

# Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias bovinas en el Uruguay



CIENTÍFICO

## Molecular Diagnosis of Cattle Hereditary Diseases in Uruguay

Kelly, L.<sup>1</sup>, Dutra, F.<sup>3</sup>, Llambí, S.<sup>2</sup>, Rivero, R.<sup>3</sup>, Moraes, J.<sup>4</sup>, Trenchi, G.<sup>1</sup>, D'Agosto, S.<sup>1</sup>, Peraza, P.<sup>1</sup>, Ravagnolo, O.<sup>1</sup>, Dalla Rizza, M.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se presenta una revisión sobre enfermedades hereditarias letales descritas en nuestro país con énfasis en aquellas que han sido confirmadas por diagnóstico anatomopatológico y molecular. Las enfermedades congénitas y/o hereditarias observadas por el DILAVE para la región Este de nuestro país, se estiman entre un 3% a 9% de morbilidad en el período de 2009 a 2011. Se discute la pertinencia y relevancia de realizar su control considerando la actual legislación uruguaya con el fin de detectar animales portadores sanos y disminuir las pérdidas por mortalidad. Se concluye que las enfermedades genéticas son de una importancia considerable en los sistemas productivos comerciales siendo una oportunidad de mejora en nuestros rodeos.

**Palabras claves:** *enfermedades hereditarias bovinas, diagnóstico molecular*

### SUMMARY

This review presents information about lethal hereditary diseases described in Uruguay, with emphasis on those that have been confirmed pathologically and by molecular diagnostics. Congenital and / or hereditary diseases observed by DILAVE for the eastern region of our country are estimated to be 3% - 9% in the period 2009-2011. We discuss the relevance and importance of controlling these diseases considering the current Uruguayan legislation to detect healthy carrier animals and reduce death losses. We conclude that genetic diseases have a considerable importance in commercial production systems being an opportunity for improvement in our herds.

**Keywords:** *bovine Inherited diseases, molecular diagnostics*

### INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se han descrito numerosas enfermedades hereditarias letales (EHL) que afectan la producción en bovinos (Gentile y Testoni, 2006; Giovambattista y García, 2010), muchas de las cuales se detectan a través de diagnósticos moleculares. La Sociedad Internacional de Genética Animal fundada en 1972 (ISAG: <http://www.isag.us/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> (22/08/12) realiza pruebas comparativas internacionales remitiendo a los laboratorios que son miembros de dicha Sociedad, muestras de ADN bovino con el fin de hacer el test de comparación internacional para EHL y marcadores moleculares.

Actualmente existen varias EHL que se han diseminado por el mundo a través del semen (Cuadro 1) y el uso intensivo de reproductores que son portadores sanos que al cruzarse aumentan la mortalidad y por ende afectan la producción animal.

En nuestro país la morbilidad causada por enfermedades congénitas y/o hereditarias han sido descritas por Archivo Veterinario del Este pertenecientes a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm>) desde el año 2009 (Dutra y col., 2009, 2010, 2011).

En nuestro país se han detectado enfermedades genéticas en razas de bovinos mediante sintomatología clínica, necropsias y histopatología. Sin embargo estas técnicas no permiten identificar animales portadores sanos que transmiten el alelo letal recesivo y diseminan las EHL que se manifiestan luego de varias generaciones de endocria (Dutra y Baroni, 2007; Dutra y Castro, 2007; Dutra y Lussich, 2007; Rivero y col., 2011). Actualmente con el desarrollo de la biotecnología es posible identificar mediante técnicas moleculares, animales portadores asintomáticos de genes letales. Además debemos considerar que existen otras patologías genéticas como las alteraciones cromosómicas producidas durante la formación de los gametos y se transmiten a las siguientes generaciones disminuyendo la tasa de preñez. Algunas enfermedades congénitas son producidas por mutaciones que ocurren durante el desarrollo embrionario de las células somáticas, naciendo animales con malformaciones letales que no dejan descendencia. También existen EHL como el Síndrome de malformación vertebral (CMV) cuyo diagnóstico es difícil de realizar dado que las malformaciones vertebrales pueden confundirse con otras malformaciones congénitas. También existen casos como la deficiencia de la enzima uridina monofosfato sintetasa (DUMPS) causada por una mutación letal que es esencial

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas. Ruta 48 km10, Rincón del Colorado, Canelones-Uruguay.  
Correo electrónico: [gokellyster@gmail.com](mailto:gokellyster@gmail.com).

<sup>2</sup>Área Genética. Departamento de genética y Mejoramiento Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>DILAVE «Miguel C. Rubino». Laboratorio Regional Este. Treinta y Tres-Uruguay.

<sup>4</sup>Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

Recibido: 4/5/12 Aprobado: 13/8/12

**Cuadro 1.** Descripción de los genotipos (sanos y portadores) según la nomenclatura utilizada internacionalmente (código genético) para las EHL descritas en las razas Holstein, RedAngus y Hereford (página de internet de los criadores).

Enfermedades hereditarias letales	Genotipos		Enfermedades hereditarias letales	Genotipos	
	<i>HOLSTEIN*</i>	Sanos Portadores		<i>REDANGUS**</i>	Sanos Portadores
Brachyspina	TY	BY			NH
BLAD	TL	BL	Hidrocefalo Neuropático		OS
Complejo de Malformación Vertebral.	TV	CV	Osteopetrosis		PH
DUMPs	TD	DP	Hipoplasia Pulmonar con Anasarca		PR
Pie de Mula	TM	MF	Protoporfira		MF
			Sindactilia (Pie de Mula)		
			<b>HEREFORD***</b>		
			Hipotricosis (Alopecia)		S/N <sup>1</sup>
Arthrogryposis Multiplex Contractural Arachnodactyly		AM CA	Dilución del color de pelo.		S/N
Double Musculatura		DM	Epilepsia Idiopática		S/N
Dwarfism (enanismo)		DW	Epidermiolisis Bullosa		S/N
Hypotrichosis		HY	MSUD 248		S/N
Alpha-Mannosidosis		MA	Cardiomiopatía de Pelo Crespo.		S/N
Hemimelia Tibial		TH	<b>VARIAS RAZAS</b>		
			Citrulinemia		S/N

