



FAVE Sección Ciencias Veterinarias  
ISSN: 1666-938X  
ISSN: 2362-5589  
favecv@gmail.com  
Universidad Nacional del Litoral  
Argentina

Suarez, VH.; Martínez, GM.; Olmos, LH.; Arapa, C.; Cortez, HS.;  
Rojas, MC.; Brihuega, BF.; Santillán, G.; Álvarez, I.; Goz, ML.  
**Problemas sanitarios de las majadas caprinas en los sistemas  
familiares de los valles calchaquies (Payogasta, Salta)**  
FAVE Sección Ciencias Veterinarias, vol. 19, núm. 2, 2020, Julio-, pp. 40-49  
Universidad Nacional del Litoral  
Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=617766522001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

ARTÍCULO ORIGINAL

## Identificación por catálogo y detección molecular de bovinos Holstein portadores de braquiespina en Uruguay

Artigas R<sup>1\*</sup><sup>ψ</sup>, Federici MT<sup>2ψ</sup>, Vázquez N<sup>3</sup>, Alcántara M<sup>1</sup>, Ramírez M<sup>1</sup>, Guerra S<sup>1</sup>, Dutra F<sup>4</sup>, Llambí S<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética y Mejora Animal, Área Genética. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR). Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología. Estación experimental INIA Las Brujas. Ruta 48, km10, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay.

<sup>3</sup> Departamento de Morfología y Desarrollo, Área Anatomía. Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup> DILAVE Miguel C. Rubino, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

\* Correspondencia: Rody Artigas, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Av. Alberto Lasplaces 1550, C.P 11600, Montevideo, Uruguay.. E-mail: [rodyartigas@gmail.com](mailto:rodyartigas@gmail.com)

ψ Estos autores contribuyeron por igual

Recibido: 3 Marzo 2020. Aceptado: 1 Agosto 2020. Disponible en línea: 14 Agosto 2020

Editor: P. Beldomenico

**RESUMEN.** El síndrome de braquiespina es una condición genética de la raza Holstein, detectada en el año 2006. Es causado por una delección de 3.3 Kb en el gen *FANCI* localizado en el cromosoma bovino 21. La mutación fue identificada en poblaciones de Holstein de Europa, América del Norte y Asia. Dada la importancia económica del defecto y su amplia distribución mundial, el objetivo de este trabajo ha sido la identificación de animales portadores en el núcleo de selección genética de la raza en Uruguay y el diagnóstico molecular del alelo deletéreo en animales del rodeo nacional. En el presente estudio se analizaron 2598 registros de toros Holstein del catálogo de padres del sistema de evaluación genética lechera, los registros de toros pertenecientes a los catálogos de semen Holstein disponible para Uruguay de los años 2014 al 2018; y 71 vacas pertenecientes al rodeo general. Se encontraron 28 toros portadores de braquiespina de un total de 377 toros con información genética del catálogo de padres y cuatro vacas portadoras de un total de 71 genotipificadas en nuestro laboratorio. Se demostró una disminución en el ingreso de semen de animales portadores al país entre los años 2014 y 2018. La frecuencia significativa de animales portadores en Uruguay evidencia la necesidad de implementar estrategias que permitan eliminar gradualmente el defecto de la población.

**SUMMARY. Identification through sire catalogues analysis and molecular detection of brachyspina carriers in Uruguayan Holstein.** Brachyspina syndrome is a hereditary recessive disease of recent identification in the Holstein breed. It is caused by a deletion of 3.3Kb in the *FANCI* gene located in the bovine chromosome 21. The mutation was identified in Holstein populations of Europe, North America and Asia. Given the economic importance of the defect and its wide distribution, the objective of this work was the identification of carrier animals in the genetic selection nucleus of the breed in Uruguay and the molecular verification of the deleterious allele in animals of the national herd. In the present study, 2598 records of Holstein bulls were analyzed from the list of parents of the dairy genetic evaluation system, records of bulls belonging to the Holstein semen catalogs available for Uruguay from 2014 to 2018; and 71 cows belonging to the general herd. Twenty-eight brachyspina carrier bulls were found of a total of 377 bulls with genetic information from the list of parents and four carrier cows of a total of 71 genotyped in our laboratory. A decrease in the income of semen from carrier animals to the country between 2014 and 2018 was demonstrated. The significant frequency of carrier animals in Uruguay evidences the need to implement strategies to gradually eliminate the population defect.

