 43:178-185.
- Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30:860-866.
- Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, Lear TL, Adelson DL, Bailey E, Bellone RR, Blöcker H, Distl O, Edgar RC, Garber M, Leeb T, Mauceli E, MacLeod JN, Penedo MC, Raison JM, Sharpe T, Vogel J, Andersson L, Antczak DF, Biagi T, Binns MM, Chowdhary BP, Coleman SJ, Della Valle G, Fryc S, Guérin G, Hasegawa T, Hill EW, Jurka J, Kialainen A, Lindgren G, Liu J, Magnani E, Mickelson JR, Murray J, Nergadze SG, Onofrio R, Pedroni S, Piras MF, Raudsepp T, Rocchi M, Røed KH, Ryder OA, Searle S, Skow L, Swinburne JE, Syvänen AC, Tozaki T, Valberg SJ, Vaudin M, White JR, Zody MC; Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Whole Genome Assembly Team, Lander ES, Lindblad-Toh K. 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954):865-7.
doi:10.1126/science.1178158.

- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal reproduction science*, 123:127–138.
- Weigel KA. 2011. Haplotypes affecting fertility and their impact on dairy cattle breeding programs. [En línea]. 12 de agosto 2022. Disponible en: https://www.holsteinusa.com/pdf/haplotypes_affecting_fertility_080511.pdf.
- Wetterstrand KA. 2021. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). [En línea]. 3 de junio 2022. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
- White H, Potts G. 2006. Mutation scanning by high resolution melt análisis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory (Wessex, 2006). [En línea]. 12 de agosto 2022. Disponible en: <http://www.ngri.org.uk/Wessex/downloads.htm>.
- Wiggans GR, Cooper TA, Van Raden PM, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Simpson B. 2013. Technical note: Characteristics and use of the Illumina BovineLD and GeneSeek Genomic Profiler low-density bead chips for genomic evaluation. *Journal of Dairy Science*, 96 (2013):1258–1263. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6192>.
- Windsor PA, Agerholm JS. 2009. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Australian Veterinary Journal*, 87:5.
- Wittwer C, Hahn M, Kaul K. 2004. Eds. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications—quantification*, 223 pp. Springer-Verlag Berlin.

- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49:853-860.
- Wu X, Mesbah-Uddin M, Guldbbrandtsen B, Lund MS, Sahana G. 2019. Haplotypes responsible for early embryonic lethality detected in Nordic Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 102(12):11116-11123. doi:10.3168/jds.2019-16651.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, 94(6):739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81733-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81733-x).
- Zambianchi AR. 1999. Efectos genéticos en producción lechera. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28:1263-1267.
- Zenger KR, Khatkar MS, Cavanagh JAL, Hawken RJ, Raadsma HW. 2007. Genome-wide genetic diversity of Holstein Friesian cattle reveals new insights into Australian and global population variability, including impact of selection. *Animal Genetics*, 38:7–14.
- Zhang W, Chen J, Yang Y, Tang Y, Shang J, Shen B. 2011. A practical comparison of de novo genome assembly software tools for next-generation sequencing technologies. *PloS one*, 6:e17915.
- ZhiLing L, XiaoWei W, Wei K, DaoZhong Z, ZhongYong L, ZengRong C, Guo XiaoFeng G. 2015. Establishment and application of TaqMan real-time PCR to detect the complex vertebral malformation in Holstein cattle. *Journal of South China Agricultural University*, 36(5):26-30.

12. **ANEXOS**

12.1. **ANEXO 1: IDENTIFICATION OF HOLSTEIN COWS
CARRIERS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION
BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVES (HRM)**

IDENTIFICATION OF HOLSTEIN COWS CARRIERS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVES (HRM)

(Identificação de vacas holandesas portadoras da malformação vertebral complexa através de curvas de dissociação de alta resolução – HRM)

Andrea Branda Sica¹, Paula Nicolini², María Teresa Federici¹, Sílvia Llambí³

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología;

²Universidad de La República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular; ³Universidad de La República, Facultad de Veterinaria, Sección Genética

Corresponding author: abranda@inia.org.uy

ABSTRACT: The objective of this study was the optimization and implementation of a reliable and economical molecular screening method for the detection of the mutant allele of CVM (complex vertebral malformation, c.559G>T, *SLC35A3*) by HRM analysis, as well as analyzing its existence in a representative sample of Holstein cows from the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay. The optimization of the HRM methodology in the *RotorGene*[™] 6000 equipment (Corbett Life Science, Australia) by amplification of the 79 bp PCR products clearly differentiated the two genotypes: homozygous, wild type: GG; and heterozygous, carrier for the mutation CVM: GT (c.559G>T; *SLC35A3*). In the analyzed sample, the frequency of the mutant allele (T) for CVM was high ($q = 0.032$), with a prevalence of carrier cows of 6.45%. It is concluded that the PCR-HRM analysis is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for the detection of this mutation in Holstein cattle, which may be implemented in genetic selection programs.

Keywords: CVM; high-resolution dissociation curve; Holstein.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi otimizar e implementar um sistema fiável e económico para a detecção molecular do alelo mutante CVM (malformação vertebral complexa; c.559G>T; *SLC35A3*) por meio da análise HRM, assim como analisar sua presença em uma amostra representativa de vacas Holandesas do Banco de ADN do Instituto Nacional de Pesquisa Agropecuária de Uruguai. A otimização da metodologia HRM no equipamento *RotorGene*[™] 6000 (Corbett Life Science, Austrália) através da amplificação dos produtos de PCR de 79 pb permitiu diferenciar os dois genótipos: o homocigoto de tipo selvagem (GG) e o heterocigoto que apresenta a mutação CVM (GT). Verificou-se que a frequência do alelo mutante (T) para CVM na amostra analisada foi alta, de $q = 0,032$, enquanto que a prevalência de vacas portadoras da mutação foi 6,45%. Concluiu-se que a análise por PCR-HRM é uma técnica rápida, facilmente interpretável, de baixo custo e alta precisão para a detecção dessa mutação no gado Holandês, que poderia ser implementada em programas de seleção genética.

Palavras-chave: Curvas de dissociação de alta resolução; CVM; Holandês.

Recebido em 18/03/2019

Aprovado em 28/08/2019

INTRODUCTION

Complex vertebral malformation (CVM, OMIA 001340-9913) is a recessive autosomal disease that causes miscarriages and perinatal problems. The single site mutation causing this disease is a substitution of Guanine (G) by Thymine (T) in the position 559 of exon 4 of gene *SCL35A3* (c.559G>T; Thomsen *et al.*, 2006), which plays an essential role in the development of the axial skeleton. This gene codes the UDP-N-acetylglucosamine transporter, and the mutation replaces a valine with a phenylalanine (V180F) at position 180 (Rusc and Kaminski, 2007). Thereof, the defective transporter molecule leads to vertebral malformations (Thomsen *et al.*, 2006). VanRaden *et al.* (2011) confirmed that this mutation is located in position 43.412.427 bp of chromosome 3.

This disease was reported by Danish scientists as from 2000 (Agerholm *et al.*, 2001; 2004), and its origin could be traced to the elite American bull *Carlin-M Ivanhoe Bell*, who received the lethal recessive mutation of the CVM disease from his father, *Penstate Ivanhoe Star* (Revell, 2001; Chu *et al.*, 2008). Due to the superior performance of his daughters at lactation, this bull was worldwide widely used for the raising of dairy cattle (Agerholm, 2007; Windsor and Agerholm, 2009; Agerholm *et al.*, 2004). Among the bulls used for artificial insemination, CVM carrier animals were identified with a very high prevalence (10-30 %) in several countries (Kearney *et al.*, 2005; Citek *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2006). Since then, the disease and several CVM carriers have been identified in other countries (Revell, 2001; Duncan *et al.*, 2001; Nagahata *et al.*, 2002; Konersmann *et al.*, 2003; Berglund *et al.*, 2004; Rusc and Kaminski, 2007; Chu *et al.*, 2008).

The high resolution melting curves analysis (HRM) is a simple and economic method, performed in closed tubes, for the analysis of PCR products (Wittwer *et al.*, 2003). This method is based in the melting behavior of PCR products (Reed *et al.*, 2007). It shows a high sensitivity and specificity with PCR products smaller than 400 bp long (Reed *et al.*, 2007). HRM has been widely used for genotyping and screening of mutations, both in human (Montgomery *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2008; Vossen *et al.*, 2009; Vorkas *et al.*, 2010) and animal health, particularly in cattle (Gabor *et al.*, 2012a and 2012b; Santos *et al.*, 2012; Federici *et al.*, 2018).

