



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS GENÉTICO EN UN CLUSTER ASOCIADO AL
DESARROLLO EMBRIONARIO Y DE LA PLACENTA EN BOVINOS
CRIOLLOS PORTADORES DE LA ROB(1;29)”.**

Lic. Nariné Balemian

Directora de Tesis: Dra. Alicia Postiglioni

Tribunal:

Presidente: Dra. Graciela García

Vocales: Dra. Eileen Armstrong

Dr. José Sotelo Silveira

Agradecimientos

En esta oportunidad me gustaría agradecer muy especialmente a la Dra. Alicia Postiglioni por su gran ayuda, interés y orientación en todas las etapas de realización de esta tesis.

A la Dra. Silvia Llambí por permitirme realizar la misma en el Laboratorio de Genética de Facultad de Veterinaria y por su ayuda en la obtención de las muestras de Bovinos Criollos.

Al Dr. José Sotelo por su gran colaboración en el análisis bioinformático de los datos obtenidos, así como al equipo de trabajo del Laboratorio de Genómica del IIBCE.
A la Msc. Valeria Romero por la preparación de muestras para secuenciar y a Cecilia Mathós por su ayuda en el análisis de datos.

Al Dr. Rody Artigas por su gran colaboración en la realización de cultivos linfocitarios y al Msc. Eugenio Jara por su ayuda en la interpretación de resultados.

A la Dra. Graciela García, a la Dra. Eileen Armstrong y al Dr. José Sotelo por formar parte del tribunal evaluador de esta tesis.

A mis compañeros del Área Genética por el ánimo que me dieron a lo largo de esta etapa.

Y finalmente a mi familia, ya que sin ellos esto nunca hubiera sido posible.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	4
Introducción	5
Diversidad genética en bovinos comerciales	5
Diversidad genética en Bovinos Criollos	6
Marcadores cromosómicos en Bovinos Criollos Uruguayos	8
Clúster de genes improntados en BTA29	9
Translocación Robertsoniana [rob(1;29)].....	13
Imprinting y desarrollo embrionario	15
Herramientas moleculares: Secuenciación	19
Hipótesis de trabajo.....	22
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Técnicas de citogenética.....	24
Técnicas de biología molecular	24
Resultados y discusión	31
Citogenética	31
Biología molecular	32
Secuenciación individual.....	34
Secuenciación en pool.....	37
Análisis de los transcritos de ARN.....	46
Análisis proteico	47
Conclusiones	55
Bibliografía	56
Apéndice I	60
Apéndice II	61

ANÁLISIS GENÉTICO EN UN CLUSTER ASOCIADO AL DESARROLLO EMBRIONARIO Y DE LA PLACENTA EN BOVINOS CRIOLLOS PORTADORES DE LA ROB(1;29).

Resumen

Los bovinos Criollos Uruguayos (BCU) han demostrado poseer en su genoma una amplia variabilidad genética. Este hecho es de gran valor en la actualidad en vista de que la misma se encuentra disminuyendo en las razas de bovinos comerciales como consecuencia del efecto fundador, el tamaño efectivo poblacional y los programas de selección intensiva. De forma contraria a lo que sucede en estas razas, las razas Criollas compuestas por poblaciones silvestres o semi-silvestres presentan poco o ningún tipo de selección artificial, por lo que se encuentran adaptadas a un amplio rango de ambientes. Como consecuencia las mismas muestran altos niveles de variabilidad fenotípica y un aumento de su fitness en condiciones naturales, lo que las hace muy importantes como recurso de alelos escondidos. En la reserva de BCU ubicada en el Parque de San Miguel (Rocha) se ha detectado un marcador cromosómico descripto razas iberoamericanas, la translocación robertsoniana (1;29). Esta se encuentra en condición heterocigota con una frecuencia de 4%. Los individuos portadores de la misma presentan subfertilidad por la producción de gametos desbalanceados, lo que genera abortos en las primeras etapas del desarrollo. El genoma bovino focalizado en el cromosoma 29 (BTA29), posee un cluster asociado al desarrollo embrionario y de la placenta, genes directamente involucrados en el imprinting genético con consecuencias de mortalidad embrionaria temprana. En este cluster encontramos a los genes improntados de expresión materna PHLDA2, CDKN1C y KCNQ1. Los mismos presentan funciones reguladoras del desarrollo embrionario y de la placenta. El gen CDKN1C restringe el crecimiento embrionario, está involucrado en la replicación de las células de la placenta, en la formación de las células gigantes del trofoblasto, en la invasión del trofoblasto y en la expansión de las capas celulares de la placenta. PHLDA2 interviene en la regulación del glicógeno, conservando el reservorio energético extraembrionario de la placenta. La pérdida de función de PHLDA2 produce un aumento del tamaño placentario en detrimento del tamaño fetal, por lo que una dosis precisa de PHLDA2 es necesaria para el crecimiento fetal óptimo. KCNQ1 codifica un canal de potasio dependiente de voltaje. La pérdida de su imprinting causa la expansión de las células del trofoblasto, alterando la función de la placenta. Por estas razones, la expresión de dichos genes debe de estar altamente regulada para un desarrollo normal, ya que variaciones en dicha expresión alteran el crecimiento placentario y como consecuencia el desarrollo fetal.

En esta tesis se realizó el análisis genético del cluster en BTA29 del genoma de bovino Criollo en individuos normales y portadores de la Rob (1;29) utilizando diversas metodologías integradas (citogenéticas, moleculares) evaluadas con programas bioinformáticos, a los efectos de profundizar en este genoma de amplia diversidad genética.

INTRODUCCIÓN

Diversidad Genética en bovinos comerciales.

La diversidad genética en bovinos comerciales se encuentra disminuyendo, entre y dentro de las poblaciones, un hecho que causa preocupación a nivel mundial. De acuerdo a la *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (FAO) y de *Domestic Animal Diversity Information System* (DAD-IS), la dispersión de las razas comerciales, la mayoría originadas en Europa, está poniendo en riesgo de extinción a muchas razas locales bien adaptadas. La erosión de la diversidad genética presenta consecuencias negativas tales como la pérdida de viabilidad, disminución de la fertilidad, disminución de resistencia a enfermedades y en el aumento de la frecuencia de enfermedades recesivas. De acuerdo al reporte del estatus y tendencias de los recursos genéticos animales (FAO, 2011), aproximadamente el 8% de las razas de ganado reportadas se han extinguido y un 21% se consideran en riesgo de extinción. Por otra parte, la situación es desconocida para el 35% de las razas, la mayoría de las cuales se crían en países en desarrollo (FAO, 2011).

La variabilidad genética dentro de las razas comerciales bovinas más frecuentes (Holstein-Friesian y Hereford) ha disminuido de forma drástica. Varias son las causas, jerarquizándose el efecto fundador, el tamaño efectivo de las poblaciones originales y los programas de selección artificial intensiva. (FAO, 2011) La conservación de la variabilidad genética en bovinos es importante, especialmente al considerar los cambios ambientales que se están sucediendo cada vez más frecuentes en el mundo y en forma específica en nuestro país.

Herramientas moleculares como marcadores genéticos de microsatélites (MS), polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y ADN mitocondrial (mtDNA) han sido metodologías importantes para estudiar la información genética, estableciéndose marcadores propios de razas, asociación con características productivas, determinación de paternidad, análisis de diversidad genética, etc. La *International Society of Animal Genetics* (ISAG) proporciona registros confiables de respaldo internacional, brindando información respecto a caracteres distintivos entre y dentro de las razas asociados con marcadores moleculares (Boettcher et al., 2010).

El rendimiento en rasgos asociados al fenotipo y a la adaptación pueden ser elementos a considerar para su conservación.

“Los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura son la materia prima de la que el mundo depende para mejorar la productividad y calidad de los cultivos, la ganadería, la silvicultura y la pesca, así como para mantener poblaciones saludables de especies silvestres. Conservar un amplio abanico de diversidad -tanto entre como dentro de las especies- significa garantizar opciones para responder a los retos del futuro” (www.fao.org).

De forma contraria a lo que se ve en razas comerciales altamente seleccionadas, las razas criollas compuestas por poblaciones silvestres o semi-silvestres presentan poco o ningún tipo de selección artificial, por lo que se encuentran adaptados a un amplio rango de ambientes (Armstrong et al., 2010). Como consecuencia, muestran altos niveles de variabilidad fenotípica y un *fitness* aumentado en condiciones naturales.

Diversidad Genética en Bovinos Criollos Uruguayos.

El bovino Criollo fue introducido en América en 1493 por los colonizadores españoles y portugueses, siendo éstos el producto de múltiples cruces de bovinos ibéricos y europeos. El ambiente favorable en el cual fueron introducidos permitió su reproducción y su dispersión por América Central y Sudamérica. Su adaptación a diferentes ambientes permitió la manifestación de una gran variabilidad genética, pero hoy en día solo permanecen pequeñas poblaciones en Sudamérica, especialmente localizadas en la Patagonia Argentina, en el Pantaneiro de Brasil y en el Parque Nacional de San Miguel (Rocha, Uruguay) (De Alba, 2011; Delgado et al., 2011).

La primera introducción de bovinos en Uruguay fue llevada a cabo por Hernando Arias de Saavedra a comienzos del siglo XVII y luego por las Misiones Jesuitas del Alto Uruguay. A fines del siglo XIX se introdujeron varias razas comerciales, reduciéndose así la gran población del Bovino Criollo a una población única y pequeña (Postiglioni et al., 2002). Esta está comprendida por aproximadamente 600 cabezas, incluyendo 18 toros y 250 vacas de cría en 650 hectáreas en el Parque San Miguel (Rocha), en un área de bosques nativos y humedales.



Fig. 1: Hato de bovinos Criollos en su hábitat.



Fig. 2: Muestreo de madres con sus crías. Obsérvese el ecosistema natural.



Fig. 3: Ejemplar macho de bovino Criollo Uruguayo.

Arredondo (1958) documentó la creación de la población fundadora la cual consistía de 35 individuos comprendida por vacas, toros y terneros encontrados en diferentes regiones del país en montes indígenas.

Las principales características de las razas criollas son la mansedumbre, la diversidad de pelajes, la presencia de cuernos, la alta fertilidad, la gran habilidad materna, la gran longevidad, la piel y las mucosas pigmentadas, la inserción alta de la cola que se relaciona con ausencia de partos distócicos y el alto vigor híbrido que presentan en cruces con razas comerciales (Armstrong, 2004). Algunas de estas características se observan en Figs. 1, 2 y 3.

Los bovinos Criollos Uruguayos (BCU) son un ejemplo de estas poblaciones locales, habiéndose demostrado una alta variabilidad genética. La conservación de estas, es de gran importancia ya que son consideradas un recurso de alelos raros con un uso potencial en programas de reproducción. Para la población de Bovinos Criollos Uruguayos,

trabajos anteriores con marcadores microsatélites demostraron poseer una alta heterocigosidad ($He=0,80$) y un coeficiente de endogamia de $F=0,02$. Trabajos posteriores referidos a la secuencia de la región del D-loop del mtDNA, permitieron identificar haplotipos específicos (UY1, UY2 y UY3) para esta población que habita en condiciones semi-silvestres (Armstrong et al., 2004, 2013).

La alta diversidad genética de estos Bovinos Criollos se potencia con los resultados obtenidos en fragmentos génicos asociados a las proteínas de la leche. Para el caso de la K-caseína, se identificaron frecuencias dialélicas similares ($A=0,5$; $B=0,5$), a diferencia de la alta frecuencia del alelo A ($A=0,9$) encontrada, en un muestreo estratificado, en la raza comercial Holando uruguayo (Postiglioni et al., 2002).

Marcador Cromosómico en Bovinos Criollos Uruguayos.

Existe en la población de Bovinos Criollos Uruguayos un marcador cromosómico similar al descrito en razas iberoamericanas (destacándose la Berrenda, Andaluza, Retinta) y en hatos sudamericanos (Argentina, Venezuela, Colombia, entre otros) (Muñoz et al., 1994; Ducoset al., 2008). Este marcador es producto de una translocación Robertsoniana entre los cromosomas acrocéntricos BTA1 y BTA29 (rob(1;29)). En el hato de Bovinos Criollos Uruguayos se ha encontrado este reordenamiento en condición heterocigota y con una frecuencia de 4% (Postiglioni et al., 1996).

Estudios de estructura cromosómica realizados con un inductor desmetilante, la 5-azacytidina-C (5-AZA) han demostrado que esta translocación rob(1;29) en condición heterocigota presenta un comportamiento similar al cromosoma X inactivo de la hembra, hipotetizando una inactivación de la cromatina para ésta translocación (Artigas et al., 2010).

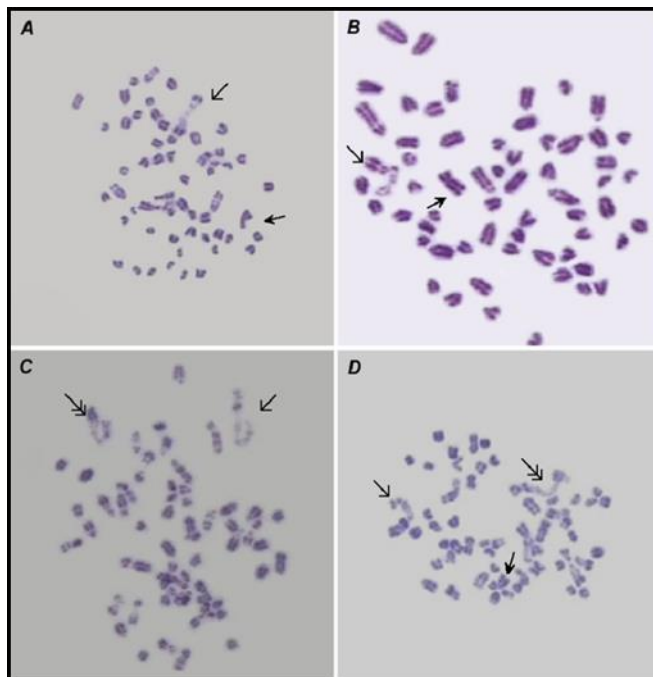


Fig. 4. Metafasas linfocitarias de individuos normales y portadores de la rob(1;29), tratados con 5-aza-C ($1 \times 10^{-3}M$, 2 h). La doble flecha indica la rob(1;29) desmetilada; las flechas simples indican los cromosomas X inactivos y activos. (Permiso del autor; Artigas R., et al., 2010)

Este agente clastogénico al ser utilizado a altas concentraciones produce una descondensación del cromosoma X en G2, debido a una desmetilación del ADN (Haaf&Schmid, 2000). Un efecto similar de descondensación del ADN hipometilado se encontró en la región heterocromática de la rob(1;29) después de 2hrs. de inducción de los linfocitos cultivados con altas concentraciones de 5-aza-C (10mM) (Doolittle&Sapienza, 1980; Yoder et al., 1997; Artigas et al., 2010.).

En el cromosoma 29 bovino (BTA29) encontramos genes que codifican glicoproteínas asociadas a proteínas de señalización intracelular durante la gestación (Elsik et al., 2009). Estos regulan aspectos específicos del crecimiento fetal en rumiantes, adaptación maternal a la gestación y aspectos asociados al parto. En el BTA 29 se describe un clúster cuyos genes se encuentran asociados al desarrollo embrionario y de la placenta, el cual presenta sintenia con los cromosomas 11 de humano y 7 de ratón. Este clúster está regulado por el centro regulador del imprinting (ICR) KvDMR1 y contiene a la secuencia correspondiente al ARN paterno no codificante KCNQ1OT1 y a los genes de expresión materna *CDKN1C*, *KCNQ1* y *PHLDA2*. El centro regulador del imprinting KvDMR1 se encuentra metilado en el alelo materno, mientras que no presenta metilación en el paterno (Robbins et al., 2012).

Clúster de genes improntados en BTA29.

El clúster regulado por KvDMR1se encuentra ubicado en la región 49,157,383-49,955,760 del cromosoma 29 bovino y contiene diferentes genes de expresión materna y paterna (*ASCL2*, *TSPAN32*, *CD81*, *TSSC4*, *TRPM5*, *KCNQ1*, *CDKN1C*, *SLC22A18*, *PHLDA2*, *NAP1L4*, *CARS*, *TNFRSF26*, *TNFRSF22*, *TNFRSF23*, *OSBPL5*)

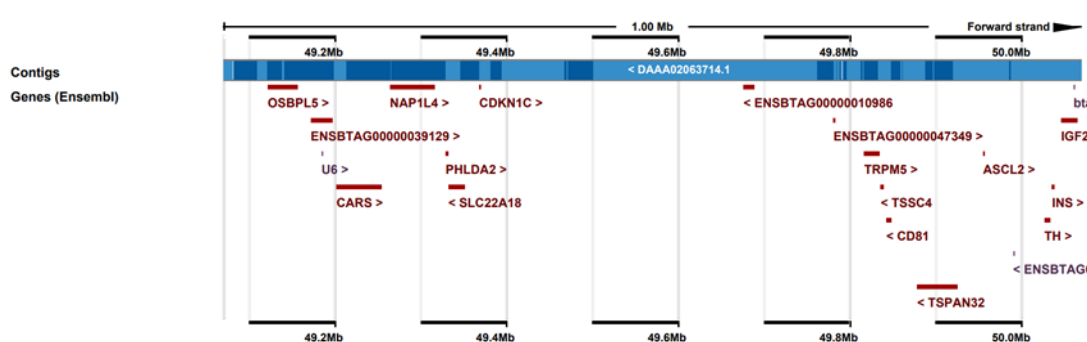


Fig.5: Ubicación del clúster en el BTA 29

CDKN1C

CDKN1C, también conocido como p57Kip2, es un miembro de la familia de inhibidores del ciclo celular CIP/KIP que tiene función en la embriogénesis. Interviene en la regulación del ciclo celular, en la dinámica del citoesqueleto y en la diferenciación celular. *CDKN1C* es un gen que restringe el crecimiento embrionario (Tunster et al., 2016). Está involucrado en la replicación de las células de la placenta, en la formación de las células gigantes del trofoblasto, en la invasión del trofoblasto y en la expansión de las capas celulares de la placenta (Saunders et al., 2016).

La sobreexpresión de *CDKN1C*, produce detención del ciclo celular en la fase G1 sugiriendo su actuación como inhibidor del mismo y regulador negativo de la proliferación celular (Lefebvre, 2012). El crecimiento embrionario es muy sensible a la dosis de expresión de *CDKN1C*. La expresión bialélica del mismo incrementa la mortalidad embrionaria, mostrando que existe sensibilidad a su dosis en etapas tempranas del desarrollo, mientras que la pérdida de expresión del alelo materno produce sobrecrecimiento embrionario (Lefebvre, 2012).

Experimentos realizados en ratón mostraron que al aumentar los niveles de *CDKN1C* disminuye el tamaño de los animales, mientras que la pérdida de la función de *CDKN1C* se encuentra asociada con el sobrecrecimiento embrionario en etapas tempranas del desarrollo. Por lo tanto, este actuaría como un reóstato del crecimiento embrionario, siendo su principal regulador dentro del dominio KvDMR1 (Andrews et al., 2007).

En ratón, *CDKN1C* se expresa en tres capas de la placenta, en particular en las células gigantes del trofoblasto. *CDKN1C* también se expresa en pequeñas poblaciones celulares de la zona de unión, las que podrían ser precursoras de las células trofoblásticas asociadas al glicógeno. Es posible que la pérdida de expresión de *CDKN1C* interfiera con la diferenciación de los precursores en células trofoblásticas de glicógeno maduras y que genere el sobrecrecimiento embrionario por una acumulación de glicógeno, pero esta hipótesis necesita más evidencia experimental (Andrews et al., 2007).

PHLDA2

El gen improntado *PHLDA2* (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A Member 2) es un gen que expresa su alelo materno en placenta. *PHLDA2* codifica una proteína citoplasmática con un dominio PH (pleckstrin homology) implicado en la unión a fosfatidil inositol (PH) (Lefebvre, 2012).

El mismo interviene en la regulación del glicógeno, conservando el reservorio energético extraembrionario de la placenta (Sikora et al., 2012). Estudios recientes en células bovinas han mostrado niveles reducidos de *PHLDA2* asociados al sobrecrecimiento de la misma, sugiriendo que los niveles de expresión de este gen afectan su crecimiento en bovinos y otros mamíferos (Sikora et al., 2012).

