



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DEL GEN PHLDA2, REGULADOR DEL GLICOGENO, EN UNA
MUESTRA DE BOVINOS CRIOLLOS URUGUAYOS PORTADORES DEL
REORDENAMIENTO CROMOSOMICO ROB (1; 29)**

Nariné Balemian

Orientador: Dra. Alicia Postiglioni

Tribunal: Dra. Silvia Llambí

Dra. Eileen Armstrong.

INDICE

INTRODUCCION

El gen PHLDA2. Imprinting Genético	3
Cariotipo del bovino. Translocación rob (1; 29)	4
Historia del Bovino Criollo	6
Características de la raza	6
Situación actual del Bovino Criollo	7
Origen de la raza Holstein Friesian	8
Características de la raza	8
HIPOTESIS. FUNDAMENTO	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	11
Materiales	11
Metodología de la genética molecular	12
Metodología de citogenética	13
Cronograma de trabajo	14
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	24
AGRADECIMIENTOS	25
BIBLIOGRAFÍA	26
APÉNDICE I	28
APÉNDICE II	29

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

INTRODUCCION

El gen PHLDA2. Imprinting genético.

El gen de mamíferos PHLDA2 (pleckstin homology like domain family A), es un gen que se expresa de forma materna en la placenta de humanos y ratón. La delección de la expresión del alelo materno PHLDA2, causa el sobrecrecimiento de la placenta, mientras que la pérdida del "imprinting" produce retardo del crecimiento. La proteína PHLDA2 interviene en la regulación del glicógeno, conservando el reservorio energético extraembrionario de la placenta. Estudios recientes en células somáticas bovinas han mostrado niveles reducidos de PHLAD2 asociados al sobrecrecimiento de la placenta, sugiriendo que los niveles de expresión de este gen afectan el crecimiento de la misma en bovinos y otros mamíferos (Sikora et al, 2012). Este gen se encuentra identificado en el cromosoma 29 en bovinos, cromosoma involucrado en la translocación Robertsoniana rob (1; 29) (Gustavsson, 1969; Sikora et al, 2012; www.ensembl.genome4).

La impronta genómica "imprinting" representa un caso especial de modificación epigenética donde uno de los alelos es silenciado específicamente según su origen Parental, un fenómeno esencial para el crecimiento y el desarrollo. Desórdenes en el mecanismo de "imprinting" son causados por cambios genéticos y epigenéticos que alteran la dosis de expresión de los genes improntados, exhibiendo varios fenotipos, principalmente asociados con alteraciones del desarrollo y desórdenes neurológicos (Ishida y Moore, 2012).

Es de resaltar que este fenómeno de "imprinting" se observa principalmente en mamíferos euterios (mamíferos placentados). Los mamíferos euterios son dependientes de sus madres durante su crecimiento temprano y desarrollo. Esto es que los nutrientes fetales son obtenidos directamente de los tejidos maternos. El cigoto se encuentra en el tejido materno, extrae nutrientes y manipula la fisiología materna mediante vías parácrinas. El principal órgano que lleva a cabo estas funciones es la placenta corioalantoidea. La placenta de los euterios produce varias moléculas críticas para el desarrollo fetal, esto ha sido comprobado mediante mutaciones dirigidas ("knockouts") en ratones de laboratorio. (Vrana, 2007)

Las secuencias de ADN de los dos alelos parentales de los genes improntados son idénticas. Con el objetivo de que se produzca una expresión parental específica, los cromosomas homólogos tienen que distinguirse mediante algún tipo de marca epigenética. Los genes improntados muestran regiones con patrones de metilación diferentes entre los alelos parentales. Estos tienden a organizarse en clústers, muchos de los cuales están bajo elementos de control en Cis, llamados centros de control del imprinting. Aunque la regulación de la expresión de los genes improntados es clúster específica, hay características similares compartidas por dichos clústers tales como un aumento demetilación de CpG, modificación de histonas asociado a la activación o represión

transcripcional mediante cambios en la compactación de la cromatina, alta concentración de repeticiones en tándem, entre otros (revisado por Ishida y Moore, 2012).

Vrana (2007) se refiere al concepto de impronta genómica proponiendo para esta expresión diferencial el conflicto existente entre sexos en mamíferos. Aquí se predice que la expresión de genes paternos promueve el crecimiento fetal al obtener la mayor cantidad de recursos maternos, mientras que el genoma materno se resiste al crecimiento del feto al limitar parte de sus recursos y asegura la supervivencia y la asignación equitativa de los nutrientes entre sus descendientes los cuales portarán sus genes. De acuerdo con esto el fenómeno de "imprinting" ocurre predominantemente en genes involucrados en el crecimiento fetal mediante la adquisición de nutrientes de la placenta.

Una sobrerrepresentación de los genes involucrados en la reproducción en bovinos se asocia con varias familias génicas expresadas en la placenta de rumiantes. Estas familias codifican las glicoproteínas de señalización intercelular asociadas a la preñez (en BTA29) proteínas del trofoblasto (en BTA13) e interferón tau (INFT) (en BTA8). Se ha identificado también una familia que codifica proteínas asociadas a la prolactina (en BTA23). Estos genes regulan aspectos específicos de rumiantes tal como el crecimiento fetal, adaptaciones maternos asociados a la preñez y a la coordinación del parto. Aunque el interferón de tipo 1 (INF) está involucrado en la respuesta inmune, INFT impide la regresión del cuerpo lúteo durante la etapa temprana de la preñez, lo cual resulta en un ambiente uterino receptivo (Elsik, et al., 2009).

Cariotipo del bovino. Translocación rob(1;29).

Los bovinos presentan un cariotipo de $2n=60$, XX; XY, hembra y macho respectivamente. Todos los autosomas son acrocéntricos, mientras que los cromosomas sexuales corresponden a un cromosoma X submetacéntrico y un pequeño Y metacéntrico. Teóricamente todos los cromosomas acrocéntricos tendrían la misma probabilidad de presentar fusiones céntricas, pero solo se conoce la translocación Robertsoniana monocéntrica rob (1; 29), siendo ésta considerada un polimorfismo cromosómico (Eldridge, 1985; Chaves et al., 2003).

Las translocaciones Robertsonianas rob (1; 29) son las alteraciones cromosómicas más comunes en bovinos americanos y europeos. En Uruguay estos reordenamientos cromosómicos, en condición heterocigota, se identificaron en el hato de bovinos Criollos, estableciéndose una frecuencia de 4% (Postiglioni et al., 1996). Sin embargo, no se detectaron homocigotas en esta población, siendo muy poco frecuente en las poblaciones (Dukos et al., 2008). Ciertas razas bovinas iberoamericanas, consideradas como posibles ancestros de los criollos americanos (Berrenda, Retinta, Andaluza, etc.), así como en poblaciones de América (Argentina, Perú, Venezuela) se ha encontrado ésta translocación en estado heterocigota (Postiglioni et al., 2002).

