

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE BRAQUIESPINA POR DOS TÉCNICAS
MOLECULARES DIFERENTES DE AMPLIFICACIÓN IN VITRO**

“por”

Mariana CAGGIANO CLAVIJO
Sabrina MEDINA ZORRILLA

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección-
Control y Tecnología de los Alimentos

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Rody Artigas

Tercer Miembro:

Cuarto Miembro:

Dra. Silvia Llambí

Quinto Miembro:

Dra. María Teresa Federici

Fecha:

/ /

Autores:

Br. Mariana Caggiano

Br. Sabrina Medina

AGRADECIMIENTOS

Gracias a nuestro tutor Dr. Rody Artigas y a nuestras cotutoras, Dra. Silvia Llambí y Dra. María Teresa Federici.

A toda la cátedra de Genética en especial.

A los funcionarios de la sección de Biblioteca de la FVET- UdelaR.

A la Facultad de Veterinaria por hacernos sentir a gusto, por darnos la oportunidad de estudiar nuestra vocación, un privilegio que no todos tienen.

De Mariana:

En primer lugar, agradezco a mi madre, sin ella todo esto no hubiese sido posible, desde los comienzos hasta el final, momentos buenos y malos siempre presente y sin bajar los brazos. A mi padre, por el esfuerzo invaluable del que estoy inmensamente agradecida.

A mi hijo, que ha sido quién me dio fuerzas para seguir, más que nada en estos últimos años.

Mi familia, que de una manera u otra aportaron a que este sueño se haga realidad. Uriel, gracias por creer que podía y por alentarme a seguir.

Noel, mi pilar, gracias por estar siempre.

A la Dra. Ana Inés Aznárez, por creer en mí y darme el último empuje para lograr lo que hoy parecía inalcanzable.

De Sabrina:

Gracias a mi familia por el apoyo y ayuda incondicional que me brindaron a lo largo de toda la carrera y sobre todo en este último tramo que parecía interminable.

Un especial agradecimiento a mis padres que son el gran pilar de mi vida y que sin su esfuerzo y amor no hubiera sido posible este gran soñado logro. A mi compañero de vida y a mi hija hermosa, el motor de mi vida, que me dan la mayor felicidad cada día.

Al Dr. Augusto Butler, mi mejor jefe que me brindó su apoyo siempre y sin limitaciones.

A cada uno que pasó por mi vida a través de la facultad, sin duda dejaron huella y con algunos se cultivó una linda amistad. De aquí me llevo muy lindos recuerdos, muchas enseñanzas, grandes valores y excelentes personas.

Gracias a Dios por tanta bendición.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. El síndrome de braquiespina.....	10
1.2. Base molecular del síndrome de braquiespina.....	12
1.3. Distribución del alelo deletéreo en el mundo.....	13
1.4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	14
1.5. PCR en tiempo real (rtPCR).....	17
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIALES Y METODOS.....	22
4.1. Material animal.....	22
4.2. Análisis molecular.....	22
4.2.1. Preparación de las muestras de ADN genómico.....	22
4.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo final (PCR) y electroforesis.....	22
4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (rtPCR) y análisis de la temperatura de curvas de fusión.....	22
4.2.4. Determinación de la especificidad de los primers.....	23
4.2.5. Evaluación de costos y tiempo de reacción.....	23
4.2.6. Análisis poblacional de la muestra de referencia Holstein.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Preparación de las muestras de ADN genómico.....	24
5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo final y electroforesis.....	25
5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (rtPCR) y Análisis de las curvas de disociación.....	26
5.4. Especificidad de los primers y de la reacción rtPCR.....	27
5.5. Evaluación de costos y tiempo de reacción.....	29
5.6. Análisis Genético-poblacional.....	30
6. DISCUSIÓN.....	31
7. CONCLUSIÓN.....	34
8. BIBLIOGRAFIA.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto fenotípico de un ternero muerto con síndrome de braquiespina.....	10
Figura 2	Tomografía computarizada de un ternero con síndrome de braquiespina.....	11
Figura 3a	Corte longitudinal de una porción torácica de la columna.....	11
Figura 3b	Microfotografía de la porción torácica posterior de la columna.....	11
Figura 4	Representación esquemática de la estructura del gen <i>FANCI</i> Bovino.....	12
Figura 5	Esquema de la proteína <i>FANCI</i>	13
Figura 6	Desnaturalización del ADN.....	15
Figura 7	Inicio de la reacción de la PCR.....	15
Figura 8	Progreso de la reacción de la PCR.....	15
Figura 9	Esquema del fragmento de 3.3Kb perdidos en la deleción responsable del SB y su relación con el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR.....	17
Figura 10	Esquema de la óptica de una plataforma de rtPCR.....	18
Figura 11	Curva de amplificación.....	19
Figura 12	Curva de <i>melting</i> o de disociación.....	20
Figura 13	Captura de pantalla de una de las muestras de ADN utilizadas en esta tesis.....	24
Figura 14	Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del ADN.....	25
Figura 15	Electroforesis de los productos de PCR a tiempo final.....	26
Figura 16	Curva de amplificación obtenida por medición de la fluorescencia en cada ciclo.....	26
Figura 17	Curvas de <i>melting</i> o de disociación para los fragmentos amplificados en dos animales normales (azules) y dos animales portadores de SB (rojos).....	27
Figura 18	Captura de pantalla del BLAST realizado para las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados por PCR.....	28
Figura 19	Captura de pantalla del alineamiento de secuencias reverse de tres animales normales para el SB.....	28
Figura 20	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR a tiempo final y rtPCR.....	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Variantes más conocidas de la técnica de PCR elaborado a partir de Serrato y col. (2014).....	16
Tabla 2	Costo para la técnica de PCR a punto final, electroforesis y tiempo de reacción.....	29
Tabla 3	Costo para la técnica de rtPCR/análisis de curvas de <i>melting</i> y tiempo de reacción.....	30
Tabla 4	Proporción de portadores de SB y frecuencia del alelo mutado en diferentes poblaciones Holstein del mundo.....	33

RESUMEN

El síndrome de braquiespina es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva de los bovinos Holstein Friesian. La enfermedad se caracteriza mayormente por producir pérdidas gestacionales (previas al día 100) y raramente el nacimiento de animales con severas malformaciones en la columna vertebral, entre otras. Una delección de 3.3Kb dentro del gen *FANCI*, que elimina por completo los exones 25 al 27, es la responsable de la enfermedad. Actualmente, la detección de animales portadores es posible gracias a las técnicas de referencia de PCR y electroforesis. Estas resultan laboriosas e insumen tiempo y materiales que encarecen el diagnóstico. Alternativamente se ha propuesto que el PCR en tiempo real y análisis de curvas de *melting* podría ser de utilidad en el screening de animales portadores a nivel poblacional. El objetivo de esta tesis es validar la técnica propuesta y evaluar sus ventajas y desventajas frente a la técnica clásica de diagnóstico. Pudimos demostrar mediante la validación del PCR en tiempo real que la frecuencia de animales portadores en el país es elevada, similar a lo que ocurre en otras partes del mundo. La técnica de PCR en tiempo real constituye una herramienta rápida, más económica y segura para el operario que la técnica clásica de diagnóstico, siendo aplicable en los programas a gran escala de control del defecto.

SUMMARY

Brachyspina syndrome is an autosomal recessive inherited disease of Holstein Friesian cattle. The disease is characterized mainly by producing gestational losses (prior to day 100) and it rarely causes the birth of animals with severe malformations in the spine, among others. A deletion of 3.3Kb within the *FANCI* gene, which completely eliminates exons 25 to 27, is responsible for the disease. Currently, the detection of carrier animals is possible thanks to the reference techniques of PCR and electrophoresis. These are laborious and take time and materials that make diagnosis more expensive. Alternatively, it has been proposed that real-time PCR and *melting* curve analysis could be useful in the screening of carrier animals in the population. The objective of this thesis is to validate the proposed technique and evaluate its advantages and disadvantages compared to the classical diagnostic technique. We were able to demonstrate by validating the real-time PCR that the frequency of carrier animals in the country is high, similar to what happens in other parts of the world. The real-time PCR technique is a fast, cheaper and safer tool for the operator than the classic diagnostic technique, being applicable in large-scale control programs of the defect.

1. INTRODUCCIÓN

La lechería representa uno de los principales rubros pecuarios del Uruguay, con un rodeo de bovinos de leche de 766.000 cabezas, principalmente pertenecientes a la raza Holstein Friesian. En el año 2018 se produjeron 2173 millones de litros de leche comercial, producción concentrada principalmente en 3600 predios (cuya principal actividad es la lechería), ocupando 754.000 hectáreas (MGAP, 2019). El principal destino de la leche producida es la industrialización (MGAP, 2019), siendo de particular importancia el contenido de sólidos con el objetivo de elaborar subproductos lácteos.

La obtención de materia prima de calidad para la industria de los subproductos lácteos implica un proceso de mejoramiento de los rodeos, en busca de animales genéticamente superiores para la producción de leche y sólidos. En este aspecto, la utilización de toros con DEPs superiores en las características productivas, ofrece oportunidades únicas de mejora.

La movilización de material genético posibilita cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones, sin la necesidad de ingresar animales en pie a los rodeos. En este sentido, las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, permiten acelerar el progreso genético. Sin embargo, el comercio internacional de un número limitado de toros de élite ha tenido connotaciones negativas, facilitado la diseminación de enfermedades hereditarias recesivas, lo que afecta directamente a la performance reproductiva.

La fertilidad está influenciada por tres componentes individuales: madre (capacidad para reanudar el ciclo del estro después del parto, capacidad de fertilización de ovocitos, capacidad uterina), padre (capacidad de fertilización del semen) y descendencia (capacidad de desarrollo del embrión / feto) (Charlier, 2012).

La capacidad reproductiva es uno de los rasgos más importantes en el ganado lechero, y ha ido disminuyendo constantemente en las últimas décadas (particularmente en la lechería Holstein-Friesian), y se ha convertido en la causa principal de refugio de las vacas lecheras (Charlier, 2012). Uruguay no escapa a esta tendencia, observándose tasas de procreo que no superan significativamente el 70% (MGAP, 2014). En consecuencia, a las pérdidas económicas por fallas reproductivas se le suman las de producción de leche.

La selección unidireccional sobre características productivas puede producir un efecto no deseado sobre los caracteres reproductivos. Fritz y col., (2013) establecen que solo la mitad del descenso reproductivo puede ser atribuible a un efecto indirecto de la selección a favor de la producción de leche, lo que sugiere la existencia de otros factores como la mortalidad embrionaria debido a alelos letales.

