



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**GENOTIPADO PARA MSUD, OSTEOPETROSIS Y SINDACTILIA
EN BOVINOS DE CARNE DE LA REGIÓN ESTE DE URUGUAY**

DR. AGUSTIN ROMERO BENAVENTE

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2017**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**GENOTIPADO PARA MSUD, OSTEOPETROSIS Y SINDACTILIA
EN BOVINOS DE CARNE DE LA REGIÓN ESTE DE URUGUAY**

AGUSTIN ROMERO BENAVENTE

**Dr. Fernando Dutra MSc.
Director de Tesis**

**Dra. Silvia Llambí PhD
Co-director**

2017

INTEGRACION DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Prof. Dr. José M. Verdes

Prof. Dra. Rosa Gagliardi

Dr. Rodolfo Rivero

2017

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

“Genotipado de las principales enfermedades hereditarias en bovinos de las razas Hereford (MSUD) y Aberdeen Angus (Osteoporosis y Sindacilia) en la Región Este de Uruguay”

Por: Dr. Agustín Romero Benavente

Director de Tesis: Dr. Fernando Dutra
Codirectora de Tesis: Dra. Silvia Llambí

Tribunal

Presidente: Dr. José M. Verdes

Segundo Miembro: Dra. Rosa Gagliardi

Tercer Miembro: Dr. Rodolfo Rivero

Fallo del Tribunal:

Aprobada

Montevideo
Martes 19 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Posgrados Académicos y Especializaciones

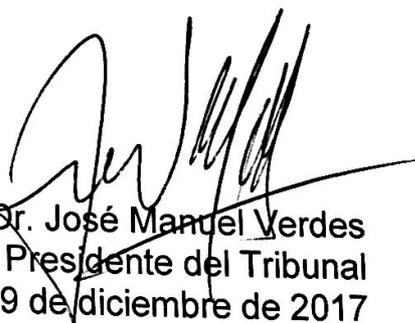
El tribunal considera que el maestreado Dr. Agustín Romero ha realizado un trabajo de tesis adecuado para la obtención del título, con una revisión bibliográfica suficiente para sustentar la justificación e hipótesis del trabajo, además de los objetivos planteados.

Los resultados del trabajo son interesantes y se presentaron en forma clara, constituyendo un buen aporte al conocimiento de las enfermedades de origen hereditario presentes en algunas de las razas bovinas criadas en la región Este del Uruguay.

La redacción de la tesis es correcta con observaciones editoriales y la presentación oral fue clara y cumplió con lo esperado.

La presentación oral fue clara, concisa y amena, respaldada adecuadamente con datos propios de la tesis y del Laboratorio donde se desarrolló principalmente la misma (DILAVE "Treinta y tres", MGAP), demostrando conocimiento en el desarrollo del trabajo de tesis.

Por lo anteriormente expresado, el Tribunal por unanimidad, califica el trabajo de Tesis del Dr. Agustín Romero, "Genotipado de las principales enfermedades hereditarias en bovinos de las razas Hereford (MSUD) y Aberdeen Angus (Osteoporosis y Sindacilia) en la Región Este de Uruguay", como APROBADO.



Dr. José Manuel Verdes
Presidente del Tribunal
19 de diciembre de 2017

La realización de la presente tesis de maestría fue posible gracias a:

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)
Llamado a “Becas de Posgrado Nacionales en Área Estratégica 2013”



Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP)



División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE-MGAP)



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a cada una de las personas que me acompañaron en este proyecto. Mi profundo agradecimiento por toda su colaboración sin la cual este trabajo no hubiese sido posible de culminar.

Quisiera comenzar agradeciendo a mis directores de tesis Dr. Fernando Dutra y Dra. Silvia Llambí por los conocimientos técnicos brindados y por la colaboración en la redacción de la tesis. Fundamentalmente a Fernando, por todo el apoyo brindado desde mis inicios en el Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este y por su disposición de compartir sus conocimientos en todo momento. Agradecerle enormemente ya que gracias a él descubrí lo que es y significa la Patología en el Diagnóstico Veterinario.

Un enorme agradecimiento a la Dra. Carolina Briano encargada de la unidad de Biotecnología del laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este por su colaboración incondicional en la realización de los análisis de laboratorio y en la redacción de esta tesis.

También debo agradecer a la Dra M^a Teresa Federici y la Licenciada MSc. Andrea Branda de la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas por su apoyo para la realización de las distintas actividades en el laboratorio y posterior análisis de los resultados obtenidos.

Agradecer también a los veterinarios privados, técnicos de la Asociación Rural Uruguay y cabañeros que permitieron mi actividad durante la recolección de las muestras en forma desinteresada.

Mi agradecimiento a la División General de Servicios Ganaderos del MGAP por permitirme la realización de esta Maestría.

Por último agradecer el apoyo incondicional de mi familia. Principalmente a María Noel por acompañarme en esta etapa profesional y sobre todo por formar parte de mi vida, y a dos personitas que me llenan de luz y energía- Iñaki y Maitena- que sin entender de qué se trata todo esto, me tuvieron paciencia y comprensión en todo momento.

ÍNDICE

GENOTIPADO PARA MSUD, OSTEOPETROSIS Y SINDACTILIA EN BOVINOS DE CARNE DE LA REGIÓN ESTE DE URUGUAY	i
INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS	iv
ACTA DE DEFENSA DE TESIS.....	v
AGRADECIMIENTOS	viii
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
ENFERMEDADES CONGÉNITAS Y HEREDITARIAS EN LA REGIÓN ESTE DE URUGUAY	2
Diagnóstico de las enfermedades hereditarias	3
Frecuencia de las enfermedades hereditarias en la región Este de Uruguay.....	4
MSUD (Maple Syrup Urine Disease) en Polled Hereford	7
Osteopetrosis en Aberdeen Angus.....	8
Sindactilia en Aberdeen Angus.....	10
Cardiomiopatía asociada al pelaje crespo en Hereford.....	11
Fibrosis hepática congénita en Red Angus.....	13
Síndrome de braquignatia superior y poliartritis en Aberdeen Angus.....	14
Epidermolisis Bullosa <i>Simplex</i> en Hereford	15
Hidrocefalo Neuropático en Aberdeen Angus	16
Artrogriposis múltiple en Aberdeen Angus	18
Lisencefalia- Paquigiria con hipoplasia cerebelosa en Polled Hereford	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	21
HIPÓTESIS	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Recolección de muestras.....	22
Extracción de ácidos nucleicos.....	22
MSUD - PCR tiempo real y análisis por HRM	23
OSTEOPETROSIS - PCR tiempo final	24
SINDACTILIA-PCR tiempo final y secuenciación.....	25
RESULTADOS	26
MSUD –Vacas PHe	26
MSUD - Toros PHe/He	27
Osteopetrosis - Toros AA/RA.....	28
Sindactilia- Ternero AA.....	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS.....	41
Anexo 1 Extracción de ADN a partir de folículos pilosos.....	41
Anexo 2 Extracción de ADN a partir de Sangre Entera.....	41
Anexo 3. Tabla III. Cuantificación y calidad del ADN extraído.....	42
Material Publicado por el autor.....	46

ABREVIATURAS (en orden alfabético)

AA: Aberdeen Angus

AM: Artrogriposis múltiple

EBS: Epidermolisis Bullosa Simplex

FHC: Fibrosis Hepática Congénita

He: Hereford

Ho: Holando

HRM: High Resolution Melting

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MSUD: Maple Syrup Urine Disease

NH: Hidrocéfalo Neuropático

OS: Osteopetrosis

PHe: Polled Hereford

PS: Polled Shorthorn

RA: Red Angus

SNC: Sistema Nervioso Central

Tm: Temperatura de melting

RESUMEN

Las enfermedades hereditarias son una causa de preocupación creciente a nivel mundial. Las técnicas actuales de mejoramiento genético en bovinos han llevado a propagar en todo el mundo características productivas económicamente valiosas, pero también algún gen recesivo defectuoso. El progreso genético ha ido acompañado de la aparición con alta incidencia de enfermedades hereditarias letales, con gran impacto en la fertilidad de los rodeos y la salud animal. Estas enfermedades se asocian con determinadas razas o líneas dentro de cada raza. La alta incidencia de estas enfermedades diagnosticadas en los últimos años en la zona Este de Uruguay hace sospechar que la proporción de animales portadores en algunos rodeos es alta y que las mutaciones pueden estar difundidas. Se hace necesario desarrollar métodos de diagnóstico genéticos apropiados y que se investigue la incidencia y difusión de los genes involucrados para lo cual se realizó un estudio de prevalencia de las tres enfermedades hereditarias de mayor relevancia en la zona Este, como lo son la Osteopetrosis y la Sindactilia en Aberdeen Angus y el MSUD en Hereford. Para MSUD y Osteopetrosis se realizó extracción de pelos de la cola de 124 toros de pedigrí Hereford (de 23 cabañas) y 92 Aberdeen Angus (de 20 cabañas) respectivamente, durante las exposiciones ganaderas de Melo, Minas, Treinta y Tres en los años 2015 y 2016. También se realizó extracción de sangre de 86 vacas en un predio con antecedentes de MSUD. Para sindactilia se realizó necropsia y se procesó sangre de un ternero Aberdeen Angus con diagnóstico de la enfermedad. Luego de la extracción de ADN, las muestras fueron procesadas por PCR-HRM y secuenciación en las muestras pertenecientes a la raza Polled Hereford y Hereford y PCR tiempo final en la raza Aberdeen Angus. En el rodeo con antecedentes de MSUD se confirmó por secuenciación la presencia de 3 (3.5%) vacas portadoras de la mutación, confirmando que la mutación se encuentra en los rodeos de cría de nuestro país. De los 124 toros Polled Hereford y Hereford, solamente presentaban calidad de ADN aceptable el 4 % de las muestras. De los 92 toros Aberdeen Angus analizados, en una (1.6%) se comprobó la delección responsable de la Osteopetrosis. Se confirmó mediante patología, PCR y secuenciación un caso de Sindactilia hereditaria en Aberdeen Angus.

SUMMARY

Hereditary diseases are a cause of growing concern worldwide. Current techniques of genetic improvement in cattle have led to the propagation of economically valuable productive features throughout the world, but also some defective recessive genes. Genetic improvement has been accompanied by the occurrence of a high incidence of lethal hereditary diseases, with great impact on herd fertility and animal health. These diseases are associated with certain breeds or lines within each breed. The high incidence of these diseases diagnosed in recent years in the eastern zone of Uruguay suggests that the proportion of carriers in some herds is high and that the mutations may be widespread. It is necessary to develop genetic diagnostic methods and investigate the incidence and diffusion of the genes involved. A prevalence study of three major hereditary diseases in the Eastern zone, such as Osteopetrosis and Sindactilia in Aberdeen Angus and MSUD in Hereford was performed. Tail hairs were extracted from 124 and 92 pedigree bulls of the Hereford and Aberdeen Angus, respectively, during 2015-2016 Regional Livestock Shows (Melo, Minas, and Treinta y Tres). Blood extraction was performed on a farm with a history of MSUD and on an Aberdeen Angus calf with syndactyly. After DNA extraction, samples were processed by PCR-HRM and sequencing in the samples of the Polled Hereford-Hereford and PCR-final time in the Aberdeen Angus breed. In the herd with a history of MSUD, the presence of 3 cows (3.5%) carrying the mutation was confirmed by sequencing. In the 124 Polled Hereford bulls, only 4% of the samples had acceptable DNA quality and in none the MSUD mutation was shown by sequencing. Of the 92 Aberdeen Angus bulls analyzed, in one (1.6%) the deletion responsible for Osteopetrosis was found. Post-mortem examination, PCR and sequencing confirmed a case of hereditary syndactyly in Aberdeen Angus. This study verified the existence of the recessive mutant allele for the disease MSUD in Polled Hereford, confirming that the mutation is found in the breeding herds of Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hereditarias de los bovinos son motivo de preocupación creciente a nivel mundial (Agerholm, 2007). Los métodos de mejoramiento genético (inseminación artificial, ovulación múltiple, fertilización *in vitro*, transferencia de embriones, etc.) han llevado a un gran avance genético en características económicamente productivas, tales como producción de leche, facilidad de parto, peso al destete, calidad de la carne, terneza, entre otras (Cieplóch et al., 2017). Pero como todo animal es portador de algún gen recesivo defectuoso (Nicholas, 2010), el progreso genético ha ido acompañado en numerosos países de la aparición con alta incidencia de enfermedades genéticas letales, con gran impacto en la fertilidad de los rodeos y la salud animal (Agerholm, 2007; Meydan et al., 2010; Windsor et al., 2011a). La utilización en forma masiva de las tecnológicas de reproducción ha provocado la aparición en forma más o menos simultánea de distintas enfermedades hereditarias en todo el mundo (Windsor et al., 2011a), incluyendo Uruguay (Dutra, 2016).

Actualmente hay 517 enfermedades hereditarias descritas en bovinos, de las cuales 142 son causadas por mutaciones identificadas mediante diagnóstico molecular (OMIA, 2017). La mayoría son monogénicas, autosómicas recesivas, letales, que sólo se expresan como un fenotipo enfermo cuando ambos alelos están presentes (Meydan et al., 2010). Cuando un alelo defectuoso se encuentra establecido en alguna raza, y la frecuencia génica del mismo es alta, comienza a ser motivo de preocupación por las sociedades criadoras, ya que recién entonces empiezan a visualizarse problemas en la progenie (Agerholm, 2007; Whitlock et al., 2008).

La falta de diagnóstico es la principal causa de difusión de estas patologías, por lo tanto, es importante reportar todo tipo de malformación congénita (Dutra, 2016). Para evitar su difusión, en varios países se están desarrollando programas de vigilancia activa para identificar portadores de caracteres indeseables y para aumentar el conocimiento clínico y patológico de las malformaciones, de forma que los casos futuros puedan ser mejor diagnosticados y prevenidos (Gentile & Testoni, 2006; Agerholm, 2007; Windsor et al., 2011a). Los programas de control introducidos en los centros de inseminación y también en algunas sociedades de criadores, han reducido enormemente las cifras de prevalencia de algunas de estas enfermedades (Jolly & Windsor, 2010). Cuando se dispone de pruebas basadas en el ADN y se publican las listas de animales portadores se puede reducir significativamente la dispersión de genes defectuosos (Gentile et al., 2012), algo de lo que Uruguay actualmente carece.

Cuando se diagnostica una enfermedad genética, probablemente representa sólo la "punta del iceberg" de lo que realmente está aconteciendo (Dutra, 2016). La manifestación de una enfermedad hereditaria siempre va a estar asociada con la endogamia o la cría de animales relacionados entre sí (Agerholm, 2007; Nicholas, 2010). Si bien la mayoría de los casos ocurren en animales de raza pura, también existe la posibilidad de que el problema suceda en animales cruce (Jolly & Windsor, 2010).

El reconocimiento temprano de estas enfermedades es importante para facilitar las medidas de manejo que puedan minimizar su impacto negativo sobre el bienestar

animal y la producción, ya que el costo para controlar la enfermedad cuando está bien establecida en una raza, es considerablemente mayor (Jolly & Windsor, 2010). La investigación se hace necesaria para el desarrollo de métodos de detección de heterocigotos y la promoción por parte de las sociedades de criadores de la importancia de la utilización de este tipo de análisis (Jolly & Windsor, 2010; Windsor et al.2011b).

ENFERMEDADES CONGÉNITAS Y/O HEREDITARIAS EN LA REGIÓN ESTE DE URUGUAY

En la región Este de Uruguay, una región esencialmente criadora donde se concentran los mayores rodeos PHe y AA del país (DIEA, 2003), en los últimos años numerosas enfermedades congénitas y/o hereditarias han sido confirmadas por diagnóstico patológico y/o molecular, tanto en cabañas como en rodeos comerciales que utilizan razas puras y que compran toros en cabañas nacionales (Dutra et al., 2012b; Kelly et al., 2012; Dutra et al., 2015). Una lista actualizada de tales enfermedades se muestra en la Tabla I.

Tabla I.
Anomalías congénitas y/o hereditarias con diagnóstico patológico y/o molecular, y sospechadas pero no confirmadas. Se indica el número fenotípico según OMIA. (DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este).

Enfermedad	Sistema	OMIA	Raza
Abraquia/Amelia	Esquelético	000002	Angus
Rinitis Alérgica	Respiratorio	000027	Normando
Anencefalia/Craniosquisis	Nervioso	000044	Hereford
Artrogriposis	Esquelético	000069	Varias
Braquignatia superior y artropatía	Esquelético	000150	Angus
Cardiomiopatía del pelaje crespo	Cardiovascular	000161	Hereford
Cardiomiopatía dilatada	Cardiovascular	000162	Holando
Condrodisplasia tipo Dexter	Esquelético	000187	Holando
Diplopagus/Diprosopus	Esquelético	000290	Hereford
Epidermolisis bullosa	Piel	000340	Hereford
Fibrosis hepática congénita	Hígado	000454	Angus
Displasia de cadera	Esquelético	000473	Hereford
Hidrocefalo interno	Nervioso	000489	Varias
Hipotricosis	Piel	000540	Hereford
Semialopecía congénita	Piel	000541	Hereford
BLAD	Hemopoyético	000595	Holando
Lipomatosis congénita	Digestivo	000606	Hereford
MSUD	Nervioso	000627	Hereford, Shorthorn
Neurofibromatosis cutánea	Nervioso	000716	Angus
Osteopetrosis letal hereditaria	Esquelético	000755	Angus
Espina bífida	Nervioso	000933	Holando
Sindactilia congénita	Esquelético	000963	Angus
Lisencefalia/Paquigiria	Nervioso		Hereford

<i>Sospechadas</i>			
Braquispina	Esquelético	000151	Holando
Citrulinemia	Nervioso	000194	Holando
DUMPS	Reproductivo	000262	Holando
Mioclonia congénita	Nervioso	000689	Hereford
Artrogriposis múltiple	Esquelético	001465	Angus
Complejo malformación vertebral	Esquelético	001494	Holando
Artrogriposis múltiple	Esquelético	001465	Angus
Hidrocefalo neuropático	Nervioso	000487	Angus

Modificado de: Dutra, 2016.