Los individuos heterocigotas para una translocación presentan un fenotipo normal, incluso, los machos son sobresalientes en las pruebas realizadas en Centros de Inseminación Artificial (Gustavsson, 1969) pero exhiben disminución en su fertilidad identificada por una tasa de retorno a los servicios menor a la esperada. La respuesta es la existencia de mortalidad embrionaria temprana. La translocación rob (1; 29) se origina por reordenamientos que consisten de fusiones céntricas, con la formación de un

cromosoma monocéntrico, submetacéntrico con la pérdida de ciertas clases de ADN satélites y un reordenamiento de sus secuencias repetidas donde están involucrados los dos cromosomas: BTA1 y BTA29 (Chaves, et al., 2003; Di Meo et al., 2006). Como dijimos, esta translocación implica al cromosoma 29 bovino, donde se identifican además, otros genes improntados como el gen IGF2, el TSSC4, ASCL2, PHLDA2, H19, CD81, OSBL5. El gen PHLAD2, recientemente identificado, produce un sobrecrecimiento de la placenta que probablemente podría ser causal de la mortalidad embrionaria temprana (Sikora et al., 2012)

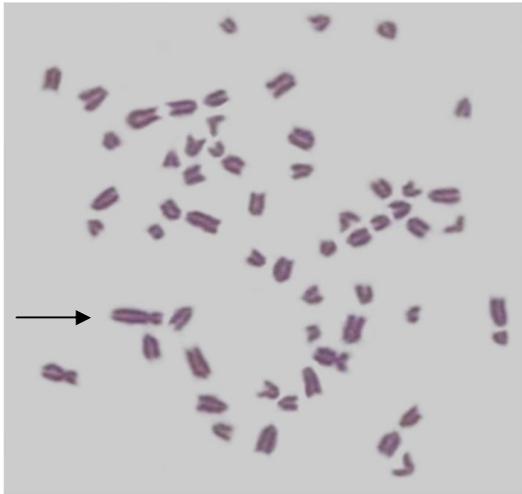


Figura 1. Metafase linfocitaria de un ejemplar hembra de Bovino Criollo portador de la translocación Robertsoniana (1;29). La flecha indica la translocación rob (1; 29). (Extraído de material de Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria)

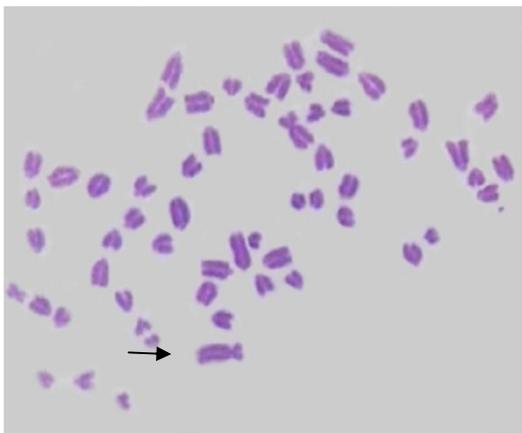


Figura 2: Metafase linfocitaria de un ejemplar macho de Bovino Criollo portador de la translocación Robertsoniana (1; 29). La flecha indica la translocación rob (1,29). (Extraído de material de Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria)

Sikora et al., (2012) establece un diseño para demostrar la impronta de este gen en bovinos, valiéndose de individuos heterocigotas por la presencia de SNPs (polimorfismo de simple nucleótido), ubicados en los exones 1 y 2 del gen PHLDA2.

BOVINO CRIOLLO

Historia del Bovino Criollo

El bovino criollo fue introducido en América en 1493 por los conquistadores Españoles y Portugueses, estos son el producto de múltiples cruces de bovinos Ibéricos y Europeos. El ambiente favorable en el cual fueron introducidos permitió su reproducción y su dispersión por América Central y Sudamérica. Su adaptación a diferentes ambientes permitió una gran variabilidad genética, pero hoy en día solo permanecen pequeñas poblaciones semi-silvestres en Sudamérica, estas se encuentran en la Patagonia Argentina y en el Pantaneiro de Brasil. Estas poblaciones son importantes porque son un recurso de alelos escondidos con un uso potencial en programas de reproducción, una razón importante para la conservación de las mismas.

La primera introducción de bovinos en Uruguay fue llevada a cabo por Hernando Arias de Saavedra a comienzos del siglo diecisiete y luego por las Misiones Jesuitas del Alto Uruguay. A finales del siglo diecinueve se introdujeron varias razas comerciales incluidas la Holstein Friesian, Hereford y Aberdeen Angus con el objetivo de aumentar la producción y la economía Uruguaya. Esta introducción redujo la gran población de bovino criollo a pequeñas subpoblaciones diseminadas por el país y hoy se encuentra una única población semi –silvestre de aproximadamente 600 cabezas en 650 hectáreas en el suroeste de Uruguay en un área de bosques nativos y humedales. Arredondo (1958) documentó la creación de la población fundadora la cual consistía de 35 individuos comprendida por vacas, toros y terneros traídos de diferentes regiones con ambientes similares (Armstrong , 2004).

Características del Bovino Criollo

Los bovinos criollos Americanos son poblaciones adaptadas durante 400 años a las condiciones del medio, desarrollándose así una importante variabilidad genética y fenotípica. Existen variedades adaptadas a casi todos los ecosistemas americanos, como la selva húmeda tropical, los bosques subtropicales, las praderas y las pampas, las planicies inundables, la estepa patagónica, el altiplano andino y regiones áridas. Actualmente es posible encontrar bovinos criollos en casi todos los países americanos.

Las principales características de las razas criollas son la mansedumbre, la diversidad de pelajes, la presencia de cuernos, la alta fertilidad, la gran habilidad materna, la gran longevidad, la piel y las mucosas bien pigmentadas, la inserción alta de la cola que se relaciona con una muy baja incidencia de partos distócicos y el alto vigor híbrido que presentan en cruces con razas comerciales.

Situación actual

Antiguamente los bovinos criollos se distribuían en forma uniforme por todo el territorio nacional, hoy en día existen alrededor de mil bovinos Criollos restringidos a los parques de Santa Teresa y San Miguel, en el departamento de Rocha. El rodeo de San Miguel constituye un núcleo reproductivo o reserva donde se encuentra el mayor número de animales. Estos reciben un manejo mínimo, reducido a desparasitaciones periódicas y vacunaciones exigidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. El manejo reproductivo es mínimo, reduciéndose a la extracción de determinado de machos por año para controlar el tamaño poblacional, dándose los apareamientos de forma natural. Se descarta el exceso de terneros macho mediante su castrado, así como los animales de edad avanzada o en estado sanitario deficiente.

El parque de San Miguel se encuentra en una zona limítrofe con Brasil, junto al arroyo San Miguel. En sus 650 hectáreas presenta grandes extensiones de bañados, praderas naturales, monte indígena y serranías. Existe un convenio entre SEPAE y las áreas de Genética y de Mejoramiento Animal de Facultad de Veterinaria (UDELAR) para el estudio, caracterización y manejo de este rodeo (Armstrong, 2004).



Figura 3: Ejemplares de bovino Criollo junto a su crías.



Figura 4: Hato de bovinos Criollos, se puede observar la gran variabilidad de pelajes.

