



Foto: INIA

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

Lic. Biol. MSc. Andrea Branda Sica<sup>1</sup>, Dra. Lic. Biol. MSc. María Teresa Federici<sup>1</sup>, Dra. M. Vet. MSc. Carolina Briano<sup>2</sup>, Dr. M. Vet. MSc. Fernando Dutra<sup>2</sup>, Dr. M. Vet. MSc. Rody Artigas<sup>3</sup>, Lic. Biol. PhD. Paula Nicolini<sup>4</sup>, Dr. M. Vet. PhD. Darío Caffarena<sup>5</sup>, Dr. M. Vet. Federico Giannitti<sup>5</sup>, Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza<sup>1</sup>, Dra. M. Vet. PhD. Silvia Llambi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología - INIA

<sup>2</sup>División Laboratorios Veterinarios, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres - MGAP

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

<sup>4</sup>Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular - Udelar

<sup>5</sup>Plataforma 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 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.

## 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 OMIA	MODO DE HERENCIA	ANCESTRO COMUN	GEN/CROMOSOMA	TIPO DE MUTACION	SINTOMAS CLINICOS	SIMBOLOGIA EN CATALOGOS	EXISTENCIA DE ENFERMEDAD EN URUGUAY (PREVALENCIA DE PORTADORES, %)	METODO DE DIAGNOSTICO GENETICO-MOLECULAR
Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina	BLAD	000595-9913	Autosómica recesiva	Osborndale Ivanhoe	ITGB2 (Integrin Beta 2, 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 la enfermedad	SI (1.04 %) <sup>1</sup>	PCR-RFLPs; PCR-HRM; Secuenciación (Branda-Sica et al., 2016; 2018; Federici et al., 2018)
Malformación Vertebral Compleja	CVM	001340-9913	Autosómica recesiva	Carlin-M Ivanhoe, Penstale Ivanhoe	SLC35A3[Solute Carrier Family 35 (UDP-N-acetylglucosamine transporter), member 3], BTA3	Puntual, transición de Guanina por Timina [G/T] (Thomsen et al. 2006)	Malformación vertebral y de extremidades. Retraso en crecimiento. Artrogriposis. Malformación del tracto digestivo y corazón. Abortos y nacimientos prematuros.	CV: Portador; TV: Libre de la enfermedad	SI (2.09 %) <sup>1</sup>	PCR-HRM; Secuenciación (Branda-Sica et al., 2019)
Deficiencia de Colesterol	CD	001965-9913	Autosómica codominante	Maughlin Storm	APOB (Apolipoprotein B), 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 %) <sup>1</sup>	PCR-Melting; Secuenciación (Branda-Sica et al., 2022)
Deficiencia de Uridina Monofosfato Sintasa	DUMPS	000262-9913	Autosómica recesiva	Happy Herd Beautician	UMPS (Uridine Monophosphate Synthetase), 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 la enfermedad	NO	PCR-RFLPs; PCR-HRM (Branda-Sica et al., 2018; Federici et al., 2018)
Citruinemia	CT	000194-9913	Autosómica recesiva	Linmarkr Kriss King	ASS1 (Argininosuccinate Synthase 1), 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 la enfermedad	NO	PCR-RFLPs; PCR-HRM; Secuenciación (Branda-Sica et al., 2016; 2018)
Braquiespina	BS	000151-9913	Autosómica recesiva	Sweet Haven Tradition, Bis-May Tradition Cleitus, Rothrock Tradition Leadman	FANCI (Fanconi anemia complementation group 1), 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 la enfermedad	SI (3.39 %) <sup>1</sup>	PCR punto final; PCR-Melting (Artigas et al., 2020; Federici et al., 2021)
Aborto debido a Haplotipo Holando 1	HH1	000001-9913	Autosómica recesiva	Pawnee Farm Arlinda Chief (Chief)	APAF1 (apoptotic protease activating factor 1), BTA5	Puntual, transición de Citosina por Timina [C/T] (Adams et al., 2016)	Desarrollo embrionario incompleto. Aborto espontáneo en el 1º trimestre. Fertilidad reducida en portadores.		SI (4.44 %) <sup>1</sup>	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 3	HH3	001824-9913	Autosómica recesiva	Glendell Arlinda Chief, Gray View Skyline, 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 %) <sup>1</sup>	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo Holando 4	HH4	001826-9913	Autosómica recesiva	Besne Buck	GART (glycinamide ribonucleotide transformylase), BTA1	Puntual, transición de Adenina por Citosina [A/C] (Fritz et al., 2013)	Aborto en el 1º mes de gestación. Reducción de la tasa de parto en vacas portadoras.		SI (1.04 %) <sup>1</sup>	En desarrollo
Aborto debido a Haplotipo 5	HH5	001941-9913	Autosómica recesiva	Thornlea Texal Supreme	TFB1M (transcription factor B1 mitochondrial), BTA9	Delección de 138 Kb (Schultz et al., 2016)	Muerte fetal. Reducción de la tasa de fertilidad en portadores.		SI (0.26 %) <sup>1</sup>	En desarrollo

<sup>1</sup>Briano 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/>



Foto: Sebastián Bogliacino

Figura 2 - Vacas Holando, INIA La Estanzuela.