En la especie bovina se han identificado 532 caracteres hereditarios (OMIA, 2019), muchos de los cuales corresponden a defectos recesivos. Algunos de ellos son de ocurrencia exclusiva en la raza Holstein Friesian, como el síndrome de braquiespina.

1.1. El síndrome de braquiespina

El síndrome de braquiespina (SB) es una enfermedad hereditaria monogénica recesiva de la raza Holstein Friesian y constituye (junto a los haplotipos de fertilidad) en uno de los últimos desórdenes genéticos reconocidos por la Holstein Association USA (<http://www.holsteinusa.com>).

El primer caso comunicado data del año 2006 en Dinamarca como un caso aislado. El historial endogámico del individuo afectado y la ausencia de efectos ambientales relevantes hizo suponer de un componente hereditario (Agerholm y col., 2006). Un año más tarde el mismo autor describe dos casos familiares de la patología, determinándose por primera vez su mecanismo de herencia autosómica recesiva (Agerholm y col., 2007). En los años sucesivos nuevos casos fueron comunicados en Países Bajos, Italia, Alemania y Canadá (Agerholm y col., 2007; Testoni y col., 2008; Buck y col., 2010 citado por Fang y col., 2013; Agerholm y col., 2010).

La enfermedad se caracteriza clínicamente por abortos tempranos de los individuos afectados (lo más frecuente) o por el nacimiento de terneros muertos con severas malformaciones (Charlier y col., 2012; Fang y col., 2013).

Dentro de las malformaciones corporales más importantes se describe: reducción severa del peso corporal, desplazamiento caudal de las orejas y malformaciones vertebrales extensas que causan un acortamiento significativo de la columna (que da el nombre braquiespina a la enfermedad). Las extremidades se perciben desproporcionadamente largas para el tamaño del tronco, que junto al braquignatismo inferior (alineación desigual de la parte superior e inferior de la mandíbula) (Figura 1), le dan a los terneros un característico aspecto de alce (Agerholm y col., 2006; Agerholm y col., 2007; Testoni y col., 2008).



Figura 1. Aspecto fenotípico de un ternero muerto con síndrome de braquiespina. Obsérvese el acortamiento significativo de la columna vertebral, prominencia de los procesos espinosos torácicos y braquignatismo (tomado de Agerholm y Peperkamp, 2007).

A pesar de que se han comunicado malformaciones de los órganos internos, en particular el corazón, los riñones y las gónadas (Agerholm y col., 2010), el hallazgo más consistente en todos los casos es la sinostosis vertebral (fusión de las vértebras) (Figura 2 y Figura 3 a y b).

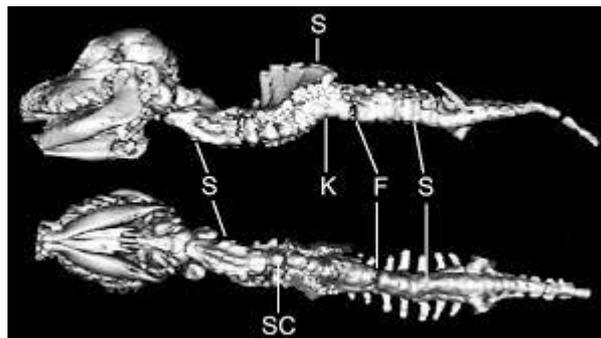


Figura 2. Tomografía computarizada de un ternero con síndrome de braquiespina. En la columna cervical (C2 - C6), se observa sinostosis (S) de los cuerpos vertebrales. A nivel torácico, las vértebras caudales a T3 están presentes como grandes sinostosis (S), que se ven fácilmente en los procesos espinosos dorsales. Hay una cifosis (K) centrada en la columna torácica caudal, una escoliosis (SC) que involucra la columna torácica y una fractura (F) en la unión toracolumbar. En la columna lumbar, hay sinostosis (S) que afecta los cuerpos vertebrales (tomado de Agerholm y col., 2006).

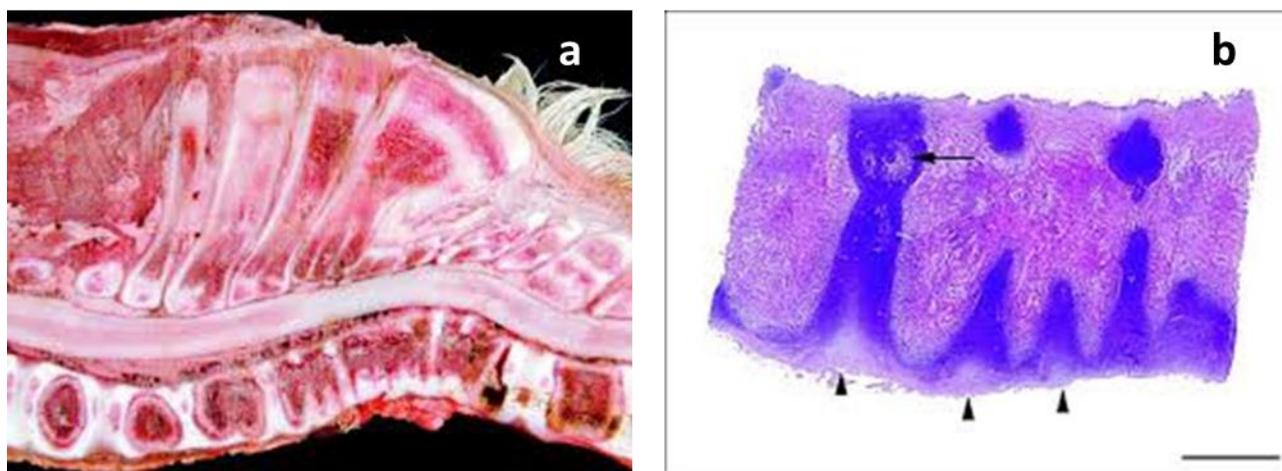


Figura 3 a: Corte longitudinal de una porción torácica de la columna. Obsérvese múltiples vértebras malformadas con grados variables de fusión y cartílago prominente, **b:** Microfotografía de la porción torácica posterior de la columna. Obsérvese la formación incompleta y fusión de los cuerpos vertebrales, así como centros de osificación (flecha) rodeados por cartílago. Pueden notarse rudimentos de discos intervertebrales protruyendo del borde ventral. Tinción de Hematoxilina-Eosina. La barra indica 0.5 cm.

Aunque los hallazgos de necropsia no son patognomónicos, la morfología macroscópica del síndrome es muy característica. Sin embargo, para llegar a un diagnóstico definitivo, deben realizarse estudios genéticos concluyentes. Esto se debe a varias similitudes que este síndrome guarda con otras patologías hereditarias de la raza, como el síndrome letal de la columna corta y el complejo de malformación vertebral bovino (Agerholm y col., 2010).

Muchos de los síntomas mencionados en el SB son similares a los comunicados en la Anemia de Fanconi (FA) de los humanos. La FA es una enfermedad autosómica recesiva asociada con Inestabilidad cromosómica (Moustacchi, 2003). Se

caracteriza por una pancitopenia progresiva, diversas anomalías congénitas y una mayor predisposición al desarrollo de tumores (Auerbach, 1989). Los pacientes presentan síntomas heterogéneos, incluido retraso en el crecimiento, anormalidades esqueléticas, renales, cardíacas, gastrointestinales y malformaciones reproductivas; así como insuficiencia de la médula ósea, aparición temprana de cáncer y mortalidad a una edad temprana (Charlier, 2012). Tal similitud no es de extrañar, si consideramos que ambas enfermedades son producidas por mutaciones en el mismo gen.

1.2. Base molecular del síndrome de braquiespina

Si bien la naturaleza hereditaria del SB se sospechó desde el primer caso comunicado, no fue hasta el año 2012 en que se describió la base molecular de la enfermedad. Utilizando un panel de alta densidad de SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) y secuenciación de nueva generación, (Charlier y col., 2012) se identificó al gen *FANCI* (Fanconi Anemia complementation group I) como responsable del SB.

FANCI se encuentra localizado en el cromosoma bovino 21 (BTA21) y está compuesto por 37 exónes (ENSEMBL 2019). El gen codifica para una proteína mono-ubiquitinada de 1327 aminoácidos (aa), con un rol vital en la reparación del ADN (Gene Ontology Consortium, <http://geneontology.org/>). La mutación responsable de producir la enfermedad es una delección de 3.3Kb dentro del gen, que elimina los exones 25-27. Esto genera un empalme del exón 24 con el 28 (Figura 4) (Charlier y col., 2012).

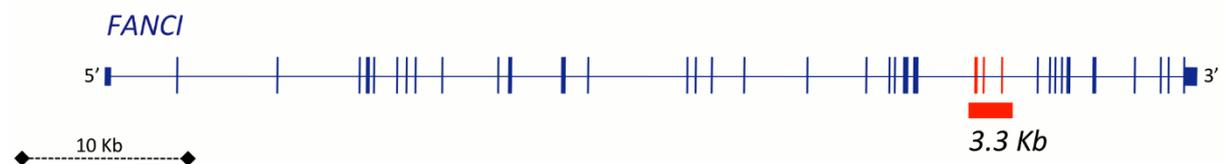


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del gen *FANCI* bovino. Las líneas verticales representan los exones y las líneas horizontales los intrones. En rojo se indican los 25-27 perdidos en el fragmento delecionado de 3.3Kb (modificado de Charlier y col., 2012).

La pérdida de los exones 25-27 del gen genera un cambio a la altura del 876aa de la proteína, sustituyendo los 451aa de su extremo carboxiterminal por un péptido ilegítimo de 26aa (Charlier y col., 2012) lo que genera una proteína incapaz de cumplir su función (Figura 5).

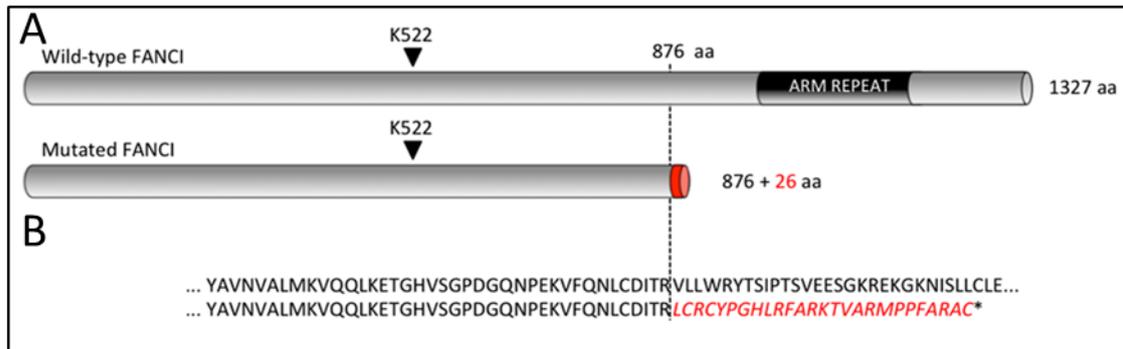


Figura 5. Esquema de la proteína FANCI. A: Proteína salvaje, producto del gen normal. B: proteína mutante, producto de la deleción de 3.3Kb (adaptado de Charlier y col., 2012).