1: S/N= Sin Nomenclatura

**Página web:**\*Holstein Frisian: [http://www.holsteinusa.com/pedigree\\_info/genetic\\_codes\\_traits.html](http://www.holsteinusa.com/pedigree_info/genetic_codes_traits.html)\*\*Angus: <http://redangus.org/genetics/defects/OS>\*\*\*Hereford: <http://www.hereford.org/>

para la formación de los nucleótidos de pirimidina que es requerida en gran cantidad durante el desarrollo embrionario. En este caso el embrión muere *in utero* alrededor de los 40 días de gestación produciendo un retorno al servicio de las vacas portadoras (Schwenger y col., 1993). Los portadores son fenotípicamente normales, pero al tener una disminución de la actividad normal de la enzima uridina monofosfato sintetasa deben realizarse más servicios por parto (3,1) en vez de 2 servicios cuando se cruzan individuos normales (Harden y Robinson, 1987).

En resumen, en animales domésticos es difícil determinar si una malformación congénita es de origen genético, ambiental o la combinación de ambas. A continuación se diferencian las causas que producen dichas enfermedades según Legates y Warwick, (1992) y Nicholas, (1990).

Para que una enfermedad sea considerada hereditaria se deben cumplir los siguientes requisitos:

- 1- Aparecer con más frecuencia en rodeos consanguíneos donde los individuos de la prole están emparentados y vinculados a una genealogía, ya que hay un incremento de individuos homocigotos para el gen recesivo debido a la endocria.
- 2- El carácter anormal suele aparecer en más de una temporada aunque las condiciones ambientales hallan cambiado.

Para determinar si una enfermedad es hereditaria se deben realizar los siguientes pasos:

- 1- En caso de que exista una mayor incidencia de un defecto o enfermedad en una familia o una raza, se debe comprobar mediante un análisis de segregación entre las diferentes generaciones realizando una genealogía para determinar que la enfermedad se transmite a los miembros de dicha familia.
- 2- Las variaciones entre y dentro de las razas en la contribución genética no indica necesariamente que sean producidas por diferentes genes, sino que puede ser debido a que presentan diferente frecuencia génica del alelo deletéreo entre las razas o familias según el grado de endocria.
- 3- En el caso que la enfermedad sea similar en otra especie o raza es muy probable que se deba a la misma mutación (ej. Alfa Manosidosis en humanos y bovinos), pero existen algunos casos que dicha enfermedad presenta mutaciones diferentes en el mismo gen para una EHL en una misma raza o especie. A esto se le llama heterogeneidad genética como vemos en ciertos casos presentados en el artículo como el Síndrome neuroaxial en bovinos.
- 4- Para descartar otras causas, se debe determinar si la enfermedad está asociada a causas ambientales como la alimentación

deficiente de la madre y/o cría, infecciones víricas, plantas tóxicas o estrés ambiental. En caso de mejorar dichas condiciones (ración, ambiente), y si la enfermedad no recurre, se puede concluir que la causa probablemente era ambiental.

5- En caso que se presente una sola vez y en raras ocasiones, la malformación se puede deber a alteraciones en el desarrollo.

A continuación se describen las EHL cuyo diagnóstico molecular ha sido desarrollado en nuestro país. En razas de bovinos de leche se han diagnosticado: BLAD (Llambí y col., 2003; Llambí y col., 2007; <http://enfermedadeshereditariaderumiantes.blogspot.com/>) y Citrulinemia (Llambí, 2002; Kelly y col., 2010), y en razas de bovinos de carne: MSUD 248 (Kelly y col., 2008), Alfa Manosidosis I (Kelly y col., 2010; Rivero y col., 2011), Epidermolisis Bullosa (Kelly y col., 2010) y Osteopetrosis (Dutra y col., 2011). La mayoría de estas EHL son recesivas y actualmente se detectan los portadores con técnicas moleculares. También se han descrito enfermedades poligénicas o recesivas ligadas al sexo como la Displasia u osteoartrosis de cadera en bovinos Hereford machos (toros y novillos) (Bellenger, 1971; Berg y col., 1997; Carnahan y col., 1968; Dutra, 1995).

En la actualidad, en el mundo hay descritas 397 EHL en bovinos según la base de datos gestionada por NCBI-OMIA (On line Mendelian Inheritance in Animals, <http://omia.angis.org.au>) de las cuales 145 son producidas por mutaciones de uno o más genes y se ha identificado la mutación en 78 de éstas, permitiendo desarrollar el diagnóstico molecular. Existen asociaciones de criadores de razas (como Angus **Association USA** y **Holstein Association USA**) que publican en internet los animales de pedigrí portadores de genes deletéreos ([http://www.holsteinusa.com/pedigree\\_info/genetic\\_codes\\_traits.html](http://www.holsteinusa.com/pedigree_info/genetic_codes_traits.html); <http://redangus.org/genetics/defects/OS>) (30/8/12). En el Cuadro 1 se resumen la nomenclatura genética que utilizan dichas asociaciones para las EHL presentes en cada raza estudiada.

A continuación se describen las enfermedades hereditarias que han sido diagnosticadas en Uruguay y la frecuencia genética (Cuadro 2) de las muestras analizadas (pertenecientes a individuos de rodeos afectados).

**Cuadro 2.** Descripción de las muestras analizadas molecularmente. Número, procedencia y raza según EHL estudiadas. Detalle de los resultados: portadores calculados como:  $2pq$  siendo  $p$ = fr. génica del alelo normal y  $q$ = frecuencia génica del alelo letal.