OMIA: On line Mendelian Inheritance in Animals.

Diagnóstico de las enfermedades hereditarias

Para el diagnóstico de estas enfermedades, debido a la ausencia de pruebas de rutina basadas en PCR en los laboratorios de nuestro país, toma trascendental importancia como herramienta el diagnóstico patológico. Cada nuevo caso que surge con sospecha de alguna enfermedad de esta índole, se debe investigar minuciosamente para determinar o descartar una causa hereditaria, y eventualmente enviar muestras al exterior o a laboratorios especializados nacionales, que no siempre tienen las pruebas diagnósticas específicas disponibles.

Se debe realizar una buena anamnesis y recolectar datos que puedan ser relevantes al respecto, por ejemplo:

- Composición racial del establecimiento y/o cabaña. Uso de razas puras o cruza.
- Rodeos consanguíneos.
- Sistema de cruzamientos entre los animales.
- Utilización de herramientas de reproducción como inseminación artificial, transferencia de embriones, etc.
- Uso de los mismos toros o líneas sanguíneas durante muchos años.
- Datos de pedigrí de los animales y registros genealógicos. Se debe considerar que en ausencia de genotipados para parentesco, más del 5% de los pedigríes son registrados en forma incorrecta (Jolly & Windsor, 2010).
- Reposición con animales reproductores procedentes del mismo sitio durante varias temporadas.
- Incorporación reciente de un nuevo toro o línea genética.
- Antecedentes de pérdidas embrionarias y/o diferencias entre diagnóstico de gestación y parición.
- Casos similares ocurridos en años anteriores con diferentes condiciones ambientales.

En los casos donde los animales se pueden inspeccionar ante- mortem, los síntomas clínicos también pueden ser de importancia. En algunas patologías, la sintomatología es muy característica y permite sospechar rápidamente la enfermedad, como el MSUD en Hereford, en la que los síntomas se van incrementando con las horas de nacido el animal.

Luego de la inspección clínica, se debe realizar la necropsia a los efectos de lograr una descripción morfológica clara de los hallazgos macroscópicos, ya que en algunas enfermedades hereditarias las lesiones macroscópicas e histopatológicas pueden ser patognomónicas (Jolly & Windsor, 2010). Además, se deben seleccionar y acondicionar adecuadamente las muestras para los diferentes estudios moleculares (PCR), serológicos, enzimáticos e histopatológicos.

Los análisis enzimáticos no se realizan frecuentemente y generalmente son costosos. Tal es el caso del MSUD donde se mide la concentración de aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina y de sus respectivos alfa-cetoácidos derivados, que si bien permiten realizar una aproximación diagnóstica no es definitiva (Meydan et al., 2010; Dutra et al., 2015). Los estudios serológicos son importantes para descartar alguna etiología vírica. Así, el virus de la Diarrea Viral Bovina y el virus de Akabane son teratogénicos y producen malformaciones en el SNC muy similares a las anomalías hereditarias. Pero el diagnóstico serológico debe complementarse con el diagnóstico molecular, ya que la sola presencia de anticuerpos no significa que el animal haya muerto a causa de la misma (Kessell et al., 2011).

Por último, las muestras se deben procesar para histopatología, ya que en algunas de estas enfermedades las lesiones son solamente reconocibles microscópicamente, a la vez que permite también descartar otro tipo de enfermedades. Por ejemplo, en el caso de la Fibrosis Hepática Congénita en Red Angus, la histopatología es importante para descartar la intoxicación por Senecio, que es una de las principales enfermedades tóxicas del bovino en la región Este del país y cuyos hallazgos macroscópicos pueden ser similares (Dutra et al., 2012a). Otro ejemplo es el caso del MSUD y la Mioclonía congénita hereditaria (ICM), donde ambas enfermedades se dan en la raza PHe y He y son muy similares clínicamente. Sin embargo mientras en el ICM no hay lesiones microscópicas en el SNC, en el MSUD las lesiones son bien características (Dutra et al., 2015; Windsor et al., 2011a).

El diagnóstico final de una enfermedad hereditaria se debe realizar mediante los hallazgos macro y microscópicos y si se dispone de diagnóstico molecular, la misma puede ser importante para confirmar o no la presencia de dicha enfermedad.

Frecuencia de las enfermedades hereditarias en la región Este de Uruguay

Las anomalías congénitas y/o hereditarias tienen distribución mundial, y su prevalencia en bovinos está estimada entre 0,2% y 3% (Leipold & Dennis, 1986; Jolly, 2002). A nivel regional, en Rio Grande do Sul, Brasil, se menciona que la prevalencia de estas enfermedades en bovinos es de 0,8%, pero cuando se toman en cuenta solamente animales donde se realizó un examen postmortem completo la misma aumenta a 4,28% (Marcolongo-Pereira et al., 2010). En nuestro país, según datos del laboratorio DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este, la prevalencia relativa cruda o global (focos / total de focos) para este tipo de anomalías es de 2,2% (**Grafico I**).

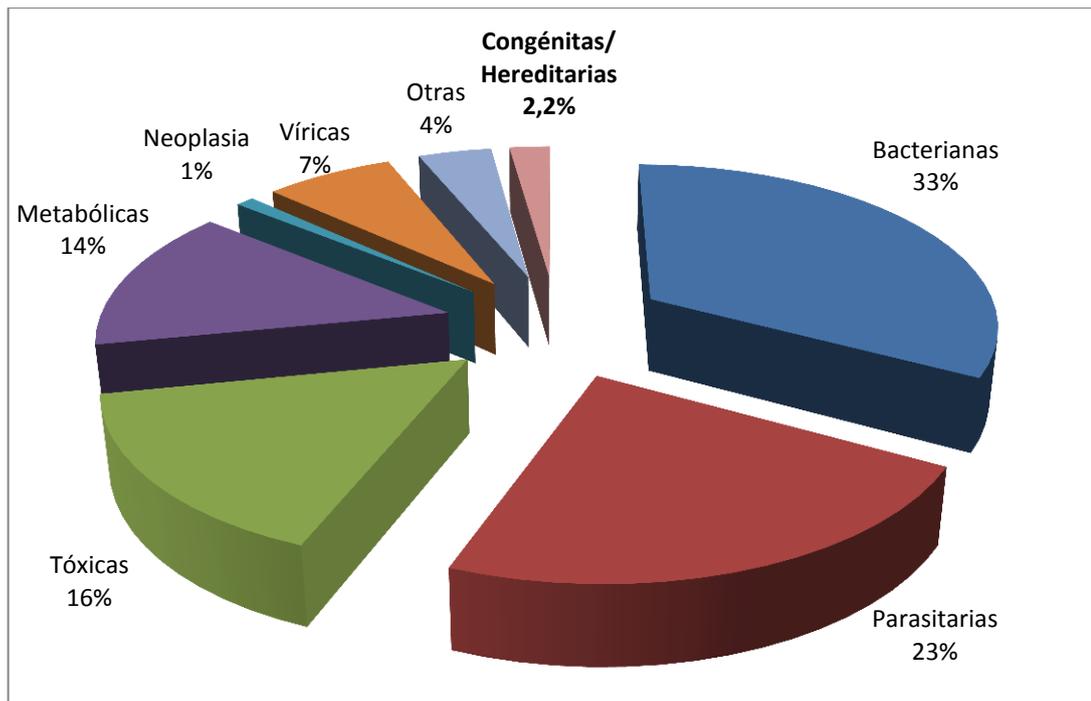


Gráfico I: Morbilidad relativa de las enfermedades congénitas y hereditarias en bovinos (1986 – 2015). Datos de 1839 focos bovinos con diagnóstico final. Según cálculos propios de la Base de Datos DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este.

Sin embargo, si en vez de la morbilidad relativa cruda se analizan los datos en función de los focos con consultas por mortalidad perinatal (Dutra, 2016), las anomalías congénitas y/o hereditarias toman mayor relevancia, siendo solo superadas por las enfermedades de etiología bacteriana como la leptospirosis y la brucelosis (**Gráfico 2**).

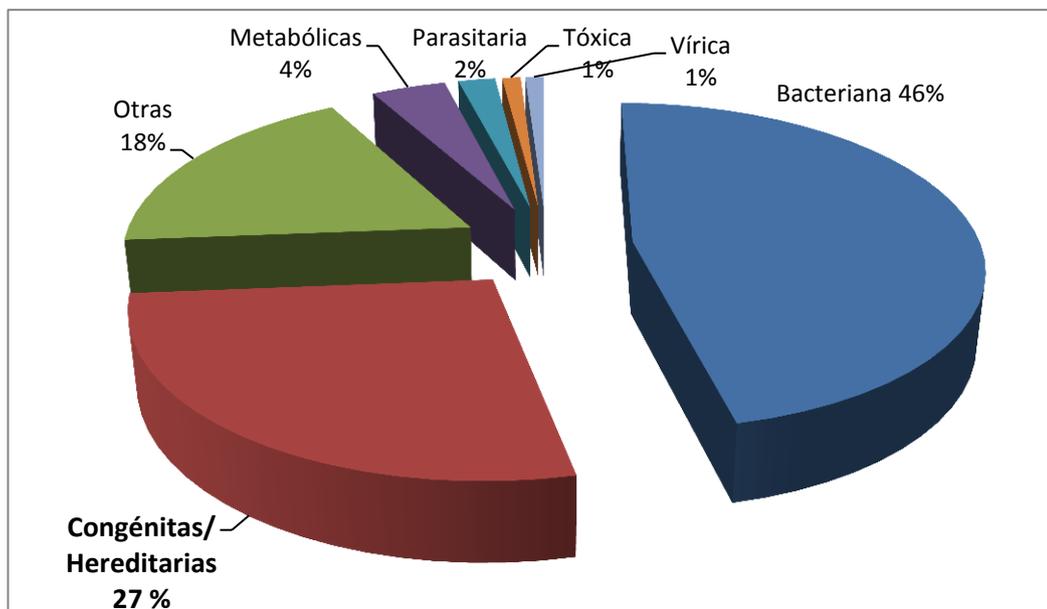


Gráfico II: Focos (N=148) con mortalidad perinatal entre 1986-2016. Cálculos propios de la Base de Datos DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este.

Pero el problema es mayor a esto, ya que a las pérdidas perinatales, que son fácilmente identificables al nacer, debe agregarse las pérdidas embrionarias y/o

abortos que ocurren desde la concepción y que son la mayoría de las pérdidas reproductivas en poblaciones de razas puras o poblaciones endogámicas (Nicholas, 2010). Los animales defectuosos que se ven al nacer son los últimos sobrevivientes de un problema que comenzó durante el servicio y/o inseminación de la vaca (Rousseaux & Ribble, 1988; Dutra, 2016).

En cuanto a la patología de las malformaciones congénitas y/o hereditarias, según datos del Laboratorio DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este, la mayoría afectan el SNC (56%) seguidas por las musculo-esqueléticas (25%) (**Gráfico III**). Esto se explica porque las mutaciones deletéreas actúan desde el momento de la concepción y afectan tempranamente la organogénesis de sistemas complejos como el SNC y el esqueleto.

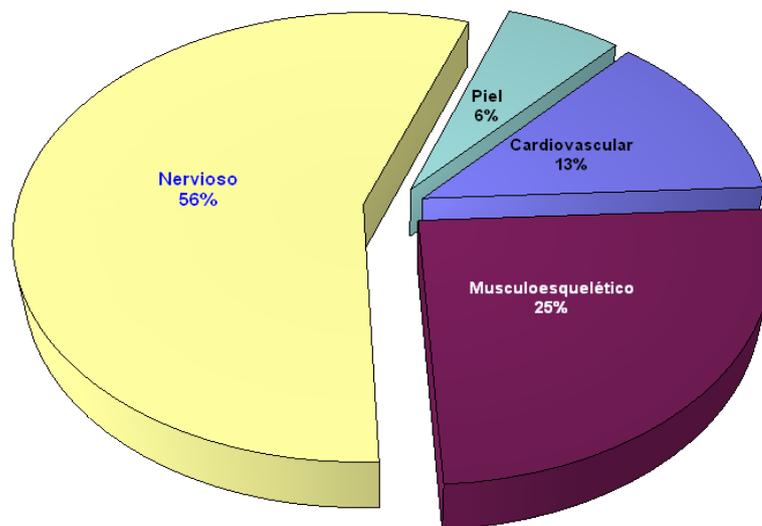


Gráfico III: Anomalías congénitas y/o hereditarias según sistema afectado (N= 148). Fuente: Base de Datos DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este.

En Uruguay existen varias enfermedades hereditarias diagnosticadas en los últimos años, y si bien los datos se basan en pocos brotes, la alta incidencia de las mismas en algunos predios comerciales demuestra que la proporción de vacas portadoras es alta y que las mutaciones están difundidas (Kelly et al., 2012; Dutra, 2016).

Además, se debe mencionar que durante el desarrollo de esta tesis, nuevas enfermedades congénitas/hereditarias se han diagnosticado por parte del Laboratorio DILAVE Miguel C. Rubino Regional Este. En la raza AA se diagnosticó la Artrogriposis Múltiple, el Hidrocéfalo Neuropático y la Condrodisplasia congénita, mientras que en la raza PHe se presentó un caso de Lisencefalia/Paquigiria con hipoplasia cerebelosa. Estos últimos casos presentan la particularidad, ya notada por otros autores (Agerholm, 2007), de ocurrir en predios con antecedentes de otras patologías hereditarias, como es el caso de Condrodisplasia en el mismo establecimiento con diagnóstico previo de Osteopetrosis en AA, y la Lisencefalia/Paquigiria en el mismo rodeo PHe con diagnóstico anterior de MSUD.

A continuación, se realiza una descripción de las enfermedades hereditarias más importantes diagnosticadas en la región Este en bovinos en las razas carniceras PHe/He y AA únicamente. Las enfermedades hereditarias de la raza Holando (Ho) y otras razas con diagnóstico en la región Este solo son mencionadas en la **Tabla I**.

MSUD (Maple Syrup Urine Disease) en Polled Hereford

El MSUD (enfermedad de la orina con Olor a Jarabe de Arce) es una de las patologías hereditarias más importantes de los bovinos de las razas PHe, He y PS. La misma se ha reportado en Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Reino Unido y Canadá (Cordy et al., 1969; Baird et al., 1987; Harper et al., 1989; Robarge et al., 2015).

Se trata de una enfermedad autosómica recesiva, debida a una mutación en uno de los genes que codifica para el complejo enzimático α -cetoácido deshidrogenasa E1 (BCKDC). Esta mutación produce un bloqueo enzimático en el catabolismo de los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina y de sus respectivos alfa-cetoácidos derivados, que aumentan en sangre y tejidos causando las lesiones características de *status spongiosus* en el SNC (Chuang et al., 2006). En la raza PHe se debe a una mutación sin sentido (MSUD 248C→T) en uno de los genes de BCKDC (Zhang et al., 1990), mientras que en PS la mutación es una transición C→T en el nucleótido 1380 (MSUD 1380C→T) del mismo gen (Dennis & Healy, 1999).

Los animales son normales al nacer, pero debido al consumo de calostro y leche que contienen aminoácidos ramificados que se acumulan en cantidades tóxicas en sangre, orina y tejidos, causan un cuadro clínico nervioso caracterizado por depresión, rigidez, convulsiones intermitentes, opistótonos y muerte (Cordy et al., 1969; Harper et al., 1990). En bovinos se ha mencionado que la placenta es poco eficiente en la regulación de las concentraciones de aminoácidos y cetoácidos por lo que el MSUD puede causar infertilidad, muerte fetal y partos prematuros en los rodeos afectados (Healy et al., 1985; Harper et al., 1990).

En nuestro país la enfermedad se diagnosticó en 3 predios comerciales en terneros PHe y PHe x PS basado en las lesiones histopatológicas características (**Figura 1**) y confirmación mediante análisis molecular donde se identificó la mutación MSUD 248C→T (Dutra et al., 2015). En estos predios la prevalencia de portadores heterocigotos estimada (en base a la incidencia al parto de terneros afectados), fue entre 25.7% y 32.3%, en tanto que la proporción de vacas portadoras detectadas por PCR-RFLP fue entre 28.5 y 37,5 % (Kelly et al., 2012; Dutra et al., 2015).