El descubrimiento de la mutación causal de la enfermedad ha permitido diseñar un método de diagnóstico simple, basado en las técnicas de biología molecular de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y electroforesis. En la mayor parte de los casos estudiados este método permitió rastrear la mutación al toro americano de élite Sweet Haven Tradition (HOUSAM 1682485) quien dispersó el alelo defectuoso por el mundo, principalmente a través de sus descendientes de alto mérito genético Bis-May Tradition Cleitus (HOUSAM1879085) y Rothrock Tradition Leadman (HOUSAM1983348) (Fang y col., 2013).

Los animales genotipados para esta enfermedad se codifican con las letras **TY** si son homocigotas normales o **BY** si son portadores del defecto (<http://www.holsteinusa.com>). Esta codificación aparece en los catálogos de semen, por lo que hoy en día se pueden seleccionar aquellos toros TY para inseminar a las vacas y evitar el ingreso o el aumento de la frecuencia del alelo deletéreo en los rodeos.

1.3. Distribución del alelo deletéreo en el mundo

Si bien hay casos comunicados de SB en Dinamarca, Países Bajos, Italia, Alemania y Canadá (Agerholm y col., 2007; Testoni y col., 2008; Buck y col., 2010 citado por Fang y col., 2013; Agerholm y col., 2010), el síndrome se considera una enfermedad de reciente aparición. Por este motivo, existe muy poca bibliografía acerca de la distribución del alelo deletéreo en las diferentes poblaciones Holstein Friesian del mundo.

En un estudio realizado por Charlier y col., (2012) se observó que la incidencia de la enfermedad (nacimiento de animales muertos con malformaciones) era sorprendentemente baja (1×10^5 nacimientos) en relación a la frecuencia de portadores. En ese estudio se estimó que para un 7.4% de animales heterocigotas, la incidencia del síndrome debería ser de 1/730 nacimientos. Esta clara discrepancia está justificada por los autores por el hecho de que el nacimiento de un animal muerto con malformaciones solo es "la punta del iceberg", ya que la mayoría de los animales recesivos morirían en etapa embrionaria. Hecho que logró comprobarse al comparar las tasas de falla de preñez del cruzamiento de animales normales entre sí vs. animales portadores entre sí, determinándose valores superiores para estos últimos apareamientos. Norman y col., (2012) demostraron que en el caso del SB la pérdida gestacional ocurre previamente al día 100.

Si bien los anuncios de casos de SB son escasos, la presencia de la mutación ha sido estudiada en otras poblaciones Holstein del mundo, aunque aún son muy pocas. Ruśc y Kamiński, (2015) estudiaron 78 toros Holstein de Polonia, detectándose que el 10% de los mismos (n=8) eran portadores del síndrome. En todos los casos fue posible rastrear las genealogías de los animales hasta el ancestro común Sweet Haven Tradition. En un estudio similar realizado en 206 toros y 136 vacas Holstein de China, se pudo demostrar que la proporción de portadores era de 4.8% en los toros y de 2.2% en las vacas. Estudios realizados en Estados Unidos ha comunicado un 6% de vacas portadoras (VanRaden y col., 2011) y en Holstein Nórdico un 4% (Sahana y col., 2013), cifras superiores a las encontradas en la población de vacas de China.

En nuestro país aún no se han identificado casos de terneros muertos por SB, sin embargo, existen algunos trabajos que hacen referencia a la presencia de animales portadores en el rodeo general y en los sistemas de mejora genética de la raza. En este sentido, Alcántara y col., (2017) realizaron un estudio de los catálogos de semen disponible para inseminación en Uruguay en el año 2015 (n=357), encontrándose un 1.73% de toros **BY**, sin embargo, el 23 % de los toros de los catálogos no presentaban codificación de libre o portador en sus fichas.

Desde un punto de vista molecular, de forma simultánea Federici y col., (2018) y Briano y col., (2018) comunican la evidencia de animales portadores de SB en el rodeo Holstein nacional. Federici y col., (2018) analizan un menor número de animales, sin embargo, reporta por primera vez la puesta a punto en el país de la técnica molecular de diagnóstico de referencia (PCR y electroforesis) para el SB. El trabajo de Briano y col., (2018) estudió un mayor número de animales, situación que permitió calcular la proporción de portadores en el rodeo, que se situó en el orden de 3.39% en animales de la región este del país.

1.4. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR son las siglas por las que se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction), técnica creada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985 (Waters, 2013).

Para realizar la técnica de PCR se parte de un molde de ADN que contiene el fragmento a amplificar. Se utiliza una enzima, ADN polimerasa, que generará las nuevas copias de ADN. Esta enzima añadirá nucleótidos al extremo 3' libre, para esto necesitará cebadores o primers que son cadenas cortas de 10 a 30 bases, que van a delimitar el fragmento a amplificar. Serán necesarios nucleótidos libres para crear la cadena complementaria (Pérez, 2011).

Esta técnica amplifica regiones específicas del ADN, obteniendo una copia exacta de la original. Las tres etapas principales de la PCR son: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios y col., 2013).

- 1) En la desnaturalización, las cadenas se separan por acción del calor, en un rango de temperatura entre 92°C a 96°C durante 20 a 30 segundos. El tiempo de desnaturalización dependerá de la composición de nucleótidos, que si tiene mayor cantidad de G-C, tardará más tiempo en separarse por ser más fuerte el enlace entre estas bases (Tamay de Dios y col., 2013).

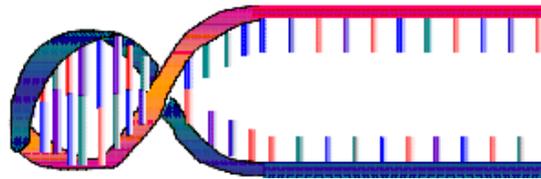


Figura 6. Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla. (Rodríguez, 2004)

- 2) En la hibridación los primers se unen delimitando el fragmento de interés, para esto es necesario una temperatura óptima que generalmente se encuentra entre 50° y 60°C.

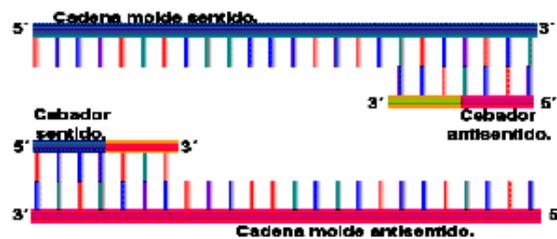


Figura 7. Inicio de la reacción de la PCR. (Rodríguez, 2004)

- 3) En la extensión la enzima ADN polimerasa, sintetiza el nuevo ADN. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional.

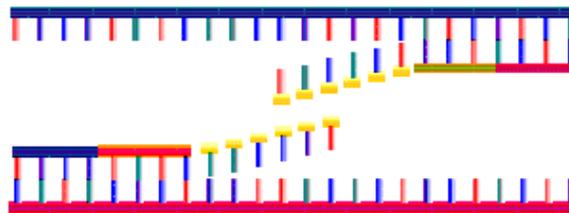


Figura 8. Progreso de la reacción de la PCR. (Rodríguez, 2004)

La PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las tres fases descritas previamente, es decir, realizando entre 25 y 35 ciclos (Pérez, 2011). La reacción se lleva a cabo en equipos denominados termocicladores, que son los responsables de aumentar, mantener y disminuir la temperatura durante todo el termociclado.

Para corroborar si se amplificó la secuencia de interés, los productos de la PCR, también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios y col., 2013).

En la actualidad se han diseñado un gran número de variantes de la PCR convencional (a tiempo final). Las más conocidas se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Variantes más conocidas de la técnica de PCR elaborado a partir de Serrato y col., (2014)

Variante	Fundamento
PCR anidada	Consiste en realizar dos rondas de amplificación con juegos de primers diferentes (cada vez más específicos) con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la reacción.
PCR múltiplex	Con este tipo de PCR se consiguen detectar varios fragmentos de ADN a la vez con una sola muestra y en una sola reacción, utilizando diferentes juegos de primers.
PCR con transcriptasa inversa	En este caso se utilizan moldes de ARN para sintetizar moléculas de ADNc (ADN copia), que posteriormente puede utilizarse como molde para la PCR convencional.
PCR en tiempo real o PCR cuantitativa	Se añade un componente fluorescente que permite medir la luz. A más luz, más cantidad del ADN detectado. Esta variante del PCR será tratada con mayor profundidad en el apartado 1.5.
PCR digital	Método alternativo a la PCR cuantitativa en tiempo real, es el más nuevo, dónde se realiza la reacción dentro de pequeñas microburbujas.

Una vez amplificado el ADN por PCR en tiempo final, se realiza una corrida electroforética para evaluar los resultados. Esta observación se realiza en geles de agarosa que son los más utilizados en el laboratorio. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cuba de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante (Fierro, 2014).

Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una banda en el gel. El ADN migrará hacia el polo positivo ya que los fosfatos de la molécula le confieren carga negativa, por lo que la corrida del gel será hacia el polo positivo (Espinosa, 2007).

La combinación de la técnica de PCR y electroforesis permite visualizar fácilmente polimorfismos de delección, como es el caso del SB. Los primers diseñados por Charlier y col., (2012) permiten amplificar el alelo normal (3738pb) así como el alelo mutado (409pb) en los animales portadores (Figura 9).