EHL	Muestra	Depto.	Raza	Fr. genotípica de portadores	Fr. génica del alelo letal (q)	Ref.
Alfa	7	Paysandú	Braford	0,452(MA)	0,345	34
Manosidosis			xLimousin			
MSUD 248	14	Lavalleja	Hereford	0,357	0,459	35
E.Bullosa	3	Cerro Largo	Hereford	-	-	34
BLAD	253	Colonia	Holando	(BL) 0,162	0,08	34
Osteopetrosis	116	Rocha	Angus	0,398	0,075	47
C.M.P.P.C.	70	CerroLargo	Hereford	0,387	0,068	17
	80	Cerro Largo	Hereford	0,364	0,057	
		Lavalleja		0,314	0,038	

EHL: enfermedades Hereditarias Letales.

BL: portadores del BLAD.

MA: portadores de la Alfa-Manosidosis.

C.M.P.P.C.: cardiomiopatía de Pelo Crespo.

## 1 - BLAD (DEFICIENCIA EN LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA) (OMIA 000595-9913)

El BLAD es una EHL que produce infecciones bacterianas recurrentes con muerte prematura en terneros de 2 a 8 meses de edad (Gerardi, 1996), siendo un problema en el tambo por las infecciones inespecíficas que presentan los terneros. La etiología es la Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina de tipo I. Es una mutación autosómica recesiva que fue descrita por primera vez por Shuster y col. (1992) quien demostró que la enfermedad se debía a una mutación sin sentido en el gen CD18 que codifica una glicoproteína de membrana del leucocito llamada beta-2 integrina. Esta familia de glicoproteínas son moléculas de adhesión leucocitaria que permiten el pasaje de las células de defensa del sistema vascular al sitio de infección. Las células leucocitarias (neutrófilos) de los terneros homocigotos para el gen CD18 (padre y madre portadores heterocigotos) no pueden realizar la migración ni la fagocitosis. En la raza Holando la enfermedad es producida por la sustitución de un aminoácido por otro en la posición 128 de la proteína. Esta sustitución se produce por la mutación Adenina (A) a Guanina (G) en el exón 4 produciéndose un cambio del aminoácido ácido aspártico por glicina en dicha proteína. Kehrlí y col. (1992) desarrollaron un diagnóstico molecular utilizando la técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) para identificar el alelo mutado del alelo normal permitiendo detectar así animales portadores de BLAD (Cuadros 1 y 2). Esta técnica en nuestro país fue descrita por primera vez en bovinos Holando (Llambí y col., 2003) por la amplificación de la región del gen CD18 donde se localiza la mutación. Posteriormente una enzima de restricción (Taq I) reconoce la mutación y corta en ese sitio exacto, permitiendo distinguir el alelo mutado del normal según la relación de tamaño y peso molecular dependiendo del largo en pares de bases (pb) del o los fragmentos resultantes.

En el ganado de raza Holando de Uruguay, se estudiaron 15 establecimientos lecheros (N=138) que se dividieron en tres grupos: 1) 104 vacas seleccionadas al azar; 2) 15 toros (14 toros nacionales y 1 toro importado); 3) 19 terneros (11 pertenecien-

tes a la progenie de un toro portador de BLAD). En los grupos se obtuvo una frecuencia de portadores de BLAD de 0.96%, 13.30% y 36.84% respectivamente (Llambí y col., 2007). Posteriormente se realizó un estudio en un tambo del departamento de Colonia en 253 vacas Holando encontrándose 0,79% portadores del BLAD (Kelly y col., 2010), confirmando la presencia de esta enfermedad el país (Cuadro 2).

## 2 - SÍNDROMES DE MIOCLONIAS CONGÉNITAS

La mioclonia congénita es un síndrome letal y hereditario de bovinos de razas de carne que se caracteriza porque los terneros presentan sintomatología nerviosa al nacer (Healy y col., 2002). La afección puede deberse a tres mutaciones diferentes que están presentes en dos genes distintos: el gen de la BCKDHA (branched chain keto dehydrogenase acid E1 beta) o el gen de la subunidad alfa-1 del receptor de la glicina (GLRA 1). El gen BCKDHA presenta heterogeneidad genética dado que dicha EHL puede deberse a dos mutaciones diferentes de un mismo gen en la posición 248 o 1380. Esta enfermedad produce el **MSUD** (Maple Syrup Urine Disease) o Enfermedad de la orina con olor a Jarabe de Arce. La otra mutación se produce en el gen de la subunidad alfa-1 del receptor de la glicina denominado GLRA 1 en la posición 156 del exón 2 y es causa de la **Mioclonia congénita hereditaria o ICM**. Ambas enfermedades son muy similares y pueden presentarse simultáneamente en el mismo rodeo (Healy y col., 2002) por lo cual se requiere realizar un diagnóstico diferencial mediante técnicas moleculares.

### 2.1 - MSUD (Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce) (OMIA 000627-9913)

El MSUD se presenta en terneros Hereford y Shorthorn y las características clínicas son idénticas, produciéndose una enfermedad neurológica rápida y progresiva terminando con la muerte a los pocos días de nacer. Los síntomas son: incapacidad para levantarse, hiperestesia, rigidez muscular y espasmos de los músculos extensores. Estas EHL se producen en los genes del ADN mitocondrial denominándose encefalomiopatías mitocondriales que afectan la fosforilación oxidativa (Rubio y Verdecia, 2004). Se caracterizan por afectar las células que requieren más energía en el organismo como son las neuronas, las células musculares y cardíacas. Las neuronas son particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial debido a que afecta la fosforilación oxidativa pues la mitocondria no le provee de ATP, alterando la modulación de la excitabilidad neural y la transmisión sináptica. La disfunción de las mitocondrias por estrés oxidativo puede generar convulsiones epilépticas, encefalopatía, afectan los músculos y otros órganos (Rubio y Verdecia, 2004).