Previo a la formación de la placenta, *PHLDA2* se expresa principalmente en el cono ectoplacental y el endodermo del saco vitelino. El cono ectoplacental contiene progenitores del espongiotrofoblasto, las células del glicógeno y cuatro de los 6 subtipos

de células trofoblásticas de la placenta. Este gen es el responsable del balance en la asignación de recursos entre el feto y la placenta, un proceso que debe ser altamente regulado para el óptimo crecimiento fetal. La expansión del espongiotrofoblasto genera una acumulación excesiva del glicógeno placentario, sugiriendo que este produce señales que actúan localmente y a distancia para estimular dicha acumulación. El espongiotrofoblasto expresa una serie de hormonas tales como prolactinas placentarias y glicoproteínas específicas de la gestación (Tunster et al., 2016).

PHLDA2 limita el tamaño del espongiotrofoblasto, como consecuencia de esta modulación, regula de forma indirecta y negativamente la expresión de hormonas de la placenta. Muchas de estas hormonas actúan en el sistema materno para enviar nutrientes al feto, asegurando su supervivencia. Esto podría mostrar por qué la pérdida de función de *PHLDA2* lleva a un aumento de los nutrientes disponibles y del glicógeno placentario (Tunster et al., 2016).

Otra explicación puede ser dada a nivel del consumo de la glucosa por parte del feto o de la habilidad de transportarla desde la placenta al mismo, produciendo una acumulación del glicógeno ya que este no es utilizado. Una tercera opción es que el espongiotrofoblasto produzca señales para el soporte nutricional que permita el crecimiento placentario. La pérdida de función de *PHLDA2* genera la desviación de recursos maternos que apoyan el crecimiento fetal hacia el crecimiento placentario. Esta explicación es plausible ya que la placenta es un órgano con un alto metabolismo que consume energía materna para mantener el transporte activo de nutrientes al feto y la producción y secreción de hormonas. En mamíferos más del 50% del oxígeno y la glucosa uterina es canalizada a los tejidos úteroplacentales. Un aumento del tamaño placentario observado por pérdida de función de *PHLDA2* requiere más recursos maternos en detrimento del crecimiento fetal. Diferentes estudios realizados en ratones revelaron que una dosis precisa de *PHLDA2* es necesaria para el crecimiento fetal óptimo y que la ganancia o pérdida de su función produce restricciones en el crecimiento (Tunster et al., 2016).

Estudios realizados por Driver et al., (2013) en embriones bovinos mostraron que estos genes *CDKN1C* y *PHLDA2* son los principales reguladores de su desarrollo, siendo éstos los genes del clúster elegidos para el desarrollo de esta tesis.

KCNQ1

El gen *KCNQ1* (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1) codifica un canal de potasio dependiente del voltaje necesario para la fase de repolarización del potencial de acción. Este gen se encuentra improntado. La pérdida de su imprinting está asociada con la expansión de las células del trofoblasto, siendo un regulador de la función de la placenta (Smith et al., 2012).

El gen *KCNQ1* ha merecido estudios especiales debido a su asociación con el síndrome Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) descrito en seres humanos. Este se caracteriza por macrosomía pre y postnatal, macroglosia, defectos abdominales y predisposición a tumores embrionarios (Smith et al., 2012).

Este síndrome puede originarse por defectos genéticos y/o epigenéticos de la región HSA11p15.5 quien presenta los dominios improntados IGF2/H19 y *KCNQ1/CDKN1C*, regulados por el ICR2 (KvDMR1) e ICR1 respectivamente.

Esta información está relacionada con dos de los genes que forma el clúster en el cromosoma bovino BTA29 (Smith et al., 2012)

De acuerdo con Calvello (2013), las alteraciones que pueden originar BWS son defectos

epigenéticos en la región 11p15.5 (60%), mutaciones puntuales en sitios de unión de OCT4/SOX2 (10%) y en *CDKN1C* (5-10%); alteraciones en la regulación del dominio ICR2 (25%) y rearrreglos cromosómicos como translocaciones (2%). Las alteraciones epigenéticas son muy comunes e incluyen hipermetilación de ICR1 (5-10%) y/o hipometilación de ICR2 (50-60%) (Smith et al., 2012).

Las modificaciones epigenéticas comprenden metilación del ADN y de las histonas, en al menos uno de los ICR (ICR1, ICR2). En el dominio 1, IC1 se asocia con los genes H19 e IGF2. La metilación del IC1 materno reprime el transcritto H19 e IGF2. En el dominio 2, IC2 regula al ARN no codificante *Kcnq1ot1* y a otros genes implicados en BWS como el *CDKN1C* (Smith et al., 2012)

La pérdida de metilación de IC2 se encuentra asociada con una reducción de la expresión de *CDKN1C*. Se ha observado que algunos de los casos de BWS presentan alteraciones a nivel cromosómico como translocaciones heredadas por vía materna e inversiones heredadas por vía paterna. Los rearrreglos cromosómicos desbalanceados que involucran a la región 11p15.5 alteran el número de copias de los genes improntados, alterando sus niveles de expresión (Smith et al., 2012).

Dichos rearrreglos inducen nuevas metilaciones en la región y cambios en la expresión de los genes metilados. Alteraciones epigenéticas en el 11p15.5 pueden generar pérdida de regulación del gen *CDKN1C*. Aunque se han observado cambios en la metilación a grandes distancias en pacientes con translocaciones e inversiones, no se han visto cambios a nivel de islas CpG en regiones promotoras fuera de la región improntada. Dicha región es más susceptible al efecto de la posición por dos razones: los genes improntados se expresan normalmente en un solo alelo, lo que los hace sensibles a la dosis y cualquier perturbación en el alelo activo puede producir cambios a nivel del transcritto. La segunda razón es que los genes improntados se encuentran bajo el control de al menos uno de los dos centros de imprinting, IC1 e IC2.

El alelo materno es mucho más susceptible a cambios en el entorno local de la cromatina debido a que estos genes improntados se expresan exclusivamente a partir del mismo (Smith et al., 2012).

La presencia de BWS en pacientes con translocaciones e inversiones puede ser explicada por dos procesos diferentes: la primera es que se produzca una disrupción en el gen *KCNQ1*, separando enhancers y elementos reguladores de la cromatina esenciales para la correcta expresión de los genes maternos bajo la regulación de ICR2. La translocación del cromosoma paterno no altera la expresión de los genes improntados de expresión materna, por lo que en la mayoría de los tejidos no se expresa, aunque la ruptura puede interrumpir otro gen o secuencia reguladora. El segundo mecanismo que explicaría porque las translocaciones e inversiones alteran la conformación de la cromatina del alelo materno en el dominio IC2, desregulando la expresión de *CDKN1C*, es que una conformación cerrada de la cromatina produce una represión del gen sin otra alteración epigenética (Smith et al., 2012).

Ya que la mayoría de los genes en el HSA11p15.5 son de expresión materna, el cromosoma materno puede exhibir una cromatina más abierta respecto al cromosoma paterno. Al producirse una translocación o inversión en esta región, el efecto posicional generado por el reordenamiento puede silenciar el alelo materno y dispersarse a lo largo del cromosoma en cis. Cuando las regiones de eucromatina se yuxtaponen a las de heterocromatina constitutiva por un rearrreglo, en esa región se produce un pasaje de heterocromatina a eucromatina, generando silenciamiento genético. Esto puede resultar por la disrupción de elementos de unión que regulan dominios cromatínicos, o, como secuencia del mantenimiento de la estructura funcional de la cromatina (Smith et al., 2012).

Por lo tanto, las translocaciones e inversiones que interrumpen dominios improntados pueden generar cambios en la región como metilaciones en el ADN y pérdida de regulación de la transcripción de genes improntados según su origen parental generando así el síndrome (Smith et al., 2012).

Translocación Robertsoniana [rob(1;29)]

La translocación robertsoniana 1;29 [rob(1;29)] fue descrita en 1964 por I. Gustavsson (Gustavsson, 1969). Ésta ha sido reportada en diversas razas de bovinos alrededor del mundo (Simmental, Charolais, Bovino Húngaro, Rubio de Aquitania, Retinta, Rubia Gallega, Asturiana, De lidia, Pirenaica y diferentes cruza). A pesar de la existencia de cientos de portadores de la rob(1;29), ninguna se ha originado *de novo*, sugiriendo la existencia de un ancestro común. La constitución monocéntrica de las rob(1;29) respalda esta hipótesis.

Desde un punto de vista genético, la rob(1;29) se origina cuando dos cromosomas acrocéntricos se fusionan a nivel del centrómero y se fijan frente a una pérdida de ADNs alfoides. De esta manera, esta translocación robertsoniana se convierte en un polimorfismo cromosómico (De Lorenzi et al., 2012).

La consecuencia de esta translocación en los portadores se encuentra confirmada por varios reportes científicos (Dyrendahl and Gustavsson 1979; Schmutz et al., 1991; Lonergan et al., 1994; Ducos et al., 2008; Iannuzzi et al., 2008).

Los machos heterocigotas para la translocación presentan una disminución de su fertilidad entre 6–10 %, mientras que en hembras portadoras esta disminución es mucho mayor, consecuencia de la producción de cigotos desbalanceados. Hembras portadoras inseminadas con espermatozoides de machos normales presentan una reducción de la fertilidad mayor a la que se observó al inseminar hembras normales con machos portadores. Estas observaciones fueron confirmadas al estudiar patrones de segregación meiótica en machos y hembras portadoras. En machos portadores, la mayoría de los espermatozoides (más del 95%) derivan de segregación adyacente, mientras que en hembras este valor disminuye a 75%. La diferencia entre machos y hembras radica en la frecuencia de segregación 3:0, cercana a 0% en machos y a 22% en hembras (De Lorenzi et al., 2012). Sin embargo, otros mecanismos tales como interacciones anormales entre trivalentes (BTA1-BTA29 y rob (1;29)) y cromosomas sexuales o efectos intercromosómicos no pueden ser excluidos ya que han sido observados en humanos (De Lorenzi et al., 2012).

Efectos intercromosómicos entre autosomas y uno de los dos cromosomas sexuales de la hembra bovina fueron descritos por estudios realizados por Barsur et al., (2001). Sus resultados muestran una reducción en el número de terneros nacidos vivos y un aumento en el porcentaje de abortos.

A su vez, es fundamental citar los trabajos de Di Meo et al., (2006) donde demuestran una transposición del marcador INRA 143, que se encuentra mapeado en la región proximal al centrómero del BTA29, en el brazo q de la rob(1;29).

En Uruguay, esta translocación en estado heterocigota se ha identificado en el hato de Bovinos Criollos con una frecuencia de 4%, pero no se han encontrado individuos homocigotas. Esta situación es la observada en todas las poblaciones de bovinos donde se ha detectado la misma (Arruga et al., 1987; Muñoz et al., 1994; Chaves et al., 1994).

Al analizar el complejo sinaptonémico en toros heterocigotas para la translocación, se observa una ausencia de sinapsis entre las regiones proximales del cromosoma 1 y 29 y los cromosomas translocados en el paquíteno temprano, indicando la falta de homología en estas regiones del trivalente. Estos cambios de posición pueden tener implicancias genéticas, si estos rearrreglos cromosómicos se encuentran asociados con el contenido genético de dichas regiones, pudiendo tener consecuencias en la supervivencia embrionaria. La región proximal de la rob (1;29) tiene genes tejido específicos involucrados en el desarrollo placentario y de las células trofoblásticas del embrión. Estas regiones funcionales además de estar implicadas en la segregación meiótica pueden producir el silenciamiento de la expresión de genes tejido específicos con funciones en diferentes etapas del desarrollo en individuos portadores de la rob (1;29) (Postiglioni et al., 2012).



Fig. 6: Metafase linfocitaria de una hembra de bovino Criollo portadora de la translocación Robertsoniana (1;29) (Postiglioni et al., 2013). La flecha indica la rob(1;29).



Fig. 7: Metafase linfocitaria de un ejemplar macho de bovino Criollo portador de la translocación Robertsoniana (1;29) (Postiglioni et al., 2013). La flecha indica la rob(1;29).

Imprinting y desarrollo embrionario

El imprinting o impronta genética es un fenómeno epigenético causado por la herencia de metilaciones en el ADN en uno de los alelos parentales. Secuencias específicas ricas en CpG adquieren marcas según su origen parental, generándose regiones con metilaciones diferenciales en células somáticas del embrión. La principal consecuencia de estas modificaciones epigenéticas específicas es permitir la expresión de uno solo de los alelos según su origen. Los genes improntados son responsables de la regulación del crecimiento y desarrollo embrionario. Estos se ubican en clústers donde se encuentran genes de expresión materna y paterna. La correcta expresión de los genes presentes en el clúster se encuentra regulado por regiones vecinas del ADN diferencialmente metiladas, conocidas como regiones de control del imprinting o ICR. Los efectos de estas regiones sobre los clústers pueden extenderse por megabases y de forma bidireccional (Driver et al., 2013). Estudios realizados en embriones en etapas tempranas del desarrollo mostraron que la correcta expresión de los genes improntados es necesaria para un desarrollo normal.

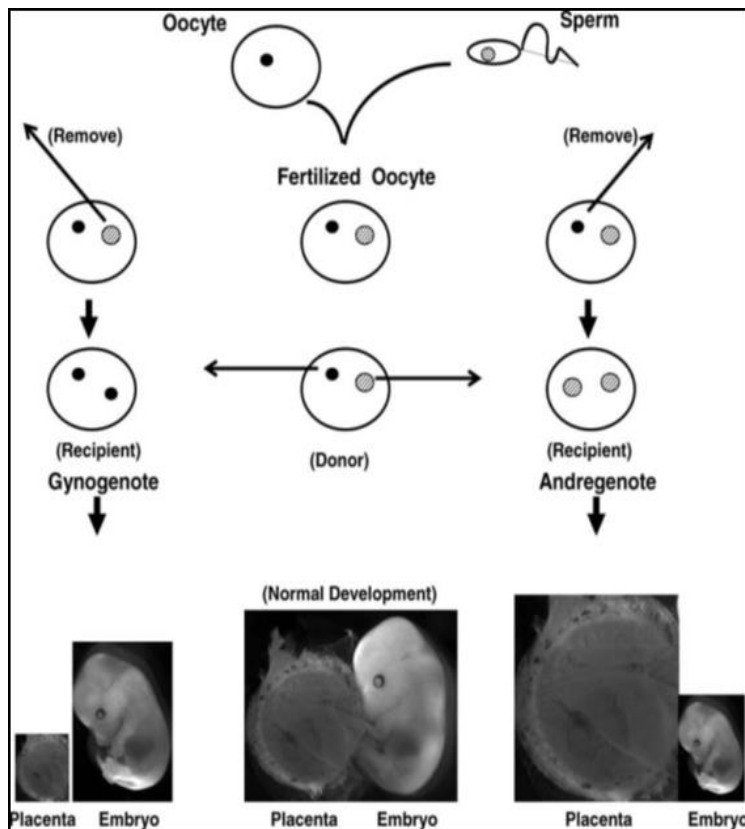


Fig. 8: Experimentos de transferencia nuclear. Las fotografías de la placenta y del embrión muestran los crecimientos relativos de los mismos. Estos demostraron la no equivalencia de los genomas del ovocito y del espermatozoide, sugiriendo la existencia de genes cuya expresión es dependiente de su origen parental. Los resultados también sugieren que estos genes improntados afectan el destino y crecimiento de los tejidos embrionarios y extraembrionarios (Vrana, 2007).

Mediante experimentos de transferencia nuclear realizados por Barton et al., (1984) se demuestra que embriones ginogenéticos, desarrollados a partir de cigotos con dos cromosomas maternos y embriones androgenéticos, conteniendo dos cromosomas paternos no alcanzaron etapas medias de la gestación. Esto demostró que los cromosomas maternos y paternos en un cigoto no son funcionalmente equivalentes, algunos genes se encuentran marcados diferencialmente o improntados en la línea germinal, produciendo expresión monoalélica de uno de los alelos parentales. Estos embriones presentaron diferencias respecto al desarrollo de los tejidos extraembrionarios. Los embriones ginogenéticos mostraron retardo en su crecimiento, aunque tuvieron un buen desarrollo, sin embargo, en sus tejidos extraembrionarios, principalmente en el linaje trofoblástico, las células no se desarrollaron adecuadamente. De forma opuesta, los embriones androgenéticos mostraron defectos a pesar de la presencia de un gran número de células trofoblásticas. Estos resultados evidenciaron que los cromosomas maternos y paternos son necesarios para el correcto desarrollo de las células del trofoblasto. De hecho, los fenotipos androgenéticos y ginogenéticos podrían ser atribuidos a un solo gen, silenciado en uno de los tipos embrionarios y expresados en alta dosis en el otro. Como consecuencia de la expresión de los dos alelos en genes improntados se afecta algún aspecto de la regulación embrionaria o de la placenta. Esto ha sido corroborado por la identificación de más de 100 genes improntados, muchos de los cuales presentan roles esenciales en el desarrollo de la placenta (Lefebvre, 2012).

Entre los genes improntados y asociados a problemas en el desarrollo embrionario y de la placenta encontramos genes en el cromosoma BTA29, que ya han sido estudiados en humano y ratón. Los genes mencionados (*CDKN1C*, *PHLDA2*, *KCNQ1*) tema de esta tesis, forman un clúster en el cromosoma BTA29, mostrando expresión o silenciamiento paterno o materno (Fig. 9).

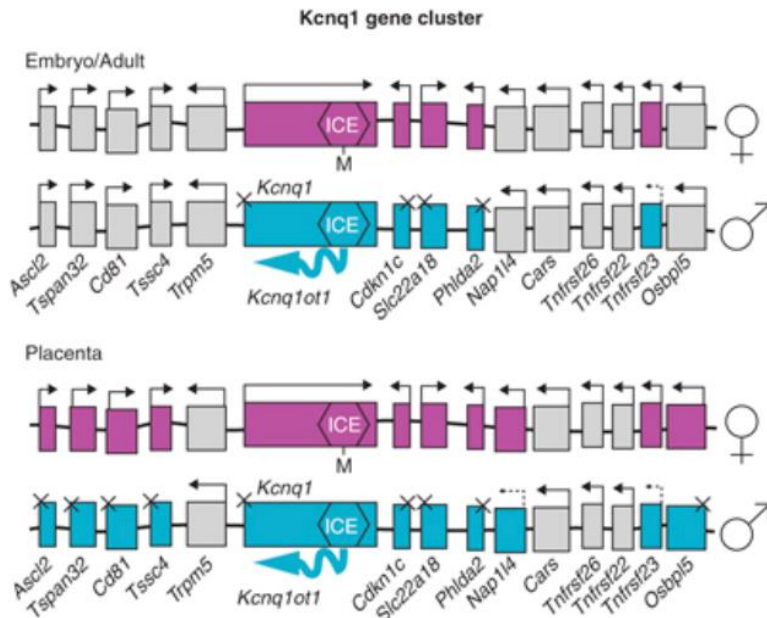


Fig. 9: Clúster Kcnq1: el silenciamiento del cromosoma paterno se inicia por el ncARN Kcnq1ot1. Los colores violeta y turquesa muestran los genes de expresión materna y paterna respectivamente. El color gris muestra genes sin diferencia de expresión parental. ICE: Imprinting control element. M: metilación E: enhancer. (Hudson et al., 2010).

El gen *PHLDA2* se ubica en el cromosoma 29 en la posición 49.329.504-49.330.560 de la hebra *forward*. Este presenta dos exones, un transcripto de 794 pb y una proteína de 142 aminoácidos.

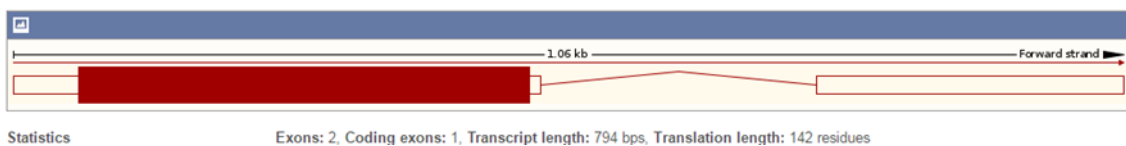


Fig. 10: Exones del gen *PHLDA2* (www.ensembl.org).

El gen *CDKN1C* se encuentra en el cromosoma 29, en la posición 49.368.787-49.370.793 de la hebra *forward*. Presenta 4 exones, 2 de los cuales son codificantes, un transcripto de 1179 pb. y una proteína de 250 aminoácidos.

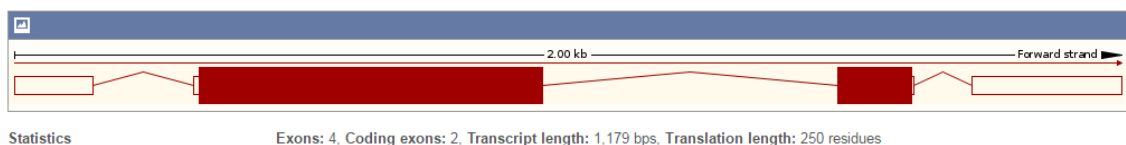


Fig. 11. Exones del gen *CDKN1C* (www.ensembl.org).