In Uruguay, the disease has not been diagnosed, and the mutant allele has not been reported in the general cattle herd. Hence, the purpose of this study consisted in the optimization and implementation of a reliable and economic molecular screening method for detection of the mutant CVM allele (c.559G>T; *SLC35A3*) by HRM analysis, as well as analyzing its presence in a representative sample of Holstein cows of the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

Samples and reference material:

The analyzed cattle consisted in a representative sample of 279 second-lactation Holstein cows of 6 commercial dairy farms from different regions of Uruguay. The DNA of these samples is stored in the Milk Genomic DNA Bank of Uruguay of the Biotechnology Unit of the INIA Las Brujas as reference material for future investigation projects (INML-UdelaR-INIA agreement).

DNA extraction, concentration and quality

Genomic DNA extraction and purification from fresh blood samples

was performed in 2008 in the Laboratory of Nuclear Techniques (Faculty of Veterinary, UdelaR) according to the salting-out and proteinase K digestion protocol described by Miller *et al.* (1988). DNA concentration was assessed with nanodrop at 260 nm (NanoDrop 8000 spectrophotometer, Thermo Scientific), and DNA quality was assessed by means of the OD260/OD280 relationship, between 1.8 and 2.0.

Optimization of genotyping by real-time PCR-HRM and data analysis

In order to identify the mutant allele of the CVM disease (c.559G>T; SLC35A3), optimization of genotyping was performed by real-time PCR applying HRM in the RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science, Australia) equipment. 79 bp PCR products were amplified with the primers described by ZhiLing *et al.* (2015). PCR reactions were carried out on a final volume of 25 µl with 50 ng of genomic DNA, 1X HRM-PCR Master Mix (kit Type-it® HRM-PCR, QiAGEN, Hilden, Germany), and 0.7 µ of each primer (forward and reverse). The cycling program consisted in an initial denaturation of 10 min at 95 °C, 40 cycles of 5 s at 95 °C, 25 s at 60 °C and 20 s at 72 °C, and two holds of 10 s at 95 °C and 1 min at 45 °C, respectively. The annealing temperature was adjusted to 60 °C with the activation of the fluorescence data in the green channel (excitation: 470 nm; detection: 510 nm). The HRM phase was adjusted with 0.1 °C increments, with a 2 s retention in each increment from 74.5 to 84.5 °C, with the acquisition of the fluorescence data in the green channel of HRM (excitation: 480 nm; detection: 510 nm). Analyses of the HRM curve were performed with the Rotor-Gene Q vers. 2.3.1 (Build 49) software and the provided HRM algorithm. The predetermined normalization regions for the CVM single site mutation (c.559G>T; SLC35A3) were applied. HRM data were

viewed as normalized HRM curves and normalized difference graphs for the GG genotypes (homozygous, wild type) and GT (homozygous, carrier of the mutation). Genotypes of unknown samples were automatically assigned by the Rotor-Gene HRM software. The confidence threshold for accepting the genotype assigned by the software was 90%. In addition, in order to confirm the precision of genotypes by HRM, 25 DNA samples were selected at random and send to the Instituto de Genética Veterinaria of the Universidad Nacional de la Plata (IGEVET-CONICET, UNLP, La Plata, Argentina) to be genotyped with the low density panel microarray ArBos1 50K of the Affymetrix platform. Allelic and genotypic frequencies were calculated by direct counting according to the method of Nei (1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1 and 2 show the results of the HRM analysis of gene SLC35A3. The Rotor-Gene HRM software automatically assigned the genotypes for the mutant CVM allele (c.559G>T; SLC35A3) according to the differences in the pattern of the melting curve and the melting temperature (T_m) of heterozygous and wild type homozygous. Figure 1 shows the different patterns of the single site mutation G for T, showing the two genotypes. Violet curves correspond to the wild type homozygous, and the green one to the heterozygous for the mutation (that is, a normal G allele, and a mutated T allele). The HRM methodology permitted to clearly differentiate the two genotypes of the mutant CVM allele (c.559G>T; SLC35A3). Figure 2 shows the difference curves obtained with the HRM analysis; these curves can be differentiated by comparing the shape of the difference curves based in the

genotypes with those of the CVM (c.550G>T; *SLC35A3*) carriers, which are taken as reference, clearly identifying the two genotypes: wild type homozygous (GG, violet), and heterozygous CVM carriers (GT, green). Figure 3 shows the melting curves of the negative derivatives (-dF/dT) generated from unprocessed data of the HRM analysis. The peak values were 78.75 °C for allele G, and 77.05 °C for allele T. The melting curves of the negative derivatives (-dF/dT) of the heterozygous genotype were identified by peaks with a value of 78.75 °C (Figure 3).

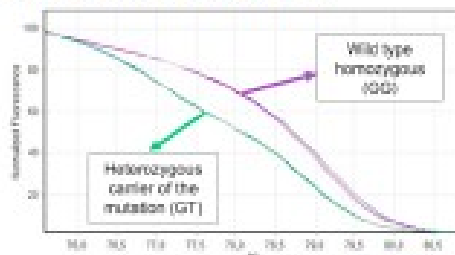


Figure 1. Graph with the normalization of the high resolution melting pattern: normalized denaturation curves obtained with the HRM analysis. Y-axis: normalized fluorescence; X-axis: temperature (°C). The graph shows three genetic materials of each genotype.

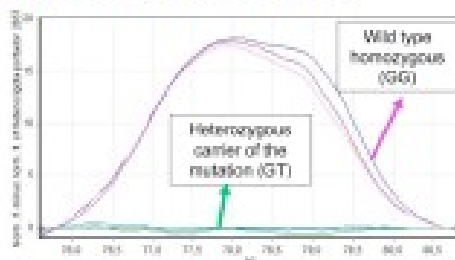


Figure 2. Graph of differences between genotypes: difference curves obtained with the HRM analysis. Y-axis: normalized fluorescence; X-axis: temperature (°C). The graph shows three genetic materials of each genotype.

The HRM analysis has the disadvantage of its sensitivity to the residues of different DNA extraction methods, which may lead to melting curves with subtle differences that, in

some cases, may cause an increase in the number of false positives (White and Potts, 2006). This was seen in the 8 groups from different dairy farms, maybe due to the fact that DNA was extracted by different operators or laboratories. Nevertheless, low quality samples can be easily identified and excluded from subsequent analyses if the PCR reaction is subjected to real time monitoring. Hence, for a HRM reaction, it is necessary to use the same bleeding (for fresh or coagulated blood) and DNA extraction procedures for all the samples.

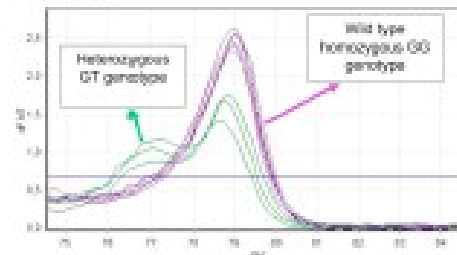


Figure 3. Negative derivative of the fluorescence melting curves at temperature (-dF/dT) for the homozygous wild type (GG) and heterozygous (GT) genotypes. The graph shows the material of three heterozygous (GT) and six homozygous (GG) genotypes.

The comparisons of the shapes and difference graphs of the melting curves of negative derivatives (-dT/dF) allowed the detection of two different CVM genotypes. CVM carriers (GT genotypes) were detected by two peaks for each G and T allele (78.75 and 77.05 °C respectively). In Gabor *et al.* (2012a), the melting point of the CVM carriers was lower than that of non-carrier animals (78.15 °C and 79.42 °C, respectively). HRM analysis permits to detect single base variations by comparing the melting curves of PCR products with the selection curve of a reference or control sample. The main advantages of HRM analysis when compared with gel-based methods are its lower cost, minimal labor, lesser time,

and reduction of the risk of contamination of the PCR reaction, the latter due to the fact that, unlike digestion with restriction enzymes or gel visualization, in HRM analysis it is not necessary to manipulate the sample after PCR (Tindall *et al.*, 2009).

This study optimized the HRM analysis protocol as a simple, fast, and reliable genotyping method for CVM disease in Holstein cattle. The first step consisted in finding the control samples for the CVM mutation in the SLC35A3 gene. A preliminary HRM analysis with 25 DNA samples detected 3 control samples carriers of the mutation for the corresponding gene. As there were no CVM positive controls (sick homozygous), we used the ArBos1 genotyping service for identification and isolation of control samples carriers of the CVM mutation, these samples with known genotypes were used as controls for the HRM analysis. The need of using an alternative genotyping method before HRM is one of the main limitations of the PCR-HRM technique. In addition, primers were selected from those amplicons with the smallest possible size. For this study we used the primers used in ZhiLing *et al.* (2015) for real-time PCR with TaqMan probes: the 79 bp long amplicon amplified for the HRM analysis described in this study. The GC content of the forward and reverse primers used in this study ranged between 40 and 60 %; this was a proper content (45.5 and 47.8 %, respectively), as neither non-specific amplifications nor primer dimers were observed; thus validating the primer design of ZhiLing *et al.* (2015) for HRM analysis. The reduction of amplicon size increases the difference of the signal emitted at a given temperature between two sequences differing in just one nucleotide position. Genotypic differences are more clearly visible with smaller amplicons (Gundry *et al.*, 2003).