HOLSTEIN FRIESIAN

Origen

En unos pocos años antes de la iniciación de la era cristiana se ubican los orígenes de la raza Holstein, cuyos antecesores fueron las vacas negras de los bávaros y las blancas de los Friesian, tribus que emigraron al oeste de Europa y que se asentaron en el delta del Rin hace cerca de 2.000 años. Más tarde, esta región se convirtió en Holanda, nación que vio nacer la raza tras un proceso de cruzamientos del cual resultaron sus características únicas de color, fortaleza y producción, que comenzaron a diferenciarla de las demás razas. En su desarrollo aprovecharon el pasto, el recurso más abundante en la zona. Este núcleo ganadero fue expandiéndose lentamente, primero en Alemania y después por otros países europeos, con un desarrollo rústico pero que le permitió en los últimos 300 años tener un valor importante en el mercado por sus características de producción y adaptación a los factores ecológicos de muchos países.

Entre 1857 y 1861 importaciones masivas desde Holanda hasta Estados Unidos, concretamente al estado de Massachusetts, representaron la llegada al continente americano de aproximadamente 8.000 ejemplares.

Con el paso de los años, con la ayuda de la ciencia, la tecnología, y la selección genética, la raza ha podido afianzar su liderazgo mundial como productora de leche, tanto pura como cruzada con otras razas.

Características de la raza

Los Holstein son rápidamente reconocidos por sus marcas distintivas de color y producción de leche. Los Holstein son animales grandes con modelos de color de negro y blanco o rojo y blanco. Un ternero Holstein pesa 40 Kg. o más al nacimiento. Una vaca madura llega a pesar unos 675 Kg. Con una altura a la cruz de unos 150 cm. La gestación es aproximadamente de nueve meses. Algunas vacas pueden vivir muchos años, sin embargo, la vida productiva promedio de una Holstein es de 4 a 6 años.

Producción de leche

Vacas Holstein que son ordeñadas dos veces al día se sabe que llegan a producir por arriba de los 30,561 Kg. de leche en 365 días.

El ganado lechero Holstein domina la industria de producción lechera en la mayoría de las regiones del mundo. Las razones de su popularidad son claras:

Excelente producción, Mayor retorno económico sobre el costo de alimentación, Mérito genético sin igual, y mucha flexibilidad a una gama amplia de condiciones ambientales.

Mejoramiento genético

La inseminación artificial ha tenido un impacto tremendo sobre el mejoramiento genético de la raza. Desde el perfeccionamiento del proceso de congelamiento del semen en los 40s, ha permitido el uso de toros probados. El 85 por ciento de los nacimientos son a consecuencia del uso de la inseminación artificial.

La raza Holstein se encuentra en cada continente y en casi cada país. Tal evidencia es sinónimo de superioridad genética lo que ha creado una exportación y comercialización para hembras, sementales, semen y embriones congelados, los cuales son exportados a más de 50 países y usados extensivamente para mejorar los hatos lecheros (www.ganaderia.com.mx).



Figura 5: Ejemplar de la raza Holstein Friesian.



Figura 6: Características morfológicas de la raza.

En Uruguay en el año 1871 se crea la Asociación Rural del Uruguay (ARU) y en el año 1889 se importa de Holanda el primer toro de la raza, entrando en los registros de la ARU con el número 1. Entre los años 1920 al 1950 se comienza la creación del Holando Uruguayo a partir de importaciones provenientes de Estados Unidos, Argentina y Holanda. Durante esos años se crean las primeras cabañas y tambos desarrollándose paulatinamente la industria lechera. En el año 1935 se funda la Cooperativa de Productores de Leche (CONAPROLE) (Caorsi, 1973). Desde el año 1959 la actual raza viene alcanzando su crecimiento máximo, pasando a ser la segunda raza dentro del stock nacional de vacunos, después de la raza Hereford y siendo la primer raza en cuanto a producción lechera (Llambí, 1995)

A los efectos de realizar una comparativa de los resultados generados con el fragmento secuenciado del gen PHLDA2 de los BCU, se analizaron con este mismo fragmento muestras de ADN genómico de Holando uruguayo. Esta raza fue elegida por ser extremadamente opuesta a la población problema en relación a su variabilidad genética, oficiando como población control.

Este concepto está basado en estudios experimentales realizados en el laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria. Los autores trabajaron las variantes alélicas de una secuencia del gen de la kappa caseína en muestras de bovinos Criollos y Holando uruguayo, obteniéndose frecuencias alélicas de 0,5 para los alelos A y B de Criollo, mientras que para el Holando uruguayo se encontró una fijación del alelo A ($A=1$) en muestras tomadas al azar (Postiglioni et al., 2000).

HIPÓTESIS

Individuos portadores de la translocación Robertsoniana rob (1; 29) presentan polimorfismo de un nucleótido (SNP) para el gen PHLDA2.

Su identificación alélica permitirá asociar un alelo específico segregado por línea paterna o materna.

Fundamento de la hipótesis

Este hallazgo realizaría aportes a los diseños que permitan profundizar en la problemática de subfertilidad provocada por irregularidades de este gen (improntas) que presenta una función involucrada en la regulación del glicógeno, asociada al sobrecrecimiento de la placenta, fenómeno demostrado en mamíferos placentarios como causal de mortalidad embrionaria temprana. Por lo expuesto, esta hipótesis estaría asociada a problemas de subfertilidad en bovinos.

OBJETIVOS

En esta tesis se pretende amplificar la secuencia polimórfica del gen PHLDA2 sobre bovinos Criollos normales y heterocigotas para la rob (1; 29) a los efectos de identificar la presencia de SNPs, en individuos portadores de la translocación.

- Identificar el amplicón del gen PHLDA2 sobre ADN genómico de bovinos Criollos normales y portadores de la translocación rob (1; 29).
- Secuenciar, alinear e interpretar los amplicones del gen PHLDA2.
- Identificar los SNPs correspondientes a las variantes alélicas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Se trabajaron muestras de ADN genómico de bovinos Criollos normales y portadores de la translocación Robertsoniana así como de Holando uruguayo que se encuentran en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria.

Se concurrió a la población de bovinos Criollos uruguayos (BCU) (Fortín de San Miguel, Depto. de Rocha) a los efectos de colaborar en la actualización de la frecuencia de esta translocación en la población.

Se extrajeron muestras de sangre periférica con anticoagulante (heparina sódica; 150U/10cc de sangre) utilizando jeringa desechables a los efectos de realizar cultivos linfocitarios y anticoagulante EDTA (10.8mg/6ml) a los efectos de la extracción de ADN genómico. Este último se realizó la extracción con tubos vacutainer. La selección de las muestras correspondieron a la categoría de terneros (de una misma generación), hijos de madres diferentes preñadas por monta natural.

Esta estrategia se debe a los efectos de potenciar la variabilidad genética de las muestras extraídas para ambos niveles de estudio, maximizando la posibilidad de encuentro de las mutaciones: SNPs A/T.

Las muestras para extracción de ADN genómico se procesaron de acuerdo a protocolo estándar (Protocolo del Laboratorio de Genética, F. Veterinaria) (Apéndice I).

Las muestras para estudios citogenéticos se procesaron por cultivos linfocitarios estándar (Protocolo del Laboratorio de Genética, F. Veterinaria) (Apéndice II).

Metodologías de genética molecular.