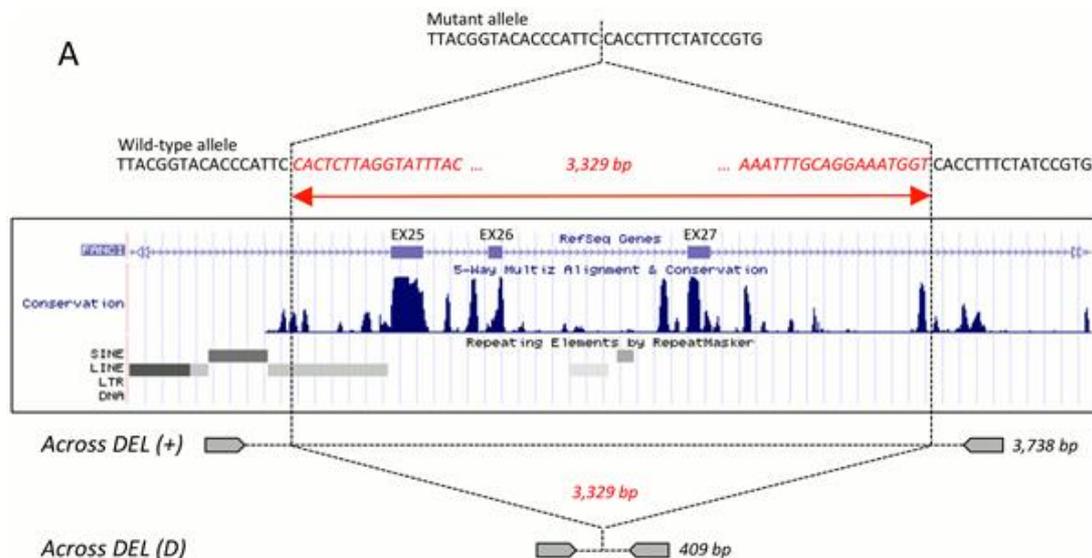


Figura 9. Esquema del fragmento de 3.3Kb perdidos en la delección responsable del SB y su relación con el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR (modificado de Charlier y col., 2012).

1.5. PCR en tiempo real (rtPCR)

La PCR en tiempo real es una variante más sensible del PCR convencional, que se diferencia de la anterior por la forma en que se detectan y analizan los productos de amplificación (Tamay de Dios y col., 2013). Los fragmentos del ADN amplificado se cuantifican en la medida en que la reacción ocurre (de ahí el nombre de: en tiempo real), mediante la utilización de una molécula fluorescente (fluoróforo) que se incorpora al ADN en la medida en que este se amplifica. Esto permite conocer el éxito de la reacción sin la necesidad de manipular el material genético en geles de agarosa.

La fluorescencia emitida por el fluoróforo se incrementa proporcionalmente al número de copias de interés amplificadas (Higuchi y col., 1993). Dado que la lectura

de fluorescencia se da ciclo a ciclo, es posible realizar una cuantificación de la cantidad de molde colocado inicialmente, por lo que además de en tiempo real, también es cuantitativa (Tamay de Dios y col., 2013).

Las plataformas de amplificación en tiempo real, implican la utilización de termocicladores especiales, equipados con ópticas y fuentes de luz y registro de fluorescencia (Figura 10).

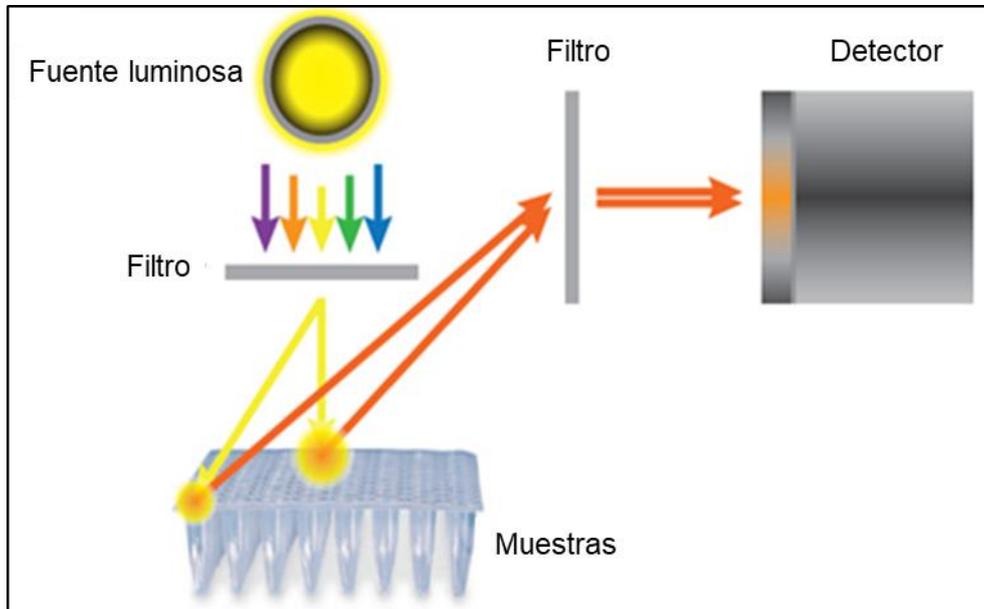


Figura 10. Esquema de la óptica de una plataforma de rtPCR (modificado de : <https://www.bio-rad.com/en-is/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye?ID=MW472W15>, Fecha de consulta: 27/11/19)

Existen varios sistemas de detección de los productos amplificados, el más empleado consiste en utilizar moléculas intercalantes o de unión (SYBR Green, EvaGreen, etc) con afinidad por el ADN bicatenario que, al ser excitados por una fuente luminosa, emiten fluorescencia que es capturada durante la etapa de extensión de cada ciclo. Una vez leída la fluorescencia, ciclo tras ciclo, los valores son graficados en una curva de amplificación, que muestra el progreso de la reacción. Cada curva consta de una etapa logarítmica de crecimiento y una etapa final de meseta, donde los componentes de la reacción se agotan y se llega al máximo de amplificación (Figura 11).

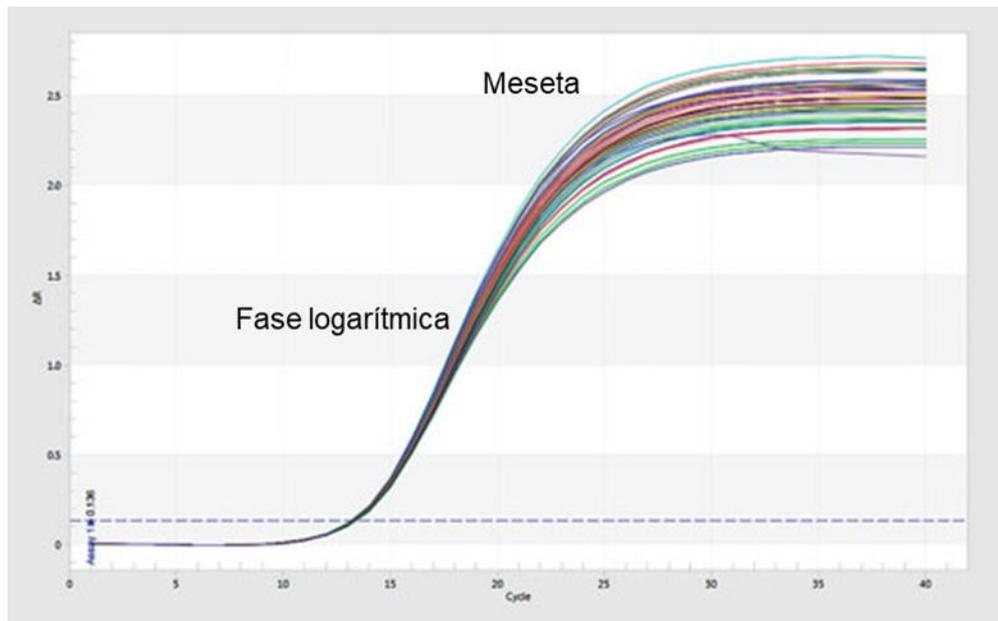


Figura 11. Curva de amplificación. En el eje de las Y se muestra la fluorescencia capturada y en el de las X el número de ciclo. Obsérvese la fase logarítmica y la de meseta. Cada línea corresponde a una muestra diferente (modificado de <https://www.genengnews.com/magazine/265/improving-real-time-pcr-data-quality/>, Fecha de consulta: 27/11/19).

Dado que los fluoróforos son inespecíficos y pueden unirse a cualquier molécula doble cadena, como dímeros de primers, es necesario evaluar la especificidad de los amplicones obtenidos. Para ello el software del equipo de amplificación cuenta con el análisis de curvas de *melting*, también conocidas como curvas de *melting*, que se realiza post amplificación. La temperatura de *melting* (T_m) es aquella en la cual el 50% de las moléculas de ADN se encuentran desnaturalizadas (Prado, 2017). La T_m depende del contenido de GC (ya que estas bases están unidas por tres puentes de hidrógeno y es necesaria más temperatura para separarlas), del tamaño del fragmento y de su secuencia (Kirk y col., 1997), por lo tanto, cada amplicón presenta una temperatura de *melting* específica (Figura 12). Esto elimina la etapa de electroforesis, necesaria en el PCR a tiempo final, para evaluar el éxito de la amplificación y la identidad del fragmento amplificado.

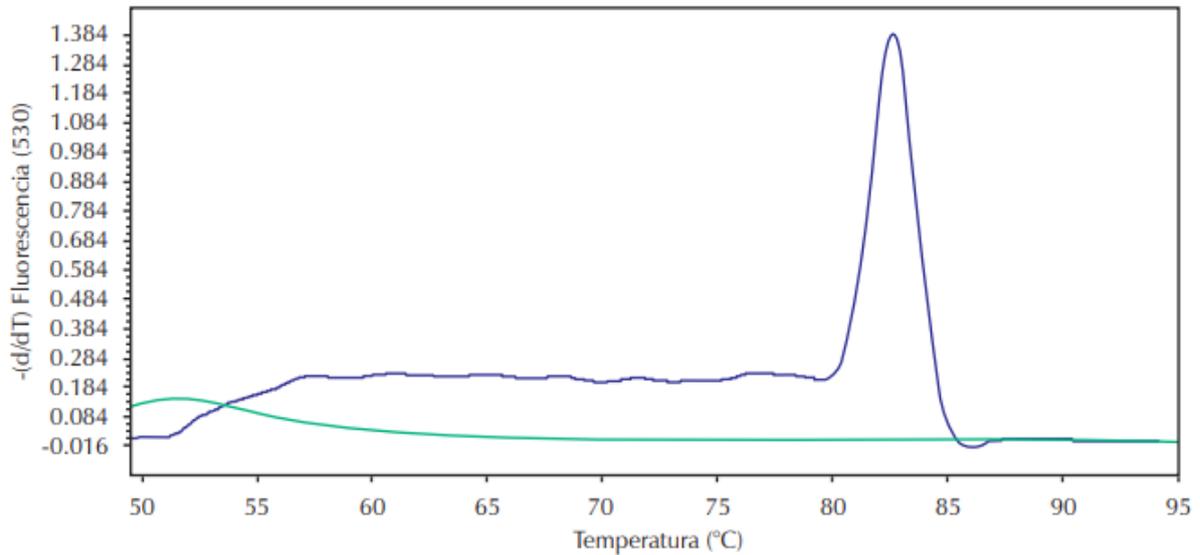


Figura 12. Curva de *melting* o de disociación. Puede observarse un único pico azul en el gráfico, lo que indica que se obtuvo un único amplicón. La línea verde indica el control negativo (tomado de Tamay de Dios y col., 2013).