Heterozygotes can be identified by a modification in the shape of the melting curve, while homozygotes are identified by a modification in the melting temperature (T_m) (Liew *et al.*, 2004).

Both the 3 DNAs of the heterozygous genotype (carrier of the mutation) and the 22 DNAs of the wild type homozygous genotype were confirmed by genotyping with the ArBos1 50K SNP panel; these were used as controls for carriers of the mutant allele for assignation of genotypes in HRM analyses with the Rotor-Gene Q program. Both the genotyping data of ArBos1 and the HRM analyses of the SLC35A3 gene confirmed the assigned genotype for all samples. The single site mutation of gene SLC35A3 influences the melting pattern (T_m) of PCR products, generating different high resolution melting curves that permit genotype differentiation and identification by HRM analysis.

In 18 cows of the analyzed sample, it was detected a mutant CVM allele (T) (c.559G>T; SLC35A3), with a confidence interval greater than 90 %. These results obtained are shown in Table 1. As a first report for molecular diagnosis of CVM, this study found a high frequency ($q = 0.032$) of the mutant CVM allele (c.559G>T; SLC35A3) in the analyzed sample, with a prevalence of 6.45 % of carrier cows. Both the frequency of the mutant allele and the prevalence of CVM carriers of this study were high when compared with those of the cows of Turkey ($q = 0.01$ and 3.4%, respectively, Meydan *et al.*, 2010). Nevertheless, the prevalence was low when compared with other countries, such as Denmark (31.0%, Thomsen *et al.* 2006), Poland (24.8%, Rusc and Kaminski, 2007), Japan (32.5%, Nagahata *et al.*, 2002), Sweden (23.0%, Berglund *et al.*, 2004), and Germany (13.2%, Konersmann *et al.*, 2003). The

reason for these differences may be due to the fact that there are samples from different populations, that is, cattle from different regions, although it may also be influenced by the use, over time, of semen from bulls carriers of the mutation. Approximately since the turn of the century, most countries have developed improvement programs to

decrease the frequency of CVM carriers in the cattle population (Rusc and Kaminski, 2007). Nevertheless, In Japan, Ghanem *et al.* (2008) found 28 CVM carriers in 200 Holstein cows (13.0 %). Hence, the frequency of CVM carriers seems to continue to be high in some Holstein populations.

Table 1 - Number of carriers, distributions of mutant allele frequency, and prevalence of complex vertebral malformation carriers in the six sampled farms of different regions of Uruguay.

Farm	Sample size (call rate >0.80)	Number of carriers	Prevalence of carriers (%)	Mutant allele frequency (q)
"A"	56	7	12.5	0,063
"V"	63	7	11.11	0,056
"L"	63	1	1.59	0,008
"G"	16	2	12.5	0,063
"M"	28	0	0	0,000
"B"	53	1	1.89	0,009
TOTAL	279	18	6.46	0,032

In this study, the first report on CVM in Uruguay, it was possible to clearly identify two different genotypes for the CVM mutation (c.559G>T; SLC35A3) with the PCR-HRM procedure, thus validating it for genotyping in cattle.

CONCLUSIONS

The PCR-HRM analysis here in described provides an alternative approach for genotyping of mutant alleles in cattle. The HRM application is a fast, easily interpretable, low-cost, and highly precise procedure for the detection of the mutant allele (T) of gene SLC35A3, allowing the genotyping of great volumes of cattle for the CVM disease. The high prevalence of CVM carriers observed in the reference population of Uruguayan Holstein cattle justifies the need of implementing

strategies for a gradual elimination of the mutant disease in dairy herd.

ACKNOWLEDGMENTS

The results of this publication are part of the research funded by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación of Uruguay under code POS_NAC_2017_1_141239.

Genotyping of the *ArBos1* was financed by the Unidad de Biotecnología of INIA Las Brujas (through Marco Dalla Rizza, PhD) and the Plataforma de Salud Animal of INIA La Estanzuela (Federico Giannitti, PhD). To BS Beatriz Carracelas, of the Banco de ADN Genómico Animal of INIA Las Brujas, for assisting with the access and supply of the DNA samples of the Holstein cows. To Pablo Mones, B.S. in Biology & BA in Translation, for the translation into English.

REFERENCES

- AGERHOLM, J.S. Inherited disorders in Danish cattle. *APMIS Supplementum*, v.115, n.122, p.1-76, 2007.
- AGERHOLM, J.S.; BENDIXEN, C.; ANDERSEN, O. et al. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.283-289, 2001.
- AGERHOLM, J.S.; BENDIXEN, C.; ARNBJERG, J. et al. Morphological variation of "complex vertebral malformation" in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.16, p.548-553, 2004.
- BERGLUND, B.; PERSSON, A.; STALHAMMAR, H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.45, p.161-165, 2004.
- CHU, Q.; SUN, D.; YU, Y. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, p.228-230, 2008.
- CITEK, J.; REHOUT, V.; HAJKOVA J. et al. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Veterinární medicína*, v.51, p.333-339, 2006.
- DUNCAN, R.B.; CARRIG, C.B.; AGERHOLM, J.S. et al. Complex vertebral malformation in a Holstein calf. Report of a case in the USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.333-336, 2001.
- FEDERICI, M.T.; BRANDA SICA, A.; ARTIGAS, R. et al. High-resolution melting (HRM) curve analysis: New approach used to BLAD and DUMPS in Uruguayan Holstein breed. *Archives of Veterinary Science*, v.23, n.4, p.01-09, 2018.
- a.- GABOR, M.; MILUCHOVA, M.; ANNA, T. et al. Detection of complex vertebral malformation carriers in Slovak Holstein cattle by high resolution melting analysis. *Acta Veterinaria*, v.62, p.239-248, 2012.
- b.- GABOR, M.; TRAKOVICKA, A.; MILUCHOVA, M. et al. The use of high resolution melting for detection of the CAPN530 polymorphism in slovak simental bulls. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.45, p.155-159, 2012.
- GHANEM, M.E.; AKITA, M.; SUZUKI, T. et al. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. *Animal Reproduction Science*, v.103, p.348-354, 2008.
- GUNDRY, C.N.; VANDERSTEEN, J.G.; REED, G.H. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry*, v.49, p.396-406, 2003.
- HUNG, C.C.; LEE, C.N.; CHANG, C.H. et al. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry*, v.41, p.162-166, 2008.
- KEARNEY, J.F.; AMER, P.R.; VILLANUEVA, B. Cumulative discounted expressions of sire genotypes for the complex vertebral malformation and beta-casein loci in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.4426-4433, 2005.
- KONERSMANN, Y.; WEMHEUER, W.; BREINIG, B. Herkunft, verbreitung und bedeutung des CVM gendefekts in der Holstein Friesian population. *Züchtungskd*, v.75, p.9-15, 2003.
- LIEW, M.; PRYOR, R.; PALAIS, R. et al. Genotyping of single-nucleotide

- polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, v.50, p.1158-1164, 2004.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.12, p.319-325, 1988.
- MONTGOMERY, J.; WITWERT, C.T.; PALAIS, R. et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, v.50, p.1748-1754, 2004.
- NAGAHATA, H.; OOTA, H.; NITANAI, A. et al. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, p.1107-1112, 2002.
- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Nueva York, Columbia University Press, 1987. 512 p.
- ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2011. Available in: <http://omia.angis.org.au/>
- REED, G.H.; KENT, J.O.; WITWERT, C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, v.8, p.597-608, 2007.
- REVELL, S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Veterinary Record*, v.149, p.659-660, 2001.
- RUSC, A.; KAMINSKI, S. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, v.48, p.247-252, 2007.
- SANTOS, S.; MARQUES, V.; PIRES, M. et al. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Medical Genetics*, v.13, n.17, p.1.13, 2012.
- THOMSEN, B.; HORN, P.; PANITZ F. et al. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research*, v.16, p.97-105, 2006.
- TINDALL, E.; PETERSEN, D.; WOODBRIDGE, P. et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Human Mutation*, v.30, p.876-883, 2009.
- VANRADEN, P.M.; OLSON, K.M.; NULL D.J. et al. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.6153-6161, 2011.
- VORKAS, P.A.; CHRISTOPOULOS, K.; KROUPIS, C. et al. Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. *Clinical Biochemistry*, v.43, p.178-185, 2010.
- VOSSEN, R.H.; ATEN, E.; ROOS, A. et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation*, v.30, p.860-866, 2009.
- WHITE, H; POTTS, G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory (Wessex, 2006). (<http://www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm>)
- WINDSOR, P.A.; AGERHOLM, J.S. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.87, p.5, 2009.
- WITWERT, C.T.; REED, G.H.; GUNDRY, C.N. et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis

using LCGreen. *Clinical Chemistry*, v.49, p.853-860, 2003.

