



Tesina de Grado

"Introducción al análisis bioinformático del gen TRO (trofinina) en bovinos"

Estudiante: María Manuela Silveira Etcheverry

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas

Realizado en Área Genética de Facultad de Veterinaria-UdelaR

Tutor: Dra. Silvia Llambí

Octubre 2010

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Dra. Silvia Llambí, por permitirme realizar está pasantía, por su apoyo y disponibilidad.

Al Lic. Andrés Iriarte por su apoyo y asesoramiento en el análisis bioinformático.

A todo el grupo del Área Genética de Facultad de Veterinaria, por la ayuda brindada.

A mi madre Graciela y a mi hermano Juan y a toda mi familia por apoyarme siempre en estos años de estudio.

A mi amiga Daniela, por enseñarme el valor de la amistad y saber que siempre puedo contar con ella.

A Joaquín, que en estos años transcurridos fue mi guía y mi apoyo en todo momento.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	6
Fragilidad cromosómica y reproducción en bovinos	7
Fecundación e implantación embrionaria.	9
Bioinformática y gen trofinina	11
Objetivos general y específicos	13
Materiales y métodos	14
Muestras	14
Bioinformática y estudios moleculares	15
Digestión virtual y análisis con endonucleasas de restricción	16
Resultados	17
Discusión	23
Bibliografía	26

RESÚMEN

En el cromosoma X del bovino existe una región de inestabilidad cromosómica (BTAXq24-31) asociada a alteraciones de la fertilidad donde se ha planteado la hipótesis de existencia de genes candidatos asociados a características reproductivas que se estarían expresando inadecuadamente. Un posible gen candidato relacionado con mortalidad embrionaria y localizado en esa región (Xq25-33) es el gen TRO.

Este codifica para una proteína troponina que interviene en la adhesión del blastocisto al epitelio endometrial del útero durante la implantación embrionaria. El gen TRO ha sido caracterizado en humanos desconociéndose su estructura molecular en bovinos.

En el presente trabajo se realizaron estudios moleculares y bioinformáticos del Gen TRO en muestras de ADN de 5 hembras bovinas Holando-Uruguayo a las cuales en estudios previos se les había realizado un control citogenético utilizando inductores químicos para estudio de fragilidad cromosómica del X. Se diseñaron oligonucleótidos y se amplificó por PCR convencional teniendo en cuenta la información suministrada por el GenBank.

Se realizó el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y el estudio de sitios de corte con endonucleasas de restricción. En las cinco muestras de ADN bovino se obtuvo amplificación por PCR de la secuencia del gen TRO siendo el tamaño del fragmento amplificado de 332 pb.

Del análisis bioinformático se pudo concluir que:

a) existe una delección en el linaje de ungulados (artiodáctilos y perisodáctilos) y a continuación un indel (inserción/delección) generándose un corrimiento en el marco de lectura.

b) Se identifica el gen en la base de datos EST del Genbank (DN287357.1) proviniendo la secuencia del “US meat animal research center”,

c) No se detectan polimorfismos en las 5 muestras secuenciadas observándose una alta conservación a nivel de codones sinónimos y no-sinónimos dentro de la región analizada

d) Al realizar la comparación con la secuencia de referencia se identifica una transición A→G en la posición 255 del alineamiento de tipo neutral con cambio de codón sinónimo. Se discuten los resultados.

INTRODUCCIÓN

El Uruguay, dada su ubicación geográfica, presenta excelentes condiciones naturales en materia de suelos y un clima templado que lo hace extremadamente apto para la producción de leche. Más del 80% de su territorio posee aptitud agropecuaria. Debido a ello el país ha podido criar razas ganaderas muy adecuadas para esta actividad. Su principal plantel de raza productora de leche es el Holando Uruguayo (Holstein Friesian). Esta raza es originaria de la región de Frisia en el norte de Holanda (Figura 1), en donde estos animales ya eran muy conocidos durante los siglos XVI y XVII, por su producción lechera. Los animales se caracterizaban por ser overos negros y overos colorados (esta última variedad es conocida desde 1906 como Meuse-Rhine-Yssel o Holando Colorado).

En nuestro País esta raza se introduce en 1889 por primera vez, pero a partir de 1920 es que aumenta de forma notoria el censo de estos animales. En las últimas décadas se produce una gran penetración del Holstein americano y canadiense en nuestros rodeos. En Uruguay la superficie agropecuaria lechera es de unas 849.000 hectáreas con un total de 4.600 tambos y 744 miles de cabezas de ganado lechero. En la actualidad la producción lechera ha tenido un creciente desarrollo (Producción leche x hectárea y por año, 2.370 lts) con respecto a los últimos diez años (<http://www.mgap.gub.uy/>).

La producción lechera se encuentra asociada a una buena aptitud reproductiva del rodeo, en teoría se debería lograr obtener un ternero/vaca por año con un Intervalo parto concepción (IPC) menor a los 90 días. En el Uruguay el IPC en rodeos de producción lechera es largo debido a diversos factores entre los que principalmente se destaca una pobre detección de los celos y una pérdida importante por mortalidad embrionaria (Cavestany y col, 2007). Durante el período 2001-2005, el IPC fue de 150 días (Instituto Nacional de Mejoramiento Lechero, INML). En animales domésticos, la fertilidad es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales complejos. En bovinos se ha determinado que la mortalidad embrionaria es una de las causas importantes de disminución de la

fertilidad (Hansen, 2002). Como factores de origen genético asociados a alteraciones de la fertilidad en bovinos se encuentran descriptos la presencia de inestabilidad cromosómica (sitios frágiles cromosómicos) en diversas especies de mamíferos (Uchida y col., 1986; 1998; Slota y col., 2000).