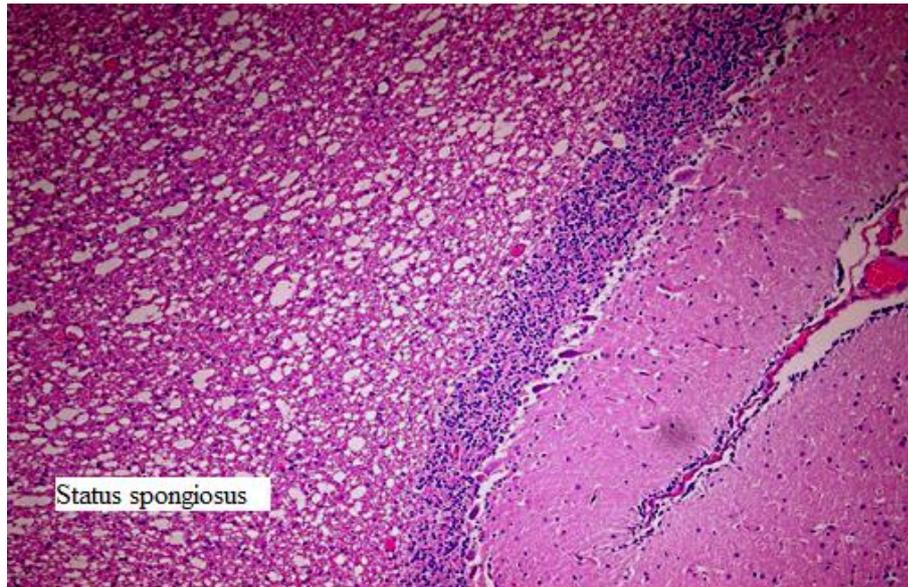


Figura 1: MSUD. Ternero neonato PHe. Histología de cerebelo con severa vacuolización (*status spongiosus*) de la sustancia blanca. H&E, x400 (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Osteopetrosis en Aberdeen Angus

La Osteopetrosis (OS), (enfermedad de los “huesos de mármol”), se trata de una enfermedad autosómica recesiva común en la raza AA, principalmente de la variedad colorada y menos frecuente en la variedad negra (Leipold et al., 1970; Huston & Leipold, 1971). También se ha diagnosticado en la raza He y Ho (Craig, 2015).

La enfermedad presentó alta incidencia en EE.UU y Canadá en la década del 60, luego disminuyó gracias a las pruebas de progenie y evitando el uso de líneas de pedigrí sospechosas, para nuevamente resurgir en el año 2005 en la raza RA, con numerosos casos diagnosticados (Meyers et al., 2010; O'Toole et al., 2011).

Los terneros afectados nacen prematuros, 10 -30 días antes de la fecha estimada de parto. Raramente nacen vivos y sobreviven postrados pocos días (Leipold & Cook, 1977; O'Toole et al., 2011). Los animales presentan frente abovedada, braquignatismo y los huesos largos son más densos y carecen de cavidad medular (Leipold et al., 1970).

La enfermedad es causada por una falla en la función de los osteoclastos, responsables de la resorción ósea (Craig, 2015; Askmyr et al., 2008). Como resultado de la misma se producen malformaciones esqueléticas especialmente en el cráneo y los huesos largos (Stark & Savarirayan, 2009; O'Toole et al., 2011). Meyers et al (2010) identificaron en RA una delección de 2.8 kb en el gen SLC4A2, localizado en el cromosoma 4, el cual codifica para una proteína de intercambio aniónico Cl^- / HCO_3^- que es primordial para mantener el pH ácido en las lagunas de resorción.

La mutación SLC4A2 está muy difundida en varios países, reportándose una prevalencia de heterocigotos de 9.4% en toros RA de pedigrí de diferentes líneas de sangre (Meyers et al., 2010) y de hasta 20% en vaquillonas de un rodeo de Wyoming que había usado intensivamente toros portadores de la línea BUF CRK ROMEO (O'Toole et al., 2011).

En nuestro país, la enfermedad se diagnosticó en rodeos de cría de la raza AA colorado y negro (Dutra et al., 2012b). En uno de los animales se observó frente

abovedada, nariz desviada, braquignatismo inferior, protrusión de lengua e impactación de molares en el medio de la rama mandibular. Los huesos largos tenían la diáfisis estrecha, las metáfisis y epífisis ensanchadas, y la cavidad medular ocupada por hueso esponjoso endocondral en forma de “doble cono” con desaparición total de la médula ósea (**Figura 2 y 3**). Estudios moleculares realizados en el exterior confirmaron la presencia de la mutación del gen SLC4A2 (Dutra et al., 2012b). A su vez se menciona que diferentes cabañas han importado semen de la línea BUF CRK ROMEO (Dutra et al., 2012b).

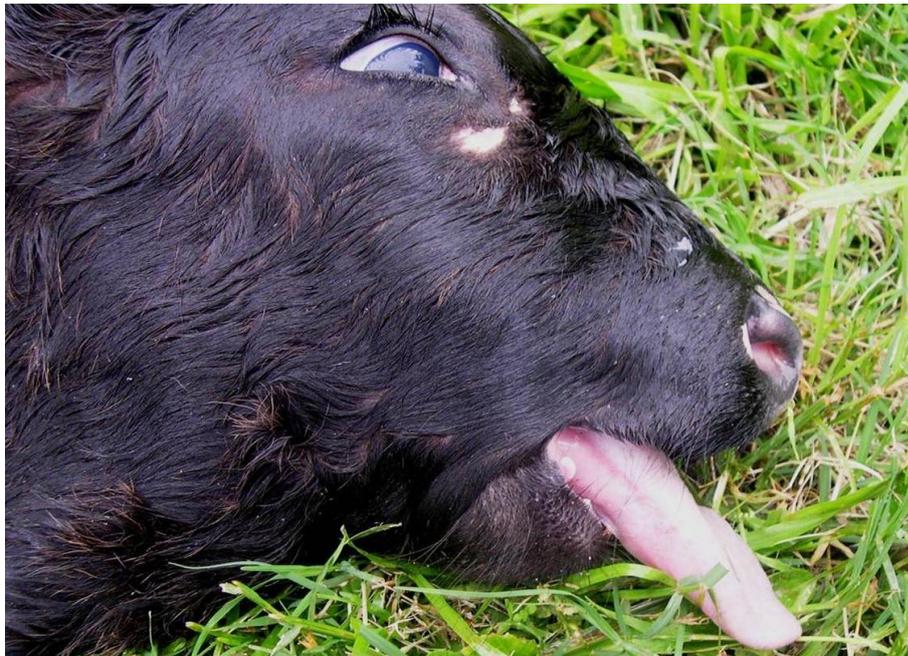


Figura 2: Osteopetrosis. Mortinato AA x RA con braquignatismo inferior y protrusión de lengua (Fototeca de DILAVE Regional Este).



Figura 3: Osteopetrosis. Corte sagital de húmero mostrando la cavidad medular rellena de esponjosa primaria dispuesta en doble cono. Las placas de crecimientos son normales (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Sindactilia en Aberdeen Angus

La Sindactilia (Pie de mula) es una malformación congénita de las partes distales de una o más extremidades caracterizada por la fusión completa o parcial o no división de las falanges (Drögemüller et al., 2007). Es considerada uno de los defectos genéticos más comunes en el bovino de las razas Ho, AA, He, entre otras (Leipold et al., 1998; Drögemüller et al., 2007; Ciepłoch et al., 2017).

La sindactilia bovina consiste en un rasgo autosómico recesivo con penetrancia incompleta (79% en Ho) y expresión variable. Puede presentarse en los 4 miembros, pero generalmente sigue un patrón de adelante hacia atrás y derecha a izquierda, observándose con mayor frecuencia en el pie anterior derecho solamente (Whitlock et al., 2008).

Los animales afectados son intolerantes a las altas temperaturas y han desarrollado hipertermia letal en condiciones experimentales (37°C, 70% humedad) (Leipold et al., 1974). La alta frecuencia de la enfermedad en Ho podría deberse a que las hembras portadoras producen significativamente mayor cantidad de leche y sólidos grasos que hembras homocigotas no portadoras (Johnson et al., 2006).

Se ha demostrado una mutación en el gen LRP4 que codifica para un miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad, que actúan en la regulación del control de la morfogénesis ósea. En AA, la mutación puntual se produce en el primer nucleótido del intrón 37 y es una sustitución de la guanina por la adenina (Johnson et al., 2006).

La enfermedad se diagnosticó en el año 2014 en un establecimiento criador de 400 vacas AA X RA servidas con toros RA, localizado en el Departamento de Cerro Largo. Durante la parición se vieron al menos 4 terneros con malformación en los 4 miembros. Los animales tenían los miembros más cortos y mostraban grandes dificultades para mantenerse de pie y para desplazarse. Había sindactilia en los 4 miembros y las pezuñas tenían un aspecto de cono truncado (**Figura 4**). A la necropsia de uno de los animales afectados, se encontró acortamiento de ambos huesos tibiales (hemimelia tibial) y sinostosis de las falanges (**Figura 5**).



Figura 4: Sindactilia. Ternero AA con los 4 miembros afectados, “pie de mula” (Fototeca de DILAVE Regional Este).



Figura 5: Sindactilia. Ternero AA. Corte sagital de falanges, donde se observa sinostosis y alteración de tejidos blandos alrededor (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Cardiomiopatía asociada al pelaje crespado en Hereford

La Cardiomiopatía asociada al pelaje crespado (CWH, Cardiomyopathy Woolly Haircoat) del ganado He, es una enfermedad hereditaria que se transmite como una característica autosómica recesiva simple. La misma es relativamente común en Australia, pudiendo su incidencia superar el 2,2% en algunos rodeos PHe, He y sus cruza (Morrow & McOrist, 1985).

Los terneros afectados, al nacimiento presentan el pelaje denso (crespado) y a los pocos días de nacidos muestran dificultad respiratoria, arritmias ventriculares, intolerancia al calor y muerte. Solo unos pocos sobreviven más allá de los 6 meses. La

enfermedad puede ocasionar abortos o nacimiento prematuros (Whittington & Cook, 1988; Storie et al. 1991). Los hallazgos patológicos más característicos son: marcada cardiomegalia, engrosamiento de las paredes ventriculares y fibrosis del miocardio (Morrow & McOrist, 1985; Robinson, 2015).



Figura 6: CWH. Ternero PHe de 15 días de edad al pie de la madre con pelaje denso (crespo) (Fototeca de DILAVE Regional Este).

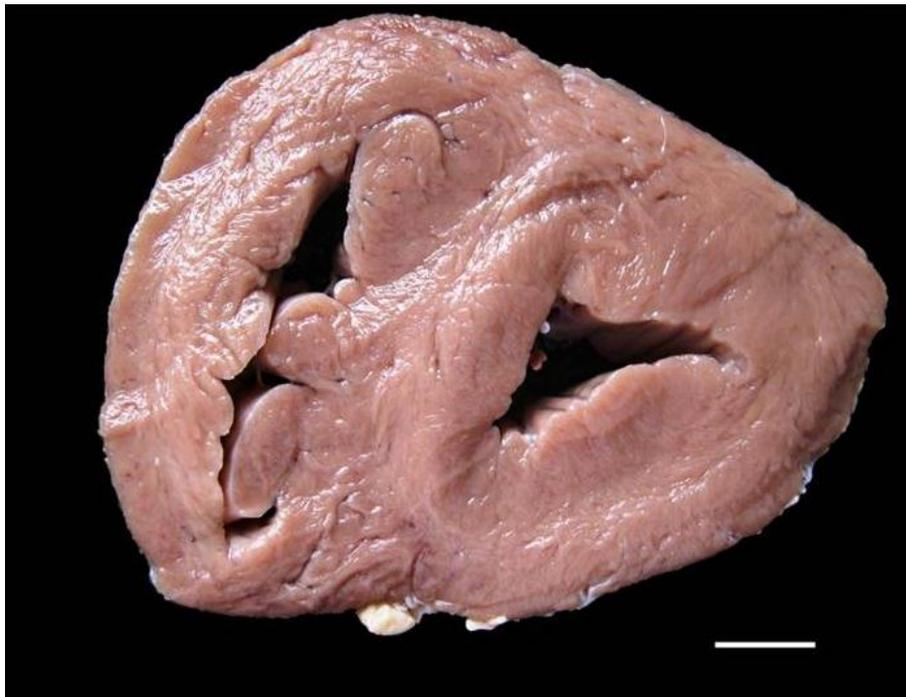


Figura 7: CWH. Ternero PHe de 2 días de edad con severa hipertrofia concéntrica de tabique interventricular, pilares y paredes ventriculares (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Los terneros crespos son homocigotos para la mutación del gen no-desmosómico Nkip1 que se expresa en la piel, miocardio y el endotelio vascular y aparentemente controla la inflamación, la respuesta inmune y la proliferación celular (Simpson et al., 2009).

En el Uruguay la enfermedad fue comunicada por Dutra et al. (2011a) en una cabaña de Cerro Largo y también en predios comerciales donde usaban toros PHe de pedigrí de diferentes líneas de sangre. El diagnóstico se realizó en base al pelaje crespo (**Figura 6**), la hipertrofia ventricular (**Figura 7**) y el peso promedio del corazón, que en los terneros crespos era significativamente mayor que en los normales (391 vs. 220-248 g). Las lesiones histológicas en miocardio y piel eran las características de esta enfermedad (Dutra et al., 2011a).

Fibrosis hepática congénita en Red Angus

La FHC (Congenital hepatic fibrosis), es una malformación hereditaria descrita en los humanos, felinos, equinos, caninos y bovinos (Haechler et al., 2000; Yoshikawa et al., 2002; Lyons et al., 2004; Brown et al., 2010; Jiang et al., 2016). En el hombre, es una enfermedad hereditaria asociada a la Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Recesiva, que cursa con insuficiencia renal. La misma se debe a una mutación en el gen PKHD1, que codifica para la fibrocistina / poliductina, proteína localizada en los cilios primarios y en la superficie de las células epiteliales tubulares biliares y renales (Jiang et al., 2016). En la FHC hay un desarrollo defectuoso de la vena porta y los ductos biliares como consecuencia de una malformación embrionaria de la placa ductal, por lo que la fibrosis ya se puede dar durante la etapa fetal (Yoshikawa et al., 2002; Brown et al., 2010).

En nuestro país, esta enfermedad se diagnosticó en la región Este en una cabaña RA en el año 2012, donde enfermó 1 ternera de un lote de 33 animales de pedigrí (Dutra et al., 2012a). Los animales eran de inseminación artificial con semen de un toro RA. El animal afectado presentaba desde el nacimiento mal estado corporal, baja ganancia de peso y diarrea intermitente. Los hallazgos patológicos más importantes fueron a nivel hepático donde el mismo presentaba fibrosis marcada, consistencia dura y bordes irregulares (**Figura 8**). Las lesiones histológicas consistían en fibrosis portal, severa, conectiva porta/porta y las ramas de la vena porta parecían hipoplásicas o estaban ausentes. Los ductos biliares eran pequeños, de contorno irregular y la mayoría sólidos (**Figura 9**) (Dutra et al., 2012a). En bovinos aún no se ha identificado la mutación responsable de esta patología.

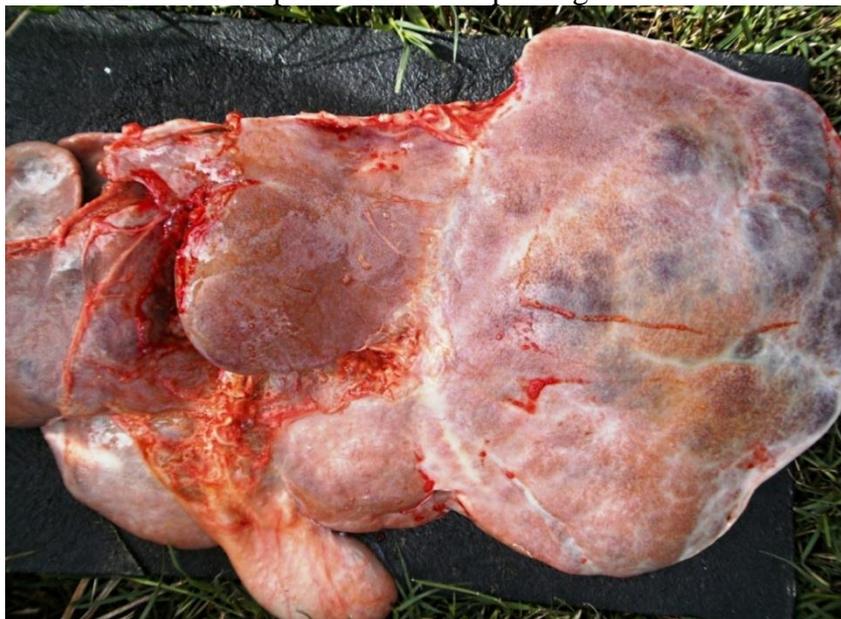


Figura 8: Fibrosis hepática congénita. Ternera RA de 6 meses de edad. Hígado con bordes irregulares y fibrosis marcada (Fototeca de DILAVE Regional Este).

