

Genotipado de SNPs relacionados con enfermedades hereditarias en terneras Holando utilizando el panel *GGP-BovineLDv3*

Genotyping of SNPs related to hereditary diseases in Holstein heifers using the *GGP-BovineLDv3* panel

Andrea Branda Sica¹, María Federici¹, Fernando Dutra², Carolina Briano², Agustín Romero², Marco Dalla Rizza¹, Silvia Llambí³.

¹ Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Ruta 48 km 10, Canelones, Uruguay. Correspondencia A. Branda Sica: abranda@inia.org.uy. Correspondencia MT. Federici: mfederici@inia.org.uy.

² DILAVE “Miguel C. Rubino”, Laboratorio Regional Este, Av. Miranda 2045, Treinta y Tres, Uruguay.

³ Sección de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Avda. Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay.

* El primer y segundo autor tuvieron igual contribución en este artículo.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54
N° 210 - 2 (2018) 9-13

DOI: 10.29155/VET.54.209.2

Recibido: 20/12/2017
Aceptado: 20/08/2018

Resumen

El objetivo de este estudio consistió en un relevamiento de las principales enfermedades hereditarias BLAD, DUMPs y Citrulinemia, en una población representativa de terneras Holando de la región este del Uruguay utilizando el panel *GGP-BovineLDv3*, así como en el análisis de la frecuencia del alelo mutante de BLAD desde que fue reportado por primera vez en Uruguay. El ADN fue extraído a partir de sangre fresca de 190 terneras Holando de la cuenca lechera de Cerro Largo (Uruguay) y genotipado con el mencionado panel, validando así técnicas previamente utilizadas tales como PCR-RFLP y PCR-secuenciación. Se detectó la presencia del alelo mutante para BLAD en una ternera y se estimó una frecuencia alélica de 0.28 %. Las frecuencias reportadas del alelo BLAD durante los últimos 15 años fueron comparadas, encontrándose una disminución de la misma en los trabajos reportados hasta llegar a cero en 2018, lo cual podría deberse al uso de semen genotipado libre de estas enfermedades durante los últimos años. No se encontraron alelos mutantes para DUMPs ni para Citrulinemia. El uso de paneles de baja densidad sería una herramienta muy útil para establecer estrategias de cría en tambos y monitorear las enfermedades hereditarias en la raza Holando.

Palabras clave: Bovinos de leche, desorden genético, diagnóstico, panel.

Summary

The objective of this study consisted in a screening of the main hereditary diseases BLAD, DUMPs and Citrullinaemia using the *GGP-BovineLDv3* panel in a representative population of Holstein heifers of the eastern area of Uruguay, as well as the analysis of BLAD mutant allele frequency since it was first reported in Uruguay in 2003. DNA was extracted from fresh blood of 190 Holstein heifers in the dairy area of Cerro Largo (Uruguay) and genotyped using the above mentioned panel, thus validating previously used techniques, such as PCR-RFLP and PCR-sequencing. We detected the presence of the BLAD mutant allele in one heifer, and allele frequency was estimated as 0.28%. Reported frequencies of BLAD allele during the last 15 years were compared and the reported studies revealed that the frequency progressively decreased and fell to zero in 2018, which can be due to the use of genotyped semen free of these diseases during the last years. No mutant alleles were found for DUMPs or Citrullinaemia. The use of low-density panels would be a useful tool to develop breeding strategies in dairy farms and to monitor hereditary diseases in Holstein breed.

Keywords: Dairy cattle, diagnosis, genetic disorder, panel.

Introducción

Los recientes avances en genética molecular han hecho posible la identificación en forma eficiente y rápida de animales heterocigotos mediante análisis genómico. Conocer la base molecular de un defecto posibilita la detección directa de los portadores a nivel genético (Agerholm, 2007). En la actualidad se conocen alrededor de 246 enfermedades genéticas relacionadas con todas las especialidades veterinarias en el ganado bovino, la mayoría de ellas son del tipo monogénico (OMIA, 2018). BLAD (deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina, 000595-9913), DUMPs (deficiencia en la enzima uridina monofosfato sintasa, 000262-9913) y Citrulinemia (deficiencia en la enzima arginosuccinato sintetasa, 000194-9913) son enfermedades de herencia autosómica recesiva y han sido descritas en el catálogo OMIA, en el cual está recopilada toda la información sobre estas tres enfermedades con las mutaciones reportadas por sus autores (Shuster y col., 1992; Schwenger y col., 1993; Dennis y col., 1989; respectivamente).