El gen *KCNQ1* se ubica en el cromosoma 29 en la posición 49.400.768-49.728.384 en la hebra *forward* y presenta 15 exones.



Fig. 12: Exones del gen *KCNQ1* (www.ensembl.org).

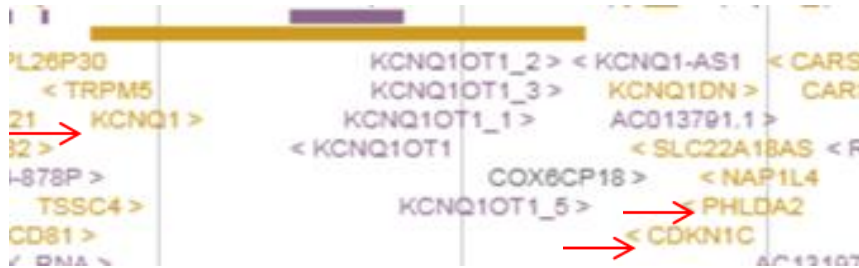


Fig. 13: Distancia entre los genes (www.ensembl.org).

Algunos genes improntados presentan un rol clave en el desarrollo placentario. Estos genes controlan el desarrollo embrionario, ya que la placenta actúa como un punto de regulación entre los tejidos maternos y embrionarios siendo la fuente un gran número de hormonas y factores de crecimiento (Plasschaert et al., 2014).

El glicógeno placentario que se acumula en las células del glicógeno de la zona de unión, provee una reserva de energía fácilmente móvil para respaldar las etapas finales del crecimiento fetal. El hallazgo de que algunos genes paternos silenciados restringen el crecimiento fetal mientras que los maternos son promotores del mismo, muestran las diferentes contribuciones energéticas que los padres brindan a su descendencia. En mamíferos existe un conflicto entre los recursos maternos utilizados por el feto y los tejidos extraembrionarios en crecimiento. En algunos casos, estos tejidos de soporte pueden consumir más del 50% de los recursos maternos asignados al embarazo, introduciendo una potencial competencia entre sus requerimientos energéticos y los del feto en desarrollo (Tunster, 2016).

Herramientas moleculares: Secuenciación

El campo de las tecnologías de secuenciación del ADN tiene una historia rica y diversa. Sin embargo, la producción abrumadora de secuencias de ADN en la actualidad se basó en alguna versión de la bioquímica utilizada en el método de Sanger. En los últimos años, el incentivo para el desarrollo de nuevas estrategias para la secuenciación de ADN ha emergido en por lo menos cuatro niveles: primero, a raíz del Proyecto Genoma Humano, hay pocas vías para la optimización que permitan reducir costos de forma significativa en las formas de secuenciación convencionales. Segundo, el uso potencial de la secuenciación de *short-reads* ha sido fortalecido por la gran disponibilidad de genomas completos de *Homo sapiens* y de los principales organismos modelo que proveen una referencia donde los *short-reads* puedan ser mapeados. Tercero, la creciente variedad de métodos moleculares que se han desarrollado han permitido evaluar una amplia gama de fenómenos biológicos mediante secuenciación de ADN de alto rendimiento y cuarto, el progreso tecnológico en diferentes campos, han creado estrategias alternativas para la secuenciación de ADN que son cada vez más prácticas de realizar (Shendure et al., 2008)

En 1975, Sanger y colaboradores introdujeron el concepto de secuenciación de ADN llamado el método de terminación de cadena. Esta tecnología de primera generación se basa en la incorporación de dNTPs fluorescentes en un PCR. La información obtenida de la última base incorporada, permite determinar la secuencia original. En 1977 Maxam y Gilbert desarrollaron un método químico de secuenciación, donde fragmentos de ADN marcados en el extremo son clivados y separados por electroforesis en gel.

En los años siguientes, se desarrolló *Polony sequencing*, la primera aproximación que permitió la secuenciación del genoma completo.

Aunque el método de Sanger fue el pilar de la secuenciación del genoma humano, presenta un gran número de limitaciones, principalmente asociados al bajo rendimiento de las secuencias obtenidas y al alto costo. El pirosecuenciador 454 desarrollado por Life Science en el 2000 fue la primera plataforma HT-NGS (*high throughput sequencing*), seguido por el secuenciador GS 20 en 2005. Esta técnica combina PCR en emulsión y pirosecuenciación (*shotgun sequencing*) y se basa en la detección de pirofosfato liberado cuando un nucleótido es incorporado en la cadena, resultando en la emisión de luz. La optimización de estas tecnologías resultó en el desarrollo de equipos de “Next Generation” (NGS) dando origen a las plataformas HT-NGS de segunda generación tales como Roche, Illumina, Solexa, Life Technologies, Helicos y otras compañías.

Las plataformas de segunda generación, realizan un procesamiento paralelo donde cada fragmento es secuenciado individualmente y separado en amplicones clonales para su posterior análisis entre todas las secuencias. La secuenciación de “Next Generation” aún tiene inconvenientes, tales como el tiempo de procesamiento y la pérdida de sincronía en alguna de las muestras lo que genera ruido y errores en las secuencias.

Ion Torrent Sequencing

Es una técnica de NGS que integra la información química y digital, permitiendo secuenciar de forma más rápida, simple y a escala masiva. Este método, se basa en que cada nucleótido incorporado en una hebra de ADN libera hidrógeno. Como consecuencia, el pH de la solución cambia y puede ser detectado directamente por un sensor.

La plataforma de Ion Torrent difiere de otras tecnologías en que no utiliza nucleótidos modificados ni elementos ópticos. No es necesario el uso de nucleótidos marcados ni de medidas ópticas ya que las incorporaciones se miden electrónicamente. El procesamiento de la señal se realiza mediante el uso de software. El Ion Torrent tiene un gran número de aplicaciones tales como transcriptomas, pequeños ARNs, ChIP-Seq pair end sequencing y estudios de metilación. Además, este método es más adecuado para aplicaciones en menor escala tales como secuenciación de genomas y transcriptomas microbianos, secuenciación de amplicones, de librerías y determinación de variantes y cambios a nivel de secuencia (Diaz-Sanchez et al., 2013)

Secuenciación en pool vs secuenciación individual

Los marcadores moleculares generados por tecnologías de NGS están revolucionando la investigación genética. Sin embargo, los costos de analizar un gran número de genomas individuales siguen siendo prohibitivos para muchos estudios poblacionales. En los últimos treinta años, se ha visto un aumento de marcadores moleculares usados en análisis genéticos en estudios poblacionales. Con la llegada de las tecnologías de NGS, es posible secuenciar el genoma completo a precios mucho más bajos que los de la secuenciación tradicional por Sanger. La aproximación más conveniente para estimar las frecuencias alélicas con un número masivo de SNPs para una gran cantidad de individuos en varias poblaciones se basa en la secuenciación masiva en *pool*. Secuenciar grandes poblaciones de individuos en *pool*, mantiene bajo el número de secuencias redundantes y provee una alternativa económica para secuenciar genomas individuales. Sin embargo, hay parámetros que deben ser tomados en cuenta para controlar errores experimentales, especialmente la posibilidad de contribuciones desiguales de los diferentes individuos. Estudios recientes realizados por Zhu et al., 2012 mostraron el potencial de los estudios realizados en *pool* vs secuenciación individual para identificar y cuantificar SNPs en genomas pequeños, en regiones genómicas y en el genoma completo de eucariotas. Por ejemplo, Zhu evaluó la exactitud del método mediante el estudio de diferentes líneas de *Drosophila*. En este trabajo se demostró que la secuenciación en *pool* permite estimar satisfactoriamente las frecuencias alélicas y que este es un medio confiable para descubrir nuevos SNPs con baja tasa de falsos positivos.

Estudios realizados por Gautier et al., 2013, mostraron que el uso de secuenciación en *pool* mediante NGS provee estimaciones de las frecuencias de SNPs muy similares o hasta más precisas que la secuenciación individual (Gautier et al., 2013). Para comprender esta diferencia, se debe recordar que las frecuencias alélicas se estiman a partir de poblaciones grandes, las muestras tomadas de poblaciones pequeñas presentan mayor varianza. En contraste, la secuenciación en *pool* se realiza en poblaciones grandes, pero no todos los cromosomas de la muestra son analizados. Esta mayor precisión se debe a que muy pocos cromosomas son secuenciados más de una vez, mientras que, en la

secuenciación individual, cada cromosoma se secuencia varias veces (5-40 veces) (Schlötterer et al., 2014).

Se espera que el uso de *pooling* mediante NGS se vuelva una estrategia popular que permita realizar inferencias sobre procesos históricos y demográficos, especialmente en organismos no modelo para los que los recursos genómicos son escasos. Esta estrategia permitirá detectar regiones con exceso o baja frecuencias de alelos. Además, los datos en *pool*, parecen especialmente prometedores para realizar estudios en poblaciones que permitirán identificar los loci responsables de la variación, por ejemplo, al secuenciar *pools* de individuos en una población que presenten fenotipos extremos. Esta técnica puede no ser aplicable a cualquier tipo de estudio, pero es una aproximación para estimar frecuencias alélicas con un gran número de SNPs en un número elevado de individuos de múltiples poblaciones (Gautier et al., 2013).

Durante el desarrollo de esta tesis se pretende detectar SNPs en individuos normales y portadores de la rob(1;29) en el hato de BCU y realizar la identificación molecular de un clúster en el BTA 29 cuyos genes se encuentran asociados a fenómenos de impronta genética mediante diferentes estrategias de secuenciación.

HIPOTESIS

La variabilidad genética encontrada en el genoma de los bovinos Criollos Uruguayos y la heterocromatina dinámica localizada en la rob(1;29), permitirá evaluar genes cercanos al centrómero del cromosoma BTA29, asociados a problemas de mortalidad embrionaria e impronta genética.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

Estudiar polimorfismos en genes asociados a impronta genética ubicados en un cluster del BTA29 en individuos normales y portadores de la rob (1;29).

Objetivos específicos:

1. Realizar un monitoreo en la reserva de Bovinos Criollos Uruguayos que permita identificar posibles individuos portadores de la translocación Robertsoniana rob(1;29).
2. Identificar genes pertenecientes al clúster ubicado en el BTA29 implicados en el desarrollo embrionario y de la placenta.
3. Analizar las secuencias de genes (*PHLDA2*, *CDKN1C* y *KCNQ1*) para detectar posibles SNPs característicos de dicha población.
4. Contrastar dos metodologías de secuenciación en la búsqueda de SNPs en el mismo fragmento génico.
5. Conocer la estructura de las proteínas codificadas por estos genes y su interacción con otras proteínas.
6. Conocer y familiarizarse con programas bioinformáticos que permitan evaluar los datos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La reserva de Bovinos Criollos, localizada en San Miguel, Departamento de Rocha, está compuesta por aproximadamente 600 animales, que incluyen las categorías vacas, toros y terneros.

Se muestrearon 38 terneros de aproximadamente 3 meses de edad (machos y hembras) nacidos a partir de monta natural, en dos períodos: años 2013 y 2015. Se realizaron controles citogenéticos a los efectos de monitorear la presencia de individuos portadores de la translocación rob(1;29) y estudios moleculares.

Se extrajo sangre periférica de cada animal en condiciones para estudios citogenéticos y moleculares. Los animales fueron registrados en planillas excel con los siguientes datos: número de caravana, sexo y metafases.



Fig. 14: Parque San Miguel, departamento de Rocha



Fig. 15: Terneros en la manga para realizar la toma de muestra.

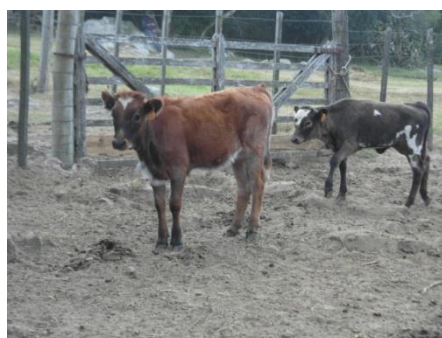


Fig.16: Terneros caravaneados.

Técnicas de citogenética

La toma de las muestras se realizó en dos períodos, el primero en el año 2013, donde se muestrearon un total de 13 animales, 7 machos y 6 hembras. La segunda toma se realizó en marzo de 2015, con un total de 25 animales, 16 hembras y 9 machos. Se obtuvieron dos muestras de sangre periférica por individuo. Se extrajeron muestras con anticoagulante (heparina sódica; 150U/10cc de sangre) utilizando jeringa desechable para realizar cultivos linfocitarios y en tubos vacutainer (10.8mg/6ml) con EDTA para realizar la extracción de ADN genómico.

Las muestras para estudios citogenéticos se procesaron para realizar cultivos linfocitarios, en macrocultivo con sangre completa (Protocolo del Laboratorio de Genética, F. Veterinaria). Estas fueron mantenidas en conservadora durante un periodo de aproximadamente 8 horas y luego se realizó el cultivo. La siembra se realiza sobre 5ml. de medio de cultivo completo RPMI, previamente preparado y fraccionado. La manipulación se realizó bajo cámara aséptica de cultivo celulares, utilizando mechero para flambear la boca del frasco estéril de vidrio donde se preparó el medio de cultivo completo. Las células linfocitarias se incubaron en baño maría durante 72hs a 38°C. Se incorporó colchicina (100mg/ml) dejándola actuar 6 hrs. y finalmente se procedió al sacrificio del cultivo (Apéndice I).

Técnicas de Biología Molecular

Las muestras (n=38) para extracción de ADN genómico se procesaron mediante kit de extracción de ADN (Quick-gDNA Mini Prep, Zymo Research).

Se trabajó con ADN de las 38 muestras y con 2 ADNs de BCU portadores de la rob(1;29) pertenecientes al banco de ADN del Laboratorio de Genética, Facultad de Veterinaria.

Se utilizaron 4 fragmentos para ser amplificados por la metodología de PCR, correspondientes a los siguientes genes: *PHLDA2* (dos fragmentos de 367 y 384 pb.), *CDKN1C* (un fragmento de 377pb.) y *KCNQ1* (un fragmento de 392 pb.). Estos corresponden a las regiones 3`UTR de los tres genes, ya que estas están implicadas en la regulación del nivel de expresión de los mismos. También se estudió el primer exón del gen *PHLDA2* para estudiar sus dos regiones codificantes.

Los *primers* utilizados para la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR se diseñaron mediante el programa Primer BLAST (Ye et al., 2012) y fueron los siguientes:

Para la secuencia ubicada en el exón 1 del gen *PHLDA2*:

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACTCGCACTGCCATCCATC	20	61.43	60.00	5.00	0.00
Reverse primer	TCTGAAAGTCGATGAGCGCC	20	60.46	55.00	4.00	3.00

Products on target templates

>[AC_000186.1](#) Bos taurus breed Hereford chromosome 29, Bos_taurus_UMD_3.1.1

product length = 367

Features associated with this product:

[pleckstrin homology-like domain family A member 2](#)

Forward primer	1	CACTCGCACTGCCATCCATC	20
Template	49329506	49329525
Reverse primer	1	TCTGAAAGTCGATGAGCGCC	20
Template	49329872	49329853

Los *primers* para la amplificación de la secuencia correspondiente a la región 3' UTR del gen *PHLDA2* fueron extraídos del trabajo de Sikora (Sikora, 2012)

Forward: PHLDA2-F: 5'-GCAGGAGATGTGCTTTTAC-3'

Reverse: PHLDA2: 5'-CTTTATTGGAATGGTGGTGGAG-3'

Para la secuencia correspondiente a la región 3' UTR del gen *CDKN1C*:

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTAGACTTCTCGCCAAGCG	20	59.01	55.00	6.00	3.00
Reverse primer	AAACACGAAACCGAACGCTG	20	59.97	50.00	2.00	1.00

Products on target templates

>[AC_000186.1](#) Bos taurus breed Hereford chromosome 29, Bos_taurus_UMD_3.1.1

product length = 377

Features associated with this product:

[cyclin-dependent kinase inhibitor 1C](#)

Forward primer	1	GTAGACTTCTCGCCAAGCG	20
Template	49370270	49370289
Reverse primer	1	AAACACGAAACCGAACGCTG	20
Template	49370646	49370627

Para la secuencia correspondiente a la región 3' UTR del gen *KCNQ1*, los *primers* utilizados fueron los siguientes:

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGAGCCCTTCTCGGTAGACG	20	62.05	65.00	4.00	3.00
Reverse primer	CACGGTCCTTCGTCTTCTCTG	21	60.40	57.14	3.00	1.00

Products on target templates

>[NM_001205441.1](#) Bos taurus potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (KCNQ1), mRNA

product length = 392

Forward primer	1	CGAGCCCTTCTCGGTAGACG	20
Template	1421	1440
Reverse primer	1	CACGGTCCTTCGTCTTCTCTG	21
Template	1812	1792

PCR (Polimerase Chain Reaction)

Para realizar la PCR utilizó el equipo Multigene II (Labnet International, Inc).

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25ul para las 3 secuencias. Para esto se utilizó:

- 1 ul de ADN genómico (~20 ng/ul)
- 1 ul de cada primer (100 pg/ul)
- 12,5 ul de ImmoMix (Bioline, Australia)
- 5,5 ul de agua MiliQ.

Programa de amplificación: Para PHLDA2 Exón 1

Desnaturalización inicial	95°C durante 5 min.
35 ciclos	
Desnaturalización	95°C durante 30 segundos
Annealing	55° C durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 1minuto
Extensión final	72°C durante 5 minutos

PHLDA2 región 3`UTR

Desnaturalización inicial	95°C durante 5 min.
35 ciclos	
Desnaturalización	95°C durante 30 segundos
Annealing	60°C durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 1minuto
Extensión final	72°C durante 5 minutos

CDKN1C región 3' UTR

Desnaturalización inicial	95°C durante 5 min.
35 ciclos	
Desnaturalización	95°C durante 30 segundos
Annealing	53° durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 1 minuto
Extensión final	72°C durante 5 minutos

KCNQ1 región 3' UTR

Desnaturalización inicial	95°C durante 5 min.
35 ciclos	
Desnaturalización	95°C durante 30 segundos
Annealing	53° durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 1 minuto
Extensión final	72°C durante 5 minutos

Los productos de la PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1% marcado con Good View Nucleid Acid Stain en buffer TBE 1X. Se utilizó el marcador de peso molecular HipperLadder 50 pb. El gel obtenido se visualizó mediante luz UV en el equipo BIOSENS SC- 805.

Los 38 amplicones de la región 3' UTR del gen *PHLDA2* se enviaron a MACROGEN para realizar la secuenciación individual y también se utilizaron para secuenciación en *pool*, siendo esta región analizada mediante las dos aproximaciones. Las secuencias obtenidas mediante la secuenciación individual fueron alineadas utilizando el programa Bioedit. Hall, T.A. (1999).

Las frecuencias alélicas se estimaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencias alélicas: } \frac{\text{n}^\circ \text{ individuos homocigotas} + \frac{1}{2} \text{ individuos heterocigotas}}{\text{Total de individuos}}$$

Secuenciación

Se realizó la cuantificación de los amplicones obtenidos por PCR mediante NanoDrop (ND100).

Para los individuos normales se armó un *pool* con los todos los amplicones de las secuencias del primer exón del gen *PHLDA2*, otro con los amplicones del segundo exón de *PHLDA2* y otro con los del gen *CDKN1C*. En el caso de los portadores de la rob (1;29), se armó un *pool* con los tres amplicones para cada uno de los portadores de la rob (1;29). En este caso, se incorporaron *barcodes* específicos que permitieron su identificación.

Los *poles* fueron purificados mediante extracción en geles QIAquick (QIAGEN).

Se utilizó la secuenciación del Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific), para esto se realizaron los siguientes pasos:

- 1- Generación de la librería
- 2 -Amplificación de la librería en partículas esféricas (emPCR).
- 3 -Secuenciación

En este proceso se utilizó el *Ion AmpliSeq*TM Library Kit. Ya que los fragmentos obtenidos a partir de PCR tienen un tamaño adecuado (400pb) no fue necesario fragmentarlos. Los extremos de los amplicones fueron reparados con enzimas del kit de amplificación. A estos se les ligaron adaptadores con código de barras (*Ion Xpress Barcode Adapters*). En el caso de la hembra portadora de la rob(1;29) fue el X11, en el macho X12, para el *pool* de la secuencia del gen *CDKN1C* en individuos normales X13, el primer exón del gen *PHLDA2* X14 y para el segundo exón X15. Luego se realizó la amplificación, para esto se utilizaron *primers* y mix de PCR del kit de librería, amplificando cada muestra por separado. Las muestras se purificaron utilizando perlas magnéticas (*XP Ampure Agent court*). Las librerías se combinaron con las perlas, se colocaron en un rack magnético y se separaron. El sobrenadante fue removido, se realizó un lavado con etanol 70%, se dejó reposar y se removió el sobrenadante. El pellet obtenido se dejó secar y se resuspendió en low TE Buffer. Las librerías se liberan de las perlas, obteniéndose en el sobrenadante la librería purificada. Una vez que se prepararon las librerías, se cuantificaron para diluirlas según el protocolo. La cuantificación se realizó mediante el fluorímetro Qubit® 2.0. Una vez que se cuantificaron las librerías, se llevaron todas a la misma concentración y se mezclaron. El próximo paso fue realizar PCR en emulsión. Se mezclan las muestras con las ISPs (*Ion Spheres Particles*) según el protocolo. Esta mezcla se introdujo en el *Ion OneTouch*TM 2, donde se realizó la emulsión.