Figura 1 : Aspecto fenotípico de la raza Holando

(Foto tomada de http://www.holando.com.uy/florida_2007/103.jpg).

FRÁGILIDAD CROMOSÓMICA Y REPRODUCCIÓN EN BOVINOS

Los bovinos (familia Bovidae) forman parte del grupo de los ungulados, del orden Artiodactyla representados por 124 especies distribuidas en 45 géneros diferentes. (<http://www.fao.org>, 2007). Los bovinos (*Bos taurus taurus*) presentan un número cromosómico $2n=60$, XX las hembras y $2n=60$, XY los machos presentando un cariotipo con cromosomas autosómicos de morfología acrocéntrica mientras que el

cromosoma sexual X es submetacéntrico y el Y es metacéntrico. Los sitios frágiles son regiones de ruptura cromosómica. Citológicamente, son definidos como sitios de pobre coloración, gaps o rupturas de la hebra de ADN en cromosomas metafásicos, cuando las células son tratadas bajo condiciones específicas de cultivos. Son altamente conservados en la evolución cromosomal y muchos de ellos son heredados en las familias. Se ha propuesto que los sitios frágiles pueden ser el resultado de la inhabilidad del ADN de compactarse durante la metafase. Se clasifican como sitios frágiles raros y sitios frágiles comunes.

Los sitios frágiles raros se presentan con una baja frecuencia poblacional y cuando se analizan en cultivos se presentan en gran número en las placas metafásicas (5-30%). Son sensibles al folato, bromodeoxiuridina (BrdU), timidina y distamycina A. (Llambí, 2002). En estos sitios son comunes las expansiones de trinucleótidos CGG y las repeticiones de microsatélites AT.

Los sitios frágiles comunes, presentan una alta frecuencia en la población y son visibles en pocas placas metafásicas (menos del 5%). Son inducidos por la afidilcolina (APC) y la azacitidina (5-azaC). La primera es un inhibidor de la ADN polimerasa alfa; mientras que la segunda es un análogo de pirimidina y actúa inhibiendo a la ADN metiltransferasa responsable de la metilación del ADN. Los sitios frágiles comunes presentan islas AT interrumpidas.

En bovinos Holando-Uruguayo se han observado la presencia de sitios frágiles en el cromosoma sexual X (BTAX) asociada con problemas reproductivos. También existe una región de inestabilidad en el brazo largo del cromosoma sexual X (BTAXq) donde se ubican genes asociados a caracteres reproductivos. El gen que codifica para la proteína trofinina se encuentra mapeado en la región Xq25-33, que coincide con una zona de inestabilidad del cromosoma BTAX.

FECUNDACIÓN E IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Durante la fecundación, el material genético del espermatozoide y del oocito secundario haploides se fusionan en un solo núcleo diploide. Esto ocurre normalmente en la trompa de Falopio.

La fecundación requiere de tres acontecimientos críticos: migración de los espermatozoides, unión y fusión de las membranas plasmáticas de los dos gametos.

Después de la fecundación, sobrevienen divisiones celulares mitóticas rápidas en el cigoto, la segmentación. La primera división celular del cigoto se inicia después de la fecundación y se completa al cabo de unas horas. En el segundo día después de la fecundación, se ha completado la segunda segmentación y existen cuatro células, mientras que al término del tercer día hay 16 células. Éstas, cada vez más pequeñas, se denominan blastómeras. Las segmentaciones sucesivas producen finalmente una esfera sólida de células, a la que rodea todavía la zona pelúcida, que recibe el nombre de mórula y tiene casi el mismo tamaño que el cigoto original.

Conforme la mórula se mueve por la trompa de Falopio hacia la cavidad uterina, el grupo denso de células se ha convertido en una esfera hueca de células que entra en la cavidad uterina y su nombre cambia a blastocisto.

El blastocisto tiene una cubierta externa de células, el trofoblasto; una masa interna de células, y una cavidad interna llena de líquido, el blastocele. El trofoblasto y una parte de la masa interna de células forman en última instancia las membranas que componen la parte fetal de la placenta, mientras que el resto de la masa interna de células constituye el origen del embrión.

El blastocisto permanece libre en la cavidad uterina durante un tiempo antes de fijarse a la pared de útero, proceso que se llama implantación. Esto es un proceso complejo en el cual hay un “diálogo” estrecho entre las células maternas y células embrionarias. (Nao y col. 1998)

La implantación es gradual y lenta. Los cambios histológicos más importantes se

refieren al desarrollo del trofoblasto, epitelio que cambia, de un tejido simple cúbico a uno estratificado con dos o tres hileras de células cúbicas o cilíndricas. Este trofoblasto desarrollado, modifica el epitelio uterino de revestimiento, el cual sufre un proceso de adelgazamiento y llega a verse como un epitelio aplanado, a partir del epitelio simple cilíndrico o seudoestratificado propio del útero en la fase progestacional del ciclo estral. Los cambios, se inician cerca del embrión y se expanden hacia las zonas periféricas.

La implantación en los bovinos es superficial y no invasiva y en ella intervienen fases de adición y adhesión de células epiteliales del trofoblasto y del útero.

¿Quiénes son los responsables de esta adhesión celular entre las células del trofoblasto y las células endometriales? En estudios recientes se ha descubierto un complejo de proteínas responsables de esta unión (trofinina, tastina y bistina). La tastina es necesaria para el correcto funcionamiento de la trofinina, siendo la Bistina la que interacciona directamente con la trofinina y la tastina. (Nao y col. 1998).