Se han utilizado *tests* genéticos que permitieron identificar las mutaciones de estas tres enfermedades en poblaciones de animales Holando en Uruguay tales como: PCR-RFLP (del inglés *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Llambí, 2002; Llambí y col., 2003; Kelly y col., 2010; Branda Sica y col., 2016), el análisis del electroferograma de la secuencia del amplicón (Branda Sica y col., 2016) y PCR-HRM (con la aplicación *High Resolution Melting*) (Branda Sica y col., 2015; Federici y col., 2018). A partir del año 2007 se desarrollaron tecnologías de genotipado en paneles que permiten evaluar de forma simultánea una gran cantidad de SNPs (siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) distribuidos de manera uniforme en todo el genoma bovino. Existen paneles de diferentes densidades, el de baja densidad que permite evaluar 6.909 SNPs de forma simultánea (*IlluminaSNP7K*), el de alta densidad, el “*BovineHD*” que cuenta con sondas específicas para evaluar 777.962 SNPs diferentes y el de media densidad ó 50K (*BovineSNP50*) que incluye sondas para 54.600 SNPs altamente informativos distribuidos de manera uniforme en todo el genoma bovino. Dado que el costo de genotipar un animal con un panel de más de 50.000 SNPs era demasiado alto para su uso masivo en la población se desarrollaron los paneles de baja densidad para estudios específicos. El primer panel de baja densidad, el *Bovine3K* con 3.072 SNPs fue desarrollado y comercializado por la empresa *Illumina* y USDA-ARS en 2010. Con el desarrollo de métodos de imputación de genotipos, el genotipado con paneles de baja densidad (*BovineLD* y *GGP*) se ha incrementado, pues en comparación con paneles de media densidad presentan una muy pequeña reducción en la exactitud, pero aproximadamente a la mitad del costo, siendo una opción eficiente para el genotipado de poblaciones grandes (Wiggans y col., 2013). Los paneles de baja densidad utilizados para ganado de leche son: *GeneSeekDairy-ULTRA-LDv2* (7.049 SNPs) y los *GGP-BovineLDv1*, *v2*, *v3* y *v4* con 8.610, 19.721, 26.151 y 30.125 SNPs, respectivamente, de *GeneSeek* (*Neogen Corpora-*

tion), y los *BovineLDv1* (6.912 SNPs) y *BovineHD777K* de *Illumina*. En este estudio se utilizó el panel *GGP-BovineLDv3* que incluye la detección de los SNPs asociados a las enfermedades monogénicas BLAD, Citrulinemia y DUMPs que antes venían como *tests* individuales.

Un tema no menor es la consideración de los costos de las técnicas moleculares tradicionales de PCR y sus variantes frente al uso de un panel de baja densidad como el utilizado en el presente trabajo (*GGP-BovineLDv3*).

El objetivo de este trabajo consistió en realizar un *screening* de las enfermedades hereditarias BLAD, DUMPs y Citrulinemia, en una población representativa de terneras Holando de la región este utilizando el panel *GGP-BovineLDv3* de 26K y comparar la evolución temporal de estas enfermedades en el país (2003 al 2018). Se validaron las técnicas previamente utilizadas en la muestra poblacional de terneras Holando de recría reportados por Branda Sica y col. (2016 y 2015).

Materiales y métodos

Muestras y material de referencia

Se colectó sangre de 190 terneras de recría (cohortes representativas de 24 predios de la cuenca lechera de Cerro Largo, Uruguay). Estas terneras de recría fueron previamente analizadas para la detección de alelos mutantes de BLAD y Citrulinemia mediante PCR-RFLP, y PCR- secuenciación (Branda Sica y col., 2016), y PCR en tiempo real con la aplicación HRM para BLAD (Branda Sica y col., 2015).