Las ISP colectadas se lavaron con buffer y se cuantificó el molde con el Qubit. Al obtener porcentajes entre 10 y 30 % de esferas cargadas con molde se continuó con el procedimiento. Finalmente, la muestra fue cargada en el chip de secuenciación (Ion 318 Chip) (Protocolo Laboratorio de Genómica del IIBCE, Msc. Valeria Romero).

La cobertura utilizada para la secuenciación fue de 100 X ya que trabajos previos realizados por Gautier et al., (2013), mostraron que la secuenciación en *pool* con dicha cobertura para 40 individuos permitió detectar de forma precisa los SNPs presentes en las muestras.

Para el alineamiento y análisis de las secuencias obtenidas a través de la secuenciación en *pool* mediante el Ion PGM™ se utilizó el programa CLC Genomics Workbench 9.0 (CLC bio, QIAGEN Company, Denmark)

Para detectar las variantes presentes en frecuencias significativas se utilizó la herramienta Legacy tools>probabilistic variant detection (CLC bio, QIAGEN Company, Denmark) en todas las muestras. Se mantuvieron las que presentaron frecuencias iguales o mayores al 10 %.

Análisis de ARN y proteínas

Para estudiar posibles cambios en la estructura o estabilidad del ARN, se utilizó el programa *on line* RNAfold (Grubber et al., 2008).

El primer producto generado a partir del ADN son los transcritos de ARN. La expresión de varios genes se encuentra regulada por la estructura del ARN, la que es producto de la interacción del transcripto con sí mismo, formando puentes de hidrógeno entre nucleótidos complementarios (G–C, A–U). Estas estructuras juegan roles esenciales en la regulación de la traducción, en la transcripción, splicing, edición del ARN y degradación del transcripto (Proctor et al., 2013).

La formación de la estructura se da co-transcripcionalmente, a medida que el ARN está siendo transcripto. La molécula de ARN no está en equilibrio termodinámico durante la formación de la estructura del ARN funcional, ya que es el plegamiento co-transcripcional es lo que la determina. Los transcritos no solo codifican información en su estructura, sino también en su vía de plegamiento co-transcripcional (Proctor et al., 2013).

Mediante la secuencia de ADN, el programa RNAfold (Grubber et al., 2008) permite predecir la estructura secundaria del ARN. El mismo busca estructuras secundarias po-

tenciales para los modelos más estables, lo que depende de cientos de parámetros de energía libre predeterminadas (Proctor et al., 2013). Este se utilizó para analizar si existen cambios en la estructura del ARN debido a SNPs

La secuencia proteica fue estudiada mediante el programa Bioedit (Hall, 1999). Las interacciones de las proteínas fueron observadas mediante el programa *on line* STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (<http://string-db.org>).

Para observar las interacciones de las proteínas *PHLDA2* y *CDKN1C* se utilizó la base de datos STRING (<http://string-db.org>). Esta reúne e integra la información de datos conocidos y predichos de asociación proteína-proteína para un gran número de organismos. Las asociaciones mostradas en STRING incluyen interacciones directas (físicas), así como interacciones indirectas (funcionales), siempre que ambas sean específicas y biológicamente significativas. Además de recolectar y reevaluar los datos experimentales disponibles sobre las interacciones proteína-proteína e importar las vías conocidas y los complejos proteicos de las bases de datos curadas, las predicciones de interacción se derivan de las siguientes fuentes: análisis sistemático de coexpresión; señales a través de los genomas, extracción automática de textos de la literatura científica y transferencia computacional de conocimientos de interacción entre diferentes organismos (Szklarczyk et al., 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Citogenética

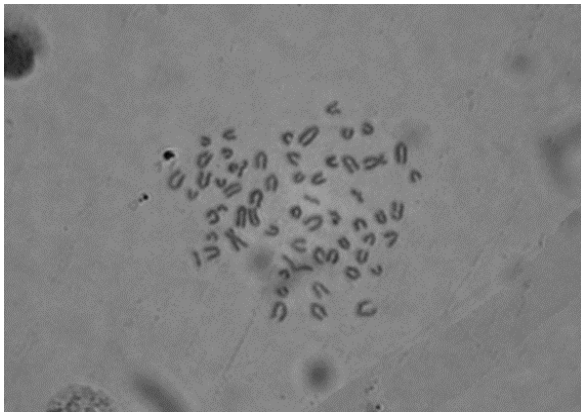


Fig. 17: Metafase de ejemplar hembra normal

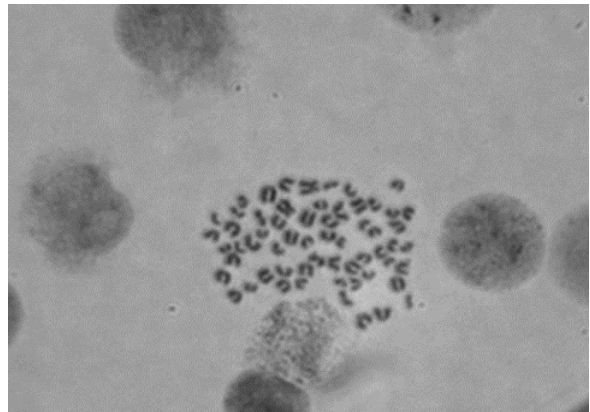


Fig.18: Metafase de ejemplar hembra normal

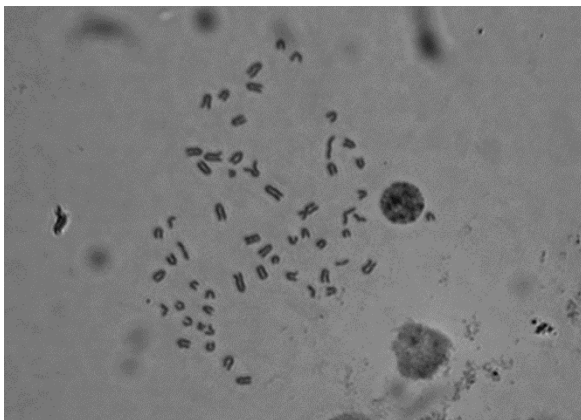


Fig. 19: Metafase de ejemplar macho normal

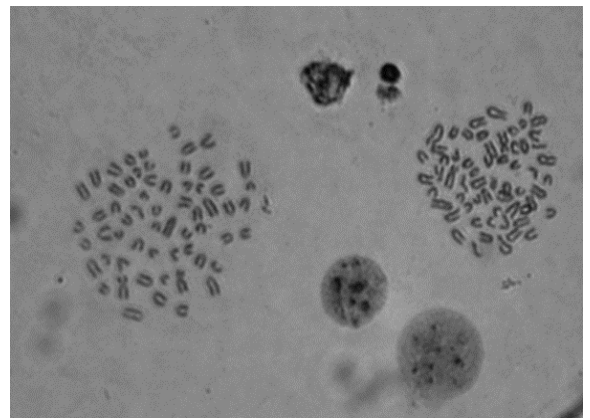


Fig.20: Metafase de ejemplar hembra normal

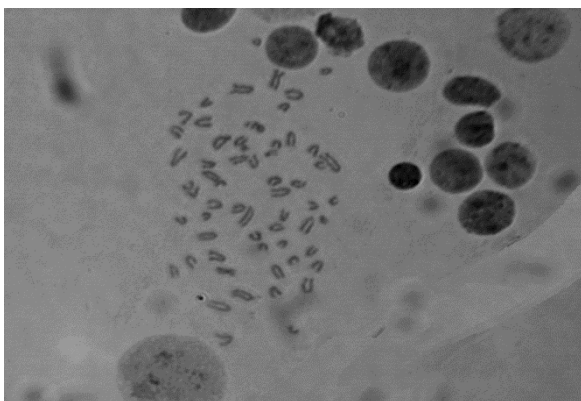


Fig. 21: Metafase de ejemplar hembra normal

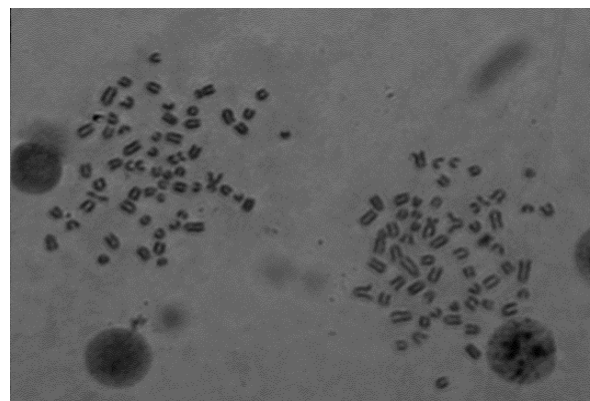


Fig. 22: Metafase de ejemplar hembra normal

A partir de los cultivos linfocitarios se obtuvieron metafases las cuales fueron observadas en el microscopio óptico OLIMPUS BX 60 y analizadas mediante el software

Image Pro-Express 6.0. La totalidad de los animales observados fueron normales, no se observó ningún portador de la rob (1;29).

En esta tesis se planteó monitorear la población a los efectos de identificar animales portadores de la rob(1;29). La reserva ha presentado 4% de heterocigotas (Postiglioni et al., 1996, 2002, 2012). Los animales muestreados en esta oportunidad (N=38) que corresponde al 6% de la población, resultó ser toda normal para la translocación. Próximas experiencias revelarán la citogenética del plantel de reproductores, a los efectos de realizar un manejo controlado.

Técnicas moleculares

En los gels obtenidos para los amplicones de los fragmentos de los genes *PHLDA2* y *CDKN1C* se observaron bandas de tamaño entre 300 y 400 pb. Esto se corresponde a lo esperado ya que el tamaño del fragmento amplificado del primer exón del gen *PHLDA2* es de 367 pb, el de la región 3`UTR es de 384 pb, y el fragmento del exón 1 del gen *CDKN1C* es de 377 pb.

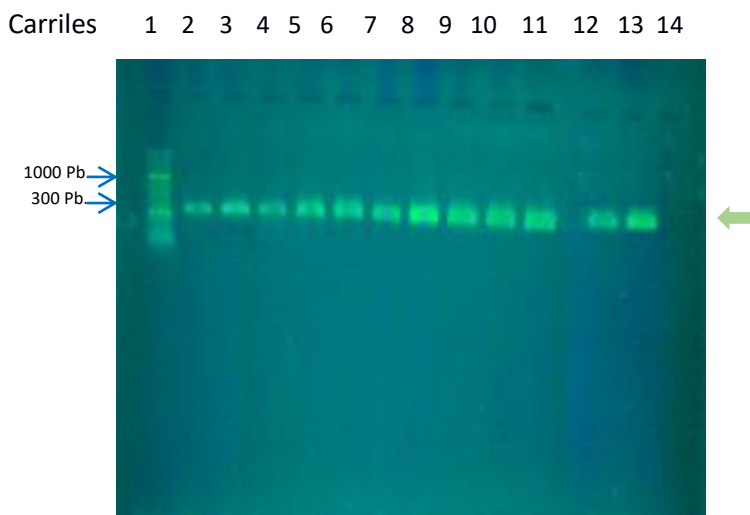


Fig. 23: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los fragmentos correspondientes al exón 1 del gen *PHLDA2*. La flecha (der.) indica el fragmento amplificado de 367 pb.

Carril 1: Marcador de peso molecular HiperLadder 50 pb.

Carril 2: Hembra portadora de la rob (1;29).

Carril 3: Macho portador de la rob (1;29).

Carriles 4-13: BCU normales.

Carril 14: Control negativo.

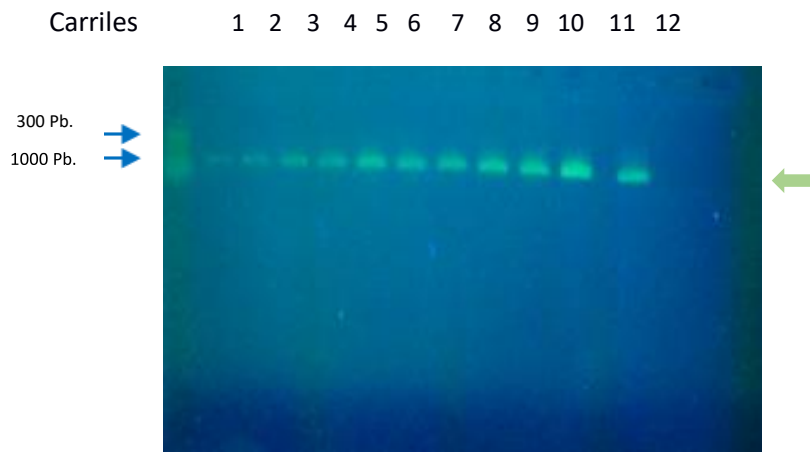


Fig. 24: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los fragmentos correspondientes a la región 3'UTR del gen *PHLDA2*. La flecha (der.) indica el fragmento amplificado de 384 pb.

Carril 1: Marcador de peso molecular Hiperladder 50pb.
 Carril 2: Hembra portadora de la rob (1;29).
 Carril 3: Macho portador de la rob (1;29).
 Carril 3-11: Bovinos Criollos normales.
 Carril 12: Control negativo.

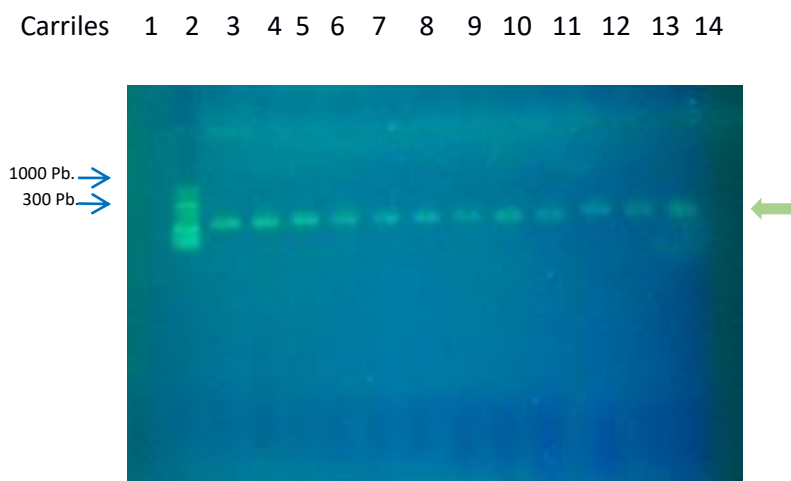


Fig.25: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los fragmentos correspondientes a la región 3'UTR del gen *CDKN1C*. La flecha (der.) indica el fragmento amplificado de 377 pb.

Carril 1: Marcador de peso molecular Hiperladder 50pb.
 Carril 2: Hembra portadora de la rob(1;29).
 Carril 3: Macho portador de la rob(1;29).
 Carril 4-13: Bovinos Criollos normales.
 Carril 14: Control negativo.

En el caso de la secuencia del gen *KCNQ1* no se obtuvieron amplicones mediante PCR, por lo que su secuencia no pudo analizarse. Esto podría deberse a errores en el diseño de los *primers*, o que las secuencias de Criollos y Hereford presenten diferencias en esa región ya que el genoma utilizado como referencia para su diseño fue el que se encuentra en la base de datos del NCBI, siendo este de la raza Hereford.

Secuenciación individual de la región 3'UTR del gen *PHLDA2*

Los productos de PCR correspondientes a la región 3'UTR del gen *PHLDA2* fueron enviados a secuenciar a MACROGEN (Korea). Estas mismas también se utilizaron para la secuenciación en *pool*. Los resultados obtenidos fueron alineados utilizando el programa Bioedit. Hall, T.A. (1999)

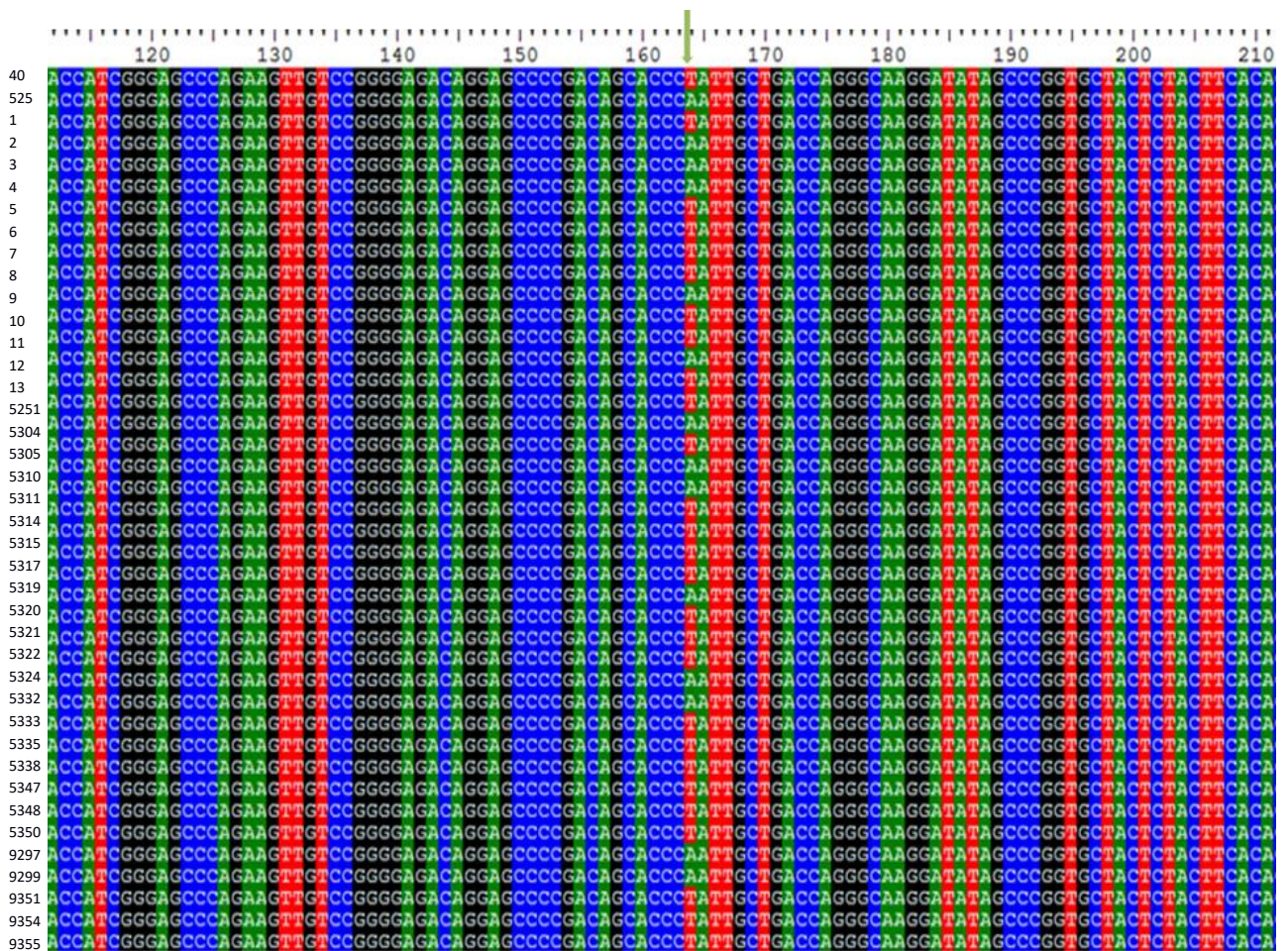


Fig. 26: Se observa el alineamiento de las 40 secuencias de BCU realizadas con el programa Bioedit (Hall, T.A, 1999)

- Línea 1: Hembra portadora de la rob (1;29)
- Línea 2: Macho portador de la rob (1;29)
- Líneas 3-40: Bovinos Criollos normales.

En la posición 164 de la secuencia se puede observar el SNP A/T descrito por Sikora (rs42194502). De los 38 individuos normales 23 fueron heterocigotas A/T, 13 homocigotas A/A y 2 homocigotas T/T. La hembra y el macho portador de la rob (1;29) resultaron heterocigotas.