La enzima mitocondrial BCKADH interviene en el metabolismo de los aminoácidos ramificados esenciales. Esta enzima tiene 4 subunidades  $\alpha$ E1,  $\beta$ E1, E2 y E3 que son codificados por diferentes genes. El MSUD se produce por la deficiencia en la subunidad  $\beta$ E1 de dicha enzima lo que aumenta la concentración en sangre y tejidos de los precursores de los aminoácidos: valina, leucina e isoleucina. Esta EHL fue descrita por Harper y col. (1986) y Healy y col. (2002) en terneros Hereford y Shorthorn respectivamente. La base molecular en Hereford es una muta-

ción sin sentido (posición: 248, mutación: C → T) que ocasiona la terminación prematura de la síntesis de esta proteína. En Shorthorn la mutación sin sentido ocurre en otra posición del mismo gen: 1380 de C → T (Zhang y col., 1990). El diagnóstico molecular fue desarrollado por Dennis y Healy (1999) para la detección de las dos mutaciones mediante la técnica de PCR-RFLP.

En el Uruguay se realizó el diagnóstico de esta enfermedad por primera vez por Dutra y Lussich (2007). Posteriormente Kelly y col. (2008) analizaron las muestras remitidas por el Laboratorio Regional Este de la DILAVE «Miguel C. Rubino» determinando la mutación MSUD 248 en 5 portadoras de las 14 vacas madres de los terneros Hereford afectados. El diagnóstico molecular se realizó con la técnica de PCR/RFLP descritas por Dennis y Healy (1999) y Healy y col. (2002) Cuadro 2.

### 2.2 - ICM o Mioclonia congénita hereditaria (OMIA: 000689-9913)

Esta EHL se presenta en terneros Polled Hereford y se caracteriza por presentar hiperestesia, mioclonias tetaniformes que ocurren espontáneamente o como respuesta a estímulos sensoriales (visual, táctil y auditivo), pérdida del tono muscular y espasticidad (Dutra y Lussich, 2007). También produce signos nerviosos en terneros *in utero* o a los pocos minutos de nacer. Los animales suelen morir por apnea o parálisis de los músculos respiratorios. Los síntomas se producen por una falla de la inhibición espinal de la sinapsis en los receptores de la glicina en la médula espinal (GLRA 1). La glicina es un neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central de los mamíferos que controla las funciones motoras y sensoriales de la médula espinal (Pierce y col., 2001). La mutación del GLRA 1 cambia en el DNA de C → A en la posición 156 del exón 2 en la posición 24 del gen autosómico que codifica la subunidad alfa-1 de dicho receptor de la glicina produciendo un codón stop y terminación prematura del mismo. Al perder la función inhibitoria de dicho neurotransmisor de la médula espinal se pierde el control de las funciones nerviosas presentando los síntomas descriptos.

### 3 - Alfa Manosidosis (OMIA: 000625-9913)

La manosidosis también puede simbolizarse como MAN2B1 por (Mannosidase alpha class 2B member 1). Los síntomas se presentan en terneros de 3 a 6 meses de edad con sintomatología nerviosa como ataxia, convulsiones, anorexia y dejan de mamar. Presentan postura con los miembros abiertos, marcha con dificultad de apoyo, incoordinación, decúbito esternal y muerte (Rivero y col. 2001).

La mutación de la  $\alpha$ -manosidasa bovina es equivalente a la enfermedad humana Manosidosis Alfa B (OMIM: 248500); la misma se produce por el almacenamiento lisosomal debido al déficit de la enzima  $\alpha$ -manosidasa que produce la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa en los lisosomas.

En el Uruguay se diagnóstico por primera vez por Rivero y col. (2001) en novillos de la raza Aberdeen Angus, encontrándose con el método lectinohistoquímico que los animales afectados tenían lesiones coincidentes con una  $\alpha$ -manosidosis en el bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal. Esta técnica se realizó mediante el análisis de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -manosi-

dasa cuya actividad en los heterocigotos estaba disminuida hasta en un 40% con respecto al homocigoto normal (Healy, 1981). Sin embargo existían variaciones en la actividad enzimática entre los individuos portadores lo que dificultaba diferenciar entre bovinos portadores y normales (Jolly y col., 1974). Posteriormente se determinó la mutación del gen que codifica la enzima  $\alpha$ -manosidasa presentándose heterogeneidad genética pues existen diferentes mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -manosidasa bovina que son específicas de razas: en la raza Galloway la mutación está en la posición 622 y cambia el nucleótido G A y en las razas Aberdeen Angus, Murray Grey y Brangus la mutación está en la posición 961 y cambia el nucleótido T C (Tollersrud y col., 1997). En ese año, se desarrolla la técnica molecular de PCR-RFLP que diferencia claramente los animales portadores de los sanos (Berg y col., 1997). Esta técnica molecular fue posteriormente puesta a punto en nuestro país (Kelly y col., 2010) confirmando su presencia en cruza Bradford-Limousin (Cuadro 2). Actualmente en la página de la Asociación de Criadores Red Angus de USA el número de portadores de Alpha-Mannosidosis es de 188 <http://redangus.org/genetics/defects/list/carrier/MA>

#### 4- EPIDERMOLISIS BULLOSA (OMIA: 000340-9913)

La Epidermolisis Bullosa (EB) ha sido descrita en varias razas de bovinos, incluyendo Simmental, Jersey y Holando, y en diferentes especies: humanos, bovinos, ovinos, caninos, felinos y equinos (Agerholm, 1994; Ford y col., 2005).

En el Uruguay, se diagnosticó macro y microscópicamente como EB de tipo simple en terneros Hereford recién nacidos (Dutra y Baroni, 2007). Los síntomas son: fragilidad de la piel y mucosas que se desprenden en grandes extensiones ante el menor trauma, con lesiones muy severas en la piel y de otros tejidos llevando a la muerte del animal al poco tiempo de nacer. Las lesiones son particularmente severas en los extremos distales de los miembros en los que se observa ulceraciones extensas, con desprendimiento del rodete coronario y exungulación en los casos más severos («enfermedad de las patas rojas») (Dutra y Baroni, 2007). Histológicamente es una patología caracterizada por la separación de la piel a nivel de la membrana basal de la epidermis (Agerholm, 1994).