WOUDA, W.; VISSER, I.J.; BORST, G.H. et al. Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in The Netherlands. *Veterinary Record*, v.147, p. 612, 2000.

ZHILING, L.; XIAOWEI, W.; WEI, K. et al. Establishment and application of TaqMan real-time PCR to detect the complex vertebral malformation in Holstein cattle. *Journal of South China Agricultural University*, v.36, n.5, p.28-30, 2015.

**12.2. ANEXO 2: OPTIMIZATION OF REAL-TIME PCR-MELTING
FOR DETECTION OF THE CHOLESTEROL-DEFICIENCY
MUTATION IN HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE**

Optimization of Real-Time PCR-melting for detection of the Cholesterol-deficiency mutation in Holstein Friesian cattle

Optimización de PCR en tiempo real con curvas de disociación para la detección de la mutación causante de deficiencia de colesterol en bovinos Holando

Andrea Branda-Sica¹, Paula Nicolini², Rody Artigas³, María Teresa Federici³ y Silva Llambí³

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Canelones, Uruguay.

²Universidad de la República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular, Tacuarembó, Uruguay.

³Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Unidad Académica de Genética y Mejora Animal, Montevideo, Uruguay.

*Email: abranda@inla.org.uy

ABSTRACT

The purpose of this study was to optimize a real-time PCR-melting analysis for reliable and economical detection of the 7.5 Kb mutant insert of the BoERVK bovine transposable element in exon 5 of the Apolipoprotein B (APOB) gene, which causes cholesterol deficiency - CD - (OMIA 001965-9913). This technique was also used to perform a preliminary molecular screening to detect this mutation in a DNA sample of Holstein Friesian cows (HFC) of six commercial dairy farms from different regions of Uruguay. By amplifying the 170 and 146 bp PCR products, two genotypes were clearly identified: homozygote (wild type wt/wt) and heterozygote (carrier of the CD mutation: MUT/wt). The homozygous wt/wt genotype was detected in the representative sample of 103 HFC. It is concluded that Real-Time PCR-melting analysis is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for detecting this mutation, which can be implemented in genetic selection programs to prevent the spread of the disease in HFC.

Key words: Cholesterol deficiency; Holstein Friesian; real-time PCR-melting

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue optimizar un análisis mediante PCR en tiempo real con curvas de disociación para la detección confiable y económica del inserto mutante de 7,5 Kb del elemento transponible bovino BoERVK en el exón 5 del gen de la Apolipoproteína B (APOB), determinante de la deficiencia de colesterol - CD - (OMIA 001965-9913). Asimismo, aplicando esta técnica se realizó un cribado molecular preliminar para determinar la presencia de esta mutación en una muestra de ADN de vacas Holando (H) pertenecientes a seis tambos o fincas comerciales de diferentes regiones del Uruguay. A partir de la amplificación de los productos de PCR de 170 y 146 pb se logró distinguir claramente dos genotipos: homocigota (tipo silvestre wt/wt) y heterocigota (portador de la mutación CD: MUT/wt). El genotipo homocigota wt/wt fue detectado en la muestra representativa de 103 vacas H. Se concluye que el análisis mediante PCR en tiempo real con curvas de disociación es una técnica rápida, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente precisa para la detección de esta mutación, el cual puede ser implementado en programas de selección genética para evitar la propagación de la enfermedad en bovinos H.

Palabras clave: Deficiencia de colesterol; Holando; PCR en tiempo real con curvas de disociación

INTRODUCTION

Cholesterol deficiency – CD – (OMIA 001960-9903) [19] is caused by a loss-of-function mutation in the Apolipoprotein B (APOB) gene, which is necessary for liver lipid metabolism, steroid biosynthesis, and cholesterol absorption in the small intestine [17]. The APOB mutation influences cattle (*Bos taurus*) fertility, growth, and health [9]. CD disease is usually confused with other types of neonatal diarrhea [14]. The economic impact of CD is very important. A study in Germany calculated that 3,400 recessive homozygous calves were born per year, resulting in an annual economic loss of approximately € 1.3 million [13]. Furthermore, in the United States of America (USA), annual losses due to that disease were calculated at USA\$ 1.7 million [3]. In addition to severe diarrhea, affected calves have hypocholesterolemia and usually die within the first weeks (wk) to 6 months (mon) of life [14]. Some heterozygous calves showed reduced blood cholesterol concentrations, whereas in recessive homozygous blood cholesterol levels and triglyceride concentrations were virtually zero [9, 14, 21]. Gross et al. [8] found that low cholesterol concentrations associated with the APOB mutation in carriers are not due to primary CD at the cellular level, as the term 'CD' suggests, but a consequence of decreased cholesterol transport capacity in blood. These authors suggest that, despite the presence of the APOB mutation, cholesterol does not limit metabolic adaptation or yield in heterozygous Holstein Friesian cows (HFC) [8]. The origin of this disease was traced to the American sire Moughlin Storm, born in 1891 and widely used in the HF population worldwide [14, 23].

This disease is caused by a 1,289 base pairs (bp) insertion of a long transposable element (LTR_ERV2-1) between nucleotides 24 and 25 of exon 5 of the APOB gene [17]. This insertion causes a shift in the reading frame of the APOB gene that leads to the truncation of 97 % of the bovine APOB protein [17]. These findings were independently confirmed by other authors [4, 22]. This result was confirmed by Charlier [4], albeit he estimated the size of the insertion of the bovine endogenous retroviral element in exon 5 of the APOB gene in 7.5 Kb (BoERV); this leads to transcriptional termination and loss of protein function. Due to this, the protein was synthesized to only 3 % of its normal size.

Although molecular methods such as Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variants are currently applied to diagnose the CD-causing mutation [5, 12, 17, 22], there are no published studies in Uruguay on the application of these techniques for the accurate and effective detection of these transposable elements. The design of molecular diagnostic strategies for this mutation would be important for this country, in order to achieve immediate results regarding the control of this disease, since Briano-Rodríguez et al. [2] reported a prevalence of CD carriers of 2-01 %. In a population sample of HF calves using the GeneSeek Genomic Profiler – GGP – Bovine 50K genotyping panel. Hence, the purpose of this study was to optimize and implement a reliable and economical molecular screening procedure for the detection of the 7.5 Kb mutant insert (BoERVK) of the APOB gene through real-time PCR analysis with melting curve analysis (real-time PCR-melting), as well as to obtain preliminary results on its presence in a representative sample of HFC from the Dairy Cattle deoxyribonucleic acid (DNA) Genomic Bank of Uruguay.

MATERIALS AND METHODS

DNA samples and reference population

It worked with a representative sample of 103 second-lactation HFC of six commercial dairy farms from different Regions of Uruguay.

Genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) from these samples was stored in the Dairy Cattle DNA Genomic Bank of the Biotechnology Unit (INIA Las Brujas) as reference material for research projects (INIA-Udelar-INIA agreement). The extraction of these gDNA samples was initially performed from fresh blood samples at the Nuclear Techniques Laboratory (Facultad de Veterinaria, Udelar) in 2008 using a digestion procedure with proteinase K and salting-out [18].

For optimization of the real-time PCR-melting, two gDNA samples were used as reference controls for comparison with the patterns of the melting curves to be analyzed. These control samples corresponded to: (1) gDNA of a bull (ALTAlep 011H012338) diagnosed as a carrier of the CD mutation, and (2) gDNA of a bull (ALTABolero 011H011572) free of the disease; both from AltoGenetics company (Montevideo, Uruguay). These gDNA samples were extracted from semen with the QIAamp DNA mini kit, according to the manufacturer's protocol #2.

gDNA was quantified in the NanoDrop equipment (NanoDrop 8000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA), obtaining a range between 1.8 and 2.0 for the OD260/OD280 ratio. The quality of the gDNA samples was assessed by 1 % agarose gel electrophoresis in TBE 0.5X buffer [7].

Optimization of the genotyping of the BoERVK_APOB insertion with real-time PCR-melting

Real-time PCR reactions were performed in a RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science, Australia) on a final volume of 25 microliters per sample containing 50 nanograms of genomic DNA, IX NZY qPCR Green Master Mix (NZY Tech Genes & Enzymes, Portugal), and 0.5 microMol of each primer. A combination of three allele-specific primers designed by Charlier et al. [5] was used. This combination of primers discriminates the wild type from the mutated sequence and corresponds to a forward primer (F1-5' AAG GAG GCT GCA AAG CCA CCT AG 3') and two reverse primers (mutant R1-5' CCT TTG TCA CGA GTG GAA TGC CT 3'; and R2-5' CCT CTT GAT GTT GAG GAT GTG TT 3').

Dip tubes without gDNA were used as a negative control to identify the possible contamination of reagents and the possible formation of primer dimers in each PCR reaction mix.