La trofinina es una proteína intrínseca de membrana, constituida por 749 aminoácidos y 8 dominios transmembrana (Michiko y col. 1995). Su región amino terminal situada en el citoplasma, presenta unos 70 aminoácidos hidrofílicos (Nao y col. 1998). Esta región presenta 3 residuos de serinas y 1 de treonina, los cuales serían lugares potenciales para la fosforilación por proteínas quinasas. (Michiko y col. 1995). Más del 90% de la proteína se compone de repetidos deca péptidos. Dentro de estos se encuentran tres regiones hidrófobas, las cuales sugieren que estas regiones son intrínsecas de la membrana. Mediante técnicas de hibridización "in situ" este gen se encuentra mapeado en la región HSAXp11.21-p11.22 en los humanos, mientras que en bovinos ha sido mapeado en la región BTAXq25-33 (Asai y col. 2004).

La trofinina media la unión inicial del embrión a los epitelios uterinos por una adherencia apical entre células trofoblásticas y células endometriales (Aplin, 1997; Junya y col. 2005) (Figura 2). En el endometrio humano, no fue detectada en la

fase de proliferación (días 6-13) o en la fase de ovulación (día 14), pero si fue detectad en las membranas plasmáticas apical de la superficie del epitelio endometrial en el día 16 y 17. La expresión de la trofinina por el epitelio materno es muy restringida e inducida por la implantación de un embrión humano. (Nao y col. 1999). En la placenta humana a partir de la semana 6 del embarazo, la trofinina se encontró en el citoplasma y en vesículas tipo lisosomas del sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas, en el epitelio endometrial glandular y en el epitelio materno próximo a las vellosidades coriónicas. Luego de la sexta semana se observa la presencia de la proteína en el citotrofoblasto, y su disminución en el sincitiotrofoblasto. En el segundo y tercer trimestre del embarazo, no se detecta expresión de trofinina. También se ha detectado la presencia de esta proteína en los macrófagos. (Michiko y col. 1995)

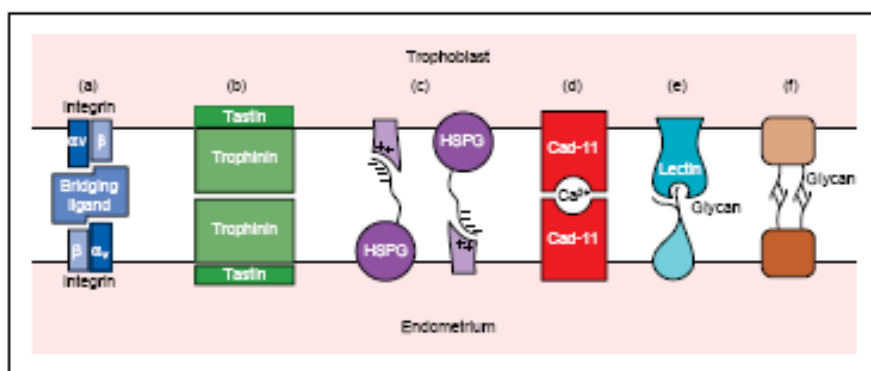


Figura 2: Interacciones mediadas por moléculas de adhesión entre el trofoectodermo y el endometrio uterino durante la implantación embrionaria. (Tomado de Aplin, 1997).

BIOINFORMÁTICA Y GEN TROFININA

La bioinformática (estudios “in silico”) es considerada actualmente una disciplina de la ciencia en donde se integran conocimientos de biología, computación, y

tecnología de información. Dentro de la llamada biología "in sílico" se conoce la utilización de recursos de programas informáticos y bancos de información de secuencias para ensamblar y alinear las mismas pudiendo conocer entre otras cosas la estructura de genes (Mejía-Guerra y Lareo., 2006).

Las herramientas bioinformáticas más usadas se han desarrollado como una respuesta a las necesidades de obtener más información sobre las secuencias aprovechando el conocimiento previo almacenado en bases de datos.

Las herramientas bioinformáticas nos permiten por ejemplo, a partir de nuestra secuencia problema buscar información relacionada con otras secuencias similares a ella. También se pueden buscar motivos funcionales y realizar alineamientos múltiples. Actualmente se puede realizar en eucariotas la predicción de genes y de estructura de proteínas.

En bovinos a la fecha existe un reporte de una secuencia parcial de gen TRO (532 pb) en el banco de genes GenBank (nº de acceso AY444495). Dicha secuencia presenta un 81% de similitud con la secuencia del gen en humanos (Asai, 2004b). Al encontrarse el gen TRO relacionado a la implantación embrionaria dentro de esta región cromosómica y debido al desconocimiento de su estructura a nivel molecular en bovinos es que nos proponemos comenzar el estudio "in sílico" de regiones del mismo y secuenciación de regiones del mismo.

OBJETIVOS GENERAL

Realizar un análisis molecular y bioinformático de secuencias del Gen TRO en ADN de bovinos hembras de la raza Holando Uruguayo con control citogenético de fragilidad cromosómica.

Objetivos específicos

- Diseñar primer específicos para analizar secuencias del gen TRO en ADN de Bovinos Holando
- Amplificación por PCR y análisis de secuencias (secuenciación automática, cortes con enzimas de restricción).
- Comenzar a ensamblar información "in sílico" del Gen TRO en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizó ADN extraído por la técnica convencional con fenol/cloroformo de 5 bovinos hembras Holando Uruguayo (Vaquillonas preñadas al 1er servicio y 2do servicio) identificadas con los números 1, 2, 3, 4 y 5. En trabajos anteriores a dichos animales se les había realizado un control citogenético utilizando inducciones con APC y 5' aza-C para estudio de fragilidad de la región BTXq3.1 (tabla 1) (Llambí y col, 2008; Llambí y col, 2004).