Las frecuencias alélicas obtenidas fueron de 0,637 para el alelo A y de 0,363 para el alelo T. Los cromatogramas de estas secuencias mostraron que ambos portadores de la rob(1;29) son heterocigotas A/T para el SNP en estudio. Trabajos previos en muestras de ganado Holando uruguayo, una raza altamente endogámica, mostraron la fijación de la variante A, encontrándose únicamente individuos homocigotas A/A (Balemian et al., 2014).

A continuación se muestran los cromatogramas de los portadores de la rob(1;29):

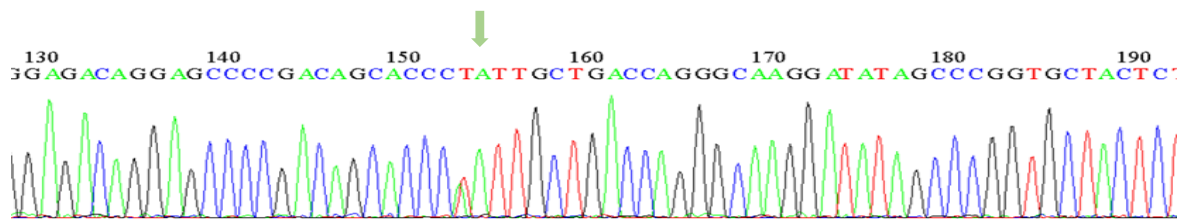


Fig. 27: Cromatograma de la hembra portadora de la rob(1;29). Se observa que la misma es heterocigota A/T

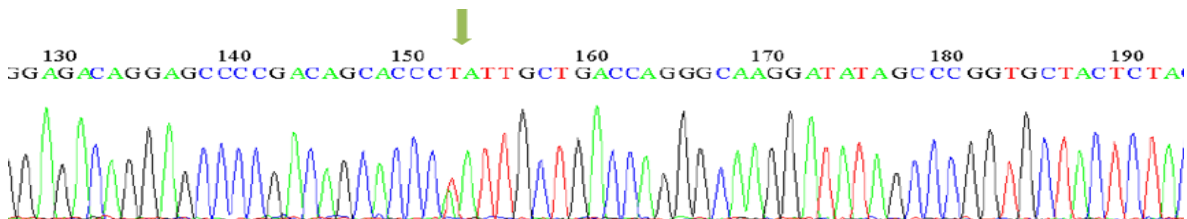


Fig. 28: Cromatograma del macho portador de la rob(1;29). Se observa que el mismo es heterocigota A/T.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos linfocitarios y los estudios moleculares para el SNP ubicado en la región 3' UTR del gen *PHLDA2* fueron registrados en la siguiente tabla:

Individuo n°	Sexo	Metafase	Genotipo
1	Macho	Normal	A/T
2	Hembra	Normal	A/A
3	Macho	Normal	A/A
4	Macho	Normal	A/T
5	Macho	Normal	A/T
6	Hembra	Normal	A/T
7	Hembra	Normal	A/T
8	Hembra	Normal	A/T
9	Macho	Normal	A/T
10	Hembra	Normal	A/A
11	Macho	Normal	A/A
12	Macho	Normal	A/T
13	Hembra	Normal	A/T
5251	Macho	Normal	A/T
5304	Hembra	Normal	A/T
5305	Hembra	Normal	A/A
5310	Hembra	Normal	A/T
5311	Hembra	Normal	A/T
5314	Hembra	Normal	A/T
5315	Hembra	Normal	A/T
5317	Hembra	Normal	A/A
5319	Hembra	Normal	T/T
5320	Macho	Normal	A/A
5321	Hembra	Normal	A/T
5322	Hembra	Normal	A/A
5324	Macho	Normal	A/A
5332	Macho	Normal	A/A
5333	Macho	Normal	A/T
5335	Macho	Normal	A/A
5338	Macho	Normal	A/A
5347	Hembra	Normal	A/T
5348	Hembra	Normal	A/T
5350	Hembra	Normal	A/A
9297	Hembra	Normal	A/T
9299	Hembra	Normal	A/T
9351	Hembra	Normal	T/T
9354	Macho	Normal	A/T
9355	Macho	Normal	A/T
40	Hembra	Portadora rob (1;29)	A/T
585	Macho	Portador rob (1;29)	A/T

Tabla 1: Resultados del análisis citogenético y de los SNPs presentes en las secuencias del gen *PHLDA2* obtenidos por método Sanger. Los individuos con las caravanas 40 y 585 pertenecen al banco de ADN del laboratorio.

Secuenciación en *pool* de las regiones de los genes *PHLDA2* y *CDKN1C*

Los *pooles* fueron purificados mediante el kit de purificación QIAquick y fueron corridos en gel de poliacrilamida para su posterior secuenciación.

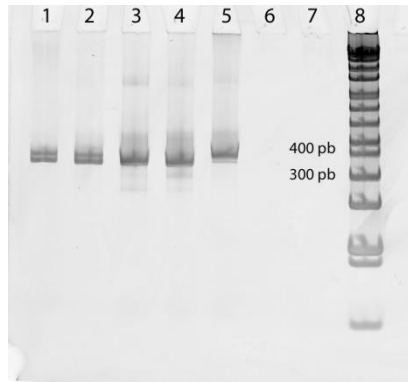


Fig. 29: Gel de poliacrilamida mostrando los *pooles* purificadas con las tres secuencias, los dos exones del gen *PHLDA2* y el del gen *CDKN1C*.

Carril 1: *Pool* de amplicones totales de la hembra portadora de la rob(1;29).

Carril 2: *Pool* de amplicones totales del macho portador de la rob(1;29).

Carril 3: *Pool* de amplicones de la región 3'UTR del gen *CDKN1C* de individuos normales.

Carril 4: *Pool* de amplicones del primer exón del gen *PHLDA2* de individuos normales.

Carril 5: *Pool* de amplicones de la región 3'UTR del gen *PHLDA2* de individuos normales.

Carril 8: Marcador de peso molecular de 1 Kb Plus.

Análisis de secuencias

La secuenciación produjo un total de 534.195 *reads* para los fragmentos en estudio. Los *reads* obtenidos fueron mapeados sobre la secuencia de referencia del gen correspondiente de la base de datos del NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov (Gen *PHLDA2* ID: 618810, gen *CDKN1C* ID: 510972). Dichas secuencias pertenecen a animales de la raza Hereford, ya que fue la raza utilizada para la secuenciación del genoma bovino. En el caso de la población total, se obtuvieron un conjunto de *reads* para cada una de las secuencias de la población normal, mientras que para el caso de los portadores de la rob(1;29) se obtuvo un *pool* constituido por *reads* de las 3 secuencias de cada animal.

Al analizar las secuencias de ambos genes (los dos exones del gen *PHLDA2* y el exón del gen *CDKN1C*), se observaron SNPs únicamente en el gen *PHLDA2*. En este caso, en el primer exón del gen, existe un SNP descrito para la raza Hereford, el SNP T/G (rs109405689) en la posición 1304 respecto a la referencia. El alelo ancestral en Hereford es el alelo T. En todas las muestras estudiadas, se observó la fijación de una de las variantes, la G, siendo esta la única observada en los 40 individuos estudiados, normales y portadores de la rob(1,29). En la región 3'UTR del mismo gen en la posición 2031 se

detectó el SNP A/T (rs42194502) descrito por Sikora (Sikora et al., 2013), siendo este el único encontrado. El resto de los SNPs e indels observados en estas regiones fueron generados por diferentes errores durante el proceso de secuenciación, esto se corroboró al analizar las secuencias en profundidad. En el caso de las secuencias correspondientes a la región 3'UTR del gen *CDKN1C* se observaron indels en baja frecuencia, también originados por errores en la secuenciación.

Alineamiento de secuencias:

Los *reads* obtenidos fueron mapeados sobre el gen correspondiente. Se puede observar el número de *reads* secuenciados para cada uno de los fragmentos. Los *reads* secuenciados en dirección *forward* se muestran en rojo, mientras que los secuenciados en dirección *reverse* se muestran en verde. Las variantes se presentan con un código de colores. Cuando la variante que se presenta es una G, se muestra en amarillo, si esta es una A, la variante se ve en rojo, si es C en azul y T en verde.

Gen *PHLDA2*

En el caso de este gen, los *reads* generados para ambos fragmentos fueron mapeados juntos sobre la referencia. La secuencia correspondiente a la región del primer exón se encuentra desde la posición 1200 a 1600 y la correspondiente al segundo desde la posición 1850 a 2250. La secuenciación de los dos exones del gen *PHLDA2* en el *pool* de individuos normales produjo un total de 421,592 *reads*, en la hembra portadora se obtuvieron 76.292 *reads* y en el macho portador 32.913 *reads*.

Las siguientes figuras muestran los alineamientos y variantes detectados en cada región:

Alineamiento para la población normal:

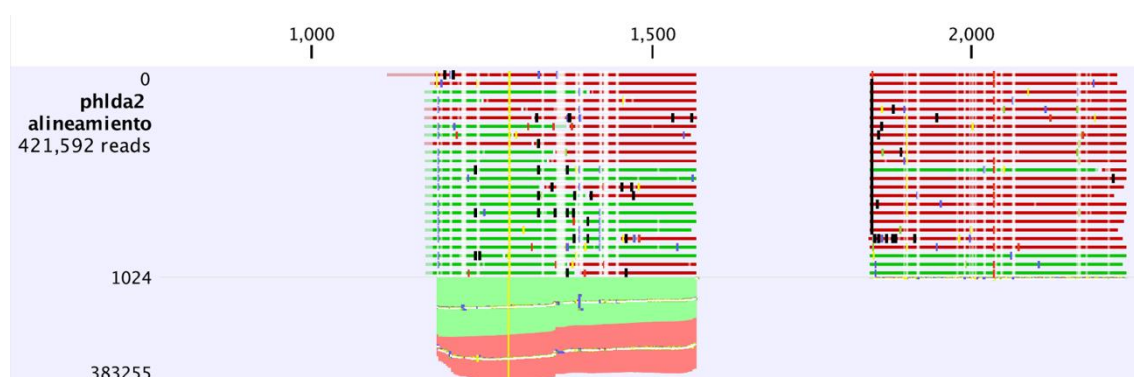


Fig. 30: Alineamiento de los *reads* correspondiente a los dos exones del gen *PHLDA2* en el *pool* de individuos normales.

Alineamientos correspondientes a los individuos portadores de la rob(1;29):

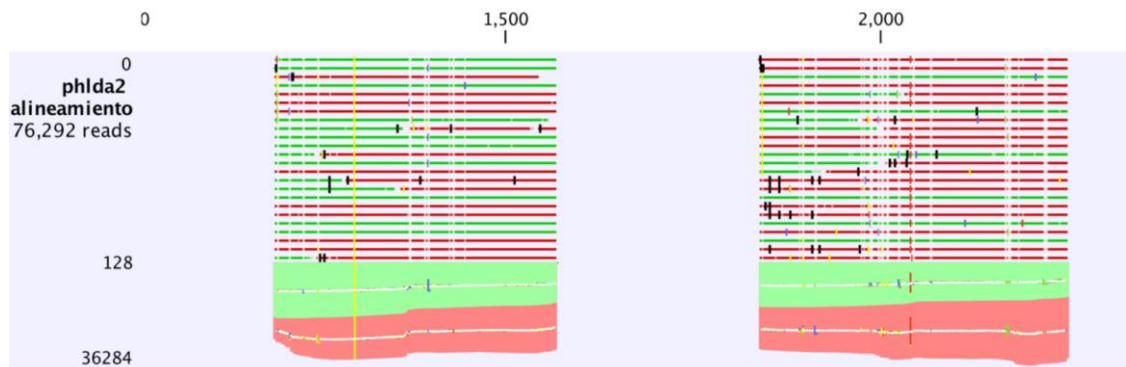


Fig. 31: Alineamiento de los *reads* correspondientes a los dos exones del gen *PHLDA2* en la hembra portadora de la rob(1;29).

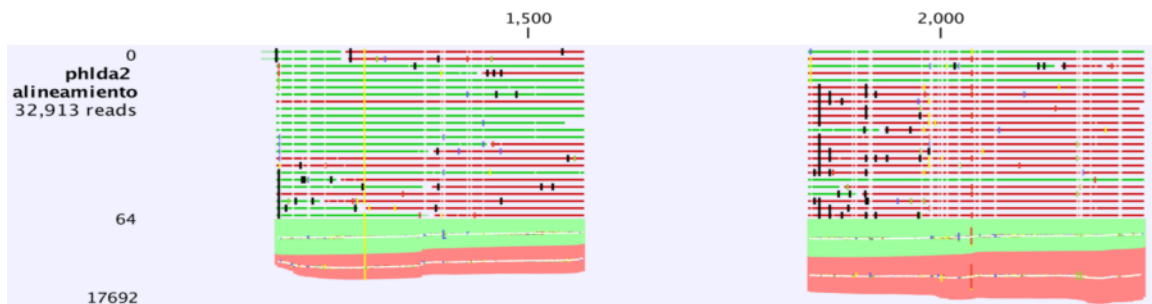


Fig. 32: Alineamiento de los *reads* correspondientes a los dos exones del gen *PHLDA2* en el macho portador de la rob(1;29).

Las variantes presentes con frecuencias mayores al 10% se pueden observar en los siguientes esquemas:



Fig. 33: Posibles variantes en la secuencia del gen *PHLDA2* en individuos normales. Se observa una delección en la posición 1201 y dos SNPs en las posiciones 1304 y 2031.

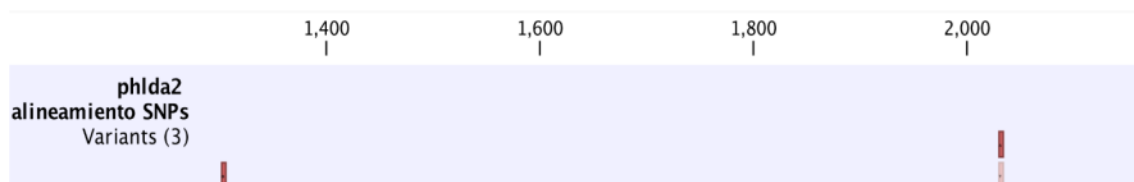


Fig. 34: Posibles variantes de la secuencia del gen *PHLDA2* en la hembra portadora de la rob(1;29). Se observan en las posiciones 1304 y 2031.



Fig. 35: Posibles variantes en la secuencia del gen *PHLDA2* en el macho portador de la rob (1;29). Se observan en las posiciones 1304 y 2031.

Primer exón del gen *PHLDA2*:

Con el objetivo de corroborar la existencia de los SNPs detectados, se realizó un análisis detallado de la secuencia.

Este mostró la fijación de la variante G de un SNP T/G (posición 1304) presente en la raza Hereford en todos los individuos estudiados:

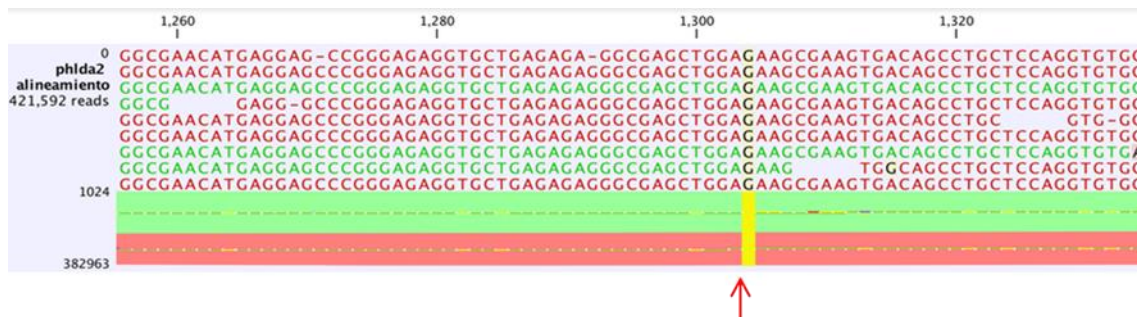


Fig. 36: Variante G presente en la población normal.

En el caso de los portadores de la rob(1;29) dicho análisis también mostró la fijación de la variante G del SNP T/G:

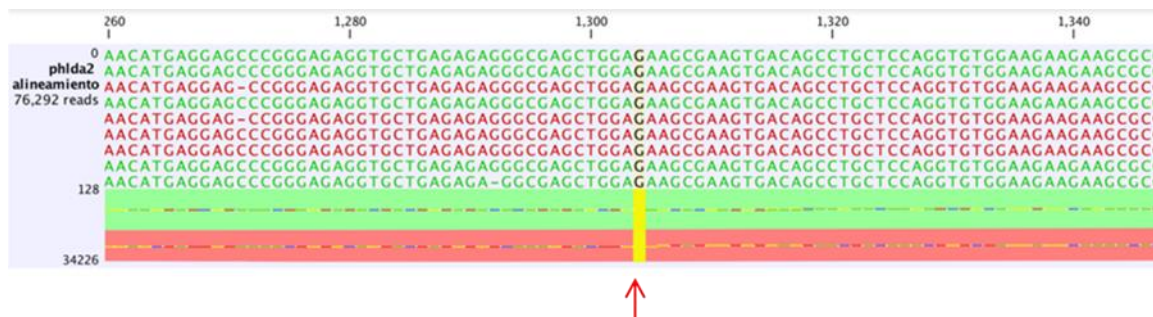


Fig. 37: Variante G presente en la hembra portadora de la rob(1;29).

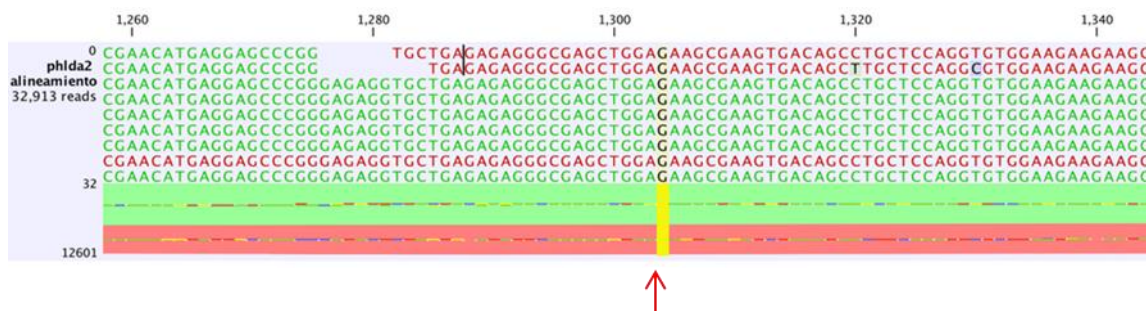


Fig. 38: Variante G presente en el macho portador de la rob(1;29).

En las secuencias correspondientes al primer exón del gen *PHLDA2* se encontró una variante fijada, la variante G de un SNP T>G descrito en la raza Hereford ubicada en el primer exón. Esta se encontró en los 40 individuos estudiados. En el caso de las muestras correspondientes a los individuos portadores de la rob(1;29) también se encontró la variante G, el localizado en la misma posición en ambas muestras.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, no se han encontrado estudios de diversidad genética en esta región del gen *PHLDA2* en Hereford ni en otras razas de bovinos. Los datos utilizados correspondieron a resultados de secuenciación encontrados en la página ensembl (www.ensembl.org)

En este mismo exón, en la población normal, los resultados mostraron una posible delección en la posición 1201. Al observar la secuencia se pudo determinar que este se generó por error ya que el mismo se encuentra dentro de la región donde hibrida de uno de los *primers*.

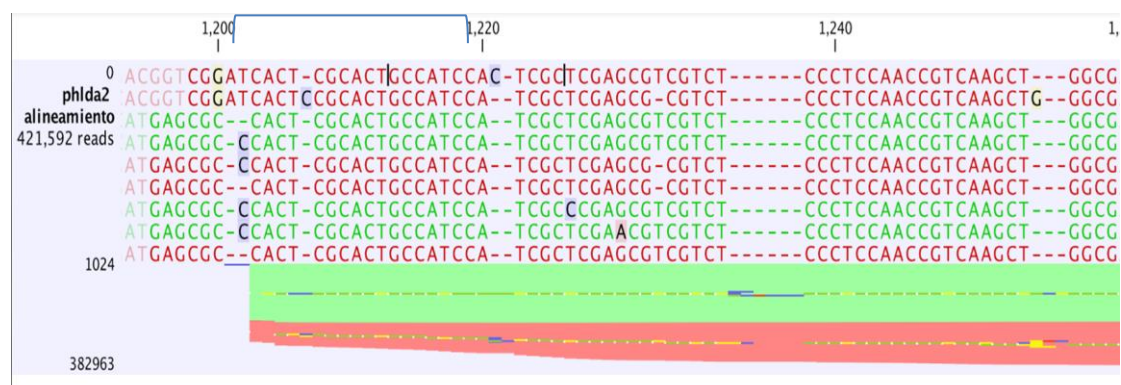


Fig.39: Secuencia correspondiente al primer exón del gen *PHLDA2*. Se indica la posición del *primer*.