La enfermedad es producida por una mutación del gen KRT5: keratina 5 (Ford y col., 2005) con herencia autosómica recesiva. La mutación sustituye una base G A en la secuencia del gen en la posición 4051 que cambia el aminoácido ácido glutámico por lisina en la posición 478 al final del dominio de la Keratina (E478K). El diagnóstico molecular identificó dicha mutación en los animales Hereford remitidos por el DILAVE Treinta y Tres (Cuadro 2) (Kelly y col., 2010).

#### 5- OSTEOPETROSIS (OS) (OMIA 000755-9913)

La osteopetrosis, también llamada Marble Bone Disease o Enfermedad de los Huesos de Mármol, es un trastorno del esqueleto de los seres humanos y animales que se caracteriza por la formación de huesos densos, debido a la deficiencia en el número y/o función de resorción ósea de los osteoclastos. Se caracteriza histopatológicamente por la acumulación de hueso endocondral en el espacio medular, malformaciones en el modelado y

remodelado del esqueleto (Dutra y col., 2012; Greene y col., 1974; Leipold y col., 1970; Leipold y col., 1977).

Los terneros afectados genéticamente suelen ser abortados al final de la gestación, nacen prematuros o mueren pocas horas después de nacer. Presentan deformidades del cráneo con frente abovedada, deformación de huesos de la cara, braquignatismo inferior, impactación de molares, protrusión de la lengua y ausencia de médula ósea en los huesos largos (enfermedad de huesos de mármol).

En bovinos Aberdeen Angus la Osteopetrosis puede ser inducida tanto por un defecto hereditario recesivo como por la infección transplacentaria del virus de la diarrea viral bovina, aunque morfológicamente ambas enfermedades son diferentes (Scruggs y col., 1995; Wight-Carter, 2006). Esta EHL se presenta en las razas: Hereford (Leipold, 1977) y Simmental (Thompson, 2007), Aberdeen Angus negro y en Red Angus. Se produce por una mutación autosómica recesiva del gen SLC4A2 (solute carrier family 4, anion exchanger, member 2) que codifica una proteína que interviene en el intercambio de aniones necesario para la función apropiada de los osteoclastos. El gen SLC4A2 presenta una sustitución en la posición 4164 en la secuencia genómica cambiando el nucleótido G por A, produciendo un cambio en el codón y su posterior traducción aminoácida del aminoácido ácido Glutámico a Lisina (básico) con pérdida de su función induciendo a la muerte celular prematura por la alcalinización citoplasmática de los osteoclastos. El diagnóstico molecular se realiza mediante una reacción de PCR que permite la amplificación diferencial del alelo normal y del mutante utilizando un trío de cebadores (Meyers y col., 2010).

En el Uruguay se reportó esta EHL por primera vez en terneros Angus negro y colorado en 2 rodeos de cría (Quinteros y col. 2011). Se confirmó mediante diagnóstico molecular de Osteopetrosis en el Laboratorio IGENITY de Canadá (Cuadro 2). De acuerdo a estos autores probablemente la osteopetrosis ingresó al país por la importación de semen de toros Red Angus americanos portadores, los cuales se han utilizados en Uruguay ([www.redangus.org/node/215](http://www.redangus.org/node/215)). Los casos se presentaron en predios comerciales donde se realizaban cruzamiento entre parientes (Dutra y col., 2012).

#### 6) CARDIOMIOPATÍA CONGÉNITA ASOCIADA AL PELAJE CRESPO (OMIA 000161-9913)

El síndrome de miocardiopatía con pelaje lanoso (CMPPC) del ganado Hereford es una enfermedad letal, autosómica recesiva. Los terneros al nacer presentan la enfermedad con los siguientes síntomas: pelaje denso, enrulado o rizado. A los pocos días presentan dificultad respiratoria, arritmias ventriculares, intolerancia al calor y muerte cardíaca súbita, a veces inmediatamente después de un ejercicio. Algunos tienen la frente abovedada, exoftalmia, corrimiento ocular seroso y desarrollan una ulceración y queratitis en los primeros días del nacimiento. Esta EHL fue diagnosticada por primera vez en 1967 en Australia (Acland y Cook, 1969), presentando los neonatos en el útero fibrosis miocárdica y muerte temprana dentro de las primeras doce semanas de vida (Cook, 1981). Al nacer presentan cambios

cardíacos y del pelaje, desarrollando en algunos casos queratitis neonatal.

En el Uruguay se diagnostica por primera vez la CMPPC en Hereford (Dutra y col., 2011), observando que la mayoría de los animales murieron dentro de los 7 días de haber nacido. La necropsia en 4 terneros sacrificados mostró marcada cardiomegalia con hipertrofia de cardiomiocitos, desorganización en la arquitectura de las fibras miocárdicas y fibrosis intersticial leve, en la piel los folículos pilosos estaban distorsionados. La enfermedad fue diagnosticada en una cabaña de Cerro Largo y en un predio comercial de Lavalleja donde usaban toros de pedigrí de diferentes líneas de sangre. Los animales afectados que nacieron en la cabaña fueron del 5,71% y en el predio comercial del 3,75%. En el caso de Lavalleja las frecuencias para los portadores es de 31,4% y los que manifiestan la EHL son 3,8% o sea que los enfermos CMPPC son 6,3 veces menos que los portadores sanos (Cuadro 2). Los autores concluyen que la Cardiomiopatía asociada al pelaje crespo tiene una incidencia relativamente alta en la raza Hereford de Uruguay.