The cycling program consisted of a 5 minutes (min) pre-hold at 95°C; and 40 cycles of 45 seconds (s) at 95°C, 40s at 95°C, and 40s at 72°C; with a 5 min stop-hold at 72°C. The annealing temperature was adjusted to 55°C, with activation of fluorescence data in the green channel (excitation 470; detection 510 nanometers – nm –). The melting peak was adjusted using T°C increments with a 5s retention for each increase from 75 to 95°C. Melting curve analyses were performed with the Rotor-Gene Q Series Software 2.3-1 (Build 48) of the RotorGene™ 6000 thermal cycler.

Electrophoresis was performed on a 3 % agarose gel in 0.5X TBE buffer [7]. In order to assess primer function and specificity, upon completion of the PCR reaction, the PCR products had the expected fragment size. The expected fragment sizes for each amplicon are 170 bp for the wild-type allele, and 146 bp and 120 bp for mutant alleles A and B, respectively.

Confirmation of results by sequencing and multiple sequence alignment

To confirm the sequence identity of the amplicons identified by real-time PCR-melting, 25 PCR samples were selected and sent for sequencing (Humanizing Genomics Macrogen, Seoul, Korea). Sequencing was performed using the primers of Charlier et al. [5].

The obtained sequences were analyzed by multiple alignment with a reference sequence for the *AP08* bovine gene (GeneID 494004, GenBank), using BioEdit free software [1].

RESULTS AND DISCUSSION

The FIG. 1 shows the denaturation curve (-dF/dT vs- temperature) of the amplicons obtained by real-time PCR for the *BoERVK-AP08* insertion in the analyzed genetic materials of each genotype. A peak was observed at 86.8°C for the homozygous wild type (wt/wt), and at 88°C for the heterozygous control, carrier of the CD mutation (MUT/wt). The homozygous wt/wt genotype was detected in the representative sample of 103 HFc.

Specialized real-time PCR thermal cyclers, such as the RotorGene™ 6000 used in this study was programmed to produce the melting curve after the amplification cycles have been completed. As the temperature increases, the double-stranded gDNA denatures to single-stranded gDNA, and the fluorophore molecules that had intercalated within the double-stranded gDNA at the end of amplification begin to separate from it as the temperature increases, leading to a decrease in fluorescence. The melting curve is obtained by derivation of the denaturation curve (fluorescence vs-temperature), which shows an increase in absorbance, intensity, and hyperchromicity during heating. The shape of this curve is related to the guanine-cytosine (GC) base content and the fragment size of the amplicons. The temperature value at which 50 % of the gDNA is denatured is called melting temperature (Tm) [6]. The Rotor-Gene Q Series Software 2.3-1 (Build 49) plots the derivative of fluorescence as a function of fluorescence (ordinates) vs- temperature (abscissae) in the plot. It can be seen a maximum peak corresponding to the Tm for each of the samples. The negative derivative plot of melting curves (-dF/dT) represents the rate of fluorescence change during the gDNA melting process and allows the identification of the Tm value by means of the temperature peaks [1].

For the samples analyzed in this work, the observation of a single temperature peak in the melting curve of each sample confirmed the specificity of the primers chosen to amplify the 146 bp mutant allele with a peak at 88°C, and the 170 bp wild type at 86.8°C. In this study, the primers of the mutant and wild type alleles had a GC content between 40 and 60 %, which was an adequate one (43.48 and 56.52 %, respectively) since no nonspecific amplifications or primer dimers were observed in the negative reaction control. Differences in the biological origin of the gDNA samples (blood vs- semen, in this case) caused the use of different DNA extraction protocols. This means that there may be differences in the chemical solutions used during the extraction process for each protocol, as well as in the contaminating residues that could remain in the final gDNA solution. Since real-time PCR equipment is highly sensitive to these differences in the conditions of the gDNA samples, differences could potentially be observed in the melting curves of amplicons that, despite having the same genotype, could be detected as different because their gDNA was extracted following different protocols [24].

However, in this work, it was not detected any effect of the gDNA extraction procedure on the melting dynamics of the amplicons, since the melting peak pattern (-dF/dT) of the disease-free control bull matched that of wild-type homozygous cows (FIG. 1). Furthermore, at the end of the PCR reaction, i.e., when the reaction reached the plateau phase, an inflection point was observed in the denaturation curve of the amplified product of the heterozygous control bull when compared with the curves of the disease-free control bull and wild type homozygous cows. Obtaining small amplicons increases the difference in the signals at a given temperature between two sequences differing in their nucleotide position from the start site of the *BoERVK* insertion element. Differences between genotypes are more clearly visible when amplicons are smaller in size [10]. The temperature and fluorescence resolution of the RotorGene™ 6000 equipment used in this study demonstrated the accuracy of the melting curves and their ability to differentiate different genotypes.

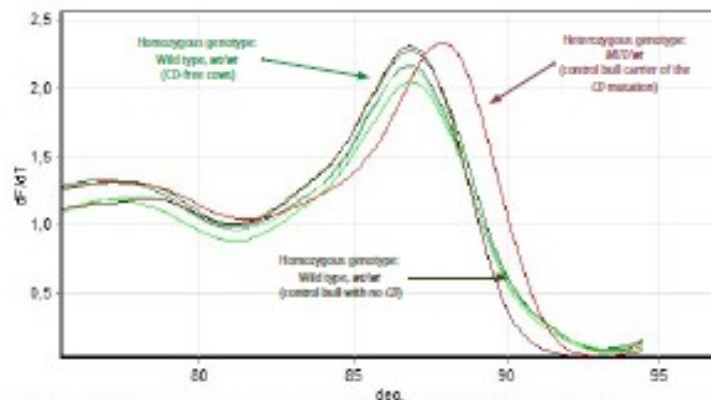


FIGURE 1. Negative derivative of the fluorescence melting curves at temperature (-dF/dT) for wild-type homozygous wt/wt and heterozygous MUT/wt genotypes. The graph shows the genetic materials of each genotype. Four homozygous wt/wt genotypes (four cows free of the disease -green curve-) were observed. Two controls were used, one heterozygous MUT/wt genotype (bull carrier of the CD mutation -red curve-) and one homozygous wt/wt genotype (bull free of the disease -black curve-).

Therefore, the primer design of Charlier et al. [5] was validated for the detection of the 7.5 Kb CD mutant Insert (BoERVK) in exon 5 of the APOB gene by real-time PCR-melting on the RotorGene™ 6000.

By analyzing the electropherogram and multiple alignments of the sequences obtained with the reference sequence, the location of the Insertion start point was determined at position 468 (26593) of the APOB-UP1-F1 sequence of the HF bull control carrier of the CD mutation (MUT/wt or InDel.BoERVK_APOB) after the GTTCC**TGAAGG** fragment on the left and before CAAGCAAGTTC, as reported by Charlier et al. [5]. The mutant BoERVK APOB Insert was not found in the sequences of HfC and, therefore, those DNA samples corresponded to cows free of the CD disease and with a wild-type homozygous genotype (wt/wt, FIG. 2).

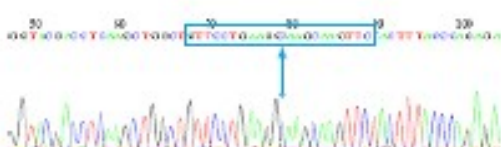


FIGURE 2. Electropherogram of the forward sequence (APOB-UP1-F1) of a CD disease-free cow showing the absent Insertion start site

Based on these results, no cows carrying the CD mutation were found in the six dairy farms sampled from different regions of Uruguay. However, as reported by Briand-Rodríguez et al. [2] a prevalence of 2.61 % of CD carriers was found in a population sample of HF calves from different regions of Uruguay. These results were similar to those observed for India (3.67 %, [15]) and the USA (2.5 %, [3]), but lower than those reported for other Countries. For example, in Germany, Kipp et al. [13] calculated the frequency of HF calves born homozygous for the CD haplotype in approximately 8.7 % of 3,400 calves born each year. However, Kipp et al. [14] reported a maximum carrier frequency of 12.25 %. In the German livestock population in 2012, which was reduced to 7.87 % in 2016 due to the genetic identification strategies applied. In another study in Germany, Schütz et al. [22] found 12.5 % of carriers among HF bulls born between 2012 and 2015. Kamfiski and Rucioa [12] reported a much higher CD carrier frequency (33-33 %) in Polish HfC. In Chinese HfC, a carrier prevalence of 5.07 and 1.11 % was found for bulls and cows, respectively [16]. Pozonikova et al. [20] reported CD carrier frequencies in two groups of Russian HfC, where 23.26 % were found in the offspring born between 2016 and 2018 of CD carrier cows, and 8.09 % in the offspring born between 2010 and 2017 of CD carrier bulls.