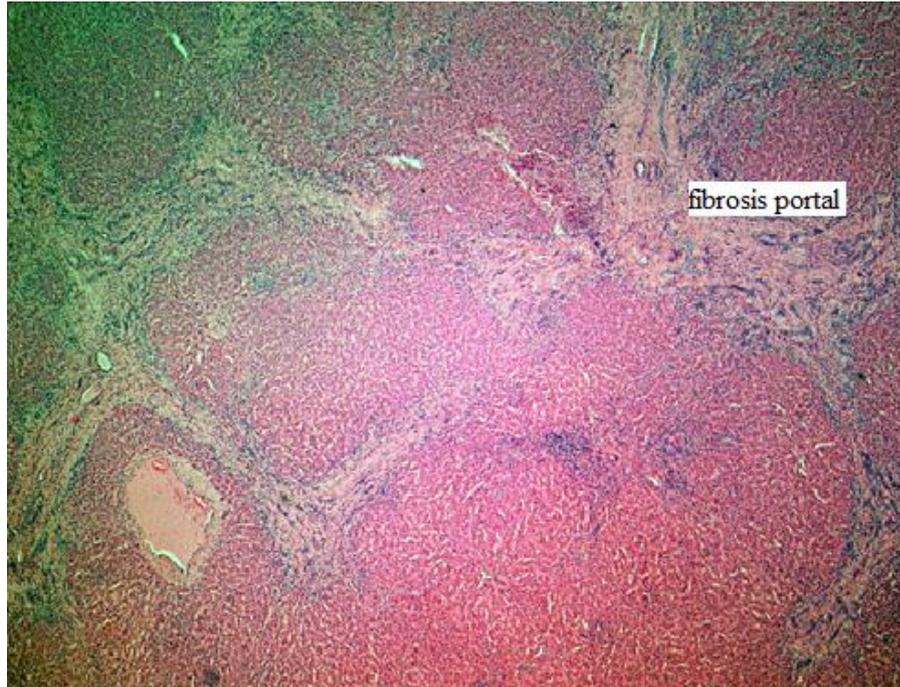


Figura 9: Fibrosis hepática congénita. Ternera RA de 6 meses de edad. Hígado con fibrosis portal conectiva, ausencia de vena porta y proliferación ductal en placa limitante. H&E, x400 (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Síndrome de braquignatia superior y poliartritis en Aberdeen Angus

En bovinos la braquignatia superior o acortamiento de la maxila se ha descrito en terneros Ho en Alemania (Thielscher, 1996). También se ha reportado en terneros AA un síndrome de braquignatia superior asociada a enfermedad degenerativa articular, caracterizada por degeneración del cartílago articular de las articulaciones móviles y sin inflamación de las mismas. Este defecto se asoció a una menor cantidad y/o calidad de glucosaminoglicano o colágeno. Los estudios genealógicos revelaron una base genética para esta patología (Jayo et al., 1987).

En el Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este se diagnosticó esta enfermedad en el año 2011, en un rodeo AA negro. Durante la parición del año 2010 nacieron 9 terneros con braquignatia superior, mientras que durante el año 2011 nacieron otros 3 terneros con iguales características en otro lote de vacas servidas con el mismo toro AA. La incidencia fue de 36 % y 16 % respectivamente para los dos años. Los animales afectados presentaban dificultad para mamar y caminar y posteriormente morían entre 1 y 60 días post-parto.

A la inspección clínica de 2 terneros se observó, debilidad, deshidratación, dificultad para caminar y decúbito esternal. La cabeza era dolicocefala y el maxilar superior más corto que la mandíbula (**Figura 10**). A la necropsia, había onfaloflebitis supurativa y artritis fibrino-supurativa en todas las grandes articulaciones móviles. La cápsula articular estaba engrosada y el líquido sinovial era fluido, abundante con pus y fibrina (**Figura 11**). Las lesiones de artrosis eran incipientes, mientras que en el caso reportado por Jayo et al. (1987) la mayoría de los animales tenían semanas o meses de edad (Dutra et al., 2011b). La mutación aún no se conoce.



Figura 10: Ternero AA con braquignatia superior (Fototeca de DILAVE Regional Este).



Figura 11: Ternero AA con osteoartritis y restos de fibrina en el fondo de la fosa del olecranon (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Epidermolisis Bullosa *Simplex* en Hereford

La EB es un grupo heterogéneo de genodermatosis mecano-bullosas, que afecta al hombre y los animales, caracterizada por la extrema fragilidad de la unión dermo – epidérmica (Ginn et al., 2015). En bovinos, la enfermedad (Red Foot Disease) ha sido diagnosticada en la raza Simmental, Brangus, Ho y He (Thompson et al., 1985; Foster et al., 2010; Murgiano et al., 2015).

Esta enfermedad microscópicamente se clasifica en: la forma **simple** (EBS, con separación en los queratinocitos basales de la epidermis); la forma de **juntura o unión** (JEB, con separación a nivel de la lámina lucida de la membrana basal); y la forma **distrófica** (DEB, con separación en la dermis superficial. La diferenciación entre las distintas formas requiere de microscopía electrónica (Hargis & Ginn, 2007).

La EB es una enfermedad hereditaria heterogénea, que resulta de una mutación en alguno de los más de 10 genes que codifican las proteínas de la unión dermo – epidérmica (Uitto & Richard, 2005). Los avances en las técnicas moleculares han demostrado varias mutaciones en los genes que codifican las proteínas estructurales (Ginn et al., 2015; Medeiros & Riet-Correa, 2015).

En los animales afectados hay desprendimiento de la epidermis, formación de vesículas y ulceraciones en la piel y membranas mucosas. En los extremos distales de los miembros puede haber ulceraciones extensas, desprendimiento del rodete coronario y exungulación (“enfermedad de las patas rojas”) (Hargis & Ginn, 2007).

En Uruguay existe diagnóstico de EB simple, en un rodeo puro por cruce de 34 vacas He servidas con un mismo toro Hereford durante varios años, que presentaba alta consanguinidad. La enfermedad había sido observada esporádicamente en el rodeo en los años anteriores por parte del propietario. Los animales afectados presentaban alopecia, áreas extensas de ulceración, desprendimiento de la piel y pezuñas desprendidas parcialmente del rodete coronario (**Figura 12**) (Dutra & Baroni, 2007). Se realizó el análisis de PCR-RFLP descrito por Ford et al. (2005) y se demostró que el toro y la madre de uno de los terneros afectados eran portadores de la mutación en el gen de la queratina BK5 (Kelly et al., 2010).



Figura 12: EBS. Ternero PHe con necrosis y ulceración de piel en miembros anteriores “Enfermedad de las patas rojas (“Red foot disease”)(Fototeca de DILAVE Regional Este).

Hidrocéfalo Neuropático en Aberdeen Angus

El hidrocéfalo es un trastorno del SNC caracterizado por acumulación excesiva de LCR en los ventrículos cerebrales. Se puede clasificar en interno (obstructivo) cuando la acumulación de LCR se da dentro del sistema ventricular, y externo (no obstructivo) cuando el LCR se acumula en el espacio subaracnoideo. Son congénitos en su mayoría, pero pueden ser también adquiridos (Krishnamurthy & Li, 2014). El hidrocéfalo ha sido observado en bovinos, ovinos, caninos, felinos y equinos (Leech

et al., 1978; Thomas, 2010; Masucci et al., 2012; Scarpante et al., 2013; Sipma et al., 2013).

El NH es un defecto genético autosómico, recesivo, letal de la raza AA, producto de una mutación en un par de bases que afecta el normal funcionamiento de una proteína aun no identificada que regula el desarrollo y mantenimiento del SNC (Gentile et al., 2012). Los animales afectados generalmente mueren al nacimiento o cercano al mismo con un peso de entre 11 y 16 kilos (Whitlock, 2010; Gentile et al., 2012).

Estudios moleculares demostraron que la mutación se originó en el toro GAR Precision 1680, y a la vez su hijo CA Future Direction 5321 se considera portador de NH y también de otra enfermedad hereditaria del AA llamada Artrogriposis múltiple. Por eso se considera que la frecuencia de las mutaciones de AM y NH son similares, sin embargo el número de terneros afectados por AM es mayor que el número de terneros afectados por NH debido a las pérdidas fetales (50-70 %) que se dan en el NH (Windsor et al., 2011a). En Estados Unidos el genotipado de 934 toros de elite AA, encontró que 91 toros eran portadores de la mutación responsable del NH (Beever, 2009).

En Uruguay, el hidrocéfalo solo o asociado a otras patologías como microftalmia o artrogriposis ha sido diagnosticado en diferentes predios comerciales y en diferentes razas o cruza. En rodeos comerciales con predominio de la raza AA se ha reportado esta enfermedad en al menos 3 predios diferentes en la región Este. En la mayoría de los casos el motivo de consulta fue por aborto y/o mortalidad perinatal. En uno de los animales remitidos al laboratorio la cabeza era marcadamente agrandada y los huesos del cráneo estaban separados, malformados y se desintegraban fácilmente. El cráneo estaba lleno de LCR y el SNC colapsó al abrir el cráneo (**Figura 13 y 14**). En todos los casos se descartó Diarrea Viral Bovina. La mutación aún no fue demostrada.



Figura 13: Hidrocéfalo Neuropático. Ternero AA de 8 días de edad con deformación del cráneo (Fototeca de DILAVE Regional Este).

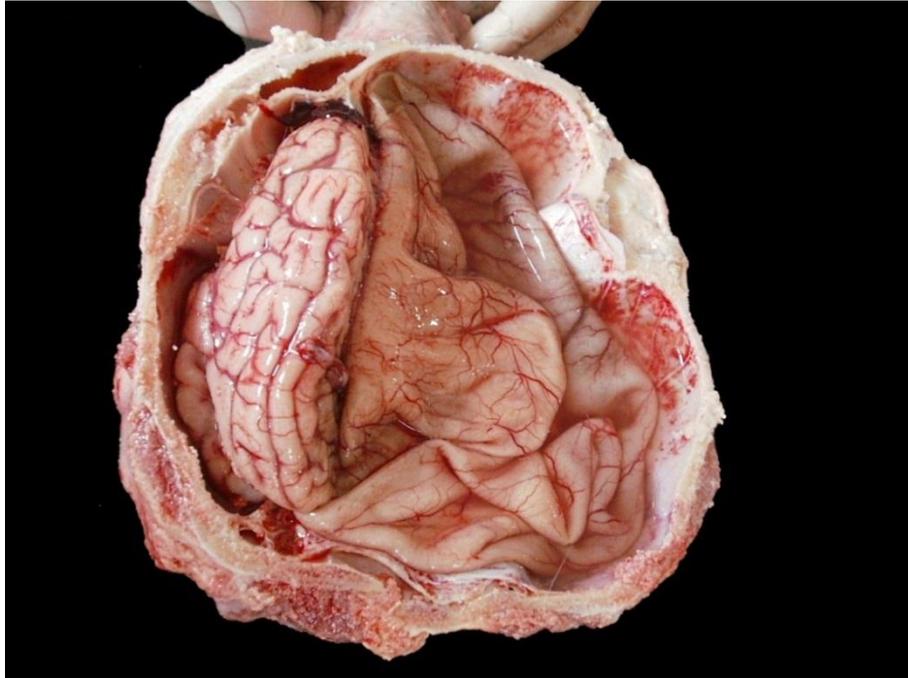


Figura 14: Hidrocéfalo Neuropático, ternero AA de 8 días de edad. SNC colapsado al abrir cavidad craneana (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Artrogriposis múltiple en Aberdeen Angus

La AM es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, del ganado AA que resulta en el nacimiento de terneros con severa contracción de las articulaciones de los miembros. La enfermedad también se conoce con el nombre de “curly calf syndrome”. Este trastorno se describió por primera vez en el año 2002 en Estados Unidos y posteriormente en diferentes países (Whitlock, 2010; Windsor et al., 2011b).

La enfermedad se produce por un defecto en la conexión entre los sistemas neuronal y muscular, resultando en un fallo del movimiento del feto *in útero*, lo cual produce un desarrollo muscular deficiente. Los terneros afectados nacen a término y mueren poco antes o durante el parto. El peso al nacer es notablemente inferior (15-25 kg), debido al limitado desarrollo muscular, sin embargo los partos distócicos son frecuentes por la deformación esquelética de los animales. Los animales presentan los miembros contraídos y rígidos, con desviación de la columna vertebral y de los huesos faciales. En algunos casos se observa paladar hendido e hidrocefalia leve (Whitlock, 2010).

El defecto se originó aparentemente en el toro 9J9, pero fue un nieto de este, GAR Precision 1680 (toro destacado por transmitir a sus crías de bajo peso al nacer y alto peso al destete) el cual diseminó la enfermedad a través de sus más de 10000 hijos según la American Angus Association. En Australia, el principal difusor ha sido CA Future Direction 5321 (Windsor et al., 2011a). En un estudio realizado en Estados Unidos se analizaron 761 toros AA de cabaña y se estimó la prevalencia de portadores en un 8 %, y a su vez mediante registros genealógicos se comprobó que estaban directamente relacionados con GAR Precision 1680 y 9J9 (Beever & Marron, 2011). La enfermedad se debe a una delección de 23,363 bp que abarca 3 genes diferentes, ISG15, HES4 y AGRN, uno de los cuales está implicado en el desarrollo del tejido nervioso y muscular (Beever & Marron, 2011).

En el Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este hemos diagnosticado esta enfermedad en el año 2017, en un rodeo AA negro del departamento de Rocha. En un establecimiento agropecuario donde se realizó inseminación artificial a tiempo fijo en un lote de 30 vacas AA se observó el nacimiento de 2 animales defectuosos. Los 2 partos requirieron de cesárea. Se había utilizado semen procedente de un centro de inseminación argentino. En uno de los animales remitidos al laboratorio se observó artrogriposis en los 4 miembros, desviación severa de la columna vertebral y desarrollo muscular incompleto (**Figura15**).



Figura 15: Artrogriposis múltiple. Mortinato AA artrogriposis en los 4 miembros y desarrollo muscular deficiente (Fototeca de DILAVE Regional Este).

Lisencefalia- Paquigiria con hipoplasia cerebelosa en Polled Hereford

La Lisencefalia o Agiria (cerebro liso) es una malformación del desarrollo de la corteza cerebral que aparece con una deficiente formación de las circunvoluciones cerebrales. La misma se origina durante el desarrollo embrionario por un defecto en la migración de los neuroblastos desde la zona ventricular y periventricular hacia la corteza cerebral (Cantile & Youssef, 2015). En la Lisencefalia la corteza cerebral se caracteriza por presentar una superficie cerebral lisa, sin surcos, mientras que en la paquigiria la corteza presenta pocas circunvoluciones pero excesivamente gruesas (Guerrini & Parrini, 2010). La corteza cerebral normalmente está compuesta de seis capas neuronales, pero en la lisencefalia sólo hay cuatro capas desorganizadas (Guerrini & Parrini, 2010).

La Lisencefalia con Hipoplasia Cerebelosa ha sido comunicada en bovinos, ovinos, caprinos, caninos y felinos (Herrmann et al., 2011; Pérez et al., 2013; Soares dos Santos et al., 2013; Fraser et al., 2016; Lemos dos Santos et al., 2016). En ovinos de la raza Churra se trata de una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva debido a una delección de 31 bp en el exón 36 del gen RELN. Recientemente, en los animales afectados se encontraron niveles bajos de la proteína reelina, que se encuentra principalmente en el SNC, y es muy importante en la regulación de la migración neuronal (Suárez Vega et al., 2013).

En el Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este se diagnosticó esta enfermedad en el año 2017, en un rodeo PHe del departamento de Lavalleja. Se trataba de un rodeo de vacas de cría en parición, las cuales habían sido servidas con un toro PHe de pedigrí. Al nacer los animales presentaban sintomatología nerviosa y muerte en pocas horas o días. Uno de los terneros se remitió vivo al laboratorio por sospecha de MSUD, ya que ese predio tenía antecedentes de esta enfermedad. El animal presentaba debilidad, incapacidad para mantenerse de pie, rigidez muscular y finalmente decúbito. A la necropsia se observó a nivel del SNC paquigiria con pocas circunvoluciones cerebrales, e hipoplasia cerebelosa (**Figura 16**). Al corte transversal del SNC se observó la sustancia gris engrosada, la sustancia blanca delgada, y la interfaz gris-blanca bien definida.



Figura 16: Lisencefalia- Paquigiria. Ternero PHe 1 día de edad. SNC con escasas circunvoluciones cerebrales e hipoplasia cerebelosa (Fototeca de DILAVE Regional Este).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En la región Este del país existe diagnóstico patológico y molecular de varias enfermedades hereditarias en las razas PHe/He y AA, sin embargo se desconoce la prevalencia y difusión de las mismas y tampoco su impacto económico en el rodeo de cría regional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

El diagnóstico de rutina de las enfermedades hereditarias en nuestro país se realiza mediante la patología macroscópica e histopatología, y su confirmación a nivel molecular requiere del envío de las muestras al exterior.

A pesar de existir numerosos registros y reportes de casos en la zona Este, aún se desconoce la frecuencia alélica de las enfermedades que aparentemente tendrían mayor importancia a nivel regional, tales como MSUD, OS y Sindactilia. Actualmente no se dispone, a nivel local, de técnicas validadas para diagnóstico de rutina de este tipo de patologías.

HIPÓTESIS

Los genes deletéreos de MSUD en PHe/He, OS y Sindactilia en AA están difundidos en las cabañas de elite y rodeos comerciales de la región Este.

Objetivo General

Analizar y diagnosticar a nivel molecular las enfermedades hereditarias MSUD, OS y Sindactilia en rodeos de cría comerciales y toros de pedigrí de la región Este del Uruguay.

Objetivos Específicos

Determinar la frecuencia alélica del gen responsable de la OS en los toros AA de pedigrí comercializados en la región Este.

Determinar la frecuencia alélica del gen responsable del MSUD en los toros PHe/He de pedigrí comercializados en la región Este y en un rodeo PHe comercial.

Poner a punto las técnicas moleculares para el diagnóstico a nivel nacional de MSUD, OS y Sindactilia.

Realizar el diagnóstico patológico y molecular de un caso clínico de sindactilia en un ternero AA.

Desarrollar un banco de ADN a partir de las muestras recolectadas de los reproductores machos y hembras muestreados en el presente proyecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras.

Se realizó un muestreo censal de todos los toros de pedigrí de las razas He, PHe y AA, que concurrieron a las exposiciones ganaderas de Treinta y Tres (33°13'51"S 54°22'56"O), Minas (34°22'00"S 55°14'00"O) y Melo (32°22'05"S 54°10'04"O) en los años 2015 y 2016 (**Tabla II**). Al momento de la recepción de los animales en cada una de las exposiciones, conjuntamente con el jurado de admisión integrado por veterinarios del ejercicio liberal y de la Asociación Rural del Uruguay, y con autorización de los cabañeros, se recolectaron pelos de región de la cola asegurando que los mismos incluyeran los folículos pilosos. Luego de la extracción, cada muestra fue colocada en sobre de papel e identificadas con la raza, edad del toro y número de registro en la Asociación Rural del Uruguay.