## DISCUSIÓN

El 31 de agosto de 2008 en el Uruguay se modificó el Artículo 14 de la Ley 18.341 en el cual se incluyó la verificación del mérito genético de los reproductores bovinos mediante la aplicación de nuevas tecnologías para acceder a exenciones tributarias. Textualmente se transcribe dicho artículo: *«Los gastos que se incurran para la incorporación de material genético animal, a saber reproductores (machos y hembras) embriones, semen y cualquier otro producto resultante de la aplicación de nuevas tecnologías, siempre que se disponga de un medio de verificación válido que compruebe objetivamente el mérito genético, y que este haya sido generado o certificado por instituciones públicas o personas jurídicas de derecho público no estatal. La instrumentación de su ejecución permitirá valorar objetivamente el mérito genético de los animales con el fin de evitar vicios redhibitorios (Código Rural, Cap. V) como el caso de aquellos reproductores portadores de enfermedades hereditarias recesivas. Sin embargo dicho artículo aún no se ha reglamentado a pesar de la presencia de varias EHL en nuestro país y su repercusión en la producción nacional. Dicha ley incentivaría a las cabañas y ganaderos a la adopción de nuevas tecnologías -como es el diagnóstico molecular para determinar portadores de EHL- cuyo costo sería deducido de los impuestos agropecuarios. Además de disminuir las pérdidas económicas por mortandad perinatal, éstas técnicas permitiría detectar genes deletéreos en los portadores sanos con un método confiable, validado internacionalmente en semen, embriones y reproductores. Dado que se requieren dos alelos recesivos en el genotipo para el nacimiento de animales con EHL se requiere 2 intervalos generacionales (Cardellino y Rovira, 1987) o sea de 8 a 12 años para que se aparezcan portadores de nuevas EHL (Cuadro 1) que lleve a un incremento de la morbilidad total actual (3 a 9%) en bovinos. El uso de pocos toros «elite» y la posibilidad de difundir animales a nivel internacional gracias a la inseminación artificial, puede llevar a un incremento en la endocria que llevaría a un incremento de las EHL de no ser consideradas al momento de seleccionar dichos reproductores. En el caso de la raza Holstein Friesian la población americana excede los 10 millones pero el número efec-*

tivo de fundadores es muy bajo (< 1000) dado el uso sistemático de la inseminación artificial en la que pocos machos dejan descendencia (Georges y Anderson, 1996). En el Uruguay se ha observado una disminución de la variabilidad genética de la raza Holando de una generación a otra dado los cruzamientos absorbentes con la población Holstein Frisian Norteamericana lo que hace que la identidad entre ambas es cercana a 0,9 (Kelly y col., 2002) indicando la existencia de una apreciable uniformidad racial entre poblaciones de diferentes países. El uso de la inseminación artificial, si bien ha permitido expandir los progresos genéticos mediante el uso de excelentes reproductores también trajo consecuencias en la expansión de las EHL. Un ejemplo es el caso del toro Carlin-M Ivanhoe Bell de EE.UU. del año 1980, portador del BLAD y del CMV (Síndrome de malformación vertebral) y tuvo 79.000 hijas registradas con producción y 1200 hijos (Citek y Bláhová, 2004; Odalys y Acosta, 2009 en dicho país). Actualmente EEUU acepta animales de pedigree Holstein portadores de 5 EHL y en Red Angus 12 EHL (Cuadro 1) pero informa el resultado del diagnóstico molecular de las mismas. En el caso del CMV el gen y la mutación que la producen se han identificado recién en el año 2001 pero el origen de la mutación se remonta al padre norteamericano de Carlin-M Ivanhoe Bell. Este toro también es portador de BLAD y se ha utilizado ampliamente en programas de ganadería en todo el mundo: Penstate Ivanhoe Star del año 1963 y era portador del BLAD (Gentle y Testoni, 2006) por lo tanto dichas enfermedades se difundieron en el mundo. El defecto genético responsable de la CVM se hereda como un rasgo autosómico recesivo y los terneros que llevan una copia del alelo deletéreo. Actualmente los animales portadores son identificados con el código genético CV en los registros de pedigree y los individuos sanos tienen el código TV. En el Cuadro 1 se describen el código genético de las EHL de las razas que más se crían en Uruguay. Por lo tanto es de gran importancia proporcionar asesoramiento genético a los criadores sobre dichos datos ya que si cruzamos hermanos portadores de EHL cuya transmisión es autosómica recesiva existe una probabilidad del 25% que sus hijos estén afectados y que un 50% sean portadores asintomáticos que transmitan la enfermedad. En nuestro país se cuenta con la tecnología molecular para testar dichas EHL que permiten detectar los portadores, además de contar con la ley 18.341 que podría dar la posibilidad de deducir su costo en los impuestos. En este sentido, es importante realizar el diagnóstico en los reproductores de dichas EHL para planificar los cruzamientos y disminuir la morbilidad mediante la selección de los reproductores libres de las mismas. Esto nos permitirá certificar los reproductores como libre de EHL y disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por la morbilidad así como detectar la presencia de las 24 EHL descritas en el Cuadro 1.

En el Cuadro 2 se estima los portadores de las EHL presentes en los rodeo analizados, de acuerdo a la ley del equilibrio génico de Hardy-Weinberg según la fórmula:  $P+H+Q=p^2+2pq+q^2$ , siendo P, H y Q las frecuencias genotípicas y p y q las Frecuencias génicas (Falconer y Mackay, 1996). Por ejemplo para el caso de la Cardiomiopatía de pelo Crespo en uno de los establecimiento de Lavalleja la frecuencia genotípica de los portadores es de 31,4% y los animales que manifiestan la EHL es de 3,8% o sea que son 8,26 veces menos la cantidad de individuos portadores normales que los afectados.

## CONCLUSIONES

Los diagnósticos patológicos y moleculares de enfermedades hereditarias en nuestro país confirman la presencia de 6 EHL de las presentes en USA para las razas Holando, Hereford y Angus. Estas son: en bovinos para carne MSUD 248, Epidermolisis Bullosa y á-Manosidosis, CMP de pelo crespo y osteopetrosis y en razas de bovinos para leche, BLAD.