**Palabras clave:** *Bos taurus, enfermedades hereditarias, inseminación artificial, fertilidad*

**Keywords:** *Bos taurus, hereditary disease, artificial insemination, fertility*

### Introducción

El síndrome de braquiespina (SB) (OMIA 000151-9913) es un trastorno hereditario letal autosómico recesivo de la raza Holstein. El primer caso reportado data del año 2006 en Dinamarca (Agerholm et al., 2006) y desde

entonces varios más se han diagnosticado en diferentes países (Agerholm & PeperKamp, 2007; Testoni et al., 2008; Agerholm et al., 2010).

La enfermedad produce mayormente mortalidad embrionaria (Charlier et al., 2012). En algunas ocasiones

puede observarse el nacimiento de terneros muertos con marcadas malformaciones como: retraso del crecimiento, braquignatismo inferior, desplazamiento caudal de las orejas, acortamiento de la columna (que da el nombre a la enfermedad) y miembros desproporcionadamente largos que le dan al animal aspecto de alce (Agerholm et al., 2006; Testoni et al., 2008; Agerholm et al., 2010).

El SB es producido por una mutación en el gen *FANCI* (Fanconi Anemia complementation group I) que se encuentra localizado en el cromosoma bovino BTA 21. *FANCI* codifica para una proteína monoubicuitinada con un rol fundamental en los procesos de reparación del ADN (Fang et al., 2013). El alelo mutado es producido por una delección de 3.3 Kb que contiene los exones 25 al 27 del gen y el empalme del exón 24 con el 28 (Charlier et al., 2012), lo que produce una proteína no funcional. La naturaleza de la mutación ha permitido diseñar una prueba diagnóstica simple basada en las técnicas de PCR y electroforesis (Charlier et al., 2012), asignando a los animales genotipados el código internacionalmente reconocido TY (libre de SB) o BY (portador de SB). Gracias a estas técnicas, la enfermedad pudo ser rastreada molecularmente en la mayor parte de los casos al toro de elite americano Sweet Heaven Tradition (023HO00206) nacido en el año 1974 (Fang et al., 2013).

La utilización de toros emparentados con Sweet Heaven Tradition en los programas de mejoramiento genético de la raza permitió que el alelo mutante se propague en las diferentes poblaciones Holstein (Fang et al., 2013). Así lo demuestran varios estudios que detectan portadores para el alelo de la enfermedad a pesar de no reportar casos clínicos (Van Raden et al., 2011; Fang et al., 2013; Sahana et al., 2013; Ruś & Kamiński, 2015; Li et al., 2016).

En Uruguay la enfermedad no ha sido diagnosticada y la presencia del alelo mutante en el rodeo general aún no se ha reportado en la literatura. Por este motivo, el objetivo de este trabajo es determinar la presencia del alelo deletéreo en la raza Holstein de Uruguay.

## Materiales y Métodos

Se analizaron los registros de 2598 toros Holstein, nacionales e importados, nacidos entre 1964 y 2014, pertenecientes al catálogo de padres actualizado al año 2018, publicado por Evaluaciones genéticas lecheras, disponible en <https://www.geneticalechera.com.uy/>. De forma independiente al catálogo de padres, se evaluaron los registros de los toros Holstein pertenecientes a los catálogos de semen lechero disponible para Uruguay entre los años 2014 y 2018, a los efectos de conocer la evolución del ingreso de semen de toros BY al país en los últimos años. Estos catálogos son publicados por la institución de Mejoramiento y Control

Lechero Uruguayo y constituyen un material de acceso público (<http://www.mu.org.uy/>). Cada uno de los registros fue evaluado utilizando las bases de datos de: Holstein Association USA (<http://www.holsteinusa.com/>) ABS Global (<https://bullsearch.absglobal