Therefore, before taking mating decisions (to produce disease-free calves), it is recommended to perform strict monitoring and control by means of testing for the detection of the CD mutation, thus preventing the spread of this disease in Uruguayan dairy farms. It is also recommended the introduction of disease-free bulls into the HF genetic improvement and semen production programs.

In this study, real-time PCR-melting made possible the clear identification of two different genotypes, wild type homozygote wt/wt, and carrier MUT/wt (or InDel.BoERVK_APOB) for the CD mutation using CD disease-free controls and confirmed carriers for the CD disease mutation, validating the use of this technique for genotyping of HfC.

CONCLUSIONS

The real-time PCR-melting analysis herein described provides an alternative approach for genotyping of mutant alleles in cattle. Real-time PCR testing with the melting application is a fast, easily interpretable, low cost, and highly accurate technique for the detection of the BoERVK mutant Insert of the APOB gene, allowing the genotyping of great volumes of HfC for the CD disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The results of this publication are part of the research funded by the National Agency for Research and Innovation of Uruguay (ANII) under code POS_NAC_2017_1_141239, the National Institute of Agricultural Research (INIA) and the Sectorial Commission for Scientific Research of the University of the Republic (CSIC-UdelaR). To the translation agency DNA Translations for the translation into English.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] ANSEVIN, A-T.; VIZARD, D-L.; BROWN, B-W.; MCCONATHY, J. High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransitions. *Biopolym.* 15: 153-174. 1976.
- [2] BRIAND-RODRÍGUEZ, C.; ROMERO, A.; LLAMBI, S.; BRANDA-SICA, A.; FEDERICO, M.; GIANNITTI, F.; CAFFARENA, D.; SCHILD, C.; CASAUX, M-L.; DUTRA, F. Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay [Mutaciones letales e semi-letales em bezerros da raça Holandesa no Uruguai.] *Anim. Prod. Cienc. Rural.* 51(7): e20200754. 2021. <https://doi.org/10.21271>.
- [3] COLE, J-B.; NULL, D-J.; WANRADEN, P-M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *J. Dairy Sci.* 99(9): 7274-7288. 2016.
- [4] CHARLIER, C. The Role of Mobile Genetic Elements in the Bovine Genome. *Plant and Animal Genome Conference XXIV*, San Diego, CA, January 9-13, USA, Abstract W636. 2016. On Line: <https://doi.org/10.3182/2022>.
- [5] CHARLIER, C.; GEORGES, M.; HARLAND, C.; COPPIETERS, W. Detecting cholesterol deficiency mutation in cattle. *European Patent Application N° EP 3 181697 A1*. European Patent Office. 19pp. 2017. On Line: <https://doi.org/10.3182/2022>.
- [6] CHIEN, A.; EDGAR, D-B.; TRELA, J-M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127(3): 1550-1557. 1976.
- [7] GREEN, M-R.; SAMBROOK, J. Agarose Gel Electrophoresis-Chapter 2. In: Green, M-R.; Sambrook, J. (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Pp 94-99. 2012.
- [8] GROSS, J-J.; SCHWINN, A-C.; SCHMITZ-HSU, F.; BARENCO, A.; NEUENSCHWANDER, T-F.; DRÖGEMÜLLER, C.; BRUCKMAIER, R-M. The APOB loss-of-function mutation of Holstein dairy cattle does not cause a deficiency of cholesterol but decreases the capacity for cholesterol transport in circulation. *J. Dairy Sci.* 102: 10564-10572. 2019. <https://doi.org/10.3182/2022>.

- [9] GROSS, J.-J.; SCHWINN, A.-C.; SCHMITZ-HSU, F.; MENZI, F.; DRÖGEMÜLLER, C.; ALBRECHT, C.; BRUCKMAIER, R.-M. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls. *J. Anim. Sci.* 94: 1761-1766. 2016. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-1081>.
- [10] GUNDRY, C.-N.; WANDERSTEEN, J.-G.; REED, G.-H.; PRYOR, R.-J.; CHEN, J.; WITTEWER, C.-T. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chemistry*. 49: 396-406. 2003.
- [11] HALL, T.-A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98. 1998.
- [12] KAMIŃSKI, S.; RUDEJE, A. Cholesterol Deficiency-new genetic defect transmitted to Polish Holstein-Friesian cattle. *Polish J. Vet. Sci.* 19(4): 885-887. 2016.
- [13] KIPP, S.; SEGELKE, D.; SCHIERENBECK, S.; REINHARDT, F.; REENTS, R.; WURMSER, C.; PAUSCH, H.; FRIES, R.; THALLER, G.; TETENS, J.; POTT, J.; PIECHOTTA, M.; GRÜNBERG, W. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Interbull Annual Meet.* 48: 49-53. 2015.
- [14] KIPP, S.; SEGELKE, D.; SCHIERENBECK, S.; REINHARDT, F.; REENTS, R.; WURMSER, C.; PAUSCH, H.; FRIES, R.; THALLER, G.; TETENS, J.; POTT, J.; HAAS, D.; RADDATZ, B.-B.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; PRODOS, I.; SCHMIDKE, M.; GRÜNBERG, W. Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and increased juvenile mortality in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 99: 8975-8979. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-1081>.
- [15] KUMAR, A.; GUPTA, I.-D.; KUMAR, S.; VINEETH, M.-R.; KUMAR, D.; MOHAN, G.; JAYAKUMAR, S.; KUMAR-NIRANJAN, S. First report of cholesterol deficiency associated APOB mutation causing calf mortality in Indian Holstein Friesian population. *Indian J. Anim. Sci.* 91(2): 148-150. 2021.
- [16] LI, Y.; FANG, L.; LIU, L.; ZHANG, S.; MA, Z.; SUN, D. The cholesterol-deficiency associated mutation in APOB segregates at low frequency in Chinese Holstein cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 99(2): 332-335. 2018.
- [17] MENZ, F.; BESUCHET-SCHMITZ, N.; FRAGNIÈRE, M.; HOPSTETTER, S.; JAGANNATHAN, V.; MDCK, T.; RAEMY, A.; STUDER, E.; MEHINAGIC, K.; REGENSCHEIT, N.; MEYLAN, M.; SCHMITZ-HSU, F.; DRÖGEMÜLLER, C.-A. Transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.* 47(2): 253-257. 2016. doi: <https://doi.org/10.1111/age.12555>.
- [18] MILLER, S.-A.; DYKES, D.-D.; POLESKY, H.-F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 12: 319-325. 1988.
- [19] ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS (OMIA). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2018. On line: <https://hl.ly/39GVFhk/>. 28/03/2022.
- [20] POZDVIKOVNA, M.-V.; GLADYR, E.-A.; ROMANENKOVA, D.-S.; VASILEVA, D.-K.; LEIBOVA, V.-B.; TYSHCHENKO, V.-I.; DEMENTEVA, N.-V. Screening of haplotype for cholesterol deficiency genetic defect in the Russian Holstein cattle population. *Pol. J. Vet. Sci.* 23(2): 315-319. 2020. <https://doi.org/10.2478/pjvs.2020.00020>.
- [21] SALEEM, S.; HEUER, C.; SUN, C.; KENDALL, D.; MORENO, J.; VISHWANATH, R. Technical Note: The role of circulating low-density lipoprotein levels as a phenotypic marker for Holstein cholesterol deficiency in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 99(7): 5545-5550. 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-1081>.
- [22] SCHÜTZ, E.; WEHRHAHN, C.; WANJEK, M.; BORTFELD, R.; WEMHEUER, W.-E.; BECK, J.; BRENNIG, B. The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TFB1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *PLoS One* 11(6): e0154602. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154602>.
- [23] VANRADEN, P.; NÜLL, D. Holstein haplotype for cholesterol deficiency (HCD) 2015. On line: <https://hl.ly/3a02hy>. 29/03/2022.
- [24] WHITE, R.; POTTS, G. Mutation scanning by high resolution melt analysis: Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). 2006. National Genetics Reference Laboratory, Wessex. On Line: <https://hl.ly/3y40iWw>. 29/03/2022.