-El desarrollo de esta herramienta biotecnológica permite controlar la diseminación de estas enfermedades hereditarias en el ganado bovino mediante un programa de erradicación y/o control testando a los toros y los sémenes. La ejecución en el Uru-

guay de la Ley 18.341 (Art.14) podría facilitar la aplicación de el diagnóstico molecular de EHL presentes en nuestro país que contribuirá a determinar la incidencia de las mismas en nuestras razas y estimar las pérdidas económicas que éstas ocasionan.

- Debemos tener en cuenta que los portadores de las EHL son normales pero mucho más numerosos que los enfermos siendo los que transmiten el alelo letal y se deberían testar ya que son el reservorio de los alelos letales y se expresan varias generaciones después.

## Agradecimientos

Por su colaboración técnica a Emma Solares y Sara Murchio.

## Referencias Bibliográficas

1. Aclannd H, Cook RW. (1969). Congenital cardiac disorder in calves. Vet Notes. Division of Animal Industry, NSW. Department of Agriculture, Sydney, 5: 8.
2. Agerholm JS. (1994). Congenital generalized Epidermolysis bullosa in a calf. Zentralbl Veterinaria Med 41:139-142.
3. Bellenger CR. (1971). Bull wastage in beef cattle. Aust Vet J 47:83-90.
4. Berg T, Healy PJ, Tollersrud OK, Nilssen O. (1997). Molecular heterogeneity for bovine á-manosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. Res Vet Sci 63:279-282.
5. Cardellino R, Rovira J. (1987). Mejoramiento Genético Animal. Montevideo, Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. 253 p.
6. Carnahan DL, Guffy MM, Hibbs CM, Leipold HW, Huston K. (1968). Hip Dysplasia in Hereford Cattle. JAVMA 152:1150-1157.
7. Citek J, Bláhová B. (2004). Recessive disorders-a serious health hazard? J Appl Biomed 2:187-194.
8. Cook RW. (1981) Cardiomyopathy and woolly haircoat in Poll Hereford calves. In: Australian Veterinary Association Year Book. En: Australian Veterinary Association. Sydney. Ed. M.G. Cooper y J.C. Holt. pp. 210.
9. Dennis JA, Healy PJ. (1999). Definition of the mutation responsible for maple syrup urine disease in Poll Shorthorns and genotyping Poll Shorthorns and Poll Herefords for maple syrup urine disease alleles. Res Vet Sci 67:1-6.
10. Dutra F. 1995. Estudio sobre la osteoartritis de cadera del novillo Hereford y su relación con la osteocondrosis y la displasia de cadera. Veterinaria, Uruguay, 30:3-24.
11. Dutra F, Baroni L. (2007). Epidermolisis hereditaria en terneros Hereford en Uruguay. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV. Paysandú. Uruguay, 270-271.
12. Dutra F, Castro A. (2007). Cardiomiopatía congénita asociada al pelaje crespo en terneros Polled Hereford en Uruguay. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV. Paysandú. Uruguay, 268-269.
13. Dutra F, Lussich M. (2007). Edema neuroaxial (posiblemente, maple syrup urine disease) en terneros Polled Hereford en Uruguay. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay, 306-307.
14. Dutra F. 2009. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag: 8-9. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
15. Dutra F. 2010. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag: 7-9. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
16. Dutra F. 2011. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag 7. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
17. Dutra F, Castro A, Mayol C, Quinteros C. (2011). Cardiomiopatía congénita asociada al pelaje crespo en terneros Polled Hereford en Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 47:17-23.
18. Dutra F, Baroni L, Techera M, Quinteros C. (2012). Osteopetrosis letal hereditaria (enfermedad de los huesos de mármol) en terneros Aberdeen Angus en Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 48:23-29.
19. Falconer D.S. y Mackay T.F.C. Introducción a la genética cuantitativa. Cap. 1. 4ª Ed. 2006. Zaragoza. Ed. Acribia S.A. pp.469.
20. Ford CA, Stanfield AM, Spelman RJ, Smits B, Ankersmidt-Udy AE, Cottier K, Holloway H, Walden A, Al-Wahb M, Bohm E, Snell RG, Sutherland GT. (2005). A mutation in bovine keratin 5 causing epidermolysis bullosa simplex, transmitted by a mosaic sire. J Invest Dermatol 124: 1170-1176.
21. Georges M, Andersson L. (1996). Livestock Genomics comes of Age. Genome Research 6:907-921.
22. Gerardi A. (1996). Bovine leucocyte adhesion deficiency: a review of a modern disease and its implications. Res Vet Sci 61:183-186.
23. Giovambattista G, Garcia P. (2010). Genética de animales domésticos. Buenos Aires. Ed. Intermédica. 261p.
24. Greene HJ, Leipold HW, Hibbs CM, Kirkbride CA. (1974). Congenital osteopetrosis in Angus calves. JAVMA 164: 389-395.