Tabla II.

Total de muestras de toros de pedigrí, distribuidas según raza, variedad y cabaña.

Raza	PHe	He	Total
Toros	107	17	124
Cabañas	20	3	23

Raza	AA	RA*	Total
Toros	77	15	92
Cabañas	15	5	20

He: Hereford; PHe: Polled Hereford; AA: Aberdeen Angus; RA Red Angus.

*: En Uruguay se encuentra dentro de la raza AA.

Por otro lado, en un establecimiento agropecuario con antecedentes de MSUD, ubicado en la 10^a seccional de Lavalleja, región Este de Uruguay, se realizó extracción de sangre venosa de 86 vacas PHe de descarte por problemas reproductivos. Se utilizaron en este caso tubos Vacutainer con EDTA (150U/10 ml de sangre) y agujas descartables (18G).

Por último en un ternero de la raza AA negro, que al nacimiento presentaba sindactilia severa en las cuatro extremidades, se le realizó extracción de 10 cc de sangre en tubos con anticoagulante EDTA.

En todos los casos se siguieron los protocolos de la Comisión de experimentación animal de nuestro País.

Extracción de ácidos nucleicos.

Bulbo piloso

La extracción de ADN del bulbo piloso de los toros de exposición se realizó en la unidad de Biotecnología del Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este. Para la misma se utilizó el protocolo comercial de Zymo Research[®] modificado. De cada una de las muestras se seleccionaron y acondicionaron 6-8 pelos en microtubo a 0.5-1 cm de la base del pelo (asegurando la presencia del folículo piloso) y se lavaron con agua destilada y alcohol etanol (96-100 %). Se realizó pre digestión con 600µL de buffer de lisis, 7µL de Proteínasa K (20mg/ml) y se incubó a 50-55 °C durante 12 hr. Luego se continuó de acuerdo al protocolo de Zymo Research[®] (**Anexo1**).

ADN de vacas

Para la extracción de ADN de las muestras de sangre entera de las vacas He de refugio se utilizó el protocolo del Laboratorio del Banco de ADN Genómico Animal de la Unidad de Biotecnología del INIA Las Brujas (**Anexo 2**).

ADN de ternero con Sindactilia

La extracción de ADN del caso clínico del ternero afectado con sindactilia y de dos bovinos normales se realizó en el laboratorio del Área Genética de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (FVET-UdelaR) a partir de 5 ml de sangre periférica extraída en tubos con EDTA utilizando el kit ZR Genomic DNATM – Tissue Mini Prep (ZYMO Research).

Concentración de ADN

La concentración de ADN de las diferentes muestras se determinó por nanodrop a 260 nm (ND 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) y su calidad por la relación OD260/OD280. Para que la calidad y pureza del ADN sea óptima, el valor debe estar entre 1,7 y 2,0. Para este estudio se utilizó el equipo perteneciente a la Plataforma de ácidos nucleicos LEMA2-Genética2 de la Facultad de Veterinaria (**Anexo 3**).

MSUD - PCR tiempo real y análisis por HRM

Para identificar la mutación MSUD-248 en las muestras provenientes de animales He/PHe (124 toros y 86 vacas de cría) se realizó PCR en tiempo real y análisis por HRM. Se utilizó el kit Type-it® HRM PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania) con el intercalante fluorescente EvaGreen siguiendo las condiciones de reacción del fabricante para un volumen final de 25 µL. Los primers utilizados fueron los descriptos por Dennis y Healy (1999). El equipo utilizado fue el Rotor-Gene Q (Corbett) el cual cuenta con un canal específico para HRM. Las condiciones de ciclado fueron 10 min de 95°C, 40 ciclos de 10s a 95°C, 30s a 59°C y 10s a 72°C, y una extensión final de 5min a 72°C. La curva de melting fue generada incrementando la temperatura desde 65°C a 95°C a una velocidad de 0.05°C/s. El análisis de HRM se realizó utilizando el software Rotor Gene versión 1.7.28 que permitió identificar las curvas de melting en la zona estable de fluorescencia (**Figura 17**).

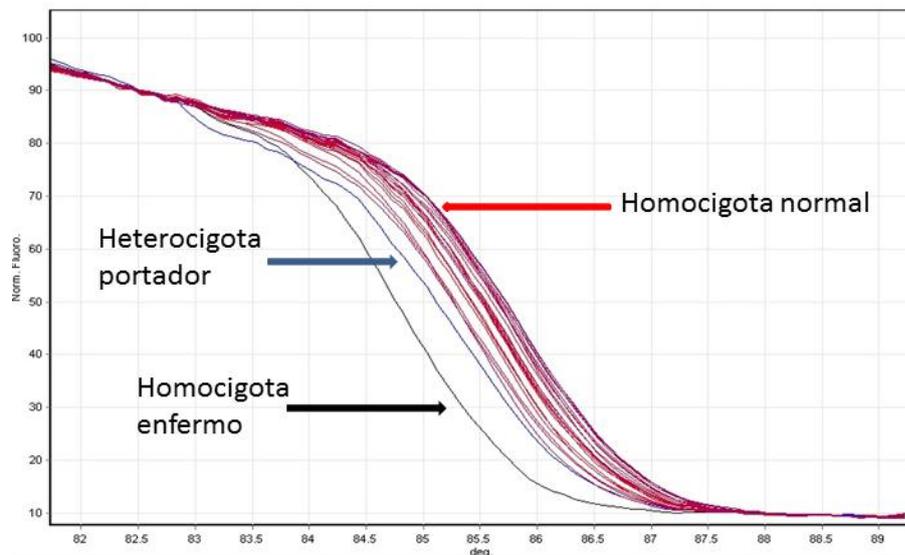


Figura 17. Normalización de las curvas de melting en función de la fluorescencia con respecto a la temperatura. Se observan tres patrones de genotipos: homocigota normal (flecha color rojo), homocigota enfermo (flecha color negro) y heterocigota portador (flecha color azul).

Luego, se normalizó con respecto a un control homocigota normal y con un control positivo (homocigota recesivo) de un ternero enfermo de MSUD 248, confirmado previamente mediante secuenciación. El software identificó el genotipo de cada muestra analizada con un porcentaje de confianza mayor a 90%.

MSUD-Secuenciación

La confirmación del genotipado fue evaluada mediante secuenciación de los productos amplificados por PCR. Se enviaron a secuenciar 67 muestras de los toros y 24 muestras de las vacas de cría a la empresa MACROGEN (Corea). Se solicitó la secuenciación de la cadena reversa por considerarse que es la cadena en la que se observa mejor la mutación. Finalmente, las secuencias fueron alineadas utilizando los softwares BioEdit (BioEdit- Sequence Alignment Editor, 7.0.5, Estados Unidos).

OSTEOPETROSIS - PCR tiempo final

Para la detección de la mutación de OS se realizó PCR tiempo final en todas las muestras provenientes de animales AA/RA.

El análisis de la delección se realizó basado en la diferencia de amplificación entre el mutado y el normal usando un trío de cebadores descritos por Meyers et al 2010. Un cebador delantero (5'-GGG AAG GGA AGC ACT AAG ACT-3') fue usado en combinación con un cebador inverso ubicado en la zona de la delección (5'-TGG AGA GAC AGC AGC AGA GAT-3') para obtener un producto de 475 bp que representa el alelo normal, y un segundo cebador inverso ubicado a través de punto de quiebre de la delección (5'-GGT GGA TGT GAT GGG AAG ACT-3') para obtener un producto de 330 bp que representa el alelo mutante. El PCR fue realizado para un volumen final de 50 µL, conteniendo 30-50 ng de ADN 5 µL, 2X buffer de PCR: MangoMix™ 25 µL, 2.5 µL de cada cebador y 12.5 µL de agua ultra pura.

El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 31 ciclos de 45s a 94 °C, 45s a 72 °C y 45s a 72 °C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.6%. Para la preparación del gel se utilizó 1.6 gr de Agarosa, 100 ml de solución Buffer TAE y 5 µL de Good ViewTM Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.). Una vez disuelta la agarosa se colocó en un molde con un peine para 15 pocillos.

Se cargó el gel con 5 µL de marcador de peso molecular como referencia (AccuRuler 100 bp DNA RTU Ladder de Maestrogen) y 15 µL de producto de PCR. Se realizó la corrida electroforética durante 40 minutos a 100 watts. Se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta de acuerdo al peso molecular esperado. El PCR tiempo final se realizó en su totalidad en la Unidad de Biotecnología del Laboratorio Miguel C. Rubino Regional Este.

SINDACTILIA-PCR tiempo final y secuenciación

Se realizó la amplificación por PCR en tiempo final de la región del gen LRP4 Ex-In 31,32 y 37. El amplicón obtenido se secuenció (ambas cadenas) en el Servicio de Secuenciación de la UNIZAR (Zaragoza-España) y la resecuenciación en el Servicio de secuenciación automatizada de MACROGEN-Corea.

Se realizó la amplificación por PCR de regiones del gen LRP4 con los juegos de cebadores DQ462703 (Gen Bank Accession number): 5'AGC GTG TGG ACA AGT ACT CAG3' (21 Mer) y 5'ACC TCA AGC TCA AAG CTC CTA3' (21 Mer) (Duchesne et al., 2006) y el juego de cebadores (ExIn37) MEJ415 5' GTG TGT CAT ATG ATC CCA CAC TCT TCT ATG TTC TGT TCC AC 3' (41 Mer) y MEJ416 5' GTG TGT AAG CTT AGG GCC CCT CAA GCT GGT CCC TCG CAA GCT G -3' (45 Mer) (Johnson et al., 2006). Se utilizó un programa convencional de 35 ciclos con 52°C y 57°C de hibridización respectivamente (Johnson et al., 2006; Romero Velázquez et al., 2015).

Una vez obtenida la secuenciación de dicha región se analizó la información obtenida con la base de datos Genome assembly BtauUMD 3.1 mediante la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la herramienta Clustal IW multiple alignment del software Bio Edit Sequence Alignment editor.

RESULTADOS

MSUD – Vacas PHe

De las 86 muestras pertenecientes a las vacas PHe, para confirmación del diagnóstico de MSUD, se enviaron los 24 productos de PCR que dieron variación en PCR-HRM (**Figura 18 y 19**).

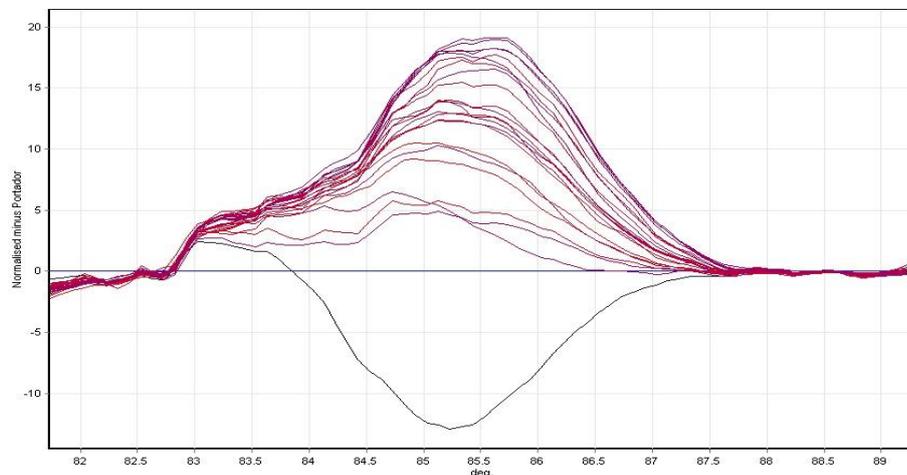


Figura 18. Normalización de las muestras con respecto a una vaca PHe heterocigota portadora de MSUD C248>T.

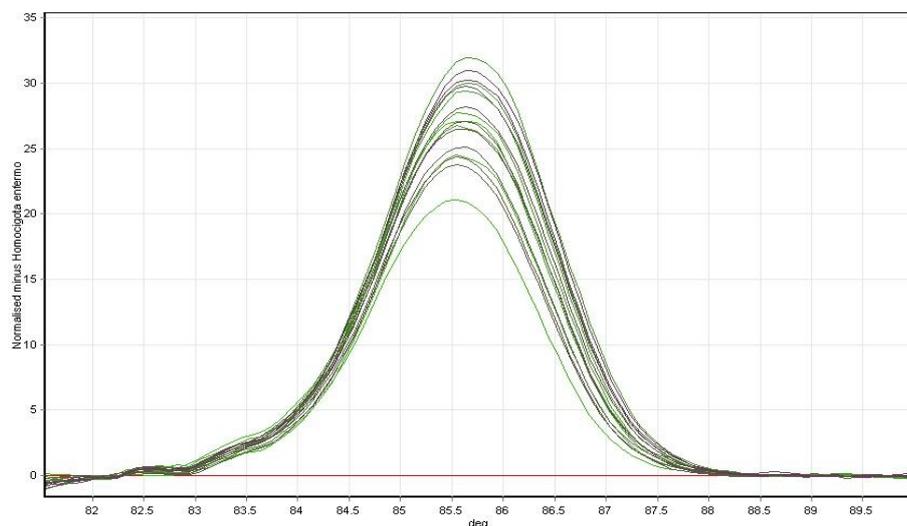


Figura 19. Normalización de las muestras con respecto a un control homocigota enfermo de MSUD248.

Mediante la secuenciación del producto amplificado por PCR se detectó la presencia de la mutación en 3 animales (3.5%). En el electroferograma de la secuencia inversa de una vaca portadora de MSUD C>T248 se detectaron los nucleótidos A y G en la región líder del gen BCDHA en el sitio de corte con la enzima BglI (**Figura 20**).

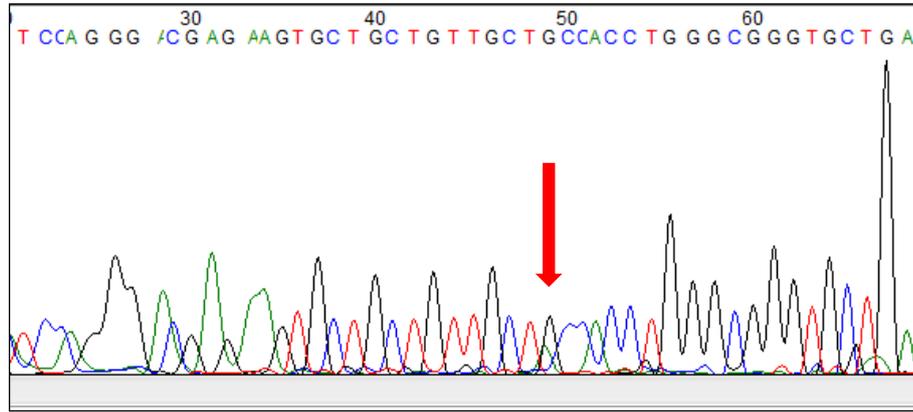


Figura 20. Electroferograma de la secuencia inversa de una vaca heterocigota portadora de MSUD G248>A. Se observa en posición 49 (flecha) la superposición de los nucleótidos G y A (picos negro y verde, respectivamente).

MSUD - Toros PHe/He

De las 124 muestras pertenecientes a los toros He/PHe de pedigrí para confirmación del diagnóstico de MSUD, se enviaron 67 (54%) productos de PCR para secuenciación. En 5 toros (4 %) se observó variación en las curvas de disociación y eran sospechosas de la mutación. La secuenciación del producto amplificado por PCR no detectó la presencia de la mutación (**Figura 21**).

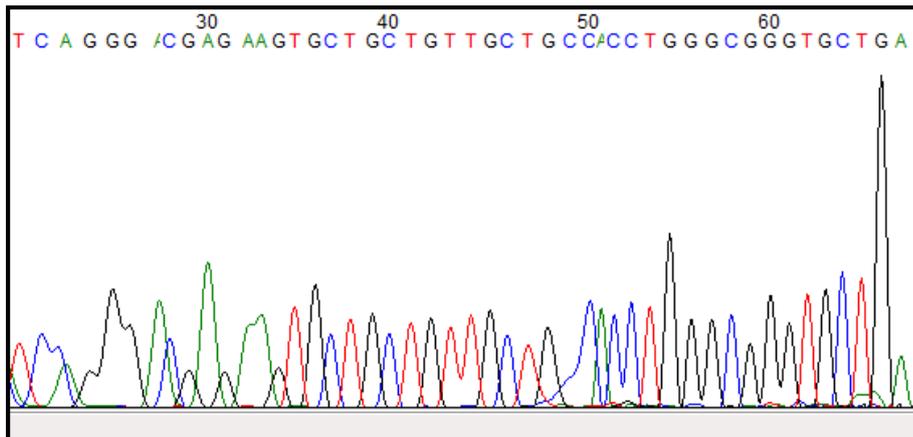


Figura 21: Electroferograma de la secuencia inversa de un toro sano homocigota.

Finalmente, las secuencias, conjuntamente con los controles, fueron alineadas con las secuencias consenso y de referencia del gen BCKDHA utilizando las herramientas *BioEdit* (*BioEdit-Sequence Alignment Editor*)(**Figura 22**).