Nº Animal	Control SFBTX3.1	APC SFBTX3.1	5' aza-C SFBTX3.1
1	4%	10%	0%
2	6%	10%	0%
3	2%	8%	2%
4	4%	20%	0%
5	8%	12%	2%

Tabla 1: Caracterización citogenética realizada previamente a dichos animales donde se estudiaron 50 placas metafásicas por cultivo (control, inducidos con 0.3 uM APC, 5uM de 5' aza-C).

Bioinformática y estudios moleculares

Se midió la concentración y pureza del ADN de las 5 muestras con espectrofotómetro UV-Nanodrop 1100. Se realizaron diluciones para obtener concentraciones de trabajo de 50-70 ng/ul.

Mediante el número de acceso a la secuencia del gen TRO bovino (AY444495.1) del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/38230715>) se diseñaron un par de oligonucleótidos utilizando la herramienta bioinformática de dominio público Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome):

F-BTAXTRO1: 5'CACTGATATCTCACTGGCTCCAT3'

R-BTAXTRO2: 5'CTCTTGACCCAGAGGGTGG3'.

Las reacciones de PCR para amplificar el fragmento del gen TRO se realizaron utilizando una concentración final de 4 uM de cada oligonucleótido. El programa utilizado fue de 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min durante 30 ciclos (con una desnaturalización previa de 1 ciclo a 94°C 4 min y extensión final de 72° C 5 min).

Con la secuencia AY444495.1 extraída del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realiza un estudio preliminar en el servidor Genome Vista (<http://genome.lbl.gov/cgi-bin/GenomeVista>) realizando un estudio comparativo con el genoma humano.

Para el análisis bioinformático de alineamiento con diferentes especies de mamíferos (secuencias obtenidas de la base de datos NCBI) se utilizó el programa de dominio público Bioedit (método Clustal) y las bases de datos: ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) .

Con los alineamientos y utilizando el programa MEGA 4 se realizó una construcción filogenética (Método neighbor-joining) usando el modelo de Tajima-

Nei. La confiabilidad del árbol filogenético se realizó con un bootstrap de 800 réplicas (Kumar y col., 2008).

Digestión virtual y análisis con endonucleasas de restricción

Al diseñar los primers (**F-BTAXTRO1** y **R-BTAXTRO2**) sobre la secuencia original del Genbank (gen TRO bovino AY444495.1) “in silico” se determinó un fragmento de amplificación de 332 pb.

Sobre la secuencia de ese fragmento se realizó una digestión virtual utilizando la herramienta bioinformática de diseño público Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

A partir de esta digestión virtual se seleccionaron 2 endonucleasas de restricción (Tabla 2) de acuerdo al número de sitios de corte y disponibilidad de las mismas en el laboratorio y se procedió a cortar los fragmentos amplificados por PCR de acuerdo al protocolo de digestión de cada enzima.

Enzimas de restricción	Secuencia reconocida	Cortes teóricos realizados en la secuencia (digestión virtual)	Fragmentos hipotéticos de corte en la secuencia de 336 pb	Temperatura y tiempo de incubación
HpyF10VI	5'...GCN [▼] NGC...3' 3'...CGN [▲] NCG...5'	4	39, 56, 59, 87, 91	37°C 16 hrs
Psu I	5'...R [▼] GATCY...3' 3'...YCTAG [▲] R...5'	1	260, 72	37°C 16 hrs

Tabla 2: Datos de las enzimas de restricción utilizadas en el experimento de digestión del fragmento del gen TRO amplificado por PCR.

RESULTADOS

En las cinco muestras de ADN bovino se obtuvo amplificación por PCR de la secuencia del gen TRO siendo el tamaño del fragmento amplificado de 332 pb (Figura 3).

En cuanto al estudio bioinformático en el servidor Genome Vista nos dio un alineamiento con una secuencia codificante del cromosoma X humano (chrX: 54,966,301-54,966,860, exón del gen trofinina humano) (Figura 4). Si se analiza “in sílico” dicha región del cromosoma sexual X humano vemos que el gen TRO esta ensamblado con el gen PFKFB1 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa1). Este gen codifica para una enzima que interviene en el metabolismo de carbohidratos (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core:g=ENSG00000158571;r=X:54959394-55020511;t=ENST00000375006)