En el rtPCR los primers deben diseñarse especialmente no sólo para asegurar una alta especificidad en la amplificación, sino que además deben generar productos de un tamaño entre 100-150pb; si los amplicones son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente (Tamay de Dios y col., 2013).

La utilización de los primers diseñados por Charlier y col., 2012 para el diagnóstico de SB mediante rtPCR, podría verse limitada, ya que el amplicón de 3738pb supera el tamaño de fragmento sugerido para rtPCR. Sin embargo, Federici, Artigas y col., (2019), comunicaron de forma preliminar la utilización de los mismos mediante un sistema de control interno (fragmento de otro gen) que solucionaría esa limitante. En este esquema, el control interno se amplificaría en todos los animales (normales y portadores), mientras que el alelo mutado solo se amplificaría en los animales portadores. De esta manera, los animales sanos no portadores tendrían solo un pico en la curva de *melting* correspondiente al amplicón del control interno, mientras que animales portadores presentarían dos picos correspondientes a los amplicones (uno del control interno y otro del alelo que presenta la mutación).

El objetivo de esta tesis fue evaluar la posibilidad de utilizar el rtPCR como técnica de *screening* o monitoreo poblacional, a los efectos de realizar un genotipado específico para esta mutación, más sensible, rápido y económico que la técnica convencional de PCR en tiempo final, y posterior electroforesis con la que se cuenta actualmente en el país.

2. HIPÓTESIS

La técnica de rtPCR permite diagnosticar a los animales portadores de SB de forma más rápida, específica y económica que la técnica tradicional de PCR a tiempo final y electroforesis.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar las dos técnicas moleculares disponibles en Uruguay para el diagnóstico del SB (PCR a tiempo final y electroforesis vs rtPCR).

Objetivos específicos:

1. Genotipar por PCR a tiempo final y posterior electroforesis muestras de animales portadores y sanos no portadores para el SB.
2. Genotipar por rtPCR y posterior análisis de curvas de *melting* muestras de animales portadores y sanos no portadores para el SB.
3. Comparar el tiempo, la especificidad y los costos de diagnóstico entre las técnicas empleadas.
4. Analizar por rtPCR y análisis de curvas de *melting* una muestra de referencia de animales Holstein Friesian del banco de ADN del área Genética y de la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas.
5. Evaluar las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio génico para las muestras analizadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Animal:

Se trabajó con 8 muestras de animales de la raza Holstein Friesian de Uruguay ya genotipados para el SB (4 normales y 4 portadores) y con 61 muestras de animales de la misma raza tomadas al azar. Las muestras pertenecen al banco de ADN del Área Genética y al Banco de ADN de la Unidad de Biotecnología del INIA Las Brujas.

4.2. Análisis Molecular:

4.2.1. Preparación de las muestras de ADN genómico:

Previo al análisis molecular, se cuantificó cada una de las muestras utilizadas, en pureza y concentración utilizando espectrofotómetro de última generación Nanodrop ND1000 (Plataforma conjunta de Ác. Nucleicos LEMA-Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR). Las muestras deben contener un mínimo de 100ng/μL de ADN a una pureza de 1,6-1,8 OD. La integridad del ADN fue evaluada utilizando electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.

4.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo final y electroforesis:

Los primers utilizados para detectar la delección de 3.3Kb son los descritos por Charlier y col., (2012). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25μL según lo comunicado por Fang y col., (2013) conteniendo: 100ng de ADN genómico, 10μM de cada primer, 2.5 μL de buffer de PCR 10X (Mg²⁺ Plus), 4 μl de dNtps 5 mM y 1.5 U Taq polimerasa. El programa de termociclado incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, hibridación de primers a 58°C 1 minuto, extensión a 72°C por 2.5 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Como control negativo se utilizó ADN de animal genotipado libre para SB del que disponemos en nuestro laboratorio.

Los amplicones obtenidos por la técnica de PCR fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con GoodView™ como colorante de ácidos nucleicos y marcadores de peso molecular de 1Kb y 100pb. Los animales normales no portadores de la mutación (homocigotas dominantes) presentaron una sola banda de amplificación de 3738pb, en tanto que los animales heterocigotas portadores presentaron 2 bandas, una de 3738pb y otra de 409pb. Cada electroforesis fue registrada mediante equipo fotográfico específico de última generación (BioScens SC805-BIOTOP) y software digitalizador de imágenes (BioSens Gel Imaging System V2.0).

4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (rtPCR) y análisis de la temperatura de curvas de *melting*:

Las amplificaciones por PCR en tiempo real fueron realizadas utilizando el Kit comercial Type-it® HRM PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania) en un termociclador Rotor Gene Q (Corbett Research). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25μL conteniendo 12,5μL de Master Mix y 50ng de ADN genómico, 0.3μM de cada primers. Los primers utilizados fueron los descritos por Charlier y col., (2012) y para el control de amplificación interno (fragmento de 150pb) los descritos por Mirk y

col., (1995). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Federici, Artigas y col., (2019): desnaturalización inicial a 95°C durante 5min, 40 ciclos de 95°C durante 30s, 55°C durante 1min y 72°C durante 2.5min.; seguido de una extensión final de 72°C durante 5m. El análisis de la curva de *melting* se realizó aumentando gradualmente la temperatura de 72°C a 95°C con un mantenimiento de la temperatura durante 90 segundos en el primer paso y 5 segundos en los siguientes. La gráfica de la curva de *melting* se realizó trazando la derivada negativa de fluorescencia (-Rn) frente a la temperatura usando el software Rotor Gene Q 1.7.75.

4.2.4. Determinación de la especificidad de los primers:

Amplicones de 3 animales normales (obtenidos por PCR a tiempo final) se enviaron a secuenciar (MacroGen-Corea) a los efectos de evaluar la especificidad de la amplificación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el software de libre acceso BioEdit Versión 7.2.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y aplicaciones accesorias como ClustalW para alineamientos múltiples. Los productos de amplificación o amplicones obtenidos a partir de animales normales y portadores, previamente genotipados por ambas técnicas, fueron evaluados en una misma corrida electroforética, a los efectos de cotejar la identidad de los fragmentos.

4.2.5. Evaluación de costos y tiempo de reacción

El costo de genotipado por muestra fue evaluado en U\$S utilizando como referencia la cotización de los productos disponibles en plaza en las empresas nacionales del rubro. El tiempo total de genotipado fue evaluado para cada técnica de forma independiente.

4.2.6. Análisis poblacional de la muestra de referencia Holstein

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas para el gen *FANCI* y el equilibrio génico utilizando el software de libre acceso Genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

5. RESULTADOS

5.1. Preparación de las muestras de ADN genómico

Las muestras de ADN genómico, de animales ya genotipados (normales y portadores) así como de los animales de la población de referencia del banco de ADN del Área Genética y de la unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas, se encontraban en buenas condiciones de conservación. Se logró cuantificar cada una de las muestras utilizando el equipo Nanodrop ND 1000, estandarizándose su concentración a 100ng/μL de ADN; con una pureza que osciló entre 1.7 y 2.0 (Figura 13). Asimismo, se evaluó la integridad del ADN genómico por electroforesis, obteniéndose mayormente bandas altas, intensas y sin señales de degradación. Las muestras degradadas no fueron utilizadas en este trabajo (Figura 14).

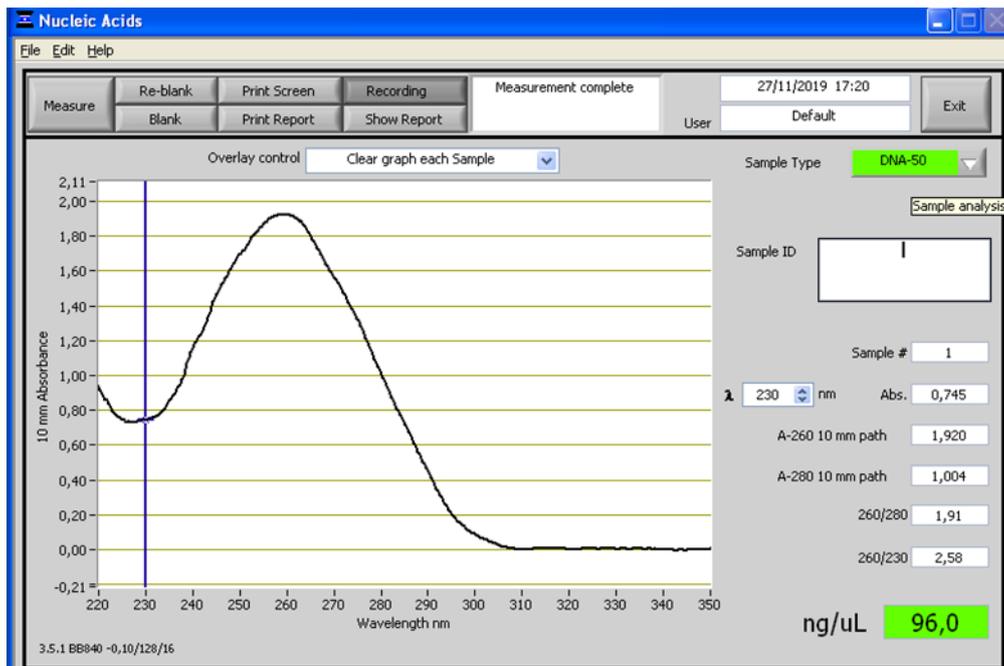


Figura 13. Captura de pantalla de una de las muestras de ADN utilizadas en esta tesis. Se muestra la concentración de ADN en verde, expresada en ng/μL y una relación de pureza (260/280) de 1.91.

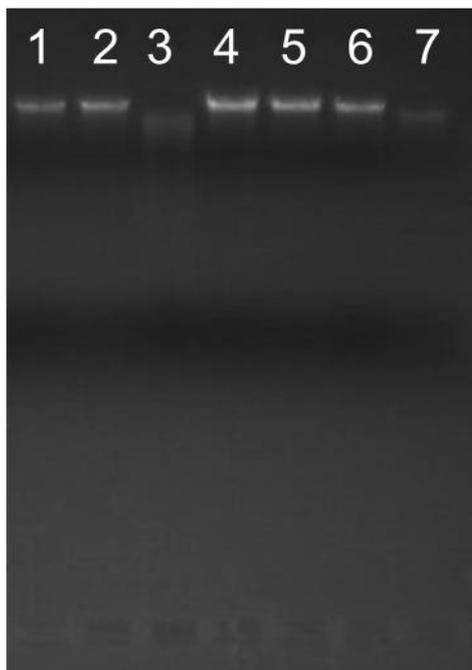


Figura 14. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del ADN. Carriles 1, 2, 4, 5 y 6 corresponden a muestras en buen estado de integridad. Carriles 3 y 7 corresponden a muestras levemente degradadas que no fueron utilizadas en este trabajo.