**12.3. ANEXO 3: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-
MOLECULAR PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES
MONOGÉNICAS EN BOVINOS HOLANDO**



MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES MONOGÉNICAS EN BOVINOS HOLANDO

Lic. Biol. MSc. Andrea Branda Sica¹, Dra. Lic. Biol. MSc. María Teresa Federici², Dra. M. Vet. MSc. Carolina Briano², Dr. M. Vet. MSc. Fernando Dutra², Dr. M. Vet. MSc. Rody Artigas³, Lic. Biol. PhD. Paula Nicolini⁴, Dr. M. Vet. PhD. Dario Caffarena⁵, Dr. M. Vet. Federico Giannitti⁶, Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza¹, Dra. M. Vet. PhD. Silvia Llamb⁷

¹Unidad de Biotecnología - INIA

²División Laboratorios Veterinarios, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres - MGAP

³Instituto de Producción Animal y Salud de Sistemas Productivos, Unidad de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria - Udelar

⁴Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular - Udelar

⁵Plataforma de Investigación en Salud Animal - INIA

La presencia de animales portadores de enfermedades hereditarias en bovinos Holando ocasiona diversos impactos negativos en las poblaciones de esta raza a nivel mundial y en nuestros sistemas de producción en particular, por lo que su identificación es muy importante. Este artículo se focaliza en el diagnóstico genético-molecular, como herramienta que permite identificar con precisión animales portadores de mutaciones asociadas y así mejorar la toma de decisiones en los apareamientos y en la selección de toros para programas de mejora genética y producción de semen.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético consiste en analizar el material genético (ADN) obtenido de una muestra del bovino (sangre, semen y otros) con el fin de detectar las variantes de secuencia del ADN asociadas a una enfermedad. El ADN está conformado por un código de cuatro letras: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) que contiene toda la información

que el organismo necesita para su desarrollo. Se encuentra repartido en los diferentes cromosomas e incluye a los genes y secuencias asociadas, que son necesarios para el desarrollo y diferenciación celular de los órganos y tejidos, así como para su correcto funcionamiento. El genoma de un mamífero tiene varios miles de millones de bases y contiene alrededor de 30 mil genes. En genética veterinaria se denominan mutaciones patogénicas a las variantes de secuencia



Figura 1 - Terneras Holando.

que causan enfermedad, las que, generalmente, se encuentran en una frecuencia con un rango del 1 % al 3 % en algunos rodeos. Hasta el día de hoy se han identificado genes responsables de 192 enfermedades monogénicas con mutaciones conocidas en bovinos de todas las razas (OMIA, <https://www.omia.org/home/>). Las enfermedades hereditarias conocidas en bovinos son, en su mayoría, causadas por un solo gen autosómico recesivo (monogénico). Tienen un origen genético específico de la raza y se transmiten de sus progenitores heterocigotas portadores a su descendencia. Cuando apareamos un toro padre (portador) con un vientre o vaquillona (portadoras), es decir ambos portadores (heterocigotas para la enfermedad o mutación), se obtiene una prole con el siguiente resultado promedio: un 25 % con el defecto genético (homocigota recesivo o afectado), un 50 % serán "portadores nuevos" y un 25 % estará libre del gen recesivo.

Las metodologías que se utilizan para el diagnóstico genético son muy variadas, permitiendo desde el estudio de cromosomas hasta el análisis del cambio de una o más bases nucleotídicas de la secuencia de ADN. Para las enfermedades monogénicas el diagnóstico genético-molecular se puede realizar mediante dos aproximaciones: 1) análisis directo, y 2) análisis indirecto.

1 - Análisis directo

Tiene por objetivo identificar o descartar una mutación patológica en un determinado gen. Se basa en el análisis específico de la secuencia de nucleótidos de un gen para determinar si es normal o mutada.

Existen dos tipos de análisis directo: 1) confirmación de una variante de secuencia conocida (genotipado), y 2) análisis completo de la secuencia codificadora de un gen (secuenciación).

2 - Análisis indirecto

Dentro de este, el análisis de ligamiento, que fue el primer tipo de diagnóstico genético-molecular, es ampliamente usado para el estudio de las enfermedades hereditarias. Se trata de un estudio genético familiar que se basa en el análisis de los haplotipos y marcadores genéticos (por ejemplo, microsatélites). Solo se aplica a los casos de familias con diagnóstico clínico certero de la enfermedad.

APLICACIONES DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO-MOLECULAR

Las principales aplicaciones clínicas de diagnóstico genético-molecular que se han optimizado en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología de INIA junto al equipo de la Unidad de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria y DILAVE Treinta y Tres son:

- 1 - el diagnóstico presintomático mediante PCR con análisis de restricción de los fragmentos de longitud polimórfica (PCR-RFLPs), PCR en tiempo real con análisis de las curvas de fusión (PCR-Melting) y con la aplicación de curvas de alta resolución (PCR-HRM) y confirmación mediante secuenciación para detectar las diferentes mutaciones que causan enfermedades monogénicas en bovinos Holando;
- 2 - la confirmación diagnóstica para casos sospechosos;
- 3 - el estudio de los portadores para descartar el riesgo de tener descendencia afectada por alguna enfermedad hereditaria.

El objetivo de este artículo es informar y resaltar la importancia del diseño de estrategias de diagnóstico genético-molecular de las enfermedades hereditarias en nuestro país con resultados inmediatos, así como también ayudar a los criadores y productores lecheros a erradicar los animales portadores.

Resulta clave diseñar estrategias de diagnóstico genético-molecular de las enfermedades hereditarias con resultados inmediatos, así como erradicar los animales portadores.

En un reporte reciente de nuestro grupo de trabajo (Briano et al., 2021) se detectó la presencia del alelo mutante de las principales enfermedades monogénicas en una muestra poblacional de terneros Holando utilizando un panel de genotipado comercial disponible a nivel internacional (GeneSeek® Genomic Profiler™ Bovine 50K BeadChip). En el Cuadro 1 se describen brevemente las principales enfermedades monogénicas y la prevalencia de portadores en

bovinos Holando, identificadas por esa metodología. En base a las enfermedades detectadas, se trabajó para poner a punto localmente técnicas de diagnóstico genético-molecular que permiten detectar los animales portadores, así como también confirmar el diagnóstico en los animales afectados por estas enfermedades. A medida que la realidad así lo requiera, se irán incorporando nuevas técnicas, por ejemplo, para el caso de los haplotipos asociados con abortos.

Cuadro 1 - Principales enfermedades monogénicas y prevalencia de portadores en bovinos Holando.

ENFERMEDAD MONOGENICA	ABREVIATURA	ID OMA	MODO DE HEREDENCIA	ANCESTRO COMÚN	GENOGRAMA	TIPO DE MUTACIÓN	SÍNTOMAS CLÍNICOS	SIMBOLOGÍA EN CATALUDES	EXISTENCIA DE ENFERMEDAD EN URUGUAY (PREVALENCIA DE PORTADORES, %)	METODO DE DIAGNOSTICO GENETICO-MOLECULAR
Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina	BLAO	00095-993	Autosómica recesiva	Oxbondale holandés	ITGB2 (Integrin Beta 2, también llamado CD18) BTA1	Puntual, cambio de Adenina a Guanine [A/C] (Shuter et al., 1992)	Bajas defensas inmunitarias. Fiebre alta. Diarreas crónicas. Enteritis. Neumonías. Gingivitis. Infecciones bacterianas recurrentes. Muestran a los 2-8 meses de nacidos.	BL: Portador; TL: Libre de la enfermedad	SI (1,04 %)	PCR-RFLP; PCR-HRM; Secuenciación (Briano-Scalet et al., 2016; 2018; Federico et al., 2018)
Malformación Vertebral Complicada	CVM	001340-993	Autosómica recesiva	Carlin-M holandés, Friesland holandés	SLC35A3 (Solute Carrier Family 35 [JDR-N, amino-glucosamina transporter, member 3], BTA3)	Puntual, transición de Guanine por Timina [G/T] (Thomson et al., 2008)	Malformación vertebral y de extremidades. Retraso en crecimiento. Artrogriposis. Malformación del tubo digestivo y corazón. Abortos y nacimientos prematuros.	CV: Portador; TV: Libre de la enfermedad	SI (2,09 %)	PCR-HRM; PCR-Melting; Secuenciación (Briano-Scalet et al., 2018)
Deficiencia de Coagulant	CD	001065-993	Autosómica codominante	Maughtin Borens	AFOS (Apo(a)lipoprotein B), BTA11	Inserción de ~70 (B)E9VJK LTR, APC(B) (Charlier et al., 2017)	Hipoproteolemia. Acumulación lipídica en vasos portadores. Muestran dentro de 3 semanas a 6 meses de vida.		SI (2,61 %)	PCR-Melting; Secuenciación (Briano-Scalet et al., 2022)
Deficiencia de Urdina Monofosfato Sintasa	DUMPS	002062-993	Autosómica recesiva	Happy Herd Belducón	UMP5 (Uridine Monophosphate Synthase), BTA1	Puntual cambio de Citosina por Timina [C/T] (Schäfers et al., 1992)	Disminución de la fertilidad al aumentar la tasa de natimorto al ser nacido por mortalidad embrionaria temprana. Disminución de la actividad de la enzima uridina monofosfato sintasa que lleva a la muerte embrionaria en los primeros dos meses de gestación.	DP: Portador; TD: Libre de la enfermedad	NO	PCR-RFLP; PCR-HRM (Briano-Scalet et al., 2018; Federico et al., 2018)
Citralinemia	CT	001094-993	Autosómica recesiva	Linnmark, Kiss King	ASS1 (Asparaginucleotid Synthase 1), BTA11	Puntual cambio de Citosina por Timina [C/T] (Demps et al., 1988)	Altos niveles de amoníaco en el cerebro y depresión del sistema nervioso. Muestran a las 12 semanas de nacidos.	CH: Portador; TC: Libre de la enfermedad	NO	PCR-RFLP; PCR-HRM; Secuenciación (Briano-Scalet et al., 2016; 2018)
Braquiespinia	BS	000195-993	Autosómica recesiva	Sweet Haven Tradition Bismarck Tradition Leadman	FANCI (Fancioni anemia complementation group 1), BTA21	Delección de 3,3 Kb (Charlier et al., 2012)	Nacimiento de terneros muertos con marcadas malformaciones: retraso del crecimiento, braquiespinia en flexor, achilamiento de la columna y miembros desproporcionadamente largos.	BY o HH: Portador; TY: Libre de la enfermedad	SI (3,39 %)	PCR-punto final; PCR-Melting (Artigas et al., 2020; Federico et al., 2021)
Aborto debido a Haplotipo Holando 1	HH1	002001-993	Autosómica recesiva	Pleasse Farm Aridea Chief (Chief)	APAF1 (apoptotic protease activating factor 1), BTA5	Puntual, transición de Citosina por Timina [C/T] (Jadavji et al., 2016)	Desarrollo embrionario incompleto. Aborto espontáneo en el 1º trimestre. Fertilidad reducida en portadores.		SI (4,44 %)	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 3	HH3	001824-993	Autosómica recesiva	Glendell Aridea Chief, Gray View Slayline, Oman	SMC2 (Structural Maintenance of Chromosomes 2), BTA8	Puntual, transición de Timina por Citosina [T/C] (McClure et al., 2014)	Aborto en el día 60 de gestación. Problemas de producción de leche en vacas portadoras.		SI (3,13 %)	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 4	HH4	001826-993	Autosómica recesiva	Beane Buck	GART (glyoxamide ribonucleotide transformylase), BTA1	Puntual, transición de Adenina por Citosina [A/C] (Fitz et al., 2013)	Aborto en el 1º mes de gestación. Reducción de la tasa de parto en vacas portadoras.		SI (1,04 %)	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo 5	HH5	001941-993	Autosómica recesiva	Thomke Texel Suprema	TFB1M (transcription factor B1 mitochondrial), BTA8	Delección de 138 Kb (Schultz et al., 2016)	Muerte fetal. Reducción de la tasa de fertilidad en portadores.		SI (0,26 %)	En desarrollo