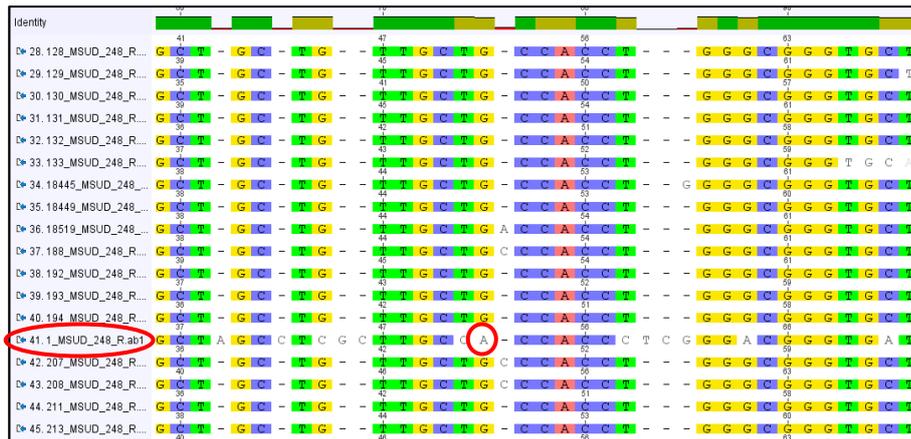


Figura 22: Alineamiento de las secuencias *reverse* de toros sanos (líneas 28, 29, 30, 31, 32, 33, 42, 43, 44, 45), un ternero enfermo (línea 41, control homocigota recesivo) y vacas portadoras de MSUD G248>A(líneas 34, 35, 36). En círculo rojo se observa la mutación en el nucleótido A de la secuencia del ternero enfermo.

Osteopetrosis - Toros AA/RA

De las 92 muestras de los toros AA/RA, en 62 se obtuvo un amplicón correspondiente al alelo normal (67%), mientras que en 29 muestras no se logró amplificar el segmento (**Figura 23**). Solamente se logró identificar un portador (1.6%) de OS, aunque la señal no era muy clara.

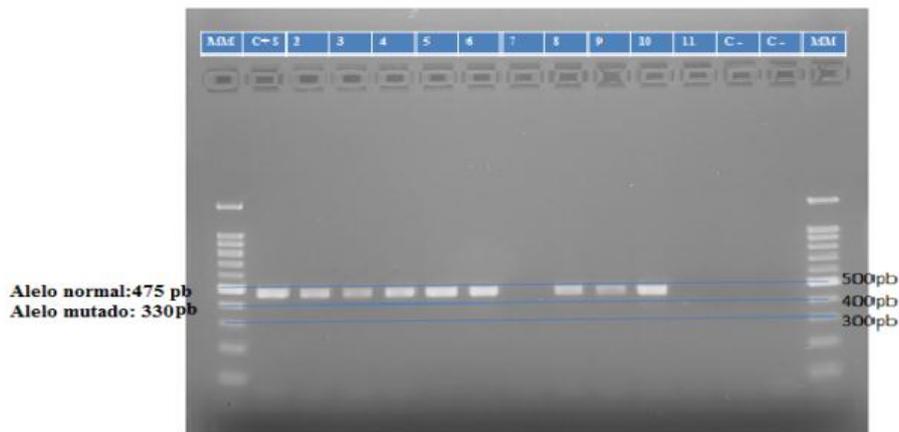


Figura 23: Gel de agarosa al 1.6% con Good View. MM:marcador de peso molecular; C+: control sano; C - : control negativo; 7 y 11 No amplificó; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10: Amplificación Alelo sano.

Sindactilia- Ternero AA

Mediante PCR se obtuvieron amplicones de aproximadamente 500 y 600 pb respectivamente. El análisis de las secuenciaciones y resecuenciaciones reveló que las amplificaciones obtenidas con el juego de cebadores DQ462703 tenían un 100% de concordancia de alineación con la secuencia referencia del genoma bovino en parte del exón 31, la totalidad del intrón 32 y exón 32 (**Figura 24 y 25**) a diferencia de lo reportado en trabajos previos donde este juego de cebadores se utilizó para amplificar el exón 33 (Duchesne et al., 2006).

Al realizar el alineamiento del fragmento secuenciado del animal afectado con las secuencias controles y de referencia del Btau no se identificaron mutaciones. Por otro lado, al analizar las resecuenciaciones producto de las amplificaciones

obtenidas con el juego de cebadores MEJ415/416 se encontró que éstas presentaban un 100% de concordancia con la región Exón/Intrón 37 y al realizar el alineamiento del fragmento secuenciado del animal afectado con las secuencias controles y de referencia del Btau se identificó la mutación puntual c. 5385 +1 G>A en forma homocigota (A/A, región Ex-In 37 AGAGATG) en el animal afectado con sindactilia.

```

AATGGGCTGAGGCACGGAAAGCTGTGGTGGGGTCTGCCTATTAATAGTTACCCCTTTGGGG
TCCCCTTGTGAGTAGCAGGCAGGGTGGATCTACTGGACAGACTGGCAGACCAAGTCCAT
TAGCGTGTGGATAAGTACTCAGSCCGGAACAAGGAGACAGTGTGGCGAACGTGGAGGG
ACTCATGGACATCATCGTGGTCTCCCTCAGCGGCAGACAGGTGGGCTCCCGGTCTGAG
GCTGCTTCCATACCCTGGTGGGGTTCACCTGGTCACCCCAAGGACTGTTAATAACCAAGA
CGATCAGAGCCACCGGAGAGCCACGTTACATCTGAAGCTCTTAGTCCTTTTCGGCCCCC
TGTGTATATCCCTCCTTCCTGCCCACTGTCCTGGGAGTCAGGGAGCCCTGAATCTC
CTCCATTGAGAGCGTCAAACCTGGGAGACTTGATTCTGCCCCAGGCCAGATGTCATT
TGCTTTGCTCATAGGGACCAACGCTTGTGGCGTGAACAACGGCGGATGCACCTCTG
CTTGGCAGAACCCTCGGACTTTGTGTGCCTGTCTGTGATGAGCCCGACGGCCGGCCCTG
CTCCCTCGGTGAGTTGGACTGACGGGGCCCCCTGCAACAGCGGAGCCCTTGCAAGGGCAG
GGGATCAGCAGCTTTTCCATCTGGGTGAGACTGTCCTCAGGGGATCTTACAGCAGAGT
GACTARGAGCTTTGAGCTTGAGCTTGGAAACGGCACAGAGCGGGTTCGTCTGGCTTGGC
ACGTACGTGCGTGTGCATGTGCGTGGCTGTGCTGGGACTTCCTTTGTACGTGGGACTT
CTCTAGTTGCGCGCGCTGGCTTCTTGTGTGGCACATGGGCTTTGGGCTCTGGAGCAG
CGGCTTAGTAGTTCCGTGCATGGGCTTCTCTAGCTGGGGCGCGTGGGCTCAGTTGTCC
TGCAGCACGTAGGATCTTAGTTCCAGCCAGGCATCCAGCCACATCCCTGCAATGGA
AGGCAGGTTCTTAGCCACTGGACCACCGGGGAAGTCCCTGGCTTCTGGCATTTACTAGAA
TGGAAATCAGCTCTCTTGTGTCCTGATCCCTGCTATAACCCGTGCATGACTCTCTTTCT
TCTGGCCCTTTGTGGCCAGCTAGCCCATCCAGAGCTGTTAATATGGAAACCAATCCT
TTTTAGCAAGAAGGACATCTAACAGGCGTGTCTAGGATGAGGGCAGCTAAAAGATGGCTC
CGTCAGGTTCTCCAGATGCTACTCTTGGGCCGAGGTAGATATTTGGGGCTCCAGTGGTC
CAGTCCAGCCCTTGTTTTCTCTCCAGTACCTGGCCTGGTGGCCCCAGCTCCACGGGCTAC
CAGTATGAGTGACAGGAGCCCGTGCTACCCAACATTACCGACTACCTGCGTCTTTC
TACCACCCGGACCCGTACATCTCTGGAGGAGGTGGAAGGGAGGTAAGTGATTTAGTATG
GGCCTGAGGGCTCTTTGATCAAATCTCATCCCTGCCAGAGACCACCATAGTCCAGCT

```

Figura 24. Secuencia amplificada con el juego de cebadores DQ462703 (indicados en los recuadros rojos). Las regiones rosadas corresponden a los exónes 31, 32 y 33 respectivamente de acuerdo al Genome assembly BtauUMD3.1.

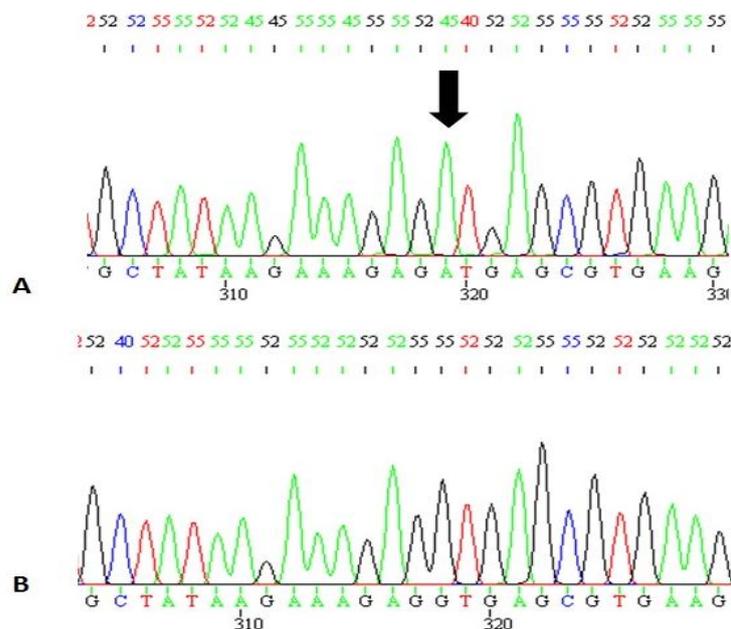


Figura 25. Cromatograma parcial de la resecuenciación de la región Ex-In 37 del animal afectado (A) y de uno de los animales normales control (B). La flecha indica la región de la mutación puntual en el animal afectado de genotipo homocigota A/A (AGAGATG) mientras que el animal control es homocigota G/G (AGAGGTG).

DISCUSIÓN

El presente trabajo se trata del primer estudio realizado en Uruguay en toros y vacas de pedigrí de las razas PHe/He y AA sobre algunas de las enfermedades hereditarias de mayor importancia registradas en la zona Este, la mayor zona criadora del país. El mismo es un estudio preliminar de tipo exploratorio que permitió poner a punto la metodología y la realización de diversas pruebas de diagnóstico molecular para MSUD en Hereford y Osteopetrosis y Sindactilia en AA. Esto facilitará en el futuro el diagnóstico de estas enfermedades en el país y la realización de muestreos poblacionales aleatorios de mayor escala a nivel predial, regional o nacional.

El principal inconveniente encontrado en la presente tesis fue el procesamiento de los pelos de la región de la cola, ya que en los toros de pedigrí muestreados en las exposiciones ganaderas la materia fecal es muy líquida y la contaminación es muy alta, lo que disminuye la calidad del ADN extraído (Jolly & Windsor, 2010). En nuestro caso, el muestreo se realizó al momento del ingreso de los toros a la exposición, durante el jurado de admisión, momento en el que la extracción de sangre no está permitida, ni es posible de realizar, por la agilidad del trabajo, por lo que solo fue posible la extracción de pelos. Esto puede explicar el bajo porcentaje de muestras con ADN calidad aceptable (4 %) en los toros PHe/He y 31.5 % de las muestras de los toros AA donde no se logró ningún amplicón, lo que contrasta con la alta calidad de ADN de las vacas de pedigrí en las que se utilizó sangre extraída directamente en el predio. Para estudios futuros donde se cuenten con más recursos se debería trabajar con ADN proveniente de sangre como forma de obtener muestras de mejor calidad diagnóstica.

En el caso de los toros PHe, la mutación para MSUD fue positiva en 5 (7.4 %) de los 67 animales en los que fue posible realizar el PCR-HRM. Sin embargo, los mismos no pudieron ser confirmados mediante secuenciación, siendo la discrepancia muy posiblemente debida a la utilización de diferentes matrices (sangre vs. pelo) entre PCR-HRM y secuenciación. Para el análisis de las muestras de los toros He/PHe mediante PCR-HRM, los controles positivos que disponíamos eran de ADN proveniente de sangre, mientras que las muestras de los toros provenían de ADN de folículos pilosos. Las condiciones ideales hubiesen sido trabajar con sangre también de los toros, como forma de mantener uniformidad en la concentración de reactivos, volúmenes de reacción y protocolos de extracción de ADN (Martín Núñez et al., 2012).

Por el contrario, en el rodeo de cría PHe sí se confirmó la presencia de la mutación responsable del MSUD en 3.5% de las vacas de cría, existiendo sí en este caso concordancia entre PCR-HRM y secuenciación. Esto confirma que dicha mutación ha traspasado los planteles de pedigrí y se ha difundido en rodeos comerciales de la zona Este (Dutra, 2016). La prevalencia de vacas heterocigotas para MSUD de 3.5 %, es superior a la reportada en otros trabajos donde se menciona una prevalencia de 1-2 % (Healy et al., 2002). Estos animales portadores fueron descartados al momento del diagnóstico de gestación por encontrarse vacíos. Al respecto podría mencionarse que en estas vacas existían problemas de infertilidad y/o mortalidad embrionaria tal como lo sugieren otros trabajos (Healy et al., 1985; Harper et al., 1990). En un rodeo de cría donde se encuentre presente el MSUD, la incidencia real de la enfermedad podría ser incluso mayor, ya que la prevalencia observada al nacimiento no incluye pérdidas embrionarias y fetales, y que pueden ser parte de las pérdidas causadas

por la enfermedad (Healy et al., 1985; Baird et al., 1987). Nuestro país cuenta con el rodeo He/PHe más grande del mundo (DIEA, 2003) por lo que era de esperar que la prevalencia de MSUD sea igual o mayor a la encontrada en otros países. En Australia luego de introducir pruebas de PCR como método de control en las cabañas la prevalencia de heterocigotos pasó de 5.8 % a 0.7 % (Healy & Dennis, 1995). Pero como indicamos, existen pérdidas silenciosas que pasan desapercibidas, y cuando llama la atención de productores o cabañeros, el gen defectuoso se encuentra ya ampliamente difundido en el rodeo (Dutra, 2016). Como mencionamos anteriormente, en este predio con antecedentes de MSUD, se presentó posteriormente un caso de Lisencefalia/Paquigiria con hipoplasia cerebelosa. Posiblemente el nivel de endogamia de este establecimiento sea elevado y pueda explicar la presentación de esta nueva enfermedad congénita/hereditaria. En este rodeo PHe se confirmó anteriormente a la presente tesis, la presencia de un toro como responsable de haber introducido la mutación para MSUD, pero se desconoce actualmente cual es la situación respecto a la Lisencefalia/Paquigiria.

En el caso de la OS, solamente 1 de 62 toros (1.6%) de los que pudo obtenerse ADN de calidad resultó ser positivo de tener la mutación, aunque la señal en la corrida electroforética fue muy débil. Según Dutra et al (2012b), dicha mutación está presente en rodeos comerciales de nuestro país, y a su vez diferentes cabañas han utilizado germoplasma proveniente de toros portadores, como por ejemplo la línea BUF CRK ROMEO. Posiblemente los toros analizados en el presente estudio no correspondan a ninguna de estas líneas portadoras que han sido importadas a nuestro país, así como también la utilización de pelos pueda haber influido en la calidad del ADN y en los análisis posteriores. La OS se da con mayor frecuencia en el AA colorado que en el negro y en este estudio el AA colorado representaba solamente el 16.3 % del total de toros AA/RA. Sin embargo, en Uruguay, a diferencia de otros países, el AA negro y colorado se mantiene unificado en el mismo registro genealógico, y por lo tanto hay un intercambio libre de germoplasma entre ambas variedades. Por lo que es de esperar que la mutación se presente tanto en la variedad colorada como negra (Dutra et al., 2012b).

En el presente trabajo también se realizó por primera vez en el país el diagnóstico patológico de Sindactilia en AA que se confirmó mediante PCR y secuenciación. Mediante análisis molecular de la región secuenciada pudimos identificar la mutación puntual de cambio de base (sustitución de la guanina por la adenina) en el sitio de corte y empalme entre exón 37 e intrón 37 del gen LRP4. La mutación encontrada se corresponde con la reportada para esta raza (Johnson et al., 2006).

En Uruguay, el diagnóstico patológico y/o molecular de varias enfermedades hereditarias en los últimos años demuestra que la difusión de diferentes defectos recesivos es innegable (Kelly et al., 2012; Dutra, 2016). Los sistemas de producción de carne comercial en nuestro país son bastante particulares ya que se realizan principalmente con la utilización de razas puras He (76 %) y AA (20 %) (DIEA, 2003), y con escasos cruzamientos comparado con otros países (Gimeno et al., 2002; Pereyra et al., 2015). Además, existe un uso extendido de tecnologías de la reproducción de última generación en la mayoría de las cabañas, con utilización de material genético de pocos animales o líneas dentro de cada raza (Mc Daniel, 2001; Weigel, 2001; Dutra, 2016). Todos estos factores

llevan a cierto grado de consanguinidad, donde el primer indicador es la pérdida reproductiva (Dutra, 2016).