Protocolo extraído de Apéndice del trabajo de Sikora et al., (2012)

Las muestras de ADN se cuantificaron con espectrofotómetro de última generación Nanodrop ND1000. El par de primers flanqueadores corresponde a la identificación rs42194502 [Bostaurus], correspondiendo:

Forward: PHLDA2_F1_FOR: 5'-GCAGGAGATGTCGCTTTCAC-3' y

Reverse: PHLDA2_F1_REV: 5'-CTTTATTGGAATGGTGGTGGAG-3'

Amplificación por PCR:

Las reacciones de PCR necesarias para la secuenciación se realizaron en un volumen total de 50 µl. Se utilizaron:

2 µl de ADN.

2 µl de cada uno de los primers.

5 µl de U Taq Buffer. 0,25 µl de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

1 µl Taq Polimerasa.

Se realizó la solución madre de los primers reverse y forward (0,4µM) a los efectos de llegar a la concentración final para el volumen utilizado en la preparación de la solución a amplificar.

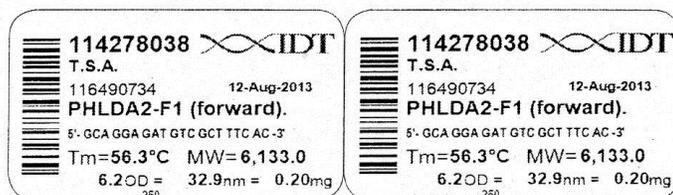


Figura 7: Etiqueta mostrando características del primer forward.

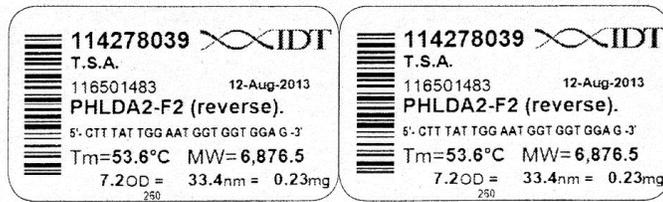


Figura 8: Etiqueta mostrando características del primer reverse.

Programa de amplificación:

La etapa inicial se llevó a cabo a 95°C durante 5 minutos para desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos de un programa de amplificación de 3 pasos: 95°C durante 30 segundos para desnaturalización, 60°C durante 30 segundos para annealing, 72°C durante 1 minuto para extensión, 72°C durante 5 minutos para extensión final (luego de 35 ciclos).

Los productos de la PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1% marcado con Good View Nucleid Acid Stain en buffer TBE 1x y se visualizaron mediante luz UV en el equipo BIOSENS SC- 805.

Los productos de amplificación se enviaron a MACROGEN para su secuenciación. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Bioedit. Hall, T.A; (1999).

Metodologías de citogenética

Se extrae sangre periférica a 13 terneros de aproximadamente de 3 meses, correspondiente a una misma generación, utilizando jeringas desechables (10ml) con anticoagulante (heparina sódica (10U/1ml).

Estas fueron mantenidas en conservadora durante un periodo de aproximadamente 8 horas y luego fueron almacenadas a 4°C en heladera del Laboratorio, por 56 horas.

La siembra se realiza sobre 5ml. de medio de cultivo completo RPMI, previamente preparado y fraccionado. La manipulación se realiza bajo cámara aséptica de cultivo celulares, utilizando mechero para flambear la boca del frasco estéril de vidrio donde se prepara el medio de cultivo completo.

Las células linfocitarias se cultivaron en medio completo RPMI, incubándose en baño maría durante 72hs a 38°C. Se incorpora colchicina (100mg/ml) dejándola actuar 6 hrs. y finalmente se procede al sacrificio del cultivo (Apéndice II).

Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados, se realiza un segundo cultivo tomando al azar 4 de las 12 muestras de sangre de bovinos Criollos (Números 7, 9, 10 y 11). Estas muestras 7 días de extraídas, mantenidas a 4°C. Se utiliza un medio de cultivo RPMI completo (sin fitohemaglutinina) que estaba conservado en freezer (-20°C) y cuyos resultados habían sido óptimos (marzo, 2013). Se agrega la fitohemaglutinina previo a la siembra.

Se procede a la siembra, incubación de las muestras y procesamiento del cultivo, en condiciones similares al anterior.

Cronograma realizado

	Octubre	noviembre	diciembre	enero	febrero
Trabajo de Laboratorio					
Identificación de muestras	X				
Metodología PCR		X	X		
Observación en gel de agarosa		X	X		
Secuenciación			X		
Alineación				X	
Identificación de SNPs, genotipado				X	
Revisión bibliográfica	X	X	X		
Trabajo de campo					
Monitoreo de la población actual			X		
Cultivo linfocitos			X		
Presentación y discusión de resultados					X
Escritura de tesis				X	X
Defensa oral					X
Publicación en Congresos y revistas arbitradas.					

RESULTADOS

Resultados de las experiencias realizadas con un fragmento específico del gen PHLDA2 en muestras de Bovinos Criollos y bovinos Holando Uruguayo.

En las figuras 9 y 10 se observan los resultados de la amplificación del fragmento génico (PHLDA2) de un tamaño de 384 pb. Se realizaron geles de agarosa para comprobar la presencia de la secuencia amplificada para Bovino Criollo (Fig. 9) y para Holando Uruguayo (Fig. 10). Se utilizó el marcador de peso molecular Hiperladder, el cual permitió observar en cada carril una banda comprendida entre los 300 y 400 pb correspondiente al segmento amplificado de 384 pb del gen PHLDA2.

Las 11 muestras de Bovino Criollo resultaron de clara nitidez, excepto uno de los bovinos translocados que aparece de manera más tenue (carril 5) (Fig. 9).

Los 11 productos correspondientes a las muestras de Holando Uruguayo, todas las bandas respondieron con amplia claridad (Fig. 10).

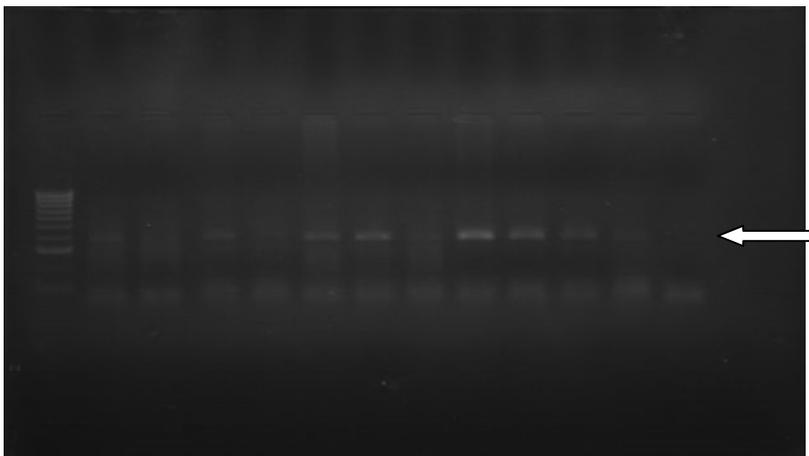


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) del producto de PCR. Amplificación de ADN genómico del gen PHLDA2 en Bovino Criollo.
Carril 1: marcador peso molecular Hiperladder (10 bandas de 100 a 1013 pb.)
Carril 2: ADN de un ejemplar macho de portador de la translocación rob (1; 29)
Carril 3: ADN de una hembra portadora de la translocación rob (1; 29)
Carriles 4-11: ADN de bovinos Criollos normales.