Extracción de ADN, concentración y calidad de ADN

El ADN fue extraído a partir de glóbulos blancos siguiendo las normas y los protocolos del Banco de ADN Genómico Animal de la Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, versión modificada del protocolo de Green y Sambrook (2012). Se determinó la concentración del ADN por nanodrop a 260 nm (*NanoDrop 8000 spectrophotometer*, *Thermo Scientific*) y su calidad por la relación OD260/OD280.

Análisis genético de los datos

Estas muestras de ADN fueron enviadas a genotipar a la empresa *Neogen Corporation* de *GeneSeek*, donde se realizó el genotipado con el panel *GGP-BovineLDv3* de 26K, de análisis químico *Infinium* de plataforma *Illumina*. Para identificar si las terneras Holando son portadoras de las enfermedades hereditarias: BLAD, Citrulinemia y DUMPs, se consideraron los genotipos con *call rate* superior a 90 % asegurando la alta calidad de los datos genómicos en esta población analizada. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas por conteo directo según el método de Nei (1989).

Resultados

Mediante el genotipado con el panel *GGP-BovineLDv3* de 26.151 SNPs se detectó la presencia del alelo mutante para BLAD en una sola ternera de recría en un total de 178 terneras genotipadas (*call rate* >0.90). La frecuencia del alelo mutante para BLAD en esta muestra poblacional estudiada fue baja, de $q=0.0028$, y la frecuencia genotípica de terneras portadoras de BLAD, 0.56 %. No se encontraron alelos mutantes para DUMPs y Citrulinemia en un total de 181 terneras genotipadas, respectivamente (*call rate* >0.90). En el **cuadro 1** se muestra el número total de animales genotipados utilizando dicho panel, así como de genotipos normales y portadores de BLAD, Citrulinemia y DUMPs, con sus identificaciones respectivas en el genoma bovino. En la **figura 1** se muestra un gráfico de comparación de la evolución a través del tiempo de la frecuencia del alelo mutante de la enfermedad BLAD en los distintos relevamientos realizados en Uruguay.

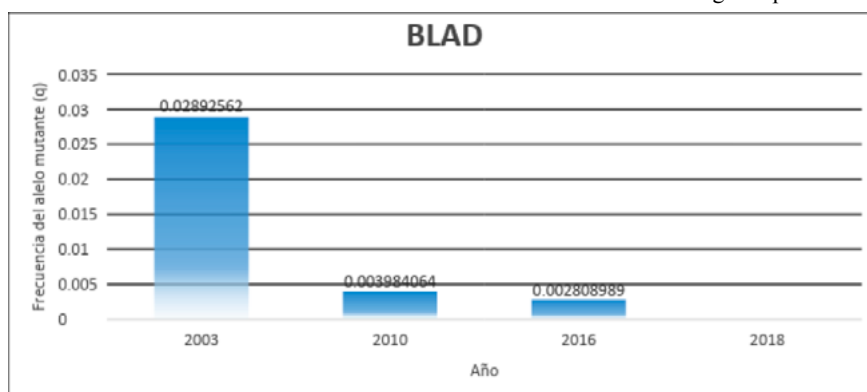


Figura 1. Evolución de las frecuencias del alelo mutante (q) de la enfermedad BLAD en Uruguay analizadas según los estudios de Llambí y col. (2003); Kelly y col. (2010); Branda Sica y col. (2016); y Federici y col. (2018).

Cuadro 1. Número de individuos genotipados libres y portadores de enfermedades hereditarias letales utilizando el panel *GGP-BovineLDv3*, 26 K (*GeneSeek Genomic Prolifer* de baja densidad para bovino, versión 3, con 26.151 SNPs), los genes asociados con su identificación en NCBI y su localización en el genoma.

Enfermedad hereditaria letal (OMIA) ¹	Gen (ID Gen NCBI) ²	Cromosoma: Localización genómica ³	Individuos genotipados (<i>call rate</i> >0.90)	Número de individuos obtenidos de cada genotipo	
				Libres	Portadores
BLAD (000595-9913)	ITGB2 (281877)	1: 145104446-145133581	178	177	1
Citrulinemia (000194-9913)	ASS1 (280726)	11:100791339-100843336	181	181	0
DUMPs (000262-9913)	UMPS (281568)	1:69732778-69782823	181	181	0

¹OMIA: *Online Mendelian Inheritance in Animals*, <http://omia.org.uy/home>, actualizado en 26/05/2018. BLAD: deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina; Citrulinemia: deficiencia en la enzima de la arginosuccinato sintetasa; DUMPs: deficiencia en la enzima de la uridinina monofosfato sintasa.