Exón codificante para la región 3'UTR del gen *PHLDA2*:

En el caso del exón codificante para la región 3'UTR, al analizar las secuencias se pudo corroborar la presencia del SNP A/T descrito por Sikora (Sikora et al., 2013), en la posición 2031.

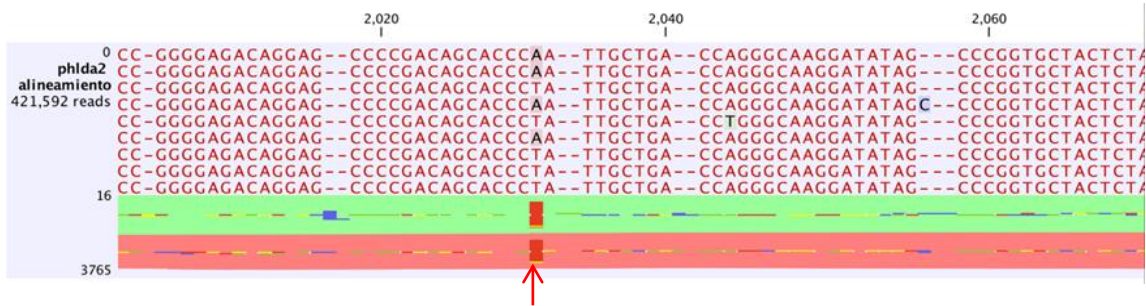


Fig.40: SNP A/T en la población normal

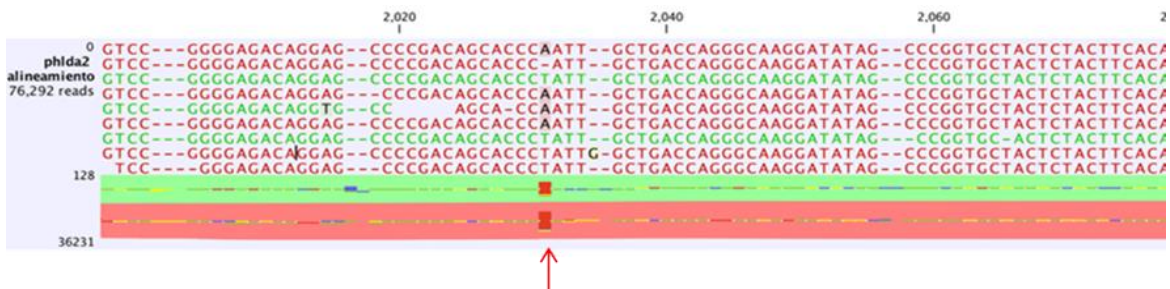


Fig. 41: SNP A/T presente en la hembra portadora de la rob(1,29). Se observa que la misma es heterocigota.

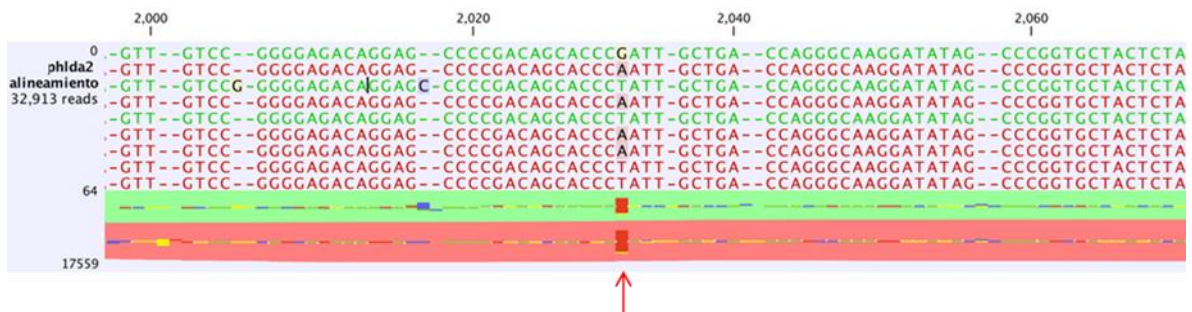


Fig. 42: SNP A/T presente en el macho portador de la rob(1,29). Se observa que el mismo es heterocigota.

En la figura 43 se observa la ubicación de los SNPs para el gen *PHLDA2*. Los exones se marcan en rojo. La letra K ubicada en el primer exón representa al SNP G>C y se encuentra coloreado en amarillo ya que es el código perteneciente a las variantes *misense*. En el caso del otro SNP, ubicado en el segundo exón, este es una variante de la región 3'UTR, por lo que se encuentra resaltado en azul.

```

ATCACTCGCACTGCCATCCATCGCTCGAGCGTCTCCCTCCAACCGTCAAGCTGGCGA
ACATGAGGMGMMGGGARAGGKGSSTGAGAGA KGGCGAGCTGGAKAAGCGAAGKGCACAGCM
TGCTCCAGGDGTGGAAGARGARGCGCGKCGYGTCCACCMCKKASCGCCTGAGSCTGKYCC
CCMCCGGCCCCSGCGCACKMYCAAGGAKCTGCGTTTCCVCTCENSBTAE00000326818 KGGMCT
GGCGGGAGCSCWCCSRCMAGTACKTCTMCTTCACCTCGBCAYVCCGASCGCAAGGAGA
TCGHCTTCCGCTGCKCGGGCGAGAGCTMCTKGRASGGCTCCRTCRGCTGGCGCTCATCG
AMTTTCAGAMCCGCGCGCCATGCAGGACTTCCGCAGCCGCGCGAGCGCGCGCGGCGG
CCGCGGCTCGAGCGGCGCGCGGCGGCGGAGCAGGAGCCGAGGCCGGGCGGGGG
GCCAGCCCTAAGTCCCACGGCGGTGAGTGCCGCGAGCCCGCTCCCCCGGGCACGGGGTG
GTGGGGGAGGACGATTTTCATCTCTGACGTGGGTGGAGGTCTGCCCCGTCTAGGTGTA
GAGAGGGGACTGGGTGCCGCGCCATCGCGGCGCGCCTCGGGCGCGGGCAGGAGATGTCG
CTTTACCTTCGGTGTAGGGGCTCGGGAGACCAACAGGCTGGACCTGGCTGGCTCAGC
CCCCGGGCTCGGGCACAGTCCCTGAATCCTTCTCTCCACAGAAATCATGCCMGCTGCA
CCATCGGGAGCCCRGAAGKTGTCCSGGGAGACMGGAGCCCGACAGACCCTATTKCTGA
CCAGGGCAAGGAKATAGCCGGKGTACTYACTTYACACACAATGACCTTCCGTGCTG
ATTCACTGAGCCTCAGAGTCCGTGKCGCGGCAAGMTACATAATTAGCTAENSBTAE0000032681
TTATTTGATGGTGCCTGTTGATCCAAACCATCTGTCTTACGTTTGTACTCCACCACA
T/A

```

Fig. 43: Ubicación de los SNPs dentro de los exones del gen. Los mismos se enmarcan en rojo

Gen *CDKN1C*

Los *reads* generados en la secuenciación del fragmento codificante para la región 3'UTR del gen *CDKN1C* fueron alineados sobre la secuencia de referencia, encontrándose desde la posición 2700 a 3100 aproximadamente.

Alineamientos correspondientes a los *reads* del gen *CDKN1C* en la población normal:

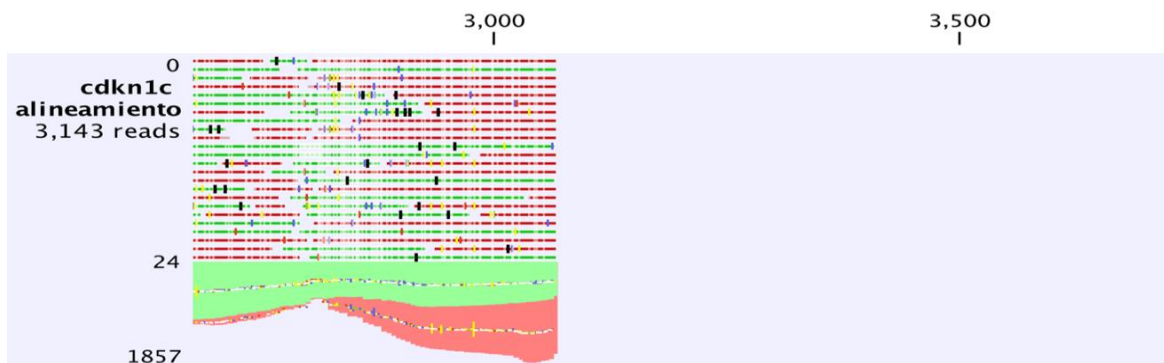


Fig. 44: Alineamiento de los *reads* del *pool* de individuos normales con la región 3'UTR del gen *CDKN1C*.

Alineamientos correspondientes a los *reads* del gen *CDKN1C* en los portadores de la rob(1;29):

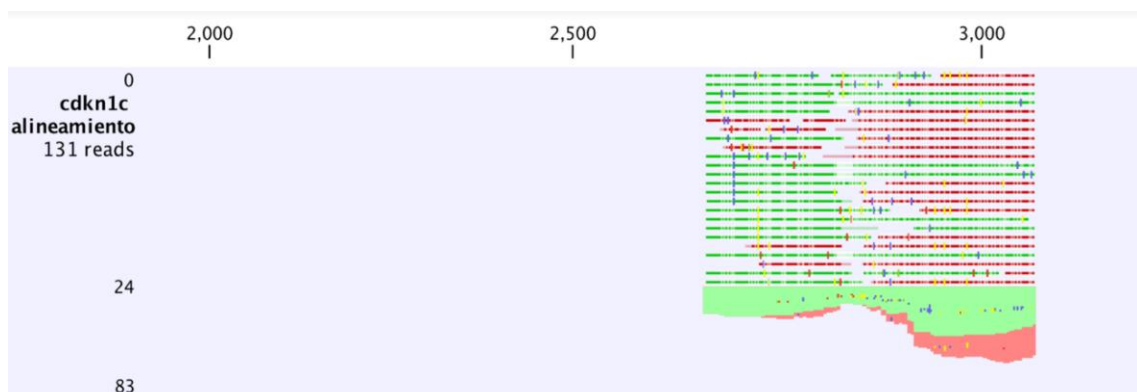


Fig. 45: Alineamiento de los *reads* correspondientes a la región 3'UTR del gen *CDKN1C* en la hembra portadora de la rob(1;29).

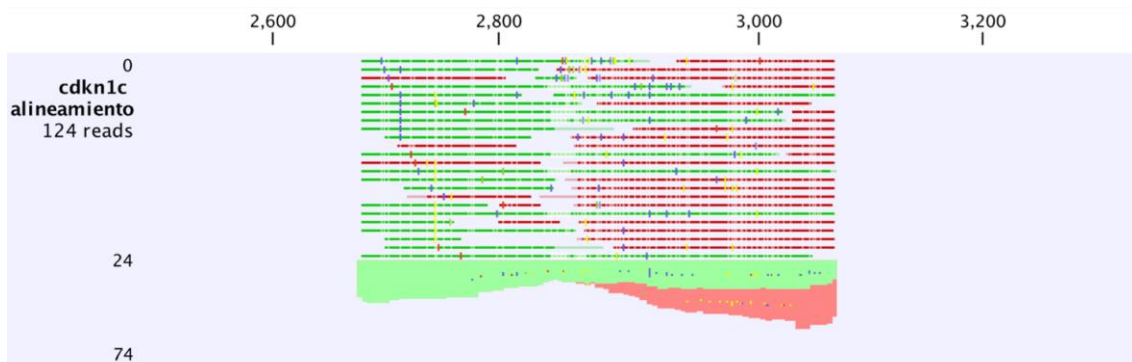


Fig. 46: Alineamiento de los *reads* correspondientes a la región 3'UTR del gen *CDKN1C* en el macho portador de la rob(1;29).



Fig. 47: Posibles variantes en la secuencia del gen *CDKN1C* en la población normal. Se observan en las posiciones 2872 y 2881.



Fig. 48: Posibles variantes en la secuencia del gen *CDKN1C* en la hembra portadora. Se observan en las posiciones 2747, 2800, 2846 y 2879.

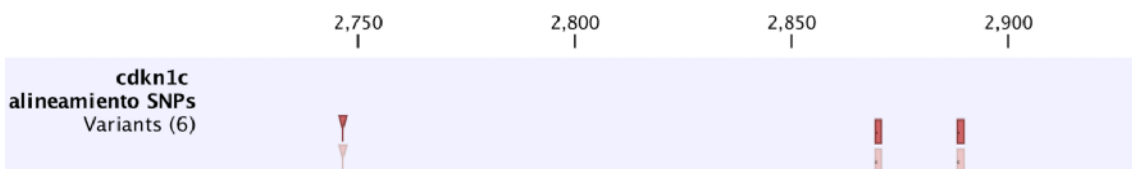


Fig 49: Posibles variantes en la secuencia del gen *CDKN1C*. Se observan en las posiciones 2746, 2870 y 2890.

Para la región 3'UTR del gen *CDKN1C*, el número de *reads* obtenidos fue bajo, siendo de 3.143 en el *pool* de la población normal, mientras que en la hembra y el macho portador se obtuvieron 131 y 124 *reads* respectivamente. Esto podría deberse a que el *pool* de dicha secuencia se encuentre en concentraciones más bajas que los del gen *PHLDA2*, consumiendo éste la mayor parte de la secuenciación. Los resultados mostraron 3 posibles SNP

presentes en esta región. Al analizar la secuencia, se observó que la misma presenta regiones de poli C y poli G. Estas repeticiones generan errores al momento de la secuenciación. El Ion Torrent utiliza chips semiconductores, cada vez que un nucleótido es incorporado en la cadena de ADN, un ion de hidrógeno es liberado. Esto genera un cambio en el pH de la solución, lo que es detectado por el sensor iónico, el que traduce la señal química a un formato digital. Cuando una secuencia presenta tramos de bases repetidas, el equipo puede realizar lecturas erróneas e incorporar bases extras en el proceso de secuenciación (www.genomics.cn). En la figura se puede observar que la secuencia del gen *CDKN1C* presenta tramos con repeticiones de C y G.

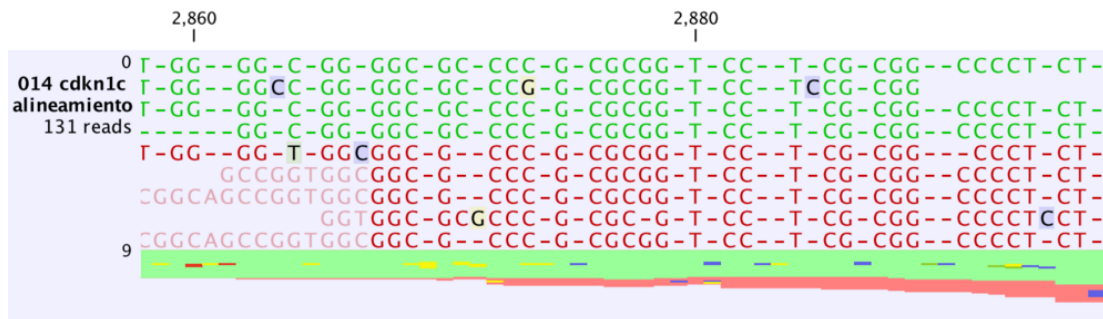


Fig. 50: Se observa un tramo de repeticiones de C y G en la región secuenciada.

En el presente trabajo se estudiaron y secuenciaron los dos exones del gen *PHLDA2*, el primer exón y la región codificante 3'UTR y el exón codificante para la región 3'UTR del gen *CDKN1C*. Este estudio se realizó a nivel poblacional, mediante la secuenciación en *pool* de muestras correspondientes a individuos normales y la secuenciación individual de muestras pertenecientes a portadores de la rob(1;29). También se realizó la amplificación y secuenciación de la región 3'UTR del gen *PHLDA2* mediante el Ion Torrent y secuenciación con método Sanger (MACROGEN) para la región 3'UTR. Los SNPs detectados por la secuenciación en *pool* se debieron a errores en el proceso, no existieron diferencias en relación al encuentro de SNPs utilizando ambas metodologías.

Los SNP generados por errores pueden originarse por diferentes causas. Es importante tener en cuenta que, hay tres parámetros a ser considerados. Entre ellos encontramos el número de individuos a incorporar al *pool* (a mayor número menor probabilidad de error), la cobertura de secuenciación y la contribución desigual de individuos en el *pool* (Gautier et al., 2013)

El gen *PHLDA2*, no presentó nuevas mutaciones en ninguna de sus secuencias. En el caso de la región reguladora 3'UTR, no se encontraron nuevos SNPs, solo se confirmó la presencia del SNP previamente descrito por Sikora (Sikora et al., 2013). Las frecuencias alélicas en la población analizada, mostraron un predominio de la variante A, existiendo genotipos heterocigotas en los individuos portadores de la rob(1;29). Análisis de frecuencias de estos genes, no se han encontrado en la bibliografía consultada.

En el primer exón, en la posición 1304 existe un SNP descrito para la raza Hereford, el SNP T > G. Al analizar los resultados obtenidos, se observó que en todas las muestras de Bovinos Criollos (normales y portadores de la rob(1;29)) la variante G se encuentra fijada, encontrándose la misma en una frecuencia de 99.8. En los bovinos de la raza Hereford, la forma ancestral corresponde al alelo T, siendo la forma mutada correspondiente a la G.

Análisis de los transcritos de ARN del gen *PHLDA2*

La secuencia de ADN se ingresó al programa RNAfold. Las conformaciones de ARN obtenidas fueron las siguientes:

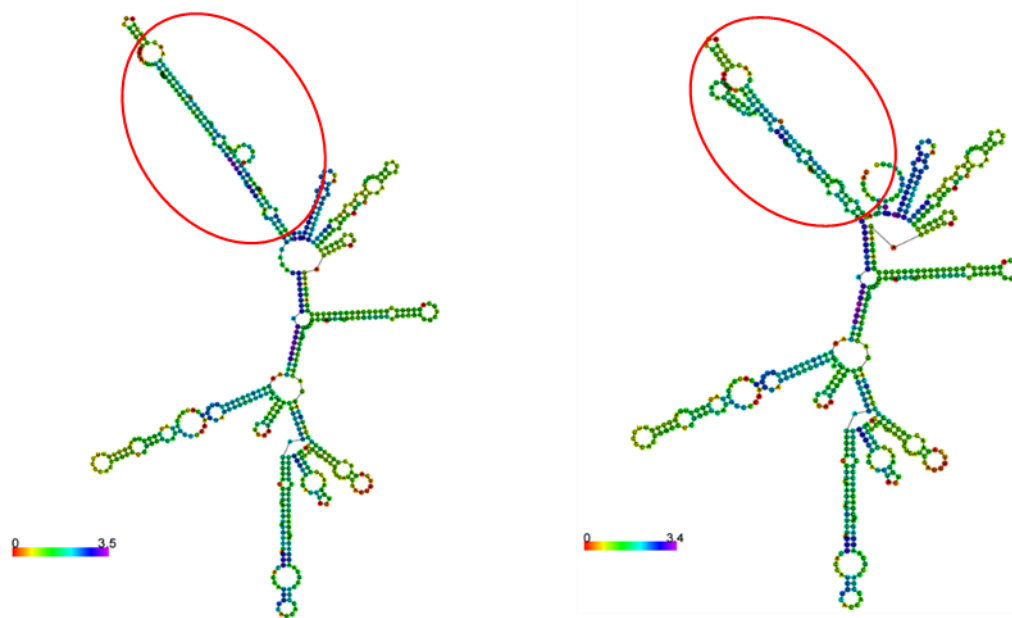


Fig. 51: Comparación de la conformación de ambas estructuras de ARN. El círculo muestra la diferencia entre ambas variantes. La figura de la derecha corresponde al portador de la variante G y la de la izquierda la variante T.

Estas conformaciones mostraron una pequeña diferencia de energía libre (Δ MFE). En el caso del portador de la variante T, la energía libre fue de -261.22 Kcal/mol, siendo esta en el caso de la variante G de -261.03 Kcal/mol.

Estos valores muestran que la diferencia de energía libre entre ambas estructuras no es muy significativa, por lo que no existirían diferencias en la estabilidad entre ambas. La estructura general en ambos casos es muy similar, observándose una diferencia de conformación en uno de los extremos de la molécula, lo que podría tener algún efecto en su asociación con los ribosomas.