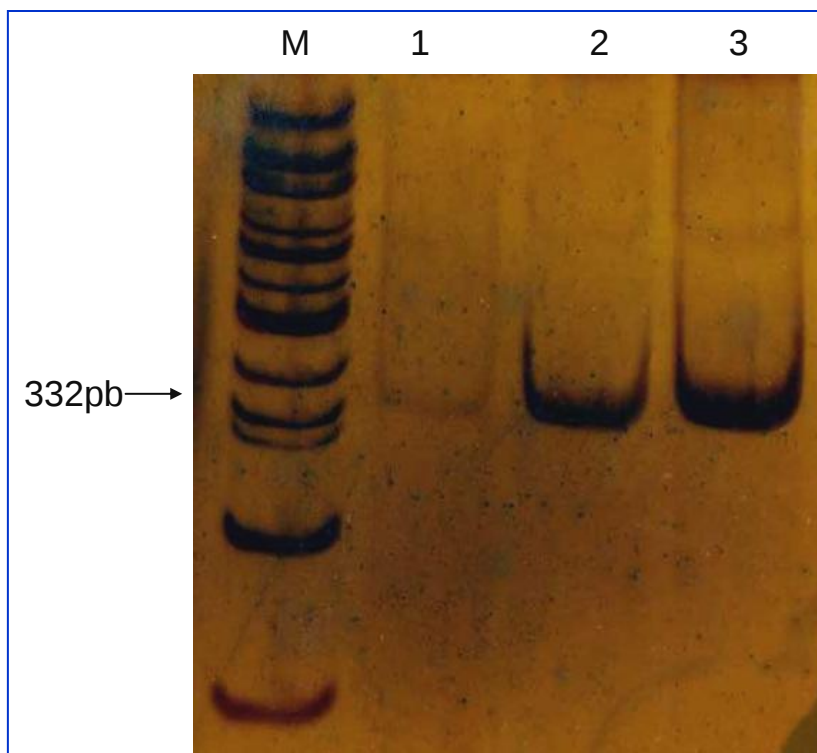


Figura 3: Gel de acrilamida al 6%, M: marcador de Peso Molecular, 1, 2, 3, amplificaciones de un fragmento de 332 pb de la secuencia del gen TRO en muestras de ADN bovino.

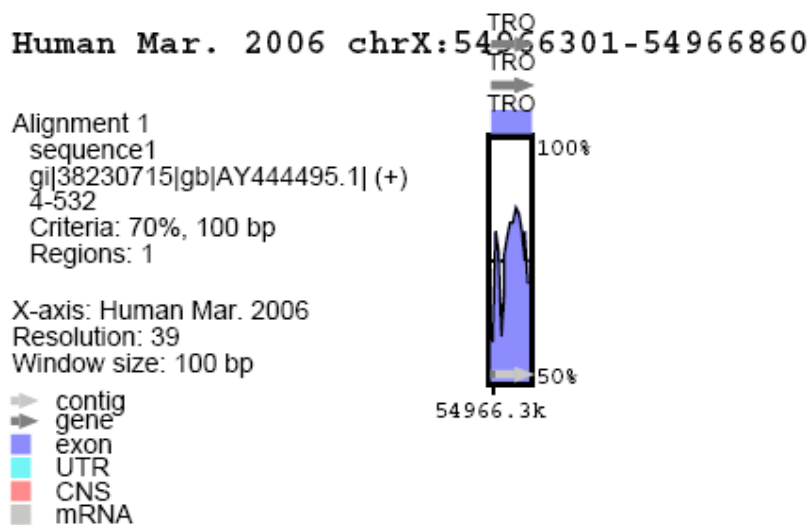


Figura 4: Resultado de alineamiento “in silico” de la secuencia AY444495.1 bovina en el servidor Genome Vista

Con el programa de alineamiento de secuencias Bioedit, se identificó una delección en el linaje de ungulados (artiodáctilos y perisodáctilos) (región A) y a continuación un indel (inserción/delección) (región B) generándose un corrimiento en el marco de lectura (Fig 5).

Se identifica el gen en la base de datos EST del Genbank (DN287357.1) proviniendo la secuencia del “US meat animal research center”

No se detectan polimorfismos en las 4 muestras secuenciadas (la comparación con la referencia muestra un sitio polimórfico sinónimo en posición 255 del alineamiento). Se observa alto grado de conservación de la secuencia analizada