²ID Gen NCBI: *National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, actualizado en 26/05/2018.

³UMD 3.1 *genome assembly* (*Center for Bioinformatics and Computational Biology*, 2010).

Discusión

Se compararon los resultados del genotipado utilizando el panel *GGP-BovineLDv3* de 26.151 SNPs con los 2 protocolos de PCR-RFLP (para BLAD y Citrulinemia), y 2 de confirmación por PCR-secuenciación (BLAD y Citrulinemia) y 1 de PCR-HRM (BLAD), respectivamente estudiados en los trabajos de Branda Sica y col., 2016 y 2015, en la muestra poblacional de terneras de recría. El 100 % de concordancia entre los resultados de los cinco métodos indican tanto la alta sensibilidad y especificidad del panel *GGP-BovineLDv3*. La frecuencia de terneras portadoras de BLAD (0.56 %) fue menor a las reportadas previamente por Llambí y col. (2003); y Kelly y col. (2010) (6.6 % y 0.79 %, respectivamente) Con respecto a la evolución de la frecuencia del alelo mutante de BLAD desde su primer reporte en 2003 al presente en Uruguay, se observó una importante disminución (Llambí y col., 2003; Kelly y col., 2010; Branda Sica y col., 2016; Federici y col., 2018) (**figura 1**). Esta disminución podría deberse al uso de semen genotipado libre de estas enfermedades

en los últimos años. La alta frecuencia en el muestreo reportado por Llambí y col. (2003) refleja el hecho de que fueron seleccionadas muestras de tamaño pequeño en el que se encontró que fue utilizado como reproductor un toro portador de BLAD. Estos cuatro trabajos representan las únicas fuentes de información sobre animales portadores de BLAD mediante técnicas de diagnóstico molecular en Uruguay y éste sería el primer estudio comparativo de la evolución de este alelo mutante en el tiempo desde que se detectó esta enfermedad por primera vez en 2003. En Alemania, Schütz y col. (2008) encontraron que la frecuencia del alelo mutante para BLAD disminuyó aproximadamente a 1,6 % en 2007 en una población de vacas Holando que fueron genotipadas utilizando dos *tests* genéticos como PCR-RFLP y PCR-FRET, y se demostró que mediante la selección asistida por marcadores se podía reducir considerablemente la frecuencia de una mutación dentro de un período no más de 5 años. La incidencia de BLAD fue muy elevada (23 %) en estudios anteriores a partir del primer reporte de Shuster y col. (1992). Debido a los análisis de *screening* regulares, las incidencias se están reduciendo en todo el mundo (Meydan y col., 2010).

Todos los animales validados en este estudio presentaron un genotipo homocigota normal para la enfermedad DUMPs, no identificándose alelos mutantes en la población analizada. Esta enfermedad había sido detectada en EE.UU y Europa (Robinson y col., 1993) por la importación de semen de “*Happy Herd Beautician*”, uno de los mejores toros Holando de EE.UU en 1987. En Uruguay no hay reportes de presencia de portadores de la enfermedad DUMPs desde 2002 (Llambí, 2002; Kelly y col., 2010). Tampoco se encontraron animales portadores de Citrulinemia en los reportes de Llambí (2002); Kelly y col. (2010); Meydan y col. (2010); y Branda Sica y col. (2016). Esta enfermedad había sido detectada en Australia, EE.UU y Europa por la importación de semen de un toro Holando de pedigrí conocido mundialmente como “*Linmarck Kriss King*” de EE.UU (Healy y col., 1991).

Se recomienda el *screening* utilizando paneles de baja densidad, como el *GGP-BovineLDv3*, en toros de cría como control para prevención y monitoreo de los alelos mutantes en relación con las técnicas moleculares previamente citadas dada la gran cantidad de información aportada por este panel, la alta precisión en el genotipado de SNPs vinculados a enfermedades hereditarias y actual tendencia a la disminución de los costos por muestra/animal. Debemos tener en cuenta que la utilización de técnicas tradicionales de PCR y sus variantes (PCR-RFLP, PCR-secuenciación y PCR-HRM) tienen un costo estimado/muestra de U\$S 39, 40 y 15, respectivamente, frente al panel de baja densidad, U\$S 40/muestra.