¹Briano et al., 2021

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Las enfermedades monogénicas hereditarias descritas se deben a genes recesivos y solo se expresan en los animales que son homocigotas recesivos con la posibilidad de reconocerlos clínicamente o por diagnóstico genético-molecular. Muchos de estos defectos genéticos son letales al nacer o a los pocos días o meses del nacimiento, por lo cual en la mayoría de los casos no son identificados. También existe la posibilidad de reconocerlos mediante estudios de probabilidades, si se conociera su genealogía y se supiera que algunos de sus ancestros fueron portadores (o heterocigotas) para la enfermedad.

Si usamos estudios de probabilidades, se espera que el animal sea libre de la mutación basada en la información del pedigrí. Sin embargo, si no está testeado mediante diagnóstico genético-molecular, no puede garantizarse que un animal tenga estatus de "libre" de enfermedades. La identificación de animales portadores de enfermedades hereditarias es importante, porque ocasionan impactos negativos en las poblaciones de bovinos Holando a nivel mundial, tanto por los abortos, las pérdidas directas por muertes de terneros, el aumento de los costos de tratamiento médico, así como por las dificultades que se generan al no obtener suficientes terneras para realizar una reposición adecuada de las vacas.

La presencia de animales portadores de enfermedades hereditarias deriva en: abortos, muertes de terneros, aumento de los costos de tratamiento médico e insuficiente disponibilidad de terneras para realizar una adecuada reposición de las vacas.

Por tanto, se recomienda realizar un estricto seguimiento y control para evitar la propagación del alelo mutante mediante la aplicación del diagnóstico genético-molecular para identificar con precisión animales portadores de mutaciones asociadas antes de tomar decisiones en los apareamientos (para producir terneros/as libres de la enfermedad), e introducir toros en los programas de mejora genética y producción de semen bovino Holando.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS (OMIA). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 2011. En línea: <https://www.omia.org/home/>



Figura 2 - Vacas Holando, INIA La Estanzuela.

**12.4. ANEXO 4: REGISTROS REPRODUCTIVOS DE LAS VACAS
DEL TAMBO DEL CAMPO EXPERIMENTAL N.º2 DE LA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Prolesa

5031 6753

VACA N°

531

N	△	◻	×	○	○	○	⊗	A	E	T	V	M	ⓕ	Ⓥ	Ⓜ	Diagnostico de Gestación
Nodriz	Celo	Servicio	Secado	Parto Previsto	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	Aborto	Enferma	Tratamien.	Venia	Muerta	OBSERVACIONES			
AÑO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET.	OCTUBRE	NOV.	DIC.				
2017									30/57			VL	21/12			
2018					14/41		P					X20				
2019		22/2		29/29			V	18/18		P			Eco 11/7			
2020		04		X7			42/42			18/18						
2021		Pao				X19		2/2	18/18	15/15						
2022			P					18					Eco 21/3			
													531			

1308 3344 VACA N° 311

N	Celo	Servicio	Secado	Parto Previsto	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	A	E	T	V	M	P	V	M	Diagnostico de Gestación	
																Observaciones	
AÑO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET	OCTUBRE	NOV	DIC					
2015				30 T57			22 24	12 14	P								ECO 22/8
2016			X24		28 2			3 14									13/12 100% Muerto
2017			X16		15 F74		26 14		P								ECO 26/8
2018			X15		3 F80		6 14	12 14									
2019		(P)	X16		19 57		12										RO 11/2 ECO 7/10
2020		P X24		30 77				24 14									ECO 5/8 posible macho embrión
2021		P			X5		20 12										311

uesasa 4500 3341 VACA N°

	Celos	Servicio	Secado	Parto Previsto	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	A	E	T	V	M	(P)	(V)
Edad	Aborto	Enferma	Tratamiento	Venta	Muerta	Diagnostico de Gestación								
	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET.	OCTUBRE	NOV	DIC	OBSERVACIONES	
1		P			X5		20 ¹²		Vc PG					
2			P				(21)							Ero 21/3
														311

Prolesa														4308 3359 VACA N°		726-97	
N	△	◻	×	○	○	○	⊗	A	E	T	V	M	Ⓟ	Ⓥ			
Notriza	Celo	Servicio	Secado	Parto Previsio	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	Aborto	Enferma	Tratamien.	Venta	Muerta	Diagnostico de Gestación	OBSERVACIONE			
AÑO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET.	OCTUBRE	NOV.	DIC.					
2015								6 ^o 53				✓					
2016			Vaca		16/10/16 31/10/16			P					3/16 Vene us 5/8 e o				
2017	X ₂₀	24 F 25/5			V/6/3 min 25/10/17		P					X ₂₆	210 215 211				
2018			27		25/10/18 16/11/18			P					210 2418				
2019	X ₂	27/11/19			27/11/19 27/11/19			18/12/19 22/12/19									
2020	P				X ₄	20 F 20/18		15/12/20 us 20/12/20		18/12/20 20/12/20			210 1719				
	Vc				31/10/20 25/11/20			P					210 109	97			

Prolesa
INSUMOS

3028 5351

VACA N°

849-32

N	△	◻	×	○	○	○	⊗	A	E	T	V	M	Ⓟ	Ⓥ	Ⓜ	Diagnostico de Gestación
Notriza	Celo	Servicio	Secado	Parto Previsto	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	Aborto	Enferma	Tratamien.	Venta	Muerta	OBSERVACIONES			
AÑO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET.	OCTUBRE	NOV.	DIC.				
2018			(27) 10/18					Aborto					eco 24/8			
2019		(26) 26					⊗ 25	(5) 26		(29) 10						
2020		(15) 15			Por		○	X		(10) 27						
2021		(10) 10											CARGANAWA RITA Eco 11/2/21			
2022			V										Eco 21/3			
													32			
													C. ROJA			

Prolesa

2945 1790

VACA N°

605

N								A	E	T	V	M	P	V	M	Diagnostico de Gestación
Nodriz	Celo	Servicio	Secado	Parto Previsto	Parto Hembra	Parto Macho	Muerto	Aborto	Enferma	Tratamien.	Venta	Muerta	OBSERVACIONES			
AÑO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SET.	OCTUBRE	NOV.	DIC.				
2098								18/8	18/8		P		210 16/11			
2019		ok.		X 21		X 21		3/20	11/20	11/20						
2020		P 21				X 21		11/20	X 21		Vc Pa.					
2021		Pa				X 10		31/10			Vc Pa.		Eco 13/10			
2022			P					30					Eco 21/3			
													605			