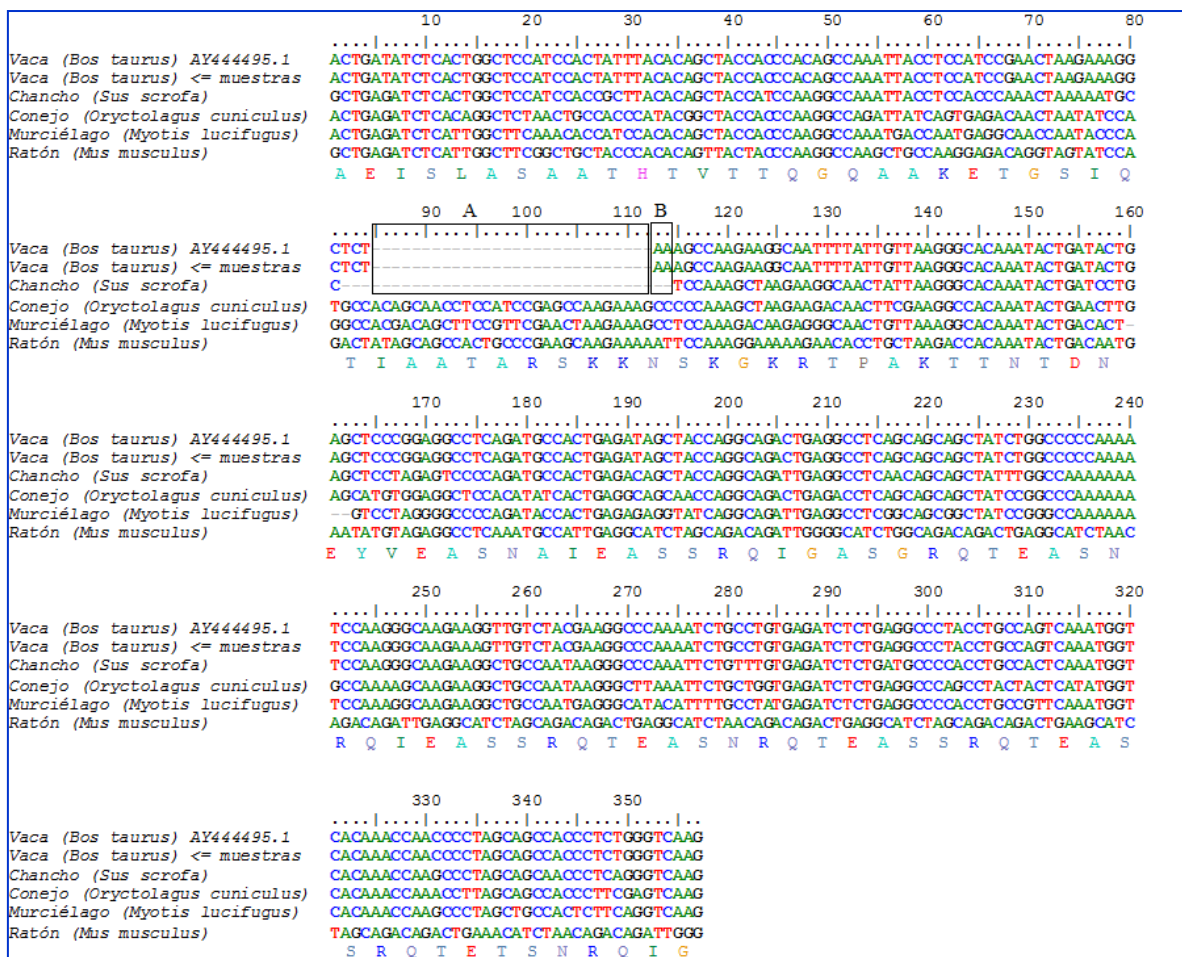
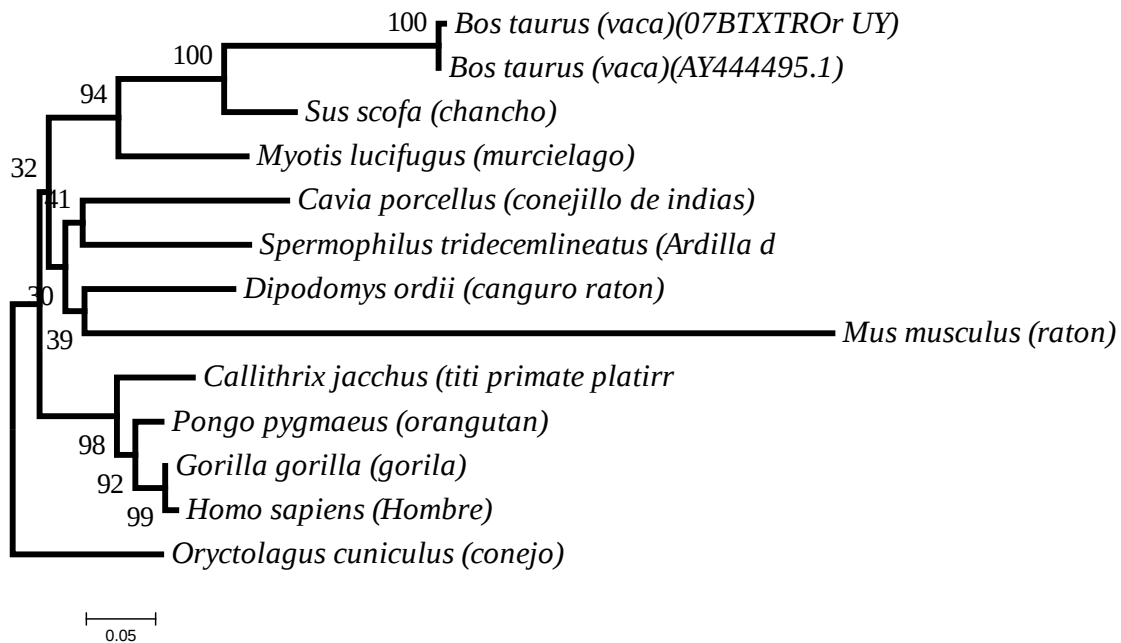


Figura 5: Alineamiento de la secuencia consenso con secuencias del NCBI Genbank.

Se realizó la construcción de un cladograma donde se observan las relaciones filogenéticas entre las secuencias TRO del bovino (el consenso y la secuencia de referencia AY444495) y secuencias de este gen en diferentes especies de mamíferos (Figura 6). Las secuencias del gen TRO bovinos se encuentran en un grupo que se asocia a las secuencias del gen TRO del suino encontrándose las secuencias del humano en un clado más alejado.



En cuanto a los resultados obtenidos con las endonucleasas de restricción *Psu* I en las cinco muestras se identificó una banda con un peso molecular entre 200 y 300 bp que pertenecería al fragmento de corte esperado en la digestión virtual (260 pb) (Figura 7). No se identificaron fragmentos polimórficos en las muestras analizadas. Con la enzima *HpyF10VI* no pudimos obtener digestión en todas las muestras analizadas.

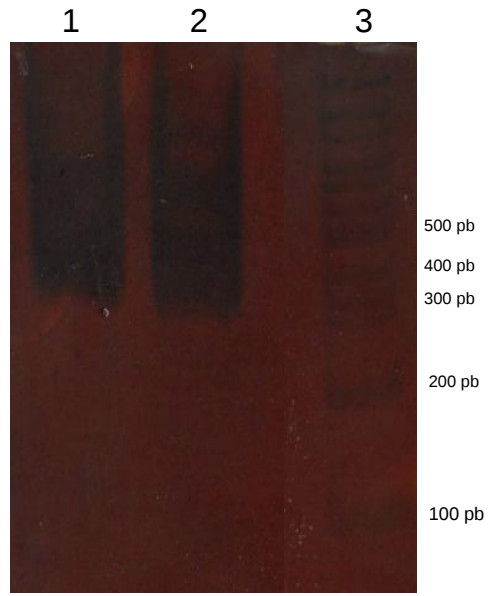


Figura 7: 1 y 2 digestiones realizadas al fragmento de amplificación del gen TRO de 332 pb (enzima *Psu I*), 3.- marcador de peso molecular 100 pb ladder DNA marker (Axygen).