Considerando la calidad de información genómica y cantidad de SNPs vinculados a enfermedades que se están incorporando junto a los caracteres productivos genotipados en un solo *test* de ADN, este insumo puede ser de gran utilidad al momento de tomar decisiones y establecer estrategias de cría, apoyando el mantenimiento de la salud de los terneros y la sostenibilidad de la raza Holando.

Agradecimientos

Al Dr. Gonzalo Macció de COLEME por su autorización y cooperación en el sangrado e información de los animales.

Bibliografía

1. Agerholm JS. (2007). Inherited disorders in Danish cattle. *APMIS Suppl* 2007, 115(122):1-76.
2. Branda Sica A, Federici MT, Briano C, Pacheco H, Romero A, Dutra F, Dalla Rizza M, Llambí S. (2015). Identificación de terneras Holando portadoras de la deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina mediante análisis de curvas de disociación de alta resolución. Resumen en formato Póster, 9° Jornadas Técnicas de Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay (Nov 23-24, 2015).
3. Branda Sica A, Federici MT, Dutra F, Romero A, Briano C, Dalla Rizza M, Llambí S. (2016). Identificación de terneras Holando portadoras de BLAD y Citrulinemia en la región Este de Uruguay por PCR-RFLP y secuenciación. *Revista Veterinaria* (Montevideo), 52(202):23-27.
4. Dennis J, Healy P, Beaudet A, O'Brian W. (1989). Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proc Natl Acad Sci*, 86:7947-7951.
5. Federici MT, Branda Sica A, Castro LA, Caffarena D, Schild C, Casaux L, Briano C, Llambí S, Dutra F. (2018). Utilización de técnicas moleculares para el diagnóstico de BLAD en terneros lecheros en Uruguay. Resumen en formato Póster, VI Congreso AUPA, Asociación Uruguaya de Producción Animal, Campus Interinstitucional Tacuarembó, Uruguay (marzo 19-21, 2018). pp.43.
6. Green MR y Sambrook J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. En Michael R. Green, Joseph Sambrook (4th Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp.2028.
7. Healy PJ, Dennis JA, Camilleri LM, Robinson JL, Stell AL, Shanks RD. (1991). Bovine citrullinaemia traced back to the sire of Linmarck Kriss King. *Austr. Vet J*, 68(4):155-157.
8. Kelly L, Trenchi G, D'Agosto S, Ravagnolo O, Peraza P, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Solares E, Dutra F. (2010). Molecular diagnosis of inherited diseases. World Buiatrics Congress XXVI. Santiago de Chile, Chile. Session Genetic and Breeding 2010. p.31.

-
9. 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 doctoral, PhD]. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
 10. Llambí S, Guevara K, Rincón G, Zaffaroni R, de Torres E, Barrera J, Arruga MV, Rodríguez V, Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiência na adesão leucocitaria em uma população de bovinos da raça holandesa, no Uruguai. *Ars Veterinaria*, 19:52–56.
 11. 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 Vet Scand*, 52:56.
 12. Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Nueva York, Columbia University Press 512 p.
 13. OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals). (2018). Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. [Internet]. [Actualizado 2018: citado 26 mayo 2018]. Disponible en: <http://omia.angis.org.au/>
 14. Robinson JL, Popp RG, Shanks RD, Oosterhof A, Veerkamp JH. (1993). Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein-Friesian cattle of North America and Europe. *Livest Product Sci*, 36:287-298.
 15. Schütz E, Scharfenstein M, Brenig B. (2008). Implication of Complex Vertebral Malformation and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency DNA-Based Testing on Disease Frequency in the Holstein Population. *J. Dairy Sci*. 91:4854-4859.
 16. Schwenger B, Schoeber S, Simon D. (1993). DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics*, 16:241–244.
 17. 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.
 18. 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. *J. Dairy Sci*, 96:1258–1263.