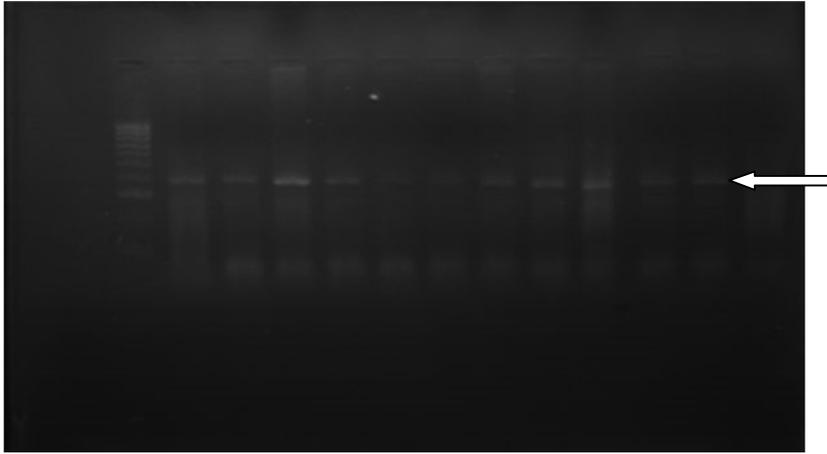


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) del producto de PCR. Amplificación de ADN genómico del gen PHLDA2 en Holstein Friesian. La flecha indica las bandas de 384 pb correspondientes a la amplificación del gen PHLDA2. Carril 1: marcador peso molecular. Hiperladder (10 bandas de 100 a 1013 pb.) Carriles 2-12: ADN de individuos de la raza Holstein Friesian. Carril 13: control negativo.

La nómina de los productos amplificados que se enviaron a MACROGEN, se muestran en la tabla 1. Estas corresponden a 11 muestras de bovinos Criollos (forward y reverse) y 11 muestras de bovinos Holando uruguayo, (forward y reverse), en total 22 secuencias.

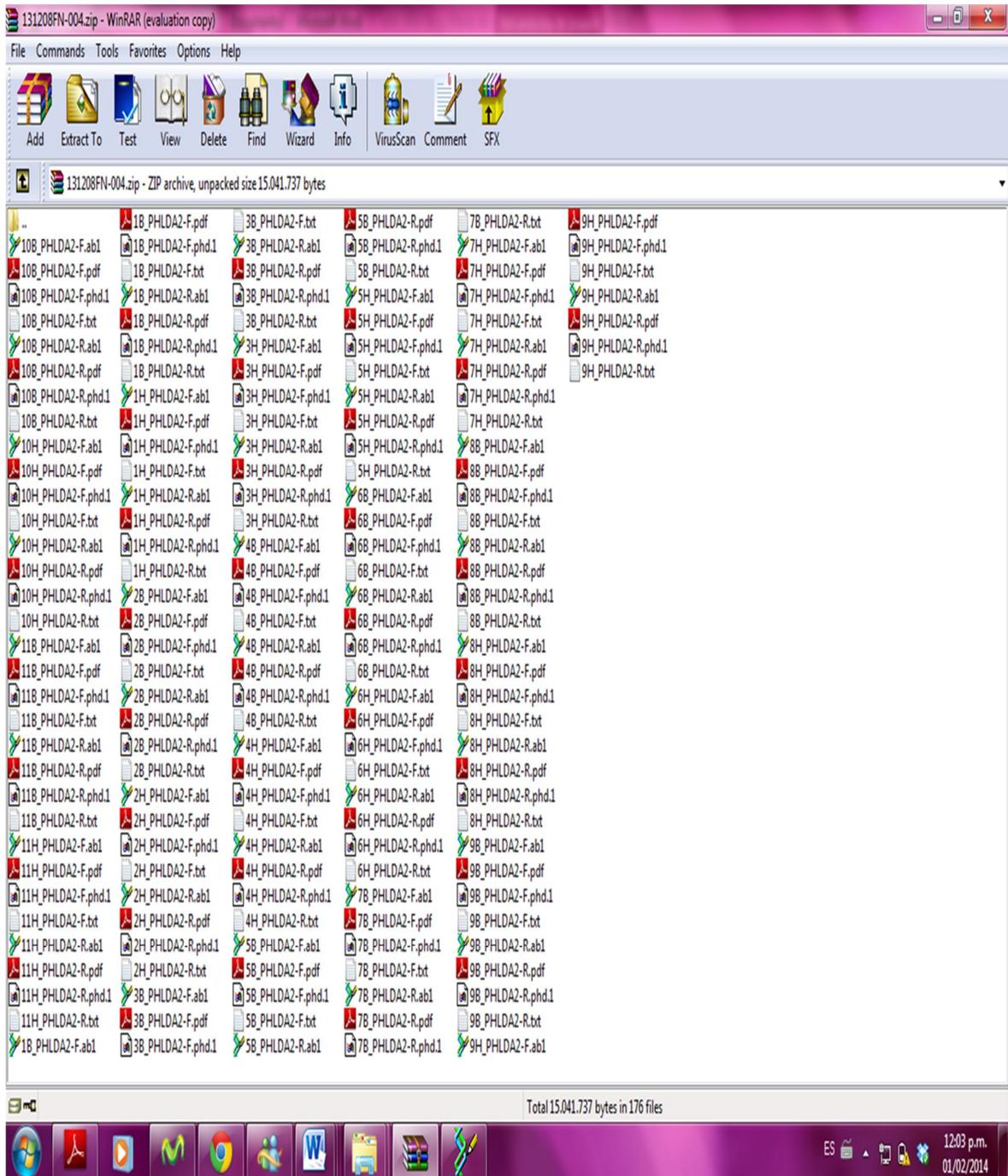


Tabla 1. Total de muestras (N= 22) secuenciadas forward y reverse de bovino Criollo (N=11) y Holando uruguayo(N=11).

Las Figuras 11 y 12 muestran una parte del cromatograma analizado correspondiente a las secuencias nucleotídicas de las muestras de Bovino Criollo y Holando Uruguayo, respectivamente.

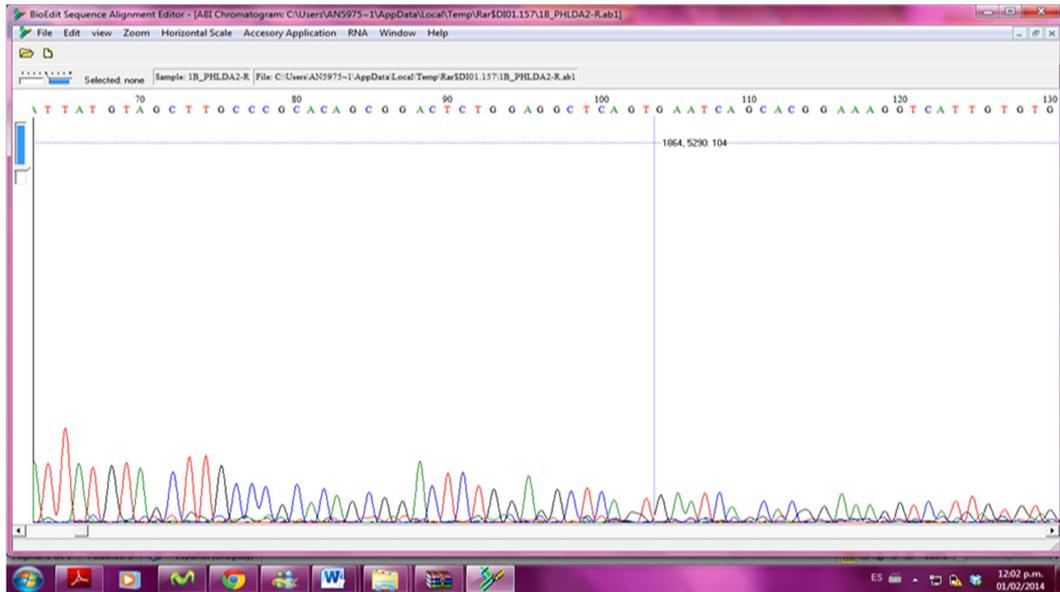


Figura 11: Cromatograma de la muestra 1 correspondiente a Bovino Criollo portador de la translocación rob (1; 29)