Dado que la falta de diagnóstico e investigación es la principal causa de difusión de genes deletéreos en el rodeo nacional, productores comerciales y cabañeros deben reportar y remitir todo tipo de anomalías congénitas a los laboratorios de diagnóstico como forma de mantener una vigilancia adecuada (Gentile & Testoni, 2006; Agerholm, 2007). A su vez es conveniente que las sociedades de criadores de las diferentes razas establezcan programas para reducir la posibilidad de difusión de los genes defectuosos y promuevan el uso de las pruebas diagnósticas en los animales de pedigrí (Jolly & Windsor, 2010; Whitlock, 2010). Las asociaciones de criadores de Nueva Zelanda, Australia, Canadá y Estados Unidos tienen sus marcos regulatorios donde reconocen los diferentes defectos genéticos y a su vez desarrollan políticas tendientes a controlarlos, para lo cual mantienen un listado actualizado de los animales conocidos como portadores y libres para las condiciones genéticas reconocidas, y también los laboratorios autorizados para la realización de los diferentes test genéticos.

El mejor control de las enfermedades hereditarias es evitar el cruzamiento de portadores de mutaciones genéticas. Sin embargo, muchos portadores de defectos hereditarios tienen un fenotipo normal y muchas veces deseado para otras aptitudes productivas, por lo que en este caso deberían ser apareados con un animal libre de la mutación (Parish & Smith, 2010). Si se dispone de test diagnósticos, es de suma importancia la elección de toros de reemplazo libres ya que de esta manera no ingresamos la mutación al rodeo. Sin embargo cuando no se dispone de pruebas moleculares y existe diagnóstico de alguna de las enfermedades, es importante que los toros de reemplazo procedan de diferentes proveedores como forma de agrandar el pool genético dentro del rodeo y a la vez disminuir las posibilidades de endogamia. En este caso la utilización de cruzamientos en forma sistemática aseguraría en teoría la no presentación de la enfermedad en cuestión (Schalles et al., 1999; Jolly & Windsor, 2010).

En futuras investigaciones sobre el MSUD, en rodeos de cría donde se conoce la presencia de la mutación genética se hace necesario estimar las pérdidas ocasionadas por dicha enfermedad. En vientres portadores de la mutación se podrían evaluar las pérdidas ocasionadas por infertilidad, mortalidad embrionaria y/o fetal. Por otro lado, con mayor disponibilidad de recursos en toros de pedigrí se debería considerar un muestreo aleatorio, así como también utilización de sangre como matriz para obtener un ADN de mejor calidad y a su vez uniformizar las muestras con los controles disponibles.

Por último, a nivel nacional se hace imprescindible equipar los laboratorios de diagnóstico y desarrollar líneas de investigación para estimar la prevalencia y difusión de los diferentes genes deletéreos involucrados. La difusión de estos es indiscutible, sin embargo, se desconoce su real impacto económico en los rodeos de cría comerciales de la región.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la presencia del alelo mutante recesivo para la enfermedad MSUD en la población de vacas Polled Hereford. Lo que demuestra que la mutación se encuentra en los rodeos de cría comerciales de nuestro país.

La técnica de HRM permitió diferenciar claramente genotipos homocigotas normales y heterocigotas portadores de MSUD. El tamaño del amplicón (94 pb) de la enfermedad se ajusta perfectamente a los requisitos del protocolo para la aplicación HRM, que está comprendido dentro del rango (70 a 150 pb).

La técnica PCR-HRM como técnica de rutina en el laboratorio para detectar la mutación, es de gran utilidad siempre que controles positivos y muestras problema provengan de ADN de buena calidad y de la misma matriz (sangre).

En los toros AA/RA de pedigrí se demostró la presencia de un animal portador de la mutación para Osteopetrosis.

La calidad de ADN extraído de los folículos pilosos de los toros de pedigrí no llegó a los mínimos requeridos de calidad (96 % de las muestras) lo que puede haber interferido en los resultados finales.

El surgimiento de nuevas enfermedades congénitas/hereditarias en predios con antecedentes de otras patologías de este tipo, muestra que en algunos rodeos la endogamia puede ser importante y esté afectando los índices reproductivos.

En el caso estudiado de sindactilia éste presentó una manifestación fenotípica más severa por la presencia de acortamiento de ambos huesos tibiales y se identificó la mutación puntual en homocigosis en la región Ex-In 37.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agerholm J.S. (2007). Complex vertebral malformation syndrome in Holstein cattle: the story so far. *Acta Vet. Scand.* 49(Suppl 1):S5.
2. Askmyr MK, Fasth A, Richter J. (2008). Towards a better understanding and new therapeutics of osteopetrosis. *Br J Haematol* 140:597-609.
3. Baird JD, Wojcinski ZW, Wise AP, Godkin MA (1987). Maple syrup urine disease in five Hereford calves in Ontario. *Can Vet J* 28:505-511.
4. Beever J. (2009). An Update on Neuropathic Hydrocephalus in Cattle. Range Beef Cow Symposium. University of Illinois.
5. Beever JE, Marron BM. (2011). Screening for arthrogryposis multiplex in bovines. <http://www.freepatentsonline.com/y2011/0151440.html>.
6. Brown DL, Van Winkle T, Cecere T, Rushton S, Brachelente C, Cullen JM. (2010). Congenital hepatic fibrosis in 5 dogs. *Vet Pathol* 47: 102-7.
7. Cantile C, Youssef S (2015). Nervous System En: M. Grant Maxie (ed.) Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals. 6a ed. WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 1.
8. Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. (2006). Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 136:243-249.
9. Ciepłoch A, Rutkowska K Oprządek J, Poławska E. (2017). Genetic disorders in beef cattle: a review *Genes Genom* 39:461-471.
10. Cordy DR, Richards WPC, Stormont C. (1969). Hereditary neuraxial oedema in Hereford calves. *Pathol Vet* 6:487-501.
11. Craig LE. (2015). Bones and joints. En: M. Grant Maxie (ed.) Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals. 6a ed. WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 1.
12. Dennis JA, Healy PJ. (1999). Definition of the mutation responsible for Maple Syrup Urine Disease in Poll Shorthorns and genotyping Poll Shorthorns and Poll Herefords for Maple Syrup Urine Disease alleles. *Res Vet Sci* 67:1-6.
13. DIEA. (2003). La ganadería en Uruguay. Contribución a su conocimiento. Montevideo MGAP.7/10/2017, <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-ganaderia,O,es,o,>
14. Drögemüller C, Leeb T, Harlizius B, Tammen I, Distl O, Höltershinken M, Gentile A, Duchesne A, Eggen A. (2007). Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genet* 8:5.
15. Duchesne A, Gautier M, Chadi S, Grohs C, Floriot S, Gallard Y, Caste G, Ducos A, Eggen A. (2006). Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics* 88:610-621.
16. Dutra F, Baroni L. (2007). Epidermolisis hereditaria en terneros Hereford en Uruguay. *Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV*. Paysandú Uruguay, 270-271.

17. Dutra F, Castro A, Mayol C., Quinteros, C. (2011a). Cardiomiopatía congénita asociada al pelaje crespo en terneros Polled Hereford en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 47:13-20.
18. Dutra F, Quinteros C, Romero A. (2011b). *Arch. Vet. Este. Boletín* N° 11.
19. Dutra F, Quinteros C, Romero A (2012a). *Arch. Vet. Este. Boletín* N° 12 y 13.
20. Dutra F, Baroni L, Techera M, Quinteros C. (2012b). Osteopetrosis letal hereditaria (enfermedad de los huesos de mármol) en terneros Aberdeen Angus en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 48:21-27.
21. Dutra F, Romero A, Quinteros C, Kelly L. (2015). MSUD (Maple Syrup Urine Disease) en terneros Polled Hereford y cruza Polled Hereford x Shorthorn en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 51:14 – 25
22. Dutra F. (2016). Monstruosidades y enfermedades genéticas de los bovinos en Uruguay. Su importancia y significado. XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay 41-50.
23. Ford CA, Stanfield AM, Spelman RJ, Smits B, Ankersmidt-Udy AE, Cottier K, Holloway H, Walden A, Al-Wahb M, Bohm E, Snell RG, Sutherland GT. (2005). A mutation in bovine keratin 5 causing epidermolysis bullosa simplex, transmitted by a mosaic sire. *J Invest Dermatol* 124:1170-1176.
24. Foster AP, Skuse AM, Higgins RJ, Barrett DC, Philbey AW, Thomson JR, Thompson H, Fraser MA, Bowden PE, Day MJ. (2010). Epidermolysis bullosa in calves in the United Kingdom. *J Comp Pathol* 142:336-340.
25. Fraser AR, le Chevoir MA, Long SN. (2016). Lissencephaly in an adult Australian Kelpie. *Aust Vet J* 94:107-110.
26. Gentile A, Testoni S. (2006). Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov Vet Res* 43:17-29
27. Gentile A, Testoni S, Murgiano L, Agerholm JS, Drögemüller C. (2012). Inherited diseases of cattle in XXVII World Buiatrics Congress 148-161.
28. Gimeno D, Avendaño S, Navajas E. (2002). Utilización de cruzamientos como herramienta para el aumento del beneficio económico: marco general. INIA Seminario de actualización técnica: Cruzamientos en bovinos para carne.
29. Ginn PE, Mansell JEKL, Rakich PM. (2015). Skin and appendages. En: Maxie MG, editor. *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*, vol. 1, 5ª ed. Edinburgh: Saunders-Elsevier.
30. Guerrini R, Parrini E. (2010). Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis* 38:154-166.
31. Haechler S, Van den Ingh TS, Rogivue C, Ehrensperger F, Welle M. (2000). Congenital hepatic fibrosis and cystic bile duct formation in Swiss Freiburger horses. *Vet Pathol* 37:669-71.
32. Hargis AM, Ginn PE. (2007). The integument. En: *Pathologic basis of veterinary disease*. Donald McGavin & James F Zachary (Eds), 4th Ed., 2007, Mosby Elsevier, St. Louis Missouri, pp.1161-1162.

33. Harper PA, Dennis JA, Healy PJ, Brown GK. (1989). Maple syrup urine disease in calves: a clinical, pathological and biochemical study. *Aust Vet J.* 66:46-49.
34. Harper PA, Healy PJ, Dennis, JA. (1990). Maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). *Am J Pathol.* 136:1445–1447.
35. Healy PJ, Harper PA, Bowler JK. (1985). Prenatal occurrence and mode of inheritance of Neuraxial Oedema in Poll Hereford calves. *Res Vet Sci* 38: 96-98.
36. Healy PJ, Dennis JA. (1995). Heterozygote detection for maple syrup urine disease in cattle. *Aust Vet J* 72:346-348.
37. Healy PJ, Dennis JA, Windsor PA, Pierce KD, Schofield PA. (2002). Genotyping cattle for inherited congenital myoclonus and maple syrup urine disease. *Aust Vet J.* 80:695-697.
38. Herrmann A, Hecht W, Herden C. (2011) Lissencephaly and microencephaly combined with hypoplasia of corpus callosum and cerebellum in a domestic cat. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 39:116-120.
39. Huston K, Leipold HW. (1971). Hereditary osteopetrosis in Aberdeen Angus calves. II. Genetical Aspects. *Ann Génét Sél Anim* 3:419-423.
40. Jayo M, Leipold HW, Dennis SM, Eldridge FE. (1987). Brachygnathia superior and degenerative joint disease: a new lethal syndrome in Angus calves. *Vet Pathol* 24:148-155.
41. Jiang L, Fang P, Weemhoff JL, Apte U, Pritchard MT. (2016.) Evidence for a "Pathogenic Triumvirate" in Congenital Hepatic Fibrosis in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Biomed Res Int.* Vol 2016, 10 pp.
42. Johnson EB, Steffen DJ, Lynch KW, Herz J. (2006). Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics* 88:600-609.
43. Jolly RD. (2002). Screening for genetic diseases in cattle. *Aust Vet J* 80:284-285
44. Jolly RD, Windsor PA. (2010). Genetic diseases of cattle. In: Parkinson TJ, Vermunt JJ, Malmo J (eds.), *Diseases of Cattle of Australasia.* Vet Learn Foundation, Wellington, New Zealand, pp 759-777.
45. Kelly L, Trenchi G, D'Agosto S, Ravagnolo O, P Peraza, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Solares E, Dutra F. (2010). Molecular diagnosis of inherited diseases. *World Buiatrics Congress XXVI.* Santiago, Chile, Pag.31.
46. Kelly L, Dutra F, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Trenchi G, D'Agosto S, Peraza P, Ravagnolo O, Dalla Rizza, M. (2012). Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias bovinas en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48:3-11.
47. Kessell AE, Finnie JW, Windsor PA. (2011). Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. IV: viral infections. *Aust Vet J* 89:331-7.
48. Krishnamurthy S, Li J. (2014). New concepts in the pathogenesis of hydrocephalus. *Transl Pediatr* 3:185-194.

49. Leech RW, Hauges CN, Christoferson LA. (1978). Hydrocephalus, congenital hydrocephalus. Animal model: bovine hydrocephalus, congenital internal hydrocephalus, aqueductal stenosis. *Am J Pathol* 92:567-570.
50. Leipold HW, Doige CE, Kaye MM, Cribb PH. (1970). Congenital osteopetrosis in Aberdeen Angus calves. *Can Vet J* 11:181-185.
51. Leipold HW, Dennis SM, Huston K, Dayton AD. (1974). Hereditary bovine syndactyly. II. Hyperthermia. *J Dairy Sci* 57:1401-9.
52. Leipold HW, Cook JE. (1977). Animal model: Osteopetrosis in Angus and Hereford calves. *Am J Pathol* 86:745-748.
53. Leipold HW, Dennis SM. (1986). Congenital defects affecting bovine reproduction. En: Morrow DA, *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Vol 2, 2^a ed*, Philadelphia, Saunders Company, pp.177-199.
54. Leipold HW, Schmidt GL, Steffen DJ, Vestweber JG, Huston K. (1998). Hereditary syndactyly in Angus cattle. *J Vet Diagn Invest* 10: 247–254.
55. Lemos dos Santos B, Florisbal Damé MC, Barreto Coelho AC, Aguiar Oliveira P, Marcolongo-Pereira C, Schild AL. (2016). Lissencephaly-pachygyria and cerebellar hypoplasia in a calf. *Ciência Rural* 46:1622-1628.
56. Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, Qin B, Grahn RA. (2004). Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1 *J Am Soc Nephrol* 10:2548-2555.
57. Marcolongo-Pereira C, Schild AL, Pereira Soares M, Vargas SF, Riet-Correa F. (2010). Defeitos congênitos diagnosticados em ruminantes na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 30:816-826.
58. Martín Núñez GM, Gómez Zumaquero JM, Soriguer F, Morcillo S. (2012). High resolution melting curve analysis of DNA samples isolated by different DNA extraction methods. *Clin Chim Acta* 413:331-333.
59. Masucci M, Mignacca SA, Capucchio MT, Biasibetti E. (2012). Un caso di idrocefalo congénito nella pecora. *Large Animal Review* Vol 18:193-196.
60. Mc Daniel B. (2001). Uncontrolled Inbreeding. *J Dairy Sci* 84: E185-E186.
61. Medeiros GX, Riet-Correa F. (2015). Epidermolysis bullosa in animals: a review. *Vet Dermatol* 26:3-13.
62. Meydan H, Yildiz MA, Agerholm JS. (2010). Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Vet. Scand.* 7:52:56.
63. Meyers SN, McDaneld TG, Swist SL, Marron BM, Steffen DJ, O'Toole D, O'Connell JR, Beaver JE, Sonstegard TS, Smith TPL. (2010). A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genómica* 11:337- 351.
64. Morrow CJ, McOrist S. (1985) Cardiomyopathy associated with a curly hair coat in Poll Hereford calves in Australia. *Vet Rec* 117: 312-313.

65. Murgiano L, Wiedemar N, Jagannathan V, Isling LK, Drögemüller C, Agerholm JS. (2015). Epidermolysis bullosa in Danish Hereford calves is caused by a deletion in LAMC2 gene. *BMC Vet Res* 11:23.
66. Nicholas FW. (2010). *Introduction to Veterinary Genetics*, 3a.ed. Iowa, Ed. Wiley-Blackwell, 318 pp.
67. Online Mendelian Inheritance in animals, OMIA Faculty of Veterinary Science, University of Sidney, 10/10/2017. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/home/>.
68. O'Toole D, Swist S, Steadman L, Johnson GC. (2011). Neuropathology and craniofacial lesions of osteopetrotic Red Angus calves *Vet Pathol* 49:746-54.
69. Parish JA; Smith T. (2010). *Managing Genetic Defects in Beef Cattle Herds*. Extension Service, Mississippi State University. Disponible en <https://extension.msstate.edu/sites/default/files/publications/publications/p2622.pdf>
70. Pereyra F, Urioste JI, Gimeno D, Peñagaricano F, Bentancur D, Espasandín A. (2015). Parámetros genéticos en la etapa de cría para el cruzamiento entre Hereford y Angus en campo natural. *Agrociencia Uruguay* 19: 140-149.
71. Pérez V, Suárez-Vega A, Fuertes M, Benavides J, Delgado L, Ferreras MC, Arranz JJ. (2013). Hereditary lissencephaly and cerebellar hypoplasia in Churra lambs. *BMC Vet Res* 9:156.
72. Robarge M, Beever J, Lenz S, Lynch C, Wigle W. (2015). Case Report. Maple Syrup Urine Disease in a Central Indiana Hereford Herd. *Case Reports in Veterinary Medicine* vol 2015.
73. Robinson WF, Robinson NA. (2015). Cardiovascular system. En: M. Grant Maxie (ed.) *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals* 6a ed. WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 3.
74. Romero Velázquez A, Romero Benavente A, Montenegro M, Artigas RA, Briano C, Dutra F, Arruga M.V, Llambí S. (2015). Identificación de la mutación A/G en el exón/intrón 37 del gen LRP4 asociada a sindactilia en un ternero Aberdeen Angus en Uruguay (primer reporte). *Proceeding XLIV Congreso Argentino de Genética, J of Basic and Applied Genetics (BAG), Suppl XXVI*, 133.
75. Rousseaux CG, Ribble CS (1988). Developmental Anomalies in Farm Animals II. Defining Etiology. *Can Vet J* 29:30-40.
76. Scarpante E, Palus V, Cherubini GB. (2013). Congenital hydrocephalus case study: pathophysiology, treatment and prognosis. *Companion Animal* 18: 206-209.
77. Schalles RR; Leipold HW; Mc Craw RL. (1999). Congenital Defects in Cattle. Product of Extension Beef Cattle Resource Committee. *Beef Cattle Handbook*. Disponible en <http://www.iowabeefcenter.org/bch/CongenitalDefectsCattle.pdf>
78. Simpson MAR, Cook W, Solanki P, Patton MA, Dennis JA, Crosby AH. (2009). A mutation in NFκB interacting protein 1 causes cardiomyopathy and woolly hair coat syndrome of Poll Hereford cattle. *Anim Genet* 40:42-46.