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final y electroforesis

Se logró amplificar por PCR a tiempo final un total de 51 animales. Todas las muestras presentaron fragmentos de amplificación de acuerdo a lo comunicado por otros autores (Fang y col., 2013). Los animales normales presentaron una sola banda de amplificación correspondiente a un fragmento de 3738pb. Los animales portadores mostraron dos bandas de amplificación, una de 3738pb (correspondiente al alelo normal) y otra de 409pb (correspondiente al alelo mutado) (Figura 15). No se encontraron nuevos animales portadores en la muestra analizada, confirmándose el genotipo de los 4 animales portadores genotipados previamente.

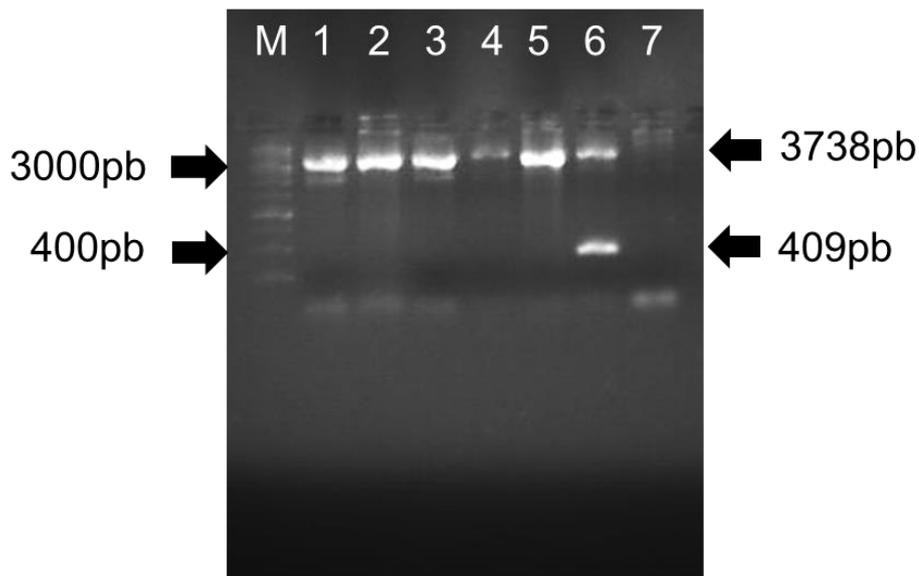


Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR a tiempo final. M: marcador de peso molecular de 1Kb. Carriles 1 al 5: animales homocigotos normales. Carril 6: animal portador. Carril 7: control negativo.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR) y análisis de curvas de *melting*.

Se logró amplificar por rtPCR un total de 18 animales. De estos, ocho ya eran de genotipo conocido (4 normales y 4 portadores), agregándose 10 animales nuevos que no habían sido genotipados previamente. El resultado obtenido fue concordante con lo comunicado previamente por Federici, Artigas y col., (2019). En la Figura 16 se observa la curva de amplificación obtenida por medición de la fluorescencia en cada ciclo, al final de cada paso de extensión.

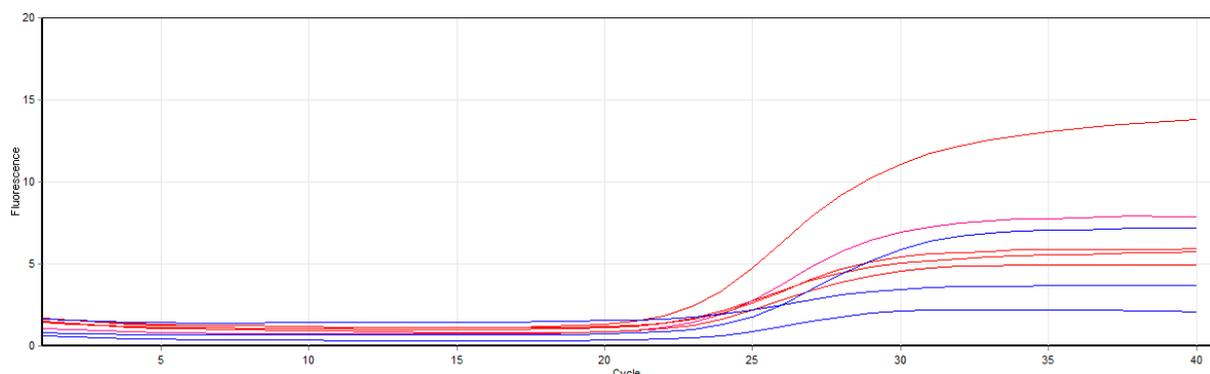


Figura 16. Curva de amplificación obtenida por medición de la fluorescencia en cada ciclo

El análisis de las curvas de *melting* (Figura 17) permitió identificar en todos los animales (rojos y azules) un pico en una temperatura que osciló entre los 87.5°C y 88°C, correspondiente al control interno de la reacción. Sin embargo, solo los animales portadores (rojos) presentaron un pico extra a una temperatura de 81.5°C a 81.7°C. Estos resultados fueron consistentes entre los 4 animales portadores y los 4 animales normales que habían sido genotipados previamente por PCR a tiempo final. Los 10 animales cuyo genotipo era desconocido, solo presentaron un pico en el rango de temperatura para el control interno, por lo que se les asignó el genotipo

normal (código TY). Todos estos resultados fueron concordantes a los descritos en el estudio preliminar de Federici, Artigas y col., (2019).

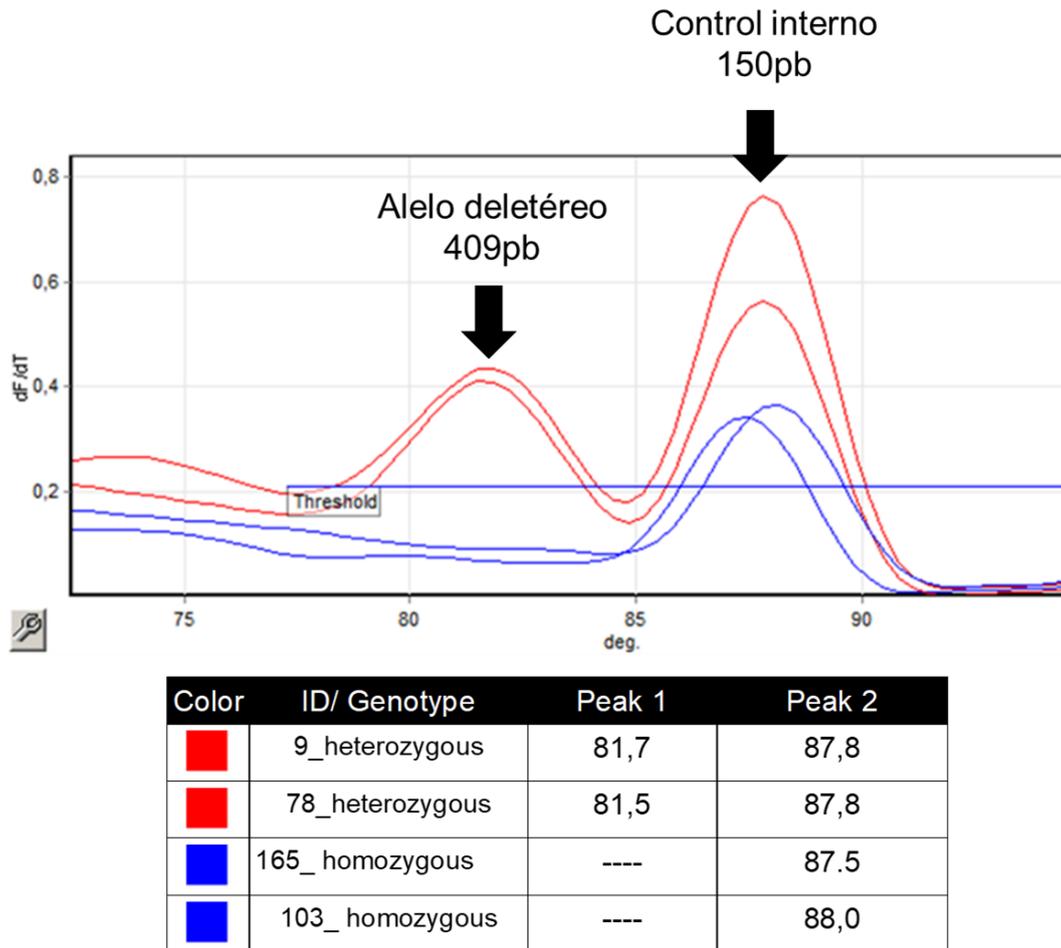


Figura 17. Curvas de *melting* o de disociación para los fragmentos amplificados en dos animales normales (azules) y dos animales portadores de SB (rojos). Las flechas indican a qué fragmento corresponde cada pico.

5.4. Especificidad de los primers y de la reacción de rtPCR

Se obtuvieron secuencias para el alelo normal de tres animales normales, sin embargo, ninguna de ellas abarcaba el tamaño total del fragmento amplificado. Al analizar las mismas mediante la herramienta BLAST (<https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core>) no se logró confirmar la identidad de los fragmentos con el gen *FANCI* bovino (Figura 18). Al realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas para los tres animales con el programa Bioedit no se logró observar coincidencias entre ellas, ni con la secuencia consenso del gel *FANCI* bovino obtenida de ENSEMBL (Figura 19).