Figura 12: Cromatograma de la muestra 1 de Holando uruguayo.

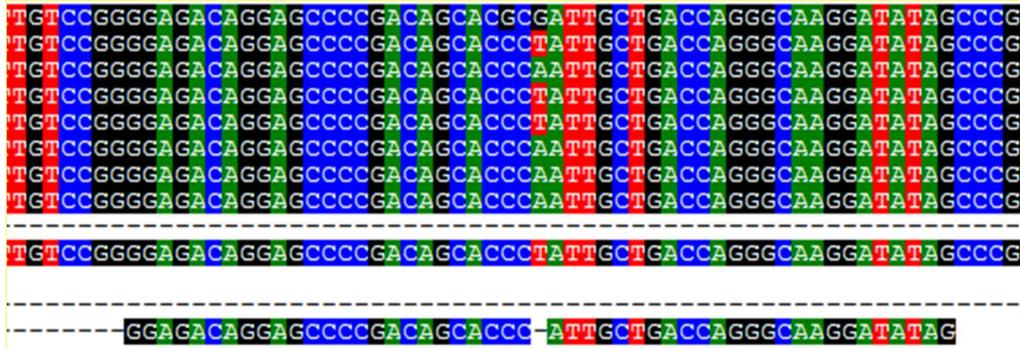


Figura 13: Alineamiento de la secuencia adyacente al SNP A/T.

De arriba hacia abajo:

- Línea 1: muestra de Bovino Criollo portador de la translocación rob(1; 29).
- Línea 2: muestra de Bovino Criollo normal.
- Línea 3: muestra de Bovino Criollo normal.
- Línea 4: muestra de Bovino Criollo normal.
- Línea 5: muestra de Bovino Criollo normal.
- Línea 6: muestra de Holando Uruguayo normal.
- Línea 7: muestra de Holando Uruguayo normal.
- Línea 8: muestra de Holando Uruguayo normal.
- Línea 9: ARNm del gen
- Línea 10: secuencia genómica de referencia.
- Línea 11: secuencia referencia para la ubicación del SNP.

En la figura 13 se observa el fragmento secuenciado del gen PHLDA2, adyacente al lugar de los SNP en estudio. Dentro de la muestra de bovinos Criollos (líneas 1-5) y en el nucleótido posición 893, se observa el nucleótido **A** en uno de ellos (línea 3) mientras que el SNP correspondiente a **T** se identifica en 3 bovinos Criollos, todos normales para la translocación rob(1; 29). En la línea 1 correspondiente al único animal portador de la rob(1; 29) se identifica una nueva variante de SNP, observándose una guanina (**G**).

En este mismo animal y adyacente al novedoso SNP, se observa una guanina (**G**) donde normalmente existe una citosina (**C**), como sí se presenta en el resto de las muestras del alineamiento.

Todas las variantes alélicas mencionadas fueron confirmadas en el análisis del cromatograma, encontrándose homocigosis en todos los genotipos analizados excepto en el portador de la translocación que correspondió a un genotipo **G/T**.

160 170
A G A T T G C T G A C

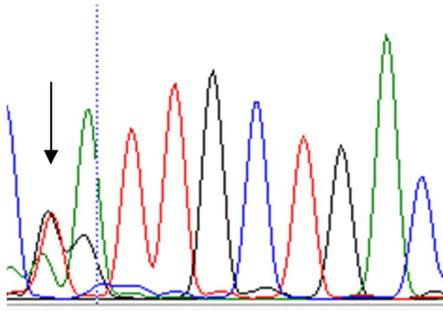


Figura 14: secuencia del cromatograma del individuo portador de la translocación mostrando que es heterocigota **G/T** para el SNP.

(La A que se encuentra en la posición 160 de la secuencia no corresponde a ella, ya que no existe un pico en el cromatograma para la misma, siendo producto de un error en el proceso de secuenciación)

La flecha indica la posición del SNP.

Resultados de las experiencias realizadas con cultivos linfocitarios de muestras de bovinos Criollos.

En el primer cultivo linfocitario (N= 12) se obtuvieron divisiones celulares en 3 muestras. Esta observación es indicador de que el medio de cultivo completo estaría en condiciones adecuadas, aunque los resultados no fueron los esperados, en cuanto a calidad de la cromatina y al índice mitótico (Fig. 15).

En el segundo cultivo (N =4) los resultados no fueron los esperados, ya que no se obtuvieron células metafásicas como para poder realizar una evaluación de las muestras.

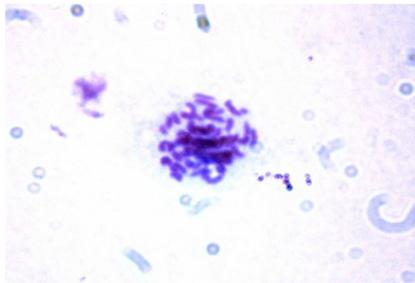


Figura 15. Metafase linfocitaria de la muestra N° 2. Cultivo A.

DISCUSIÓN

Fragmento del gen PHLDA2. SNP's con imprinting genético.

La secuencia amplificada y secuenciada corresponde a un fragmento del gen PHLDA2 ubicado en el cromosoma 29 bovino. (*www. Ensemblgenoma*). Este gen presenta 2 exones, siendo solo uno de ellos codificante para proteína. El SNP estudiado se encuentra en el extremo 3' UTR del mismo, en la posición 893 del cromosoma (Sikora et al, 2012)

La figura 13 muestra parte de la secuencia de dicho gen, adyacente al SNP A/T. Las secuencias alineadas pertenecientes a individuos normales de Bovino Criollo y de la raza Holando Uruguayo mostraron la presencia de los dos SNPs descritos en Sikora et al., en el año 2012. La estimación de las frecuencias de estos dos alelos, correspondientes a los SNPs, A y T, aunque el número de muestras de cada población de bovinos analizada fue muy baja, corresponde a la presencia de las dos variantes alélicas, en bovinos Criollos, manteniéndose para ellos, el concepto de su alta variación genética a diferencia del ganado Holando, donde se identifica una sola variante de SNP (Postiglioni et al., 2000). Este resultado corresponde al esperado dado que es una raza sometida a una alta presión de selección artificial debido a su característica de alta producción lechera.