79. Sipma KD, Cornillie P, Saulez MN, Stout TA, Voorhout G, Back W.(2013). Phenotypic Characteristics of Hydrocephalus in Stillborn Friesian Foals. *Vet Pathol*50:1037-1042.
80. Soares dos Santos JR, Medeiros Dantas AF, Macedo Pessoa CR, Rodrigues Silva T, Dantas Simões SV, Riet-Correa F, Pedrosa D. (2013). Lissencephaly and cerebellar hypoplasia in a goat. *Ciência Rural* 43:1858-1861.
81. Stark Z, Savarirayan R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis*20 4:5.
82. Suárez Vega A, Gutiérrez Gil B, Cuchillo Ibáñez I, Sáez Valero J, Pérez V, García Gámez E, Benavides J, Arranz JJ. (2013). Identification of a 31-bp deletion in the RELN gene causing lissencephaly with cerebellar hypoplasia in sheep. *PLoS One* 8(11):e81072.
83. Storie GJ, Gibson JA, Taylor JD. (1991). Cardiomyopathy and woolly hair coat syndrome of Hereford cattle. *Aust Vet J* 68:119.
84. Thielscher HH. (1996).Brachygnathia superior in a Holstein-Friesian calf [German] *Tierärztliche Umschau* 51:408.
85. Thomas WB. (2010).Hydrocephalus in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40:143-59.
86. Thompson KG, Crandell RA, Rugeley WW, Sutherland RJ. (1985). A mechanobullous disease with sub-basilar separation in Brangus calves. *Vet Pathol* 22: 283-285.
87. Uitto J, Richard G. (2005). Progress in epidermolysis bullosa: from eponyms to molecular genetic classification. *Clinics in Dermatology* 23, 33–40.
88. Weigel KA. (2001).Controlling Inbreeding in Modern Breeding Programs. *J Dairy Sci* 84:E177-E184
89. Whitlock BK, Kaiser L, Maxwell HS. (2008). Heritable bovine fetal abnormalities.*Theriogenology*70:535-549.
90. Whitlock BK. (2010). Heritable Birth Defects in Cattle. *Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings*. Nashville, TN 146-151.
91. Whittington RJ, Cook RW. (1988). Cardiomyopathy and woolly hair coat syndrome of Poll Hereford cattle: electrocardiographic findings in affected and unaffected calves. *AustVet J* 65:341-344.
92. Windsor P, Agerholm J. (2009).Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Aust Vet J* 87:193-9.
93. Windsor P, Kessell A, Finnie J. (2011a). Neurological diseases of ruminant livestock in Australia.V: congenital neurogenetic disorders of cattle. *Aust Vet J* 89:394-401.
94. Windsor P, Tammen I, Denholm L. (2011b). How to keep up with and diagnose new genetic disorders of cattle. *Australian Cattle Veterinarians Conferences Launceston*.
95. Yoshikawa H, Fukuda T, Oyamada T, Yoshikawa T. (2002). Congenital hepatic fibrosis in a newborn calf. *Vet Pathol* 39:143-145.
96. Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA. (1990). Premature translation termination of the pre-E1 alpha subunit of the branched chain

alpha-ketoaciddehydrogenase as a cause of Maple Syrup Urine Disease in Polled Hereford calves. *J BiolChem* 265: 2425–2427.

ANEXOS

Anexo 1 Extracción de ADN a partir de folículos pilosos.

1. Se colocó el microtubo en vortex 5 segundos y se centrifugó a 10000 rpm 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo (aproximadamente 550ul)
2. Se adicionó 450 ul de buffer de lisis Genomic Lysis Buffer, se colocó en vortex 5 segundos, y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Posteriormente para transferir a una columna, se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto, se cambió el tubo colector, se adicionó a la columna 200 ul de DNA pre-wash buffer y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto.
4. Se cambió nuevamente el tubo colector, se adicionó 500 ul de g-DNA wash buffer y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto.
5. Se cambió el tubo colector por un microtubo, se adicionó a la columna 75 ul de Elution Buffer, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 11.000 rpm por 1 minuto. Luego de finalizado el proceso de extracción se etiquetó y se guardó el ADN a -20 °C.

Anexo 2 Extracción de ADN a partir de Sangre Entera.

Primera Etapa:

El protocolo comienza centrifugando el tubo Vacutainer (con el total de sangre entera que contenga) a 3500 rpm por 10 minutos, considerando el balance de la centrífuga.

Luego de centrifugado el tubo, se pipetea el halo de glóbulos blancos que se forma a la mitad del tubo (entre la fase de glóbulos rojos y el plasma) y se colecta la interfase en un tubo Eppendorf de 2.0 ml.

Se adiciona 1.0 ml de Solución 1 a esta interfase, se invierte varias veces y se centrifuga a 8000 rpm por 3 min.

En esta instancia, precipita el pellet de glóbulos blancos, que en caso de presentar contaminación con Hemoglobina (puede ser un pellet rojo o rosado), se procede a lavarlo adicionando 1.0 ml de Solución 1.

Con un tip, se rompe el pellet de glóbulos blancos y re-suspende con la solución 1 para favorecer este lavado y se vuelve a centrifugar a 8000 rpm por 3 min. Este procedimiento se repite hasta que el pellet es prácticamente blanco, libre de hemoglobina.

Una vez el pellet está limpio, se le agregan 600µl de Buffer de Digestión (Digest Buffer) y se re suspende el pellet utilizando un vortex.

Se adicionan 5µl de Proteinasa K (20mg/ml), se vuelve a utilizar vortex para mezclar y se incuba a 37°C en estufa toda la noche (overnight) o 4 Hs a 50°C.

Segunda Etapa

Una vez las muestras están digeridas se adicionan 2.5 µl de RNasa A (20mg/ml) y se vuelve a incubar a 37°C por 30min. Luego de la incubación, se deja enfriar la muestra hasta temperatura ambiente.

Se adicionan 300µl de Acetato de Potasio 3M y se incuba por 10min en freezer. Se centrifuga a 14000 rpm por 10 min y se transfieren 800 µl del sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 2.0 ml.

Se vuelve a centrifugar a 14000 rpm por 10 min y se transfieren 600 µl del sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Se agregan 600 µl de isopropanol a este sobrenadante y se invierte el tubo varias veces hasta observar el precipitado de ADN. En este punto se deja el ADN en isopropanol a -20°C por 20 min.

Luego, se centrifuga a 13000 rpm por 5 min generando en el tubo un pellet de ADN. Se elimina el sobrenadante de isopropanol y se agregan 600µl de etanol 70%. Se vuelve a centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Se descarta el etanol 70%, se agregan 600µl de etanol 100% y se centrifuga a 13000 rpm por 5 min.

Se descarta el etanol 100% y se deja secar el pellet de ADN en campana 5 - 10 min.

Se resuspende el pellet en 104µl de Tris 10mM pH8.0. (Es opcional calentar el tubo a 65°C por 1h para re suspender bien).

Anexo 3. Tabla III. Cuantificación y calidad del ADN extraído.

Calidad y pureza del ADN óptima, el valor 260/280 entre 1,7 y 2,0.

ToroID	ng/ul	A260	A280	260/280
35	32,8	0,656	0,449	1,46
36	27	0,54	0,356	1,52
37	45,32	0,906	0,538	1,68
38	32,36	0,647	0,429	1,51
39	33,03	0,661	0,441	1,5
40	40,52	0,81	0,556	1,46
41	21,88	0,438	0,312	1,4
42	30,05	0,601	0,406	1,48
43	30,61	0,612	0,383	1,6
44	15,77	0,315	0,232	1,36
45	40,02	0,8	0,516	1,55
46	20,66	0,413	0,268	1,54
47	19,2	0,384	0,253	1,52
48	33,21	0,664	0,458	1,45
49	14,3	0,286	0,235	1,22
50	65,33	1,307	0,794	1,65
51	23,59	0,472	0,282	1,67
52	20,51	0,41	0,301	1,36
53	15,8	0,316	0,235	1,35
54	21,17	0,423	0,326	1,3
55	29,78	0,596	0,321	1,86
56	23,22	0,464	0,352	1,32
57	19,8	0,396	0,29	1,37
58	36,68	0,734	0,505	1,45
59	34,92	0,698	0,489	1,43

60	15,61	0,312	0,203	1,53
61	39,43	0,789	0,56	1,41
62	12,05	0,241	0,158	1,52
63	29,56	0,591	0,415	1,42
65	24,92	0,498	0,343	1,45
67	40,29	0,806	0,555	1,45
68	21,68	0,434	0,302	1,44
69	26,41	0,528	0,388	1,36
70	38,24	0,765	0,549	1,39
71	18,95	0,379	0,248	1,53
72	30,77	0,615	0,44	1,4
73	27,88	0,558	0,406	1,37
74	35,8	0,716	0,516	1,39
75	53,41	1,068	0,761	1,4
76	30,78	0,616	0,526	1,17
77	34,36	0,687	0,48	1,43
78	61,52	1,23	0,905	1,36
79	36,81	0,736	0,553	1,33
80	49,68	0,994	0,683	1,45
81	36,87	0,737	0,53	1,39
82	35,82	0,716	0,552	1,3
83	49,97	0,999	0,744	1,34
85	22	0,44	0,421	1,05
86	55,41	1,108	0,838	1,32
87	33,52	0,67	0,494	1,36
88	56,42	1,128	0,876	1,29
89	18,48	0,37	0,261	1,42
90	16,98	0,34	0,258	1,32
91	32,13	0,643	0,456	1,41
92	31,1	0,622	0,427	1,46
93	20,51	0,41	0,302	1,36
94	46,62	0,932	0,665	1,4
95	33	0,66	0,482	1,37
97	44,94	0,899	0,628	1,43
98	29,75	0,595	0,423	1,41
99	37,71	0,754	0,558	1,35
100	41,05	0,821	0,57	1,44
101	26,67	0,533	0,392	1,36
102	41,88	0,838	0,567	1,48
103	40,88	0,818	0,572	1,43
104	32,95	0,659	0,459	1,44
105	43,31	0,866	0,626	1,38
106	40,22	0,804	0,547	1,47
107	32,83	0,657	0,439	1,5
108	36,53	0,731	0,525	1,39

109	31,41	0,628	0,452	1,39
110	31,79	0,636	0,547	1,16
111	36,95	0,739	0,525	1,41
112	24,26	0,485	0,315	1,54
113	31,03	0,621	0,485	1,28
114	39,94	0,799	0,56	1,43
115	45,64	0,913	0,617	1,48
116	32,82	0,656	0,456	1,44
117	32,02	0,64	0,455	1,41
118	14,62	0,292	0,224	1,31
119	26,83	0,537	0,336	1,6
120	20,84	0,417	0,274	1,52
121	39,98	0,8	0,627	1,28
122	21,6	0,432	0,304	1,42
123	20,09	0,402	0,295	1,36
124	34,12	0,682	0,377	1,81
125	37,36	0,747	0,49	1,52
126	54,11	1,082	0,747	1,45
127	33,64	0,673	0,472	1,43
128	12,82	0,256	0,163	1,57
129	26,59	0,532	0,374	1,42
130	37,2	0,744	0,494	1,51
131	43,03	0,861	0,594	1,45
132	43,14	0,863	0,565	1,53
133	50,14	1,003	0,667	1,5
185	34,47	0,689	0,526	1,31
186	38,52	0,77	0,695	1,11
187	22,25	0,445	0,53	0,84
188	31,03	0,621	0,715	0,87
189	22,66	0,453	0,606	0,75
190	18,36	0,367	0,426	0,86
191	25,95	0,519	0,68	0,76
192	27,49	0,55	0,749	0,73
193	23,56	0,471	0,535	0,88
194	12,91	0,258	0,139	1,86
195	37,1	0,742	0,968	0,77
196	10,94	0,219	0,186	1,17
197	14,09	0,282	0,254	1,11
198	15,29	0,306	0,352	0,87
206	5,39	0,108	0,105	1,02
207	18,48	0,37	0,339	1,09
209	12,93	0,259	0,47	0,55
208	13,79	0,276	0,476	0,58
210	12,28	0,246	0,43	0,57
211	12,39	0,248	0,43	0,58

212	13,17	0,263	0,447	0,59
213	35,41	0,708	0,835	0,85
214	19,21	0,384	0,589	0,65
215	19,97	0,399	0,608	0,66
216	51,43	1,029	1,558	0,66
Ternero Sindactilia	70			1.7

Material Publicado por el autor.

GGM 25

IDENTIFICACIÓN DE VACAS POLLED HEREFORD PORTADORAS DE MSUD C248>T MEDIANTE PCR-HRM Y CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN

Branca Sira A.¹, A. Romero², M.T. Federer², C. Britano², M. Dalla
Rizza¹, F. Dutra². ¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas,
Uruguay. ²DILAVE Treinta y Tres, Uruguay.
Email: abranca@inia.org.uy

La enfermedad de la orina con olor a jarabe de Maple (MSUD, OMIA 000627-9913) es autosómica recesiva y causada por una mutación sin sentido (C248>T) en la región líder del gen de la subunidad E1 alfa (BCKDHA, cadena ramificada alfa ceto-ácido deshidrogenasa). Para identificar esta mutación en una población de 86 vacas Polled Hereford de un predio de la región Este de Uruguay se realizó el análisis HRM (*High Resolution Melting*) utilizando PCR en tiempo real (*Rotor-Gene Q*, Corbett) con el intercalante fluorescente *EvaGreen* (kit *Type-it® HRM-PCR*, QIAGEN, Hilden, Alemania), utilizando un par de *primers* específicos. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 10 min de 95 °C, 40 ciclos de 10s a 95 °C, 30s a 59 °C y 10s a 72 °C, en un rango entre 65-95 °C con incrementos de 0,1 °C durante 2s. Luego de la amplificación del fragmento 94 pb se normalizaron las lecturas de fluorescencia utilizando el *software Rotor Gene* versión 1.7.28 que permitió identificar las curvas de *melting* en la zona estable de fluorescencia. Luego, se normalizó con respecto a un control homocigota normal y el *software* identificó el genotipo de cada muestra analizada con un porcentaje de confianza >90%. La confirmación del genotipado fue evaluada mediante secuenciación de los productos amplificados por PCR. Se detectó la presencia del alelo mutante recesivo para MSUD C248>T en 3 vacas de la población analizada.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN A/G EN EL EXÓN/INTRÓN 37 DEL GEN LRP4 ASOCIADA A SINDACTILIA EN UN TERNERO ABERDEEN ANGUS EN URUGUAY (PRIMER REPORTE)

Bonero Velázquez A.¹, A. Bonero Benavente², M. Montenegro³, R. Artigas¹, C. Briano², F. Dutra², M.V. Arruga², S. Llambí¹. ¹Área Genética-FVET-UdelaR-Uruguay. ²DILAVE-MIGAP-Treinta y Trece-Uruguay. ³Laboratorio Citogenética y Genética Molecular-FVET-UNIZAR-España.
E-mail: silvia.llambi@gmail.com

La sindactilia o “pie de mula” en bovinos es una patología hereditaria autosómica recesiva con penetrancia incompleta y expresividad variable (OMIA-000963-9913). Ha sido identificada en varias razas bovinas. En los últimos años se han encontrado asociadas a esta patología distintos tipos de mutaciones en intrones y exones en el gen LRP4. En este trabajo se realiza el análisis molecular de ADN a un ternero Aberdeen Angus con sindactilia en los 4 miembros en rodeo de 400 vacas en Cerro Largo, Uruguay. Se extrajo ADN a partir de sangre extraída en tubos con EDTA y utilizando el kit ZR Genomic DNA. Se realizó la amplificación por PCR de la región del gen LRP4 Ex-In 37 utilizando un programa convencional de 35 ciclos y 57° C de hibridización. El amplicón obtenido (500 pb) se secuenció (ambas cadenas) en Servicio de Secuenciación de la UNIZAR. Se analizó la información obtenida con la base de datos assembly Btau_4.6.1, mediante la herramienta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) y la herramienta *ClustalW multiple alignment* del software *BioEdit sequence alignment editor* disponibles en línea. En la región secuenciada se identificó la mutación puntual de cambio de base A/G en forma homocigota (A/A, región Ex-In 37 AGAGATG). Dicha mutación se corresponde con la reportada en la literatura para esta raza. En nuestro país es la primera vez que se describe en Aberdeen Angus por lo que se recomienda realizar un estudio en los progenitores de este rodeo para evitar la propagación de dicha patología a través de reproductores portadores de la misma.