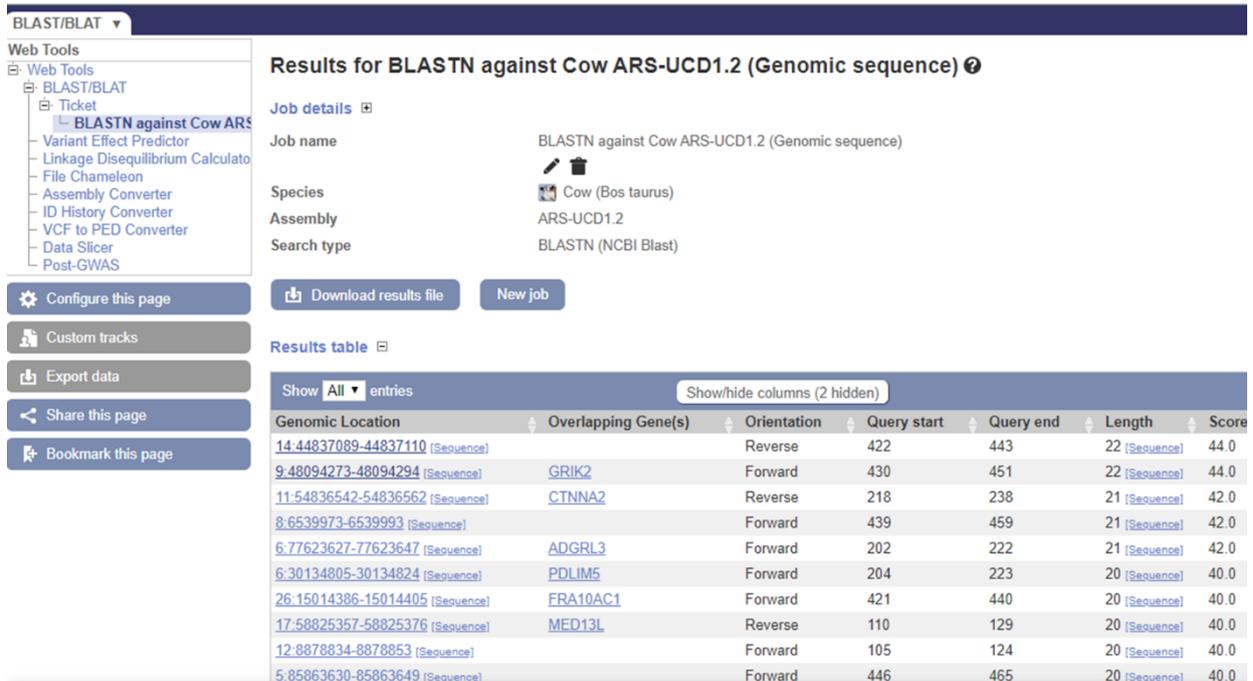


Figura 18. Captura de pantalla del BLAST realizado para las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados por PCR.

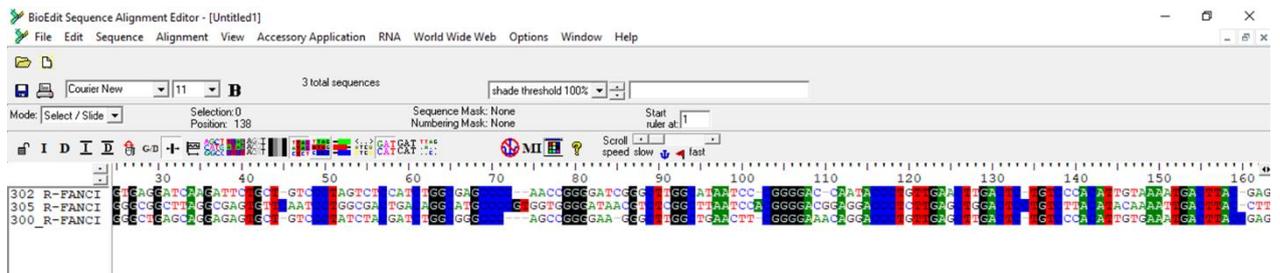


Figura 19. Captura de pantalla del alineamiento de secuencias reverse de tres animales normales para el SB.

Para validar las amplificaciones, los productos de rtPCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando como controles un animal normal y otro portador, amplificados por PCR en tiempo final (Figura 20). Se observa concordancia entre el número de picos de la curva de *melting*, el número de fragmentos obtenidos en la electroforesis de los productos de rtPCR, y el tamaño de los mismos en comparación al PCR en tiempo final.

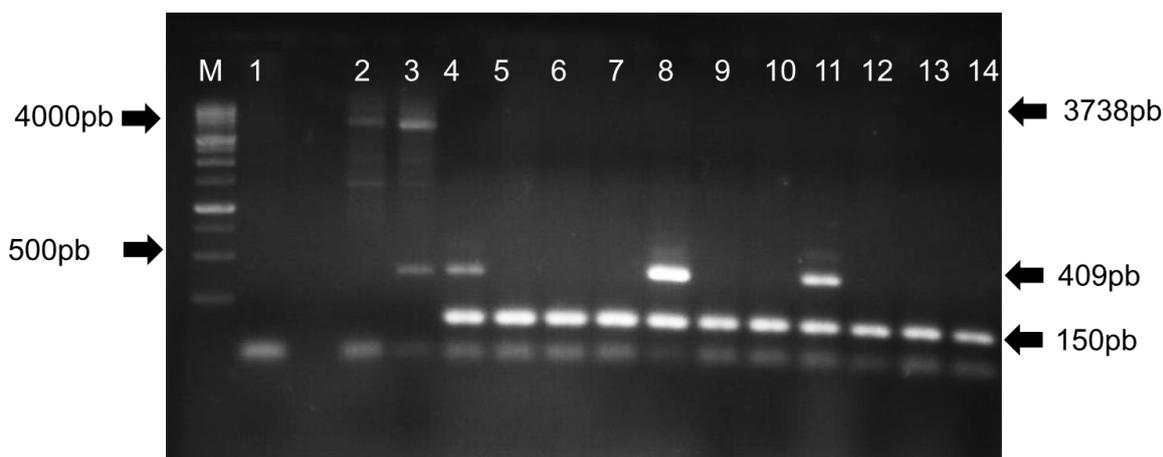


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos obtenidos por PCR a tiempo final y rtPCR. M: marcador de peso molecular de 1KB. Carril 1: control negativo, carril 2: animal normal por PCR, carril 3: animal portador por PCR, carriles 4, 8 y 11: animales portadores por rtPCR (alelo mutado y control interno), carriles 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13 y 14: animales normales por rtPCR (control interno).

5.5. Evaluación de costos y tiempos de reacción

Los costos de cada una de las técnicas fueron calculados en U\$S para una sola muestra, a precio de plaza nacional, sin tener en cuenta los controles negativos ni positivos. El costo para la técnica de PCR a punto final, electroforesis y tiempo de reacción se muestra en la tabla 2. El costo y tiempo de reacción para la técnica de rtPCR se muestra en la tabla 3.

Tabla 2. Costo para la técnica de PCR a punto final, electroforesis y tiempo de reacción

Reactivo	Costo (U\$S)/muestra
MasterMix PCR	0.85
Primers (F y R)	0.027
Marcador de peso molecular	0.75
GoodView	0.73
Agarosa	1.64
Costo total de reacción	3.997
Tiempo de reacción	
PCR + electroforesis	4hs

Tabla 3. Costo para la técnica de rtPCR/análisis de curvas de *melting* y tiempo de reacción

Reactivo	Costo (U\$S)/muestra
MasterMix	1.67
Primers	0.0085
Costo total de reacción	1.68
Tiempo de reacción	
rtPCR + análisis de curvas de <i>melting</i>	3hs

5.6. Análisis Genético-poblacional

El cálculo de las frecuencias genotípicas observadas y de las frecuencias alélicas se realizó en base a los genotipos obtenidos por ambas técnicas. El genotipo mayoritario en la muestra analizada correspondió al homocigota dominante (94%), siendo francamente menor la frecuencia de portadores (6%). La frecuencia de los alelos se encuentra en consonancia con las frecuencias genotípicas, siendo para el alelo normal de 0.97 y para el alelo mutado de 0.03.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo utilizamos muestras de alta calidad en cuanto a la cantidad, pureza e integridad, evaluadas por espectrofotometría y electroforesis. Técnicas similares como el HRM (*High resolution melting*) de los productos de rtPCR son muy sensibles a cualquier contaminante del proceso de extracción de ADN, por lo que las muestras deberían extraerse con un mismo protocolo (Gabór y col., 2012). En nuestro caso, utilizamos muestras de ADN provenientes de diferentes bancos (Genética-Fvet e INIA Las Brujas), extraídas con diferentes protocolos, obteniendo reproducibilidad de los resultados.

En lo que respecta a la PCR en tiempo final y electroforesis, son las técnicas de referencia utilizada por algunos autores para el *screening* poblacional a gran escala del SB (Fang y col., 2013). Sin embargo, la naturaleza de la mutación implica la amplificación de grandes fragmentos de ADN que podrían interferir con la eficiencia de la técnica. Esto la hace especialmente laboriosa, observándose animales en los que solo se amplifica la banda de 409pb a pesar de ser portadores (Charlier y col., 2012). En nuestro caso, logramos amplificar en todos los animales normales el fragmento de 3738pb y en los portadores los fragmentos de 3738pb y 409pb (Figura 15)

Para superar la limitante de la baja eficiencia de amplificación del fragmento de 3738pb, Li y col., (2016) desarrollaron un PCR multiplex a tiempo final, incorporando como control interno de reacción un fragmento de 269pb de ADNm (ADN mitocondrial). De esta forma los animales portadores presentarán una banda de 409pb y otra de 269pb, mientras que los normales solo presentarán la banda de 269pb.

La utilización de la técnica de rtPCR y análisis de curvas de *melting* para el genotipado de polimorfismos de inserción/delección ha sido previamente demostrada (Kisoi y col., 2019). Sin embargo, su utilización se ve restringida al hecho de que la eficiencia de amplificación se ve reducida considerablemente con amplicones demasiado grandes (Tamay de Dios y col., 2013). Por este motivo, siguiendo un esquema similar al de Li y col. (2016), en esta tesis validamos un método similar, desarrollado de forma preliminar en una plataforma de PCR en tiempo real (Federici, Artigas y col., 2019). En esta variante se utiliza como control interno un fragmento de 150pb del gen CD18 bovino. De forma que los animales normales solo amplificarán el fragmento de 150pb del control interno y los portadores el fragmento de 150pb (control) y el correspondiente al alelo mutado (409pb). Resultado que logramos reproducir en nuestros experimentos.

La principal ventaja que tiene la técnica de rtPCR sobre las técnicas clásicas de PCR y electroforesis, es que no es necesario realizar una electroforesis para visualizar el resultado de la amplificación, ganando tiempo y dinero. El análisis de las curvas de *melting* permiten identificar el número de fragmentos amplificados y su identidad en base a la temperatura de *melting*. En nuestro caso, pudimos demostrar que el fragmento del control interno presenta un pico de *melting* en un rango de temperatura que oscila entre 87.5°C y 88°C. El fragmento correspondiente al alelo mutado del SB presenta un pico de *melting* en el rango de temperatura que oscila entre 81.5°C y 81.7°C (Figura 17).