Análisis a nivel proteico del producto del gen *PHLDA2*

Secuencia aminoacídica

Las secuencias obtenidas fueron traducidas a proteína mediante el programa Bioedit (Hall, 1999), obteniéndose una proteína de 142 aminoácidos. El cambio de aminoácido se produjo en el residuo número 14. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

```
MRSPGEVLREGELKRSDSLQVWKKRGLVLTDRRLRFPTGPGARPKELRHSILKVDCVERTGKYVYFTIVTTDRKEIDFRCAGESYWNASI
MRSPGEVLREGELDKRSDSLQVWKKRGLVLTDRRLRFPTGPGARPKELRHSILKVDCVERTGKYVYFTIVTTDRKEIDFRCAGESYWNASI
```



Fig. 52: Secuencias aminoacídicas de ambas variantes

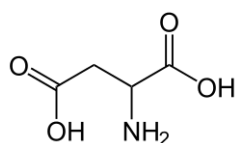
Línea 1: Secuencia traducida de bovinos Criollos

Línea 2: Secuencia traducida a partir del gen de referencia, perteneciente a la raza Hereford

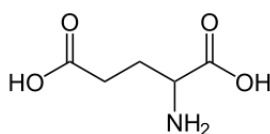
La flecha indica el cambio aminoacídico.

En el primer exón del gen *PHLDA2* se observó una tendencia a la fijación de una de las variantes para un SNP descrito en Hereford en todos los individuos estudiados. Esto produjo el cambio de un aminoácido en la proteína. En esta posición originalmente se encontraba ácido aspártico (D), el cual fue sustituido por ácido glutámico (E).

El cambio se produce entre aminoácidos muy parecidos entre sí, pertenecientes al mismo grupo, por lo que presentan características similares. Ambos son aminoácidos ácidos, ya que presentan carga negativa. Esta similitud no produciría cambios importantes a nivel proteico. En el siguiente cuadro se muestran las propiedades de los mismos:



Ácido aspártico



Ácido glutámico

	Símbolo	Hidropatía	Fórmula	Pka, NH2	Pka, COOH
Ácido aspártico	D	Hidrofílico	C ₄ N ₇ NO ₄	9.6	1.88
Ácido glutámico	E	Hidrofílico	C ₅ H ₉ NO ₄	9.67	2.19

Fig. 53: Estructura y propiedades del ácido aspártico y el ácido glutámico.

La proteína PHLDA2 regula el crecimiento placentario. Puede actuar mediante su dominio PH al competir con otras proteínas con el mismo dominio, previniendo su unión a lípidos de membrana. El dominio PH se encuentra ubicado en la región comprendida entre la posición 7 y 99.

```

      10      20      30      40      50
MRSPGEVLRE GELEKRSDSL LQVWKKKRGV LTTDRLRLFP TPGGARPKEI
      60      70      80      90     100
RFHSILKVDC VERTGKYVYF TIVTTDRKEI DFCAGESYW NASITLALID
      110     120     130     140
FQNRRAQDF RSRRERAAAA AAAAAAAAAA EQEPEAGPGG QP
  
```

Fig. 54: Ubicación del dominio PH de la proteína PHLDA2.

El dominio PH se une a fosfoinosítidos con amplia especificidad. Pueden competir con el dominio PH de otras proteínas, interfiriendo con su unión a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) y fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato (PIP3) (UniProt).

En el caso de la proteína PHLDA2 se detectaron las siguientes interacciones:

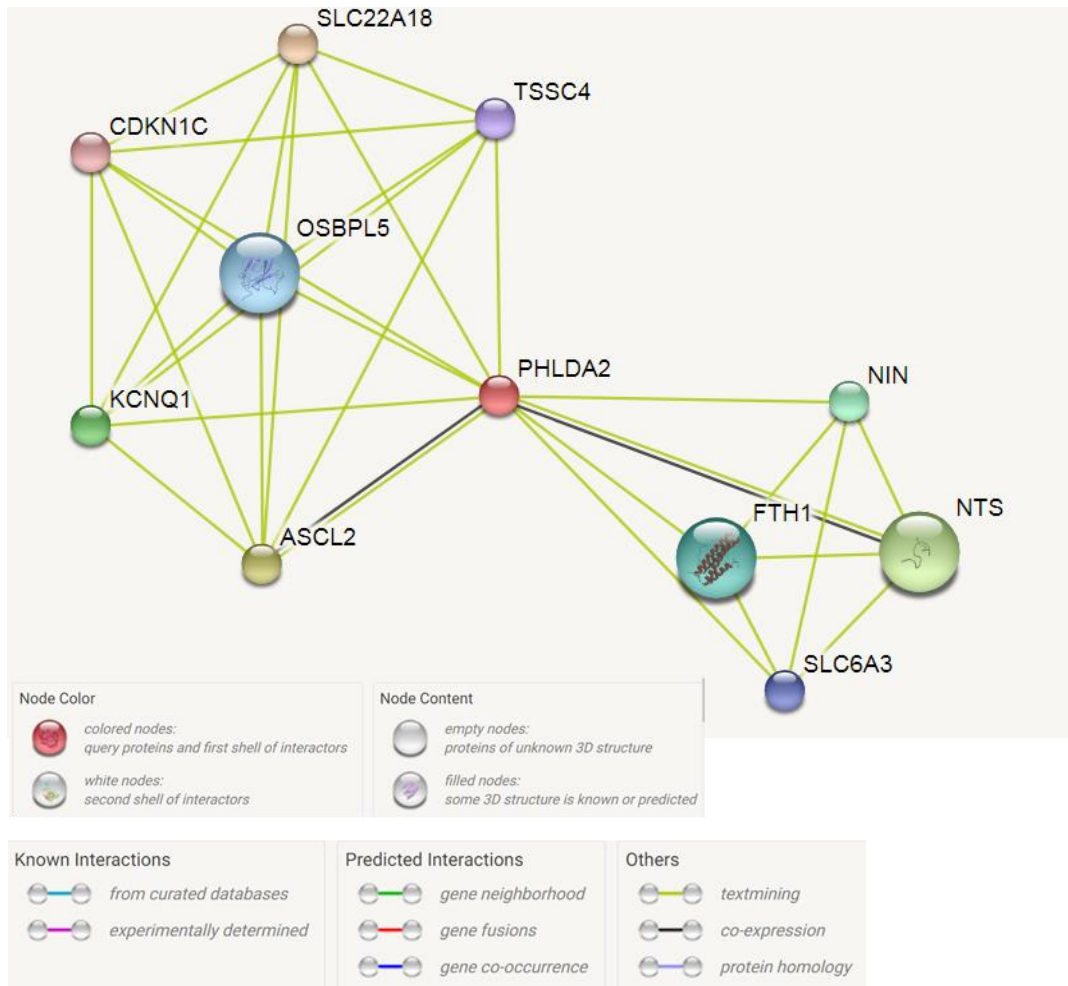


Fig. 55: Esquema de las interacciones de PHLDA2 con otras proteínas. Extraído de UniProt.

Predicted Functional Partners:

●	SLC22A18	Solute carrier family 22 member 18 (424 aa)
●	ASCL2	Achaete-scute homolog 2 ; AS-C proteins are involved in the determination of the neuro...
●	NTS	Neurotensin/neuromedin N Large neuromedin N Neuromedin N Neurotensin Tail peptid...
●	KCNQ1	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1 (329 aa)
●	NIN	Uncharacterized protein (1910 aa)
●	FTH1	Ferritin heavy chain ; Stores iron in a soluble, non-toxic, readily available form. Important...
●	OSBPL5	Oxysterol-binding protein (873 aa)
●	SLC6A3	Transporter (603 aa)
●	TSSC4	Protein TSSC4 (325 aa)
●	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (250 aa)

Cuadro 2: Listado de las proteínas con las que interacciona PHLDA2. Extraído de UniProt.

La proteína PHLDA2 interacciona con varias proteínas (*SLC22A18*, *ASCL2*, *NTS*, *KCNQ1*, *NIN*, *FTH1*, *OSBPL5*, *SLC6A3*, *TSSC4* Y *CDKN1C*). La mayoría de los genes que las codifican (*SLC22A18*, *ASCL2*, *KCNQ1*, *OSBPL5* y *TSSC4*) se encuentran ubicados en el cromosoma 29, incluso en el mismo clúster, regulado por el ncARN *Kcnq1ot1*. Muchos de los mismos presentan funciones muy similares a la de *PHLDA2*. El gen *ASCL2*, un gen improntado de expresión materna, presenta funciones asociadas al desarrollo placentario, estimulando la proliferación de células mononucleadas del trofoblasto e inhibiendo la formación de células gigantes o binucleadas (Arnold et al., 2006). Ratones *knock out* (KO) para el mismo presentaron letalidad embrionaria por la incapacidad de formar el espongioblasto en la etapa E10. Otros genes como *SLC22A18*, *TSSC4* y *OSBPL5*, también son de expresión materna y regulan el desarrollo de la placenta, sus funciones específicas en dicho proceso aún no han sido determinadas.

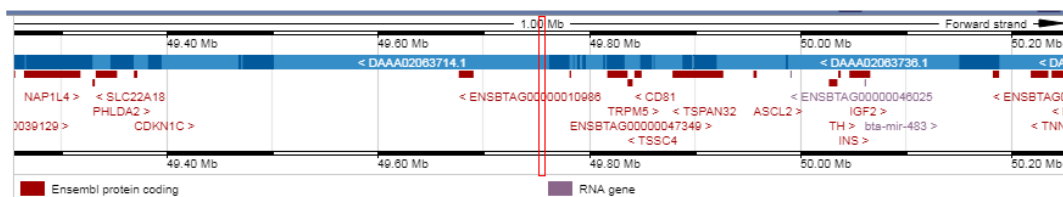


Fig. 56: Región del cromosoma 29 donde se ubican algunos de los genes (*SLCC2A18*, *ASCL2*, *TSSC4*, *CDKN1C* que codifican las proteínas con la interacciona *PHLDA2*.

La proteína CDKN1C es un inhibidor potente de varios complejos G1 ciclina / CDK (ciclina E-*CDK2*, ciclina D2-*CDK4* y ciclina A-*CDK2*) y, en menor proporción, de la ciclina B-*CDC2* mitótica. Es un regulador negativo de la proliferación celular. Puede desempeñar un papel en el mantenimiento del estado no proliferativo a lo largo de la vida (UniProt).

```

10      20      30      40      50
MERLVARRTF PMIARTSACR SLFGPVDHEE LGRELQMRLA ELSAEDQRRW
60      70      80      90     100
DYNFQLDMPL RGPGRQLQWTE VSDSDVPAFY RETVQVGRCR LLLAPRPRPD
110     120     130     140     150
GAVNPPPGP PADESVDGLG EAPASPSSGP AVVPAQAAAP APQEGSELEA
160     170     180     190     200
VPPPRSQEPQ AEPHSGISG RPAPGTAAA TSAAAAATTA AAGGAAIKKL
210     220     230     240     250
SGPLISDFFA KRKRPAPEAK ASNEVPGGCA APGAAPAVGS AEQTPRKRLR

```

Fig. 57: Secuencia de la proteína CDKN1C.

En el caso de la proteína CDKN1C, se observaron las siguientes interacciones:

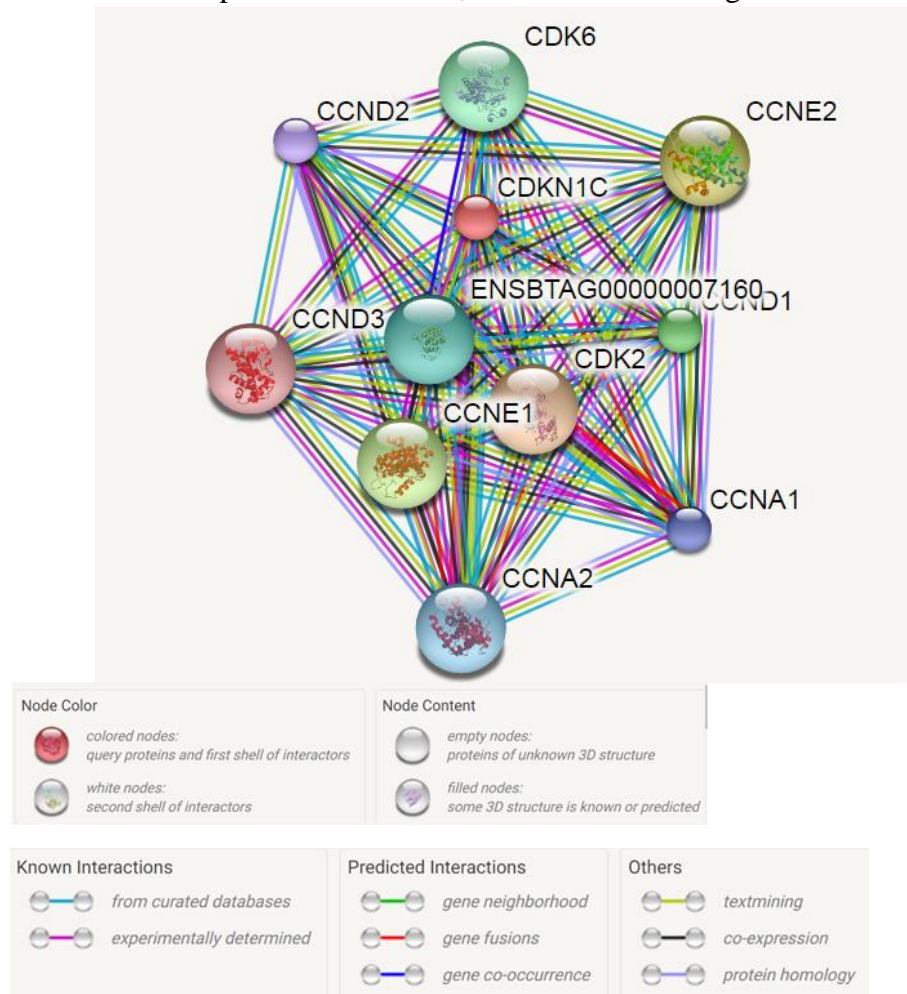


Fig. 58: Esquema de las interacciones de CDKN1C con otras proteínas. Extraído de UniProt.

Predicted Functional Partners:

CDK2	Cyclin-dependent kinase 2 ; Serine/threonine-protein kinase involved in the control of the cell cycl...
CCNE2	G1/S-specific cyclin-E2 ; Essential for the control of the cell cycle at the late G1 and early S phase...
CCNE1	G1/S-specific cyclin-E1 (375 aa)
CCND1	G1/S-specific cyclin-D1 ; Regulatory component of the cyclin D1-CDK4 (DC) complex that phosph...
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6 (326 aa)
ENSBTAG00000007160	Cyclin-dependent kinase 4 ; Ser/Thr-kinase component of cyclin D-CDK4 (DC) complexes that ph...
CCNA2	Cyclin-A2 ; Essential for the control of the cell cycle at the G1/S (start) and the G2/M (mitosis) tra...
CCNA1	Uncharacterized protein (459 aa)
CCND2	G1/S-specific cyclin-D2 ; Regulatory component of the cyclin D2-CDK4 (DC) complex that phosph...
CCND3	G1/S-specific cyclin-D3 ; Regulatory component of the cyclin D3-CDK4 (DC) complex that phosph...

Cuadro 3: Listado de las proteínas con las que interacciona CDKN1C. Extraído de UniProt.

El gen *CDKN1C* codifica una proteína que pertenece a la familia de las ciclinas, responsables de regular el ciclo celular, presenta alta expresión en placenta. Dicha proteína está involucrada en la replicación de células trofoblásticas asociadas al metabolismo del glucógeno. *CDKN1C* interacciona con otras ciclinas que regulan el ciclo celular, siendo estas: *CDK2*, *CCNE2*, *CCNE1*, *CCND1*, *CDK6*, *CCNA2*, *CCNA1*, *CCND2* y *CCND3*. Muchas de las mismas se expresan en placenta, específicamente en células del trofoblasto, regulando el ciclo celular en la transición G1/S.

A nivel proteico, se pretendió observar si estas variantes generan cambios a nivel de la conformación proteica. El programa Phyre2 es una herramienta disponible *on line* para predecir y analizar la estructura de la proteína, su función y mutaciones. El programa se basa en la detección de homología para construir modelos en 3D, predecir sitios de unión a ligandos y analizar los efectos de las variantes de aminoácidos en la secuencia de proteína a estudiar (Kelley et al., 2015)

Existen dos limitaciones principales para los métodos utilizados por el Phyre2 y otros servidores relacionados. En primer lugar, debe existir una secuencia que presente homología a la secuencia suministrada, ya que aún no se han desarrollado métodos que puedan predecir la estructura de la proteína a partir de la secuencia sin utilizar estructuras conocidas como referencia (Kalley et al., 2015). El programa Phyre realiza modelos *in silico* por homología, tomando como referencia la estructura de la proteína cristalizada.

Mediante la utilización de diferentes bases de datos de proteínas tales como Uniprot, se pudo constatar que la proteína *PHLDA2* no se encuentra cristalizada en ninguna especie. En este caso el programa toma como modelo proteínas con dominios similares, para el gen *PHLDA2* utiliza una proteína humana, *PLEKHA5 (2DKP)* ya que la misma presenta un dominio PH. La segunda limitación es predecir los efectos estructurales de mutaciones puntuales. Phyre no es capaz de determinar con precisión más allá de la posición de una cadena lateral, el efecto más amplio de una mutación puntual. Esto significa que si se desea modelar varias variantes de una sola posición se van a obtener modelos idénticos con una cadena lateral diferente en el lugar de la variante. Esto hace que no se puedan detectar variaciones en el esqueleto de la proteína.

Tomando en cuenta estos aspectos, el hecho de que la proteína no ha sido cristalizada en ninguna especie y que los efectos debidos a mutaciones puntuales no se reflejan en la estructura, no se obtuvieron resultados a este nivel.

Para detectar si existen cambios a nivel de la estructura secundaria del ARN del gen *PHLDA2*, se utilizó la herramienta RNAfold (Grubber et al., 2008). Esto mostró una diferencia de conformación en uno de los extremos de la molécula de ARN y una pequeña variación de energía libre, que no genera cambios en la estabilidad de las mismas.

A nivel proteico, se produjo una sustitución hacia un aminoácido con propiedades muy similares. Esto generó un cambio de ácido aspártico (D) en la proteína de la raza Hereford a ácido glutámico (E) en las muestras de Criollos. No se obtuvieron resultados que permitieran detectar cambios conformacionales a nivel proteico ya que la misma aún no se encuentra cristalizada. Al analizar mediante la herramienta Blast p (blast.ncbi.nlm.nih.gov), otras especies domésticas, se observó que la secuencia de la misma se encuentra muy conservada, mostrando alta homología en su secuencia. Todas las especies estudiadas presentaron E en su proteína, igual que lo observado en las muestras de bovino Criollo.

BCU-Humano	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	1	M+SP EVLREGELEKRSDSL Q+WKKKRGVLT+DRL LFP P ARPKEKELRFHSILKVDC	60
BCU- Caballo	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	1	M++PGEVLREGELEKRSDSL QVWKKKRGVLT DRL LFP GPGARPKELRFHSILKVDC	60
BCU-Cabra	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	1	MRS GEVLREGELEKRSDSL QVWKKKRGVLTDDRL+LFPTG GARPKELRFHSILKVDC	60
BCU-Cerdo	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	1	M++PGEVLREGELEKRSDSL Q+WKKKRGVLT DRL LFPTG GARPKELRFHSILKVDC	60
BCU-Rata	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	6	+++ E+L EGELEKRSDSL QVWKKK R VLT DRLRLF +G RPKEL FHSILKVDC	64
BCU-Ratón	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	12	+++ E+L EGELEKRSDSL QVWKKK R VLT DRLRLF +G + KEL FHSILKVDC	70
BCU-Bos Indicus	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
	Sbjct	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPGARPKELRFHSILKVDC	60
BCU-Gallo	Query	1	MRSPGEVLREGELEKRSDSLQVWKKKRGVLTDDRLRFPTGPG-ARPKELRFHSILKVD	59
	Sbjct	1	M+ EV+REGELEKRSDSL Q+WKKK VLT D L LFP G A+ KEL F SILKVD	60

Fig. 59: Alineamiento de la secuencia proteica de diferentes especies. Se indica el aminoácido estudiado.

Estos resultados mostraron la poca variabilidad que admiten estos genes, a pesar de la gran variabilidad genética que caracteriza a estos animales. Esto podría explicarse por la función de los mismos en el desarrollo embrionario temprano, en el desarrollo placentario

y en el neonatal. Alteraciones en su expresión pueden producir anomalías en el crecimiento y letalidad embrionaria. Los genes improntados también están implicados en el desarrollo bovino, una expresión diferencial de estos genes se asoció con el desarrollo anormal y el aborto fetal.