Dentro de las muestras correspondientes a los Criollos, 3 de ellas (líneas 2, 4 y 5) resultaron ser homocigotas para T, mientras que una de ellas (línea 3) fue homocigota para A. Las muestras pertenecientes a Holando uruguayo mostraron ser todas homocigotas para A. Estos datos muy preliminares sobre el comportamiento de esta variación alélica en bovinos nos permite observar una tendencia a homogeneizar la variante A, mientras que se observa la presencia de las dos variantes en los bovinos Criollos. Si relacionamos estos datos con aquellos de expresión de ambas variantes en experimentos diseñados para demostrar la expresión uniparental de uno de las dos variantes alélicas, observamos que la variante T es la que segregándose por vía materna se expresa en calidad uniparental en embriones heterocigotas A/T (Sikora et al., 2012).

Sorprendentemente, en el caso del bovino Criollo macho, portador de la translocación, el alineamiento de la secuencia mostró un nuevo "novel" polimorfismo en la posición del SNP, encontrándose una **G** en lugar de una A o T. Los resultados del cromatograma lo confirman, siendo este individuo un heterocigota **G/T** (Fig. 14). En una región muy cercana al SNP se encontró también otro sitio variable donde se observó la presencia de una **G** en lugar de una C.

Esta "novel" variante se observa únicamente en el animal portador de la rob (1; 29), mientras que las restantes muestras de bovinos Criollos y todas las muestras de Holando resultaron con el nucleótido **C**. Estos resultados mostraron que el individuo portador de la translocación rob (1; 29) presenta 2 polimorfismos, uno para el SNP (**G** en lugar de A o T) y otro muy próximo a éste (**G** en lugar de C)

Cultivos linfocitarios

Frente a la ausencia de metafases en los cultivos linfocitarios analizados, paso a discutir las posibles y más frecuentes causas de este resultado.

El hecho de no observar metafases en los cultivos linfocitarios puede ser debido a múltiples variables que van desde la extracción de las muestras, estado de los terneros, almacenamiento de las muestras, preparación del medio de cultivo completo, estabilidad de la temperatura del cultivo, tiempo de acción de la colchicina, de la solución hipotónica y manipulación del operador (manejo en la siembra, en la preparación del medio de cultivo, en el sacrificio del cultivo, en la realización de las preparaciones, como las más importantes).

En relación a la extracción de las muestras, la calidad de la sangre resultante sería una de las causas del resultado obtenido en los cultivos linfocitarios, donde las muestras sanguíneas podrían presentar hemólisis.

Este proceso consiste en la liberación de hemoglobina por parte de los eritrocitos indicando daño en las membranas celulares. La mayoría de las hemólisis se producen durante y después de la extracción sanguínea. En una muestra sanguínea la hemólisis se evidencia tan pronto como el plasma o el suero se separa (sedimentación o centrifugación).

Dentro de las posibles causas de hemólisis durante y después de la extracción sanguínea tenemos:

Traumatismo directo

Excesiva aspiración en la extracción de la sangre hacia la jeringa.

Excesiva fuerza en la expulsión de la sangre desde la jeringa.

Extracción de la sangre mediante tubo de vacío de gran volumen (Vacutainer) debido a la fuerza con la que la sangre choca contra las paredes del tubo.

Excesivo estasis de sangre cuando la vena se ocluye durante la extracción sanguínea.

Agitación excesiva del tubo de la muestra cuando se mezcla la sangre con el anticoagulante (formación de espuma).

Congelación de la muestra sanguínea.

Lipemia (elevada concentración de lípidos)

En algunas de las muestras sanguíneas obtenidas, se observó un color similar al encontrado en la bibliografía, por lo que no podemos excluir la acción de la hemólisis como una causal de los resultados obtenidos. (www.wikipedia.com)

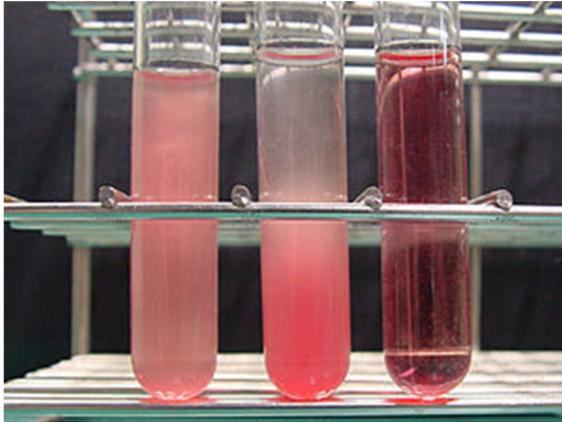


Figura 16: Células sanguíneas con hemólisis (a la derecha) y sin ella (a la izquierda y al centro)

En relación a otra variable como lo es la preparación del medio de cultivo, se realizaron dos cultivos independientes a los efectos de su evaluación:

A) preparación del medio de cultivo completo;

B) utilización de un medio de cultivo ya probado y almacenado en freezer.

La ausencia significativa de proliferación celular en ambos cultivos, excluye en parte que una de las causales fuese el medio de cultivo, aunque no podemos descartar la manipulación del operador. Debemos tener en cuenta que en el cultivo identificado como A, algunas de las muestras (N=3) respondieron con una proliferación celular aunque baja y con alteración de la estructura de la cromatina (Fig. 15)

En relación a la estabilidad de la temperatura del cultivo ($T=38^{\circ}\text{C}$) no se percibieron cambios aparentes; la solución de colchicina (10ug/ml) se introdujo 6hrs. antes de levantar el cultivo; el tiempo de acción de la solución del KCl (0,075M), correspondió a 20 min, habiéndose preparado en el momento y manteniéndola a la temperatura del medio de cultivo (aprox. 38°C). Por último cabe señalar que otra causal corresponde a la manipulación del operador (manejo en la siembra, en la preparación del medio de cultivo, en el sacrificio del cultivo, en la realización de las preparaciones, etc.).

CONCLUSIONES

En el desarrollo de esta tesis analicé un fragmento del gen PHLDA2 donde se encuentra ubicado un polimorfismo de un solo nucleótido (A/T) directamente asociado con el fenómeno de impronta genética.

El material utilizado correspondió a muestras de bovinos Criollos normales y portador de la translocación rob(1; 29). Las muestras analizadas presentaron ambas mutaciones (A/T), excepto el animal portador de la translocación donde identifiqué un nuevo SNP, correspondiendo a G. Por lo tanto observé un genotipo heterocigota G/T en este animal.

A los efectos de realizar una comparativa de los animales problema (CU), utilicé muestras de una raza netamente endogámica, el Holando Uruguayo.

Los resultados obtenidos correspondieron a una homocigosis A/A para todos los animales secuenciados y analizados.

En primera instancia es indispensable confirmar estos resultados en un número mayor de individuos a los efectos de diseñar experiencias que permitan asociar directamente los SNPs de este gen con los problemas de subfertilidad de esta translocación Robertsoniana.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la Dra. Alicia Postiglioni por permitirme realizar esta tesis, por su gran ayuda, dirección y apoyo en las diferentes facetas de la misma.

Al Br. Rody Artigas por su colaboración en las técnicas de laboratorio.

A la Dra. Silvia Llambí por proporcionarme las muestras para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Rosa Gagliardi y a la Mag. María Montenegro por su ayuda en el laboratorio.

Al Dr. Andrés Iriarte por su guía en el análisis de los datos obtenidos y a la Sra Iris Hernández por su colaboración.

A los miembros del Tribunal por su evaluación, a la Dra. Silvia Llambí y a la Dra. Eileen Armstrong.

Finalmente quiero agradecerle a mi familia por su apoyo incondicional, a mis padres, mi hermana, mi tía y mi abuelo.

Gracias a todos!

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Armstrong, E. (2004). Análisis de la diversidad genética del bovino Criollo Uruguayo mediante microsatélites. Tesis de Maestría, 41-44.
- Arredondo H. (1958). Santa Teresa y San Miguel. La restauración de las fortalezas. La formación de sus parques. Editado por la imprenta "El siglo ilustrado", Montevideo.
- Artigas, R., Iriarte, W., Iriarte, A., De Bethencourt, M., Llambí, S. & Postiglioni A. (2010). Effects of 5-azacytidine in lymphocyte-metaphases of Creole cows carrying the rob(1; 29). *Research in Veterinary Science*, 88, (2), 263–266.
- Caorsi, C.(1973). Holando Uruguayo. Historia y presente de una raza. Sociedad de Criadores Holando del Uruguay.1-35.
- Chaves R, Adegas F, Heslop-Harrison JS et al (2003) Complex satellite DNA reshuffling in the polymorphic rob(1;29) Robertsonian translocation and evolutionarily derived chromosomes in cattle. *Chromosome Res.* 11:641–648.
- Di Meo GP, Perucatti A, Chaves R et al (2006) Cattle rob (1;29) originating from complex chromosome rearrangements as revealed by both banding and FISH-mapping techniques. *Chromosome Res* 14:649–655.
- Ducos, A.; Revay, T.; Kovacs, A.; Hidas, A.; Pinton, A.; Bonnet-Garnier, A.; Molteni, L, Slota, E.; Switonski, M.; Arruga, M.V.; Van Haeringen, W.A.; Nicolae, I.; Chaves, R.; Guedes-Pinto, H.; Andersson, M and Ianuzzi, L. (2008) Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: An overview. *Cytogenetic and Genome Research*, 120, (1-2), 26-41
- Eldridge, (1985). *Cytogenetics of livestock*. AVI, 298pp.
- Elsik et al; (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324 (5926), 522-8.
- Gustavsson, I.(1969). Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 63, 68–169.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.
- Ishida, M., Moore, G.E.(2012). The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine*
- Llambí, (1995). Estudios citogenéticos y amplificación de ADN *in vitro* en Holando Uruguayo con problemas reproductivos. Tesis de Maestría, 28-29.

Postiglioni, A., Llambí, S., Gagliardi, R., DeBethencourt, M., (1996). Genetic characterization of Uruguayan Creole cattle. I. Cytogenetic characterization of a sample of Uruguayan Creole cattle. Arch. Zootec. 45 (170–171), 209–213.

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

Postiglioni et al., 2000. Analysis of the population structure of Uruguayan Creole cattle as inferred from milk major gene polymorphisms XXI Congreso Mundial de Buiatría. (CD)

Postiglioni A., Artigas R., Iriarte A., Iriarte W., Grasso N. and Rincón G. (2012). Could Tissue-Specific Genes Be Silenced in Cattle Carrying the Rob (1; 29) Robertsonian Translocation? DNA Methylation – From Genomics to Technology 7, 151-166.

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

Vrana, 2007. Genomic imprinting as a mechanism of reproductive isolation in mammals. Journal of Mammalogy, 88(1):5–23.

www.ganadería.com.mx

www.Ensemblgenoma.

www.wikipedia.com

www.quiminet.com

APÉNDICE I

Protocolo de extracción de ADN

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50mM de tris HCl, 50 nM EDTA pH 8,1 % de SDS y 50 nM de NaCl), proteinasa K (10mg/ml), NaCl (5M), TE 1X pH 8 (autoclavado), etanol o isopropanol absolutos a -20°C y opcionalmente RNAsa A (10mg/ml).

- 1- Se coloca una pequeña muestra de tejido (20mg) en un Eppendorf de 1,5 o 2 ml.
- 2- Se enjuaga con agua destilada (opcional).
- 3- Se agregan 500µl de Buffer de lisis y 10µl de proteinasa K.
- 4- Se incuba a 55°C preferentemente con agitación por un mínimo de 2 horas.
- 5- Una hora antes de finalizar se agregó 5 µl de RNAsa A.
- 6- Se centrifuga a máxima potencia (15.000 rpm) durante 15 minutos
- 7- Se colocan 500 µl de sobrenadante a un tubo limpio, evitando acarrear la extracción del fondo así como la capa superficial oleosa.
- 8- Se agregan 300 µl de cloruro de sodio agitando brevemente y se centrifugó a potencia máxima durante 15 minutos.
- 9- Se pipetea 500-600 µl de sobrenadante a un tubo limpio. Se agrega el mismo volumen de isopropanol a -20°C, agitando lentamente primero y luego se mezcló completamente.
- 10- Para recuperar la mayor cantidad de ADN se colocó a -20°C por 2 horas.
- 11- Se centrifuga a potencia máxima por 15 minutos descartando todo el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
- 12- Se lava brevemente con unos 750 µl de etanol 70° evitando perder o disgregar el pellet.
- 13- Se descarta el alcohol y se seca en estufa a 37°C (aproximadamente 2 horas).
- 14- Se resuspende en 100 µl 1X TE y se agita y opcionalmente se incuba a 55°C por 2 horas.
- 15- Se guarda a -20°C

APÉNDICE II

Cultivo Linfocitario Completo

Los cultivos de células linfocitarias se realizaron utilizando medio RPMI 1640, suero fetal bovino (SFB), fitohemaglutinina (PHA) y antibióticos (estreptomina, 10mg./ml. y penicilina, 10.000U/ml).

El medio RPMI 1640 es un medio básico que contiene vitaminas, aminoácidos, sales, glutatión, glucosa e indicador de ph. No contiene proteínas ni agentes promotores del crecimiento, por lo que necesita suplementos para ser un medio completo.

La fitohemaglutinina (PHA), fue empleada originalmente como un medio de separación de los leucocitos de la sangre entera en la preparación de los cultivos, pero luego se encontró que era un iniciador específico de la actividad mitótica: en su presencia se producía la división celular.

El suero fetal bovino (SFB) es el único producto aplicable en cultivos celulares cuyo objetivo es la proliferación in vitro y crecimiento de células animales. Aunque la composición, los efectos y las interacciones exactas de todos los componentes de SFB tienen todavía que ser esclarecidos.

Los componentes principales son:

- Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz de soporte
- Enzimas y Hormonas proteicas
- Factores específicos de activación del desarrollo celular
- Factores de inhibición del desarrollo celular
- Hormonas no proteicas
- Lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular
- Minerales
- Metabolitos y nutrientes
- Sustancias con capacidad de tampón (buffer)
- Inhibidores de proteasas
- Ligantes
- Inactivantes de materiales tóxicos

(Extraído de quiminet.com)

Protocolo de procesamiento de cultivos linfocitarios.

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