Para demostrar la especificidad de los primers y la identidad de los fragmentos obtenidos, tres muestras de animales normales (homocigotas dominantes) fueron enviadas a secuenciar. Si bien el tamaño esperado de la secuencia era de 3738pb, se obtuvieron secuencias más pequeñas, probablemente producto de la baja eficiencia para secuenciar fragmentos demasiado grandes de ADN. Esto quedó de manifiesto, al no poder confirmar la identidad de los fragmentos amplificados tanto con la herramienta BLAST como con el alineamiento de las propias secuencias entre sí (Figura 18 y Figura 19). Por este motivo, para poder confirmar la identidad de los picos en las curvas de *melting*, se realizó una electroforesis de las muestras amplificadas por rtPCR, junto a un animal normal y otro portador amplificados por PCR a tiempo final. Los resultados fueron 100% concordantes, lográndose de esta forma la validación del método (Figura 20)

El método diagnóstico desarrollado por Federici, Artigas y col., (2019) y validado en esta tesis, constituye un método más rápido y económico que el PCR a tiempo final (tablas 2 y 3), al momento de realizar un *screening* de animales portadores. Este último punto resulta de importancia, dado que la principal limitante del método es la incapacidad de detectar homocigotas recesivos (terneros malformados).

La ausencia de una electroforesis en el método validado, contribuye a un trabajo más limpio y con mayor seguridad para el operario (al no utilizar productos tóxicos como el bromuro de etidio). El riesgo de falsos positivos es menor, al reducir la manipulación de los tubos y la tan frecuente contaminación de los pocillos adyacentes en el gel por desbordes durante la siembra.

La sospecha de que el alelo responsable del SB estuviese circulando en Uruguay fue anteriormente establecida por Alcántara y col., (2017). Habiéndose confirmado molecularmente por primera vez por Federici y col., (2018). Si bien el número de animales estudiados en este trabajo (por ambas técnicas) es bajo (n=69), la procedencia de las muestras de diferentes zonas del país permite realizar algunos cálculos. La proporción de vacas portadoras de SB fue de 6%, este valor resulta superior al 3.9% comunicado por Briano y col., (2018). Esta diferencia puede ser debida al escaso número de animales analizados en nuestra muestra o contrariamente, a una mayor representatividad del muestreo, ya que Briano solo trabaja con animales de la región suroeste del país. La frecuencia de animales portadores detectada en nuestro trabajo es muy similar a la reportada por Charlier y col., (2012) y VanRaden y col., (2011) pero mayoritaria a la reportada por Fang y col., (2013) y Sahana y col., (2013). Resultados similares pueden observarse para las frecuencias alélicas en la tabla 4.

Tabla 4. Proporción de portadores de SB y frecuencia del alelo mutado en diferentes poblaciones Holstein del mundo.

Origen	Portadores (%)	Frecuencia alélica	Referencia
Holstein uruguayo	6	0.03	Presente estudio
Holstein uruguayo	3.39	0.016	Briano y col., (2018)
Holstein Holandés	7.4	0.037	Charlier y col., (2012)
Holstein Nórdico	4	0.02	Sahana y col., (2013)
Holstein Chino	2.2	0.011	Fang y col., (2013)

7. CONCLUSIÓN

Se logró poner a punto y validar la técnica de rtPCR para el diagnóstico del SB por primera vez. EL control interno utilizado logra superar la limitante del tamaño del fragmento del alelo normal, permitiendo identificar de forma específica, más rápida y más económica a los animales portadores. La técnica validada en este trabajo podrá ser utilizada en programas de monitoreo de reproductores, a los efectos de eliminar portadores o dirigir los apareamientos. Esto último, de particular importancia en países como el nuestro, donde la frecuencia de portadores es elevada.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agerholm JS, McEvoy F, Arnbjerg J (2006) Brachyspina syndrome in a Holstein calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18:418–422.
2. Agerholm JS, DeLay J, Hicks B, Fredholm M (2010) First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. *The Canadian Veterinary Journal* 51:1349–1350.
3. Agerholm, JS, Peperkamp K (2007) Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome. *BMC Veterinary Research* 3(1):8. doi:10.1186/1746-6148-3-8.
4. Auerbach AD, Rogatko, A, Schroeder-Kurth, TM (1989) International Fanconi Anemia Registry: Relation of Clinical Symptoms to Diepoxybutane Sensitivity. *Blood* 73(2):391-396.
5. Briano C, Romero A, Branda A, Federici M, Dalla Rizza M, Llambí S, Giannitti F, Caffarena D, Schild C, Casaux ML, Dutra F (2018) Principales mutaciones letales y semiletales en terneros Holando de Uruguay. *INIA Serie Actividades de Difusión N° 786, p 6-7. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12348/1/sad-786-p.6-7.pdf>* Fecha de consulta: 27/11/2019.
6. Charlier C, Agerholm JS, Coppieters W, Karlskov-Mortensen P, Li W, de Jong G, Fasquelle C, Karim L, Cirera S, Cambisano N, Ahariz N, Mullaart E, Georges M, Fredholm M (2012) A Deletion in the Bovine FANCI Gene Compromises Fertility by Causing Fetal Death and Brachyspina. *PLoS ONE* 7(8): e43085. doi:10.1371/journal.pone.0043085.
7. Dorsman JC, Levitusa M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, Schindler D, Arwert F, Pals G, Mathew CG, Waisfisz Q, de Winter JP, Joenje H (2007) Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cellular Oncology* 29:211–218. doi:10.1155/2007/151968.
8. ENSEMBL 2019 <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D745/5165265>
9. Espinosa L (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR. Las herramientas moleculares. Disponible en: <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf> Fecha de consulta: 28/11/2019.
10. Fang L, Li Y, Zhang Y, Sun D, Liu L, Zhang Y, Zhang S (2013) Identification of brachyspina síndrome carriers in Chinese Holstein cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25(4): 508–510.
11. Federici MT, Branda A, Artigas R, Briano C, Rogberg A, Giovambattista G, Nicolini P, Dutra F, Llambí S (2018) Plataformas moleculares utilizadas para

diagnóstico de enfermedades genéticas en bovinos Holando Uruguayo. INIA Serie Actividades de Difusión N° 786, p 3. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12346/1/sad-786-p.3.pdf> Fecha de consulta: 27/11/2019.

12. Fierro F (2014) Electroforesis de ADN. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales , p.27-51.
13. Fritz S, Capitan A, Djari A, Rodriguez SC, Barbat A, Baur A, Grohs C, Weiss B, Boussaha M, Esquerre D, Klopp C, Rocha D, Boichard D (2013) Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. PLoS ONE 8(6): e65550. doi:10.1371/journal.pone.0065550.
14. Gabór M, Trakovicka A, Miluchova M (2012) The Use of High Resolution Melting for Detection of the CAPN530 Polymorphism in Slovak Simental Bulls. Journal of Animal Science and Biotechnology. 45:155- 159.
15. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11: 1026-1030.
16. Kirk RM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry 245(2): 154–160. doi:10.1006/abio.1996.9916.
17. Kiso M, Moritsugu M, Imai M, Fukumoto K, Sakaguchi Y, Murata S, Kinoshita K (2019) Rapid and Cost-Effective Genotyping Protocol for Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion (Ins/Del) Polymorphism from Saliva. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 42(8):1345–1349. doi:10.1248/bpb.b19-00110.
18. Li Y, Zhai L, Fang L, Zhang S, Liu L, Zhu Y, Xue J, Xiaoqing L, Qiao L, Sun D (2016) A Novel Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for the Identification of Brachyspina Syndrome Carriers in Chinese Holstein Cattle. Journal of Veterinary Science & Medical Diagnoses 5(3) doi:10.4172/2325-9590.1000200.
19. Lorenz TC (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. Journal of Visualized Experiments (63): e3998, doi:10.3791/3998.
20. MGAP (2019) Anuario Estadístico Agropecuario 2019. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf> Fecha de consulta: 27/11/19.
21. MGAP (2014) DIEA Anuario Estadístico Agropecuario 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-2014> Fecha de consulta: 27/11/2019.
22. Moustacchi E. (2003) Fanconi's anemia. Disponible en:

<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FA.pdf> Fecha de consulta: 19/11/2019.

23. Norman HD, Miller RH, Wright JR, Hutchison JL, Olson KM (2012) Factors associated with frequency of abortions recorded through Dairy Herd Improvement test plans. *Journal of Dairy Science*, 95(7):4704-4784. Disponible en: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00387-6/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00387-6/fulltext) Fecha de consulta 27/11/2019.
24. Norman HD, Miller RH, Wright JR, Hutchison JL, Olson KM (2012) Factors associated with frequency of abortions recorded through Dairy Herd Improvement test plans. *Journal of Dairy Science* 95:4074–4084. doi: 10.3168/jds.2011-4998.
25. OMIA 2019 <https://omia.org/home/> OMIA. Online Mendelian Inheritance in Animals.
26. Peirson SN, Butler JN (2007). *Quantitative Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular Biology*, 362: 349-362.
27. Pérez AM (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/10700> Fecha de consulta: 28/11/19.
28. Prado Mantilla A (2017) Evaluación de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección y genotipificación de los genotipos humanos de sapovirus. Tesis de grado. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 53 p.
29. Ruśc A, Kamiński S (2015) Detection of Brachyspina carriers within Polish Holstein-Friesian bulls. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18(2):453–454. DOI 10.1515/pjvs-2015-0059
30. Saceda Corralo D (2019) PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) Webconsultas revista de salud y bienestar. Disponible en: <https://www.webconsultas.com/pruebas-medicas/pcr-13299> Fecha de consulta: 20/11/19
31. Sahana G, Nielsen US, Aamand GP, Lund MS, Guldbandsen B (2013) Novel Harmful Recessive Haplotypes Identified for Fertility Traits in Nordic Holstein Cattle. *PLoS ONE* 8(12): e82909. doi:10.1371/journal.pone.0082909.
32. Somma M, Querci M (2007) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº 6. Disponible en: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesion6.pdf> Fecha de consulta: 27/11/2019.
33. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2(2):70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427> Fecha de consulta: 27/11/2019.
34. Testoni S, Diana A, Olzi E, Gentile A (2008) Brachyspina syndrome in two

Holstein calves. *The Veterinary Journal* 177:144–146.
doi:10.1016/j.tvjl.2007.03.011

35. VanRaden PM, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL (2011) Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science* 94(12):6153-6161. doi: 10.3168/jds.2011-4624.
36. Waters DL, Shapter FM (2014) The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in Molecular Biology*, 1099:65-75.