El gen *PHLDA2* funciona como un reóstato. En ratones, la sobreexpresión de *PHLDA2* resulta en anomalías fetales y de la placenta, mientras que la pérdida de expresión resulta en placentomegalia. Estudios realizados en bovinos mostraron resultados similares, al aumentar la expresión del gen, se produce la degeneración embrionaria, mientras que la disminución de su expresión genera disminución del desarrollo del blastocito. Un gran número de estudios mostraron la importancia y sensibilidad a la dosis de genes improntados tales como *PHLDA2* en etapas tempranas del desarrollo. Estudios realizados por Tunster et al., (2016), mostraron que al duplicar la expresión de *PHLDA2* en ratones, se redujo en un 25–35% el peso embrionario (Driver et al., 2013). Este gen actúa de forma específica de linaje, para regular el tamaño del espongiotrofoblasto en la placenta de ratón. Usando modelos donde se aumenta o disminuye la expresión de dicho gen, se demostró que, mediante el espongiotrofoblasto, *PHLDA2* regula negativamente la expresión de un número de hormonas placentarias claves. La expansión del espongiotrofoblasto, generado por la pérdida de expresión del gen produce una acumulación excesiva del glicógeno

PHLDA2 es el único gen que actúa limitando el tamaño del espongiotrofoblasto sin afectar la contribución de otras células procedentes del mismo progenitor. El espongiotrofoblasto produce señales que actúan a distancia y localmente estimulando la acumulación de glicógeno. Este expresa un número de prolactinas placentarias y glicoproteínas específicas de la gestación. Como consecuencia, al cambiar su tamaño, *PHLDA2* regula indirectamente la expresión de varias hormonas placentarias, muchas de las que actúan en el sistema materno para dirigir nutrientes al feto y asegurar un embarazo saludable y exitoso. Una explicación de esto, es que la pérdida de función del gen aumenta la disponibilidad de nutrientes aumentando los volúmenes de glicógeno. Estudios realizados en fetos *knockout* para dicho gen mostraron que los mismos presentaron disminución en su crecimiento. Esto podría explicarse por la incapacidad del feto de tomar glucosa del medio o de transportarla desde la placenta, por lo que el glicógeno se acumula en el medio. Otra posibilidad es que el espongiotrofoblasto produzca señales de demanda de nutrientes que permiten el crecimiento placentario. Esta opción es plausible, ya que la placenta es un órgano muy activo metabólicamente que consume una gran cantidad de energía materna para realizar el transporte activo de nutrientes hacia el feto y la producción y secreción de una gran cantidad de hormonas. En mamíferos, más de la mitad del oxígeno y la glucosa uterina es canalizada hacia los tejidos uteroplacentarios. Un aumento del tamaño de la placenta, observada por pérdida de función del gen, requiere una mayor proporción de recursos maternos lo que puede generar un detrimento en el crecimiento fetal. Por esto, una dosis precisamente regulada de dicho gen es esencial para un crecimiento fetal óptimo (Tunster et al., 2016).

PHLDA2 no parece seguir las reglas aplicadas a un gran número de genes improntados por el cual los genes expresados por vía paterna promueven el crecimiento placentario y fetal mientras que los genes expresados por vía materna restringen el crecimiento de los mismos.

PHLDA2 se encuentra en un clúster de genes improntados que incluyen varios genes de expresión materna, incluido a *CDKN1C*, un potente restrictor del crecimiento embrionario. La pérdida de función de estos genes críticos tiene gran impacto en el desarrollo fetal (Tunster et al., 2016).

Estudios realizados en embriones de ratones mostraron que estos son extremadamente sensibles a los niveles de *CDKN1C*. El aumento de su expresión causa retardo del crecimiento en E13.5, mientras que la disminución de su expresión causa sobrecrecimiento. Previo a la diferenciación en blastocitos, los blastómeros son totipotentes, sin embargo, con la diferenciación de la masa celular interna, las células se vuelven pluripotentes. Un estudio realizado por Tury et al., (2011), mostró que la sobreexpresión de *CDKN1C* en E14.5-E15.5 en ratones, resultó en una transición de proliferación a diferenciación en tejidos neurales, mientras que su deficiencia generó los efectos opuestos. Así, un determinado nivel de *CDKN1C* es necesario para la proliferación y un aumento de su expresión genera una transición de división a diferenciación celular (Driver et al., 2013).

En ratones donde el gen se encontraba silenciado, la letalidad neonatal se vio aumentada, mientras que los que lograban sobrevivir presentaron anomalías en su desarrollo, defectos abdominales y paladar hendido. Otros estudios mostraron que la mayoría de los ratones donde el gen no se expresaba morían luego de nacer y sus tejidos presentaban un aumento de apoptosis celular y señales de diferenciación retrasadas. Por otra parte, el exceso de expresión de dicho gen se asocia con un aumento de la letalidad embrionaria, sugiriendo la sensibilidad a la dosis durante etapas tempranas del desarrollo.

Embriones bovinos *CDKN1C knockdown* resultaron en la disminución del desarrollo del blastocito en un 45 %, evidenciando que este gen es un factor fundamental que dirige el desarrollo embrionario temprano (Driver et al., 2013).

Experimentos realizados para ambos genes, mostraron que la inyección de siRNAs específicos para *PHLDA2* en cigotos bovinos de una célula generó un aumento del desarrollo de los blastocitos, mientras que la inyección de siRNAs específicos para *CDKN1C* generó una reducción del 45 % en el desarrollo del blastocito. Análisis mediante RNAseq comparando embriones inyectados y no inyectados con siRNA para *CDKN1C* evidenciaron la expresión diferencial de 51 genes asociados a la apoptosis, metabolismo lipídico, diferenciación y regulación del ciclo celular. Estudios de la ontología del gen mostraron que el mismo participa en nueve vías relacionadas con la señalización celular, el metabolismo y el procesamiento de ácidos nucleicos.

Estos resultados mostraron la gran conservación de secuencia que presentan los genes *PHLDA2* y *CDKN1C* ya que sus niveles de expresión se encuentran muy regulados debido a que su función es crítica en el desarrollo embrionario y de la placenta (Driver et al., 2013).

CONCLUSIONES:

En esta tesis se logró secuenciar por primera vez fragmentos de dos genes asociados a regulación del desarrollo embrionario y de la placenta en Bovinos Criollos Uruguayos. Se utilizaron dos metodologías diferentes, la secuenciación Sanger realizada en MACROGEN (Korea) y la secuenciación en *pool* mediante NGS con la tecnología del Ion Torrent. Los resultados obtenidos mediante las dos aproximaciones concordaron, mostrando que la secuenciación en *pool* puede utilizarse para detectar SNPs presentes en las muestras de estudio. Esta estrategia resulta útil para llevar a cabo estudios en poblaciones grandes, disminuyendo los costos del proceso y permitiendo evaluar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

La secuenciación del fragmento correspondiente al gen *CDKN1C* produjo pocos *reads*, a pesar de esto, en los resultados obtenidos no se observaron nuevas variantes a nivel de secuencia al alinearlos con el gen de referencia.

En el exón codificante para la región 3'UTR, se encontró el SNP A/T previamente descrito. La mayoría de los individuos muestreados, incluidos portadores de la rob (1;29) resultaron heterocigotas para el mismo. Las frecuencias alélicas obtenidas fueron de 0,637 para el alelo A y de 0,363 para el alelo T, mostrando esto que esta es una región que presenta variabilidad.

En el primer exón del gen *PHLDA2* se observó la fijación de una variante del SNP T/G presente en la raza Hereford, la variante G. La misma se encontró en todos los individuos estudiados. No existen datos bibliográficos sobre esta variante, por lo que no se ha podido analizar cambios en las frecuencias en diferentes razas. A nivel del ARNm del gen *PHLDA2* no se observaron cambios en su estabilidad, ya que ambos presentaron energías libres y estructuras muy similares.

Los aminoácidos codificados por ambas variantes (ácido aspártico y ácido glutámico), pertenecen al mismo grupo y ambos presentan propiedades muy similares. Los estudios a nivel de la conformación de la proteína no se pudieron realizar ya que *PHLDA2* no se encuentra cristalizada en ninguna especie.

Al comparar dichos fragmentos en otras especies, se observó una gran conservación a nivel de secuencia. La falta de variabilidad podría deberse a que los mismos cumplen funciones esenciales en el desarrollo embrionario y sus niveles de expresión deben de estar finamente regulados. Esta conservación se observa incluso en nuestra población de estudio, la que se caracteriza por su gran variabilidad genética.

BIBLIOGRAFÍA

Andrews S.C., Wood M. D., Tunster S. J., Barton S. C., Surani M. A., John R. M. (2007). Cdkn1c (p57Kip2) is the major regulator of embryonic growth within its imprinted domain on mouse distal chromosome 7. *BMC Developmental Biology*. doi: 10.1186/1471-213X-7-53.

Armstrong E. (2004). Análisis de la diversidad genética del bovino Criollo Uruguayo mediante microsatélites. Tesis de Maestría, 41-44.

Armstrong E., Postiglioni A. (2010). Bovinos y ovinos Criollos del Uruguay. Estudios y perspectivas. *Agrociencia Uruguay*. Vol 14, No 3.

Armstrong E., Iriarte A., Martínez A. M., Feijoo M., Vega-Pla J.L., Delgado J.V., Postiglioni A. (2013). Genetic diversity analyses of the Uruguayan Creole cattle breed using microsatellites and mtDNA markers. *Genetics and Molecular Research* 12 (2):1119-113.

Arnold D. R., Lefebvre R., Smith L. C. (2006). Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaetescute-like homologue 2 (Mash2) gene. *Placenta*: 27(11-12):1124-31

Arruga M.V., Zarazaga I. (1987). La translocación robertsoniana 1/29 en el ganado vacuno. Su incidencia en las razas vacunas españolas. *Genética Ibérica*, 39: 64-75.

Artigas R., Iriarte W., Iriarte A., De Bethencourt M., Llambí S., Postiglioni A. (2010). Effects of 5-azacytidine on lymphocyte-metaphases of Creole cows carrying the rob(1;29). *Research in Veterinary Science* 88, (2), 263–266.

Balemian N. (2014). Estudio del gen PHLDA2, regulador del glicógeno, en una muestra de bovinos Criollos uruguayos portadores del reordenamiento cromosómico rob (1; 29). Tesis de Grado.

Barsur P.K., Reyes E.R., Farazmand A., King W.A., Popescu P.C. (2001). X-autosome translocation and low fertility in a family of crossbred cattle. *Animal Reproduction Science* 67: 1–16.

Barton S. C., Surani M. A., Norris M. L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*. 311(5984):374-6.

Boettcher P. J., Tixier-Boichard M., Toro M. A., Simianer H., Eding G., Gandini G., Joost S. (2010). Objectives, criteria and methods for using molecular genetics data in priority setting for conservation of animal genetics resources. *Animal genetics Suppl* 1:64-77. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02050.x.

Calvello M., Tabano S., Colapietro P., Maitz S., Pansa A., Augello C., Lalatta F., Gentilin B., Spreafico F., Calzari L., Perotti D., Larizza L., Russo S., Selicorni A., Sirchia S. M., Miozzo M. (2013). Quantitative DNA methylation analysis improves epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics* 8 (10):1053-60. doi: 10.4161/epi.25812.

Chaves R., Adegas F., Heslop-Harrison J. S., Guedes-Pinto H., Wienberg J. (1994). Complex satellite DNA reshuffling in the polymorphic t(1;29) Robertsonian translocation. doi: 10.1023/A: 1025952507959.

De Alba J. (2011). El libro de los bovinos Criollos de América. BBA (México).

De Lorenzi L., Genuardo V., Gimelli S., Rossi E., Perucatti A., Iannuzzi A., Zannotti M., Malagutti L., Molteni L., Iannuzzi L., Parma P. (2012). Genomic analysis of cattle rob(1;29). *Chromosome Research*. Volume 20, issue pp 815-823.

Delgado J. V., Martínez A.M., Acosta A., Alvarez L. A., Armstrong E., Camacho E., Cañón J., Cortés O., Dunner S., Landi V., Marques JR, Martín-Burriel I, Martínez OR, Martínez RD, Melucci L, Muñoz JE, Penedo M.C., Postiglioni A., Quiróz J., Rodellar C., Sponenberg P., Uffo O., Ulloa-Arvizu R., Vega-Pla J.L., Villalobos A., Zambrano D., Zaragoza P., Gama L.T, Ginja C. (2011). Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics* 43(1):2-10. doi:10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x.

Di Meo G.P., Perucatti A., Chaves R. (2006) Cattle rob(1;29) originating from complex chromosome rearrangements as revealed by both banding and FISH-mapping techniques. *Chromosome Res* 14:649–655.

Díaz-Sanchez S., Hanning I., Pendleton S., De Souza D. (2013). Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety. *Poultry Science* 92:562–572.

Doolittle W., Sapienza C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm. *Nature* 284, 601 - 603; doi:10.1038/284601a0.

Driver A. M., Huang W., Kropp J., Peñagaricano F., Khatib H. (2013). Knockdown of CDKN1C (P57Kip2) and PHLDA2 results in developmental changes in bovine pre-implantation embryos. *Plos one*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069490>.

Ducos A., Revay T., Kovacs A., Hidas A., Pinton A., Bonnet-Garnier A., Molteni L., Slota E., M. Switonski M., Arruga M.V., van Haeringen W.A., Nicolae I., Chaves R., Guedes-Pinto H., Andersson M., Iannuzzi L. (2008). Cytogenetics creening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenetic and Genome Research* 120:26–41. doi: 10.1159/000118738.

Dyrendhal I., Gustavsson I. (1979). Sexual functions, semen characteristics and fertility of bull carrying the 1/29 chromosome translocation. *Hereditas* 90, 281-289.

Elsik et al. (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology. *Science* 324 (5926), 522-8.

FAO (2011). Molecular genetic characterization of animal genetics resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. n° 9. Rome.

Gautier M., Foucad J., Gharbi K., Cezard T., Galan M., Loiseau A., Thomson M., Pudlo P., Kerdelhue C., Estoup A. (2013). Estimation of population allele frequencies from next-generation sequencing data: pool-versus individual-based genotyping. *Molecular Ecology* (2013) doi: 10.1111/mec.12360.

- Gruber A. R., Lorenz R., Bernhart S. H., Neuböck R., Hofacker I. L. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*.
- Gustavsson I. (1969). Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 63, 68–169.
- Haaf T., Schmid M. (2000). Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 91(1-4):113-23.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.
- Hudson Q. J., Kulinski T. M., Huetter S. P., Barlow D. P. (2010). Genomic imprinting mechanisms in embryonic and extraembryonic mouse tissues. *Heredity* 105, 45–56; doi:10.1038/hdy.2010.23
- Iannuzzi L., Di Berardino D. (2008). Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics *Journal of Applied Genetics*, 49(4), 357-366.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., Sternberg M. J. E. (2015). *Nature Protocols* 10, 845-858.
- Lefebvre L. (2012). The placental imprintome and imprinted gene function in the trophoblast glycogen cell lineage. *Reproductive Biomedicine online* 25(1):44-57. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.03.019.
- Lonergan P., Kommisrud E., Andersen O., Refsahl A. O., Farstad, W. (1994). Use of semen from a bull heterozygous for the 29 translocation in an IVF program. *Theriogenology* 41: 1379–1384.
- McGrath J., Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*. 37(1):179-83.
- Muñoz M.G., Ocanto D., Madriz M.L., Vera O. (1994). Incidence of 1 29 translocation in Venezuelan Creole bulls. *Theriogenology* Volume 41, Issue 2, 379-382.
- Plasschaert R. N., Bartolomei M. S. (2014). Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development*: 141(9):1805-13. doi: 10.1242/dev.101428.
- Postiglioni A., Artigas R., Iriarte A., Iriarte W., Grasso N., Rincón G. (2012). Could tissue-specific genes be Silenced in Cattle Carrying the Rob(1;29) Robertsonian Translocation? *DNA Methylation-From genomic to technology* 7, 151-166.
- Postiglioni A., Llambi S., Gagliardi R., de Betheencourt M. (1996). Genetic characterisation of Uruguayan Creole cattle. *Archivos de Zootecnia*, 45: 209-213.
- Postiglioni A., Armstrong E., Rincón G. (2000). Analysis of the population structure of Uruguayan Creole cattle as inferred from milk major gene polymorphisms XXI Congreso Mundial de Buiatría. (CD).

Postiglioni A., Rincón G., Kelly L., Llambí S., Fernández G., D'Angelo M., Gagliardi R., Trujillo J., de Bethencourt M., Guevara K., Castellano A., Arruga M.V. (2002) Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. Archivos de Zootecnia, 51: 195-202.

Proctor J. F., Meyer I. M. (2013). CoFold: an RNA secondary structure prediction method that takes co-transcriptional folding into account. Nucleic Acids Research. 41(9): e102.

Schlötterer C., Tobler R., Kofler R., Nolte V. (2014). Sequencing pools of individuals - mining genome-wide polymorphism data without big funding. Nature Reviews, Genetics. 749-63. doi: 10.1038/nrg3803.

Shendure J., Ji H. (2008). Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology. 1135-45. doi: 10.1038/nbt1486.

Sikora, K.M., Magee, D.A., Berkowics, E.W., Lonergan, P., Ewans, A.C.O., Carter, F., Comte, A., Waters, S.M., MacHugh, D.E., and Spillane, C. (2012). PHLAD2 is an imprinted gene in cattle. Animal Genetics 43, 587-590.

Smith A.C., Suzuki M., Thompson R., Choufani S., Higgins M. J., Chiu I. W., Squire J. A., Greally J. M., Weksberg R. (2012). Maternal Gametic Transmission of Translocations or Inversions of Human Chromosome 11p15.5 Results in Regional DNA25–35. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.10.007.

Szklarczyk D., Morris J. H., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L. J., von Mering C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Research. doi: 10.1093/nar/gkw937

<http://string-db.org>

www.ensembl.org

www.genomics.cn

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.uniprot.org

APÉNDICE I

Protocolo de procesamiento de cultivos linfocitarios.

- 1- Para comenzar el procesamiento de las muestras, se deben agregar los siguientes componentes en tubos de cultivo estériles, correctamente identificados.
 - 5ml de RPMI- 1640
 - 0,25 ml de fitohemaglutinina (PHA)
 - 1,5 ml de suero fetal bovino (SFB)
 - 0,15 ml de antibióticos (penicilina/estreptomicina)
- 2- Tomar una alícuota de sangre con pipeta Pasteur y agregar de 10 a 15 gotas
- 3- Colocar las muestras a baño María o estufa de cultivo a 38 ° C, durante 72 horas.
- 4- Pasadas las 72 horas, se procede al sacrificio del cultivo. Entre 15 y 30 minutos antes de detener la incubación, adicionar 0,05 de colchicina o colcemid 100mg/ml en cada tubo.
- 5- Pasar el material biológico del tubo de cultivo a tubos cónicos de centrifuga
- 6- Centrifugar a 800 rpm durante 10 minutos.
- 7- Eliminar el sobrenadante, de manera de dejar una capa sobre el pellet celular.
- 8- Agregar entre 5 y 6 cm de solución hipotónica de KCl, resuspendiendo lentamente con pipeta Pasteur de punta fina. Se deja actuar durante 20 a 25 minutos.
- 9- Cortar la hipotonía con 6 gotas de fijador Carnoy
- 10- Centrifugar a 800 rpm, durante 10 minutos.
- 11- Lavado: descartar el sobrenadante, adicionar fijador y resuspender. Dejar actuar durante 15 minutos. Repetir este paso dos veces.
- 12- Fijación: descartar el sobrenadante translucido, agregar fijador y resuspender. Dejar actuar durante 30 minutos
- 13- Conservar los tubos en la heladera, adecuadamente cerrados.

APÉNDICE II

Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre. Quick-gDNA™ MiniPrep. Zymo Research.

- 1- Agregar 400ul de Genomic Lysis Buffer a 100 ul de sangre. Mezclar mediante vortexeo por 4-6 segundos. Luego dejar por 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- 2- Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin™ en un tubo de colecta. Centrifugar a 10.000 x g por un minuto. Descartar el collection tube con el sobrenadante.
- 3- Transferir la columna Zymo-Spin a un nuevo tubo de colecta. Agregar 200 ul de DNA Pre-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 10.000 x g por un minuto.
- 4- Agregar 500 ul de g-DNA Wash Buffer a la columna. Centrifugar a 10.000 x g por un minuto.
- 5- Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga. Agregar 50 ul de DNA Elution Buffer o a gua a la columna. Incubar de 2-5 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos para eluir el ADN.
- 6-Almacenar a -20° C.