DISCUSIÓN

En el 2009 se publica el ensamblaje más completo del genoma bovino (35 millones de secuencias) (Zimin y col., 2009). Estos autores utilizando mapas y datos de sinténia conservados entre el genoma humano y el genoma bovino logran el ensamblaje de aproximadamente el 91% del genoma en los 30 cromosomas del bovino.

El gen TRO codifica para una proteína de membrana que actúa durante la implantación embrionaria (Suzuki y col., 1999). Este gen en el bovino se encuentra sin ensamblar “in sílico”. Los avances realizados en ese estudio preliminar nos permitieron aportar conocimiento desde el punto de vista molecular de pequeñas secuencias de este gen en bovinos. Los tamaños del fragmento analizado por nosotros (332pb) coinciden con lo analizado “in sílico” de acuerdo al tamaño secuenciado por Asai y col., 2004.

La alta homología encontrada con las reportadas en diferentes especies de mamíferos placentados nos indican por un lado que esta secuencia pertenece al gen TRO bovino y que son ortólogas de acuerdo a la información disponible en el Ensembl (www.ensembl.org).

Al encontrar el gen TRO bovino en la base de datos EST del genbank (Expressed Sequences Tags) DN287357.1 podemos confirmar que se expresa en el bovino aunque el tamaño del ARN mensajero secuenciado no nos permite determinar como se procesa esta región del gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) .

Nakano y col (2003) investigando la expresión del ARNm y la proteína trofinina en el endometrio de cerdas encuentran una correspondencia en la secuencia y en los niveles de expresión con el humano. Estos investigadores sugieren al cerdo como un buen modelo para estudiar la importancia fisiológica de la trofinina en la preñez temprana del humano. Sin embargo en bovinos no encontramos reportes sobre la importancia fisiológica de esta proteína.

El análisis filogenético reveló una cercanía entre las secuencias del gen TRO bovino y suino. El estudio de las secuencias realizado en este trabajo se caracteriza por presentar un INDEL con corrimiento en el marco de lectura que se mantiene conservado en el linaje de los ungulados: artiodáctilos (bovinos) y perisodáctilos (cerdos).. Con lo cual los estudios realizados en bovinos y cerdos podrían extrapolarse como modelo al estudio de la fisiología reproductiva en humanos.

Por otro lado se observó una alta conservación a nivel de codones sinónimos y no sinónimos dentro de la secuencia analizada, no detectándose polimorfismos entre las secuencias y por ende entre los animales estudiados en este trabajo. Al comparar con la secuencia de referencia del Genbank del *Bos taurus* (AY444495) se identificó un sitio polimórfico sinónimo (cambio de codón sinónimo) en la posición 255 del tipo transición A→G. En mamíferos los patrones de sustitución neutral varían en la escala génica existiendo un exceso de la transición A→G en las regiones transcritas de los genomas de mamíferos (Duret, 2009). Esto podría estar relacionado al evento de reparación y escisión de nucleótidos acopladas a la transcripción (Duret, 2009). Este evento de transición identificado en todas las muestras analizadas podría ser específico de la raza Holando Uruguayo.

En cuanto al análisis con endonucleasas de restricción, con la enzima HpyF10VI no se obtuvo digestión en las muestras analizadas. Teniendo en cuenta que esta enzima en la digestión virtual presentaba 4 sitios de cortes, podríamos pensar en la existencia de factores externos que abrían inhibido la reacción de corte. Diversos factores afectan la actividad de este tipo de enzimas como ser: el pH, la concentración y tipo de iones existentes en el buffer, cambios de temperatura (Hoelzel, 1992).

En conclusión el presente trabajo nos permitió profundizar en el estudio bioinformático de una región parcial del Gen trofinina del bovino y realizar un estudio comparativo de dicha secuencia con otras especies de mamíferos. Al no

identificar ningún polimorfismo en las 5 muestras secuenciadas no se pudo relacionar con las diferencias de fragilidad cromosómica BTX estudiadas previamente en estos animales.

Como proyección futura se debería ampliar el número de muestras a secuenciar así como la región del gen a secuenciar. Por otro lado sería interesante abordar el estudio a nivel de expresión del Gen en tejidos como útero de hembras bovinas con control citogenético