25. Harden KK, Robinson JL. (1987). Deficiency of UMP synthase in dairy cattle: a model for hereditary orotic aciduria. *J Inher Metab Dis.* 10:201-209.
26. Harper P, Healy PJ, Dennis JA. (1986). Maple syrup urine disease as a cause of spongiform encephalopathy in calves. *Vet Rec* 19:62-65.
27. Healy PJ, Dennis JA, Windsor PA, Pierce KD, Schofield PR. (2002). Genotyping cattle for inherited congenital myoclonus and maple syrup urine disease. *Aust Vet J* 80:695-697.
28. Healy, PJ. (1981). Modified granulocyte test for determination of mannosidosis genotype of cattle. *Res Vet Sci* 30:281-283.
29. Healy PJ. (1996). Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J Anim Sci* 74:917-922.
30. Herron BJ, Rao C, Lui S, Laprade L, Richardson JA, Olivieri E, Semsarian C, Millar SE, Stubbs L, Beier DR. (2005). A mutation in NFkB interacting protein 1 results in cardiomyopathy and abnormal skin development in *wa3* mice. *Human Mol Genet* 14:667-677.
31. Jolly R.D. (1974). Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetics disease. *Recent Adv Vet Sci Comp Med.* 19:1-29.
32. Kehrli ME, Ackermann M.R, Shuster DE, Vandermaaten MJ, Schmalstieg FC, Anderson DC, Hughes BJ. (1992). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency beta2 Integrin Deficiency in Young Holstein Cattle. *Am J Pathol.* 140:1489-1492.
33. Kelly L, Mortari N, De Andrés D, Postiglioni A. (2002). Estudio de la estructura genética de la raza Holando Uruguayo mediante marcadores genéticos. Comparación intraracial. *Veterinaria.* 37:7-15.
34. Kelly L, Trenchi G, D' Agosto S, Ravagnolo O, P Peraza, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Solares E, Dutra F.(2010). Molecular diagnosis of inherited diseases. World Buiatrics Congress XXVI. Santiago, Chile, Pag.31.
35. Kelly L. Dutra F. D' Agosto S. (2008). Diagnostico molecular de enfermedades hereditarias en el Uruguay: MSUD e ICM. *Jornadas Uruguayas de Buiatría.* XXXVI Paysandú. Uruguay. pp 241-241.
36. Legates J.E. y Warwick E.J. (1992). Cría y mejora del Ganado. 8ª ed. México, Ed. Interamericana-McGraw-Hill 344 p.
37. Leipold HW. (1977). Osteopetrosis in Angus and Hereford Calves. *Am J Path* 86:745-748.
38. Llambí S, Guevara K, Rincón G, Zaffaroni R, de Torres E, Barrera J, Arruga MV, Rodríguez V, Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiencia na adesao leucocitaria em uma populacao de bovinos da raza holandesa, no Uruguai. *Ars Veterinaria* 19:52-56.
39. Llambí S, Nicolini P, Kelly L, de Torres E. (2007). Frecuencia de la enfermedad hereditaria BLAD en vacas Holando-Uruguayo con control de mastitis. *Jornadas Técnicas Veterinaria-UdelaR V*, Montevideo. Uruguay, pp 26-27.
40. Llambí S. 2002. Estudios citogenéticos-moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades hereditarias monogénicas en bovinos de la raza Holando-Uruguayo (*Bos taurus*) Tesis PhD. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.
41. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, Mc Kenna WJ. (2000) Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) *Lancet.* 355: 2119-2124.
42. Meyers SN, McDaneld TG, Swist SL, Marron BM, Steffen DJ, O'Toole D, JR O'Connell, Beaver JE, Sonstegard TS, Smith TPL. (2010). Aedeletion mutation in bovine *SLC4A2* is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genómica* 11:337- 351.
43. Nicholas F.W. (1990). *Genética Veterinaria.* Zaragoza. Ed. Acribia 618 pp.
44. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. MIA Number: 324/000161. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/>
45. Odalys U, Acosta A. (2009). Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle. *Biotechnol Apl* 26: 204-208.
46. Pierce KD, Handford CA, Morris R, Vafa B, Dennis JA, Healy PJ, Schofield PR. (2001). A nonsense mutation in the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor associated with bovine myoclonus. *Mol Cell Neurosci* 17:354-363.
47. Quinteros C, Baroni L, Techera M, Dutra F. (2011). Osteopetrosis. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría. *Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXIX.* Paysandú. Uruguay. p: 233-234.
48. Rajesh K, Patel KM, Singh K, Soni JB, Chauhan KRS, Sambasiva R. (2006). Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. *J Appl Genet* 47: 239-242.
49. Rivero R, Kautz S, Gomar MS, Barros SS, Gimeno EJ. (2001). Enfermedad de almacenamiento lisosomal en terneros del norte de Uruguay. *Veterinaria.* 36: 5-9.
50. Rivero R, Matto C, Verdes JM, Kelly L, Guerrero F, Gimeno E. (2011). Diagnóstico de á Manosidosis Hereditaria en bovinos de Uruguay. *ENAPAVE XV.* Goiânia. CD.
51. Rubio T, Verdecia M. (2004). Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas. *MEDISAN:* 8:43-50.
52. Schwenger B, Schöber S, Detlef S. (1993). Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. *Genomics.*16: 241-244.
53. Scruggs DW, Fleming SA, Maslin WR, Groce AW. (1995). Osteopetrosis, anemia, thrombocytopenia, and marrow necrosis in beef calves naturally infected with bovine virus diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest.*7:555-559.



54. Shuster DE, Bosworth BT, Kehrl ME. (1992). Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene*. 114:267-271.
55. Simpson MA, Cook RW, Solanki P, Patton MA, Dennis JA, Crosby AH. (2009). A mutation in NFKB1 interacting protein 1 causes cardiomyopathy and woolly haircoat syndrome of Poll Hereford cattle. *Animal genetic*. 40:42-46.
56. Schwenger B., Tammen I. and Aurich. C. (1993). Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 100: 511-514.
57. Thompson K. (2007). Diseases of bones and joints. In: *Pathology of Domestic Animals*, ed. Maxie G, 5th ed., WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 1: 38-40.
58. Tollersrud OK, Berg T, Healy P, Evjen G, Ramachandran U, Nilssen O. (1997). Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause alpha-mannosidosis. *Eur J Biochem* 246:410-419.
59. Wight-Carter M. (2006). Inherited and BVD induced osteopetrosis in calves. *Kansas Vet Q* 2-3.
60. Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA. (1990). Premature Translation Termination of the Pre-E1-Alpha-Subunit of the Branched Chain Alpha-Ketoacid Dehydrogenase as a Cause of Maple Syrup Urine Disease in Polled Hereford Calves. *J Biol Chem* 265:2425-2427.