BIBLIOGRAFÍA

- Aplin, J. (1997). Adhesion Molecules in implantation. Reviews of reproduction (2):84-93.
- Asai, M., Graphodatskaya, D., Stranzinger, G. and Joerg, H. (2004). Assignment of bovine trophinin (TRO) to the q arm of the X chromosome by fluorescence in situ hybridization. Anim. Genet. 35 (2), 157-158.
 - Asai M. Allele-specific real-time pcr for examination of x chromosome inactivation in *Bos Taurus*. (2004). Tesis Diss. ETH. N° 15838. Swiss Federal Institute of Technology. Zurich..
 - Cavestany, D.; Betancour, H.; Blanc, E.; Lemaire, C.; Slavica, J.; Moreira, F.; Piaggio, J. and Risco, C. (2007). Reproductive efficiency in grazing lactating dairy cows under a programmed reproductive management. Austr. Vet. J. 85: 141-147.
- Duret L (2009) Mutation patterns in the human genome: More variable than expected. PLoS Biol 7(2): e1000028. doi:10.1371/journal.pbio.1000028
- Hoelzel, A.R. (1992). Molecular genetic análisis of populations (a practical approach). Ed. Oxford University. United States. 1-266.
 - John D Aplin and Susan J Kimber. Trophoblast-uterine interactions at implantation. Reproductive Biology and Endocrinology 2004, 2:48.
 - Jun Nakayama, Daisuke Aoki, Tomoaki Suga, Tomoya O. Akama, Satoshi Ishizone, Hirohito Yamaguchi, Kazuhiko Imakawa, Daita Nadano, Asgerally T. Fazleabas, Tsutomu Katsuyama, Shiro Nozawa, and Michiko N. Fukuda. Implantation-Dependent Expression of Trophinin by Maternal Fallopian Tube Epithelia during Tubal Pregnancies. Possible Role of Human Chorionic Gonadotrophin on Ectopic Pregnancy. American Journal of Pathology, Vol. 163, No. 6, December 2003.
 - Junya Aoyama, Yuji Nakayama, Daijiro Sugiyama, Sakura Saburi, Daita Nadano, Michiko N. Fukuda, Naoto Yamaguchi. Apical cell adhesion

molecule, trophinin, localizes to the nuclear envelope. FEBS Letters 579 2005, 6326–6332.

- Kazuhiro Sugihara, Daijiro Sugiyama, James Byrne, Don P. Wolf, Kevin P. Lowitz, Yoichi Kobayashi, Maryam Kabir-Salmani, Daita Nadano, Daisuke Aoki, Shiro Nozawa, Jun Nakayama, Tomas Mustelin, Erkki Ruoslahti, Naoto Yamaguchi, and Michiko N. Fukuda. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. PNAS March 6, 2007, vol. 104, no. 10, 3799–3804.
- Kazuhiro Sugihara, Maryam Kabir-Salmani, James Byrne, Don P. Wolf, Bruce Lessey, Mitsutoshi Iwashita, Daisuke Aoki, Jun Nakayama, Michiko N. Fukuda. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGb and IL-1b. FEBS Letters 582 (2008) 197–202.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 9, 299–306.
- Llambí, S. Citogenética animal. Fragilidad cromosómica en mamíferos. Facultad de Veterinaria.
- Llambí, S.; Coppola, B; Gagliardi, R; Tejedor, T; Arruga, M.V. (2008). Acción de la 5'azacitidina en cromosomas de células linfocitarias de bovinos. Acta Agronomica (Palmira), v. 57 1, p. 61-64, 2008.
- Llambi, S.; Coppola, B; Cavestany, D. (2004). Estudio citogenético (fragilidad del cromosoma sexual X) en vaquillonas Holando". XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría-Paysandú-Uruguay.
- Mejia-Guerra, M; Lareo, L. (2006). Aproximaciones computacionales para la identificación de promotores eucariotas tipo II. Universitas Scientiarum. Vol 11:35-47.
- Michiko N. Fukuda, Kazuhiro Sugihara. Signal Transduction in Human Embryo Implantation. Cell Cycle 6:10, 1153-1156, 15 May 2007.

- Michiko N. Fukuda and Kazuhiro Sugihara. An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation. J. Obstet. Gynaecol. Res. Vol. 34, No. 2: 129–136, April 2008.
 - Michiko N. Fukuda, Takaaki Sato, Jun Nakayama, George Klier, Mikio Mikami, Daisuke Aoki, and Shiro Nozawa. Trophinin and tastin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. Genes & Development 9:1199-1210 (1995).
- Nakano S, Kishi H, Ogawa H, Yasue H, Okano A, Okuda K. (2003). Trophinin is expressed in the porcine endometrium during the estrous cycle. J Reprod Dev.. 49(2):127-34.
- Nao Suzuki, Daita Nadano, Bibhash C. Paria, Sergey Kupriyanov, Kazuhiro Sugihara, And Michiko N. Fukuda. Trophinin Expression in the Mouse Uterus Coincides with Implantation and Is Hormonally Regulated But Not Induced by Implanting Blastocysts. Endocrinology Vol. 141, No. 11 (2000).
 - Nao Suzuki, Jane Zara, Takaaki Sato, Edgar Ong, Nouna Bakhiet, Robert G. Oshima, Kellie L. Watson, And Michiko N. Fukuda. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with trophinin, tastin, and cytokeratin and may be involved in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95, pp. 5027–5032, April 1998.
 - Suzuki Nao, Jun Nakayama, Ie-Ming Shih, Daisuke Aoki, Shiro Nozawa, and Michiko N. Fukuda. Expression of Trophinin, Tastin, and Bystin by Trophoblast and Endometrial Cells in Human Placenta. Biology of Reproduction 60, 621–627 (1999).
 - Saeko Nakano, Hisashi Kishi, Hidehiko Ogawa, Hiroshi Yasue, Akira Okano and Kiyoshi Okuda. Trophinin is Expressed in the Porcine Endometrium During the Estrous Cycle. Journal of Reproduction and Development, Vol 49, N° 2, 2003.
 - Sakura Saburi, Daita Nadano, Tomoya O. Akama, Kyoko Hirama, Keitaro

Yamanouchi, Kunihiko Naito, Hideaki Tojo, Chikashi Tachi, and Michiko N. Fukuda. The trophinin gene encodes a novel group of MAGE proteins, Magphinins, and regulates cell proliferation during gametogenesis in the mouse.

- Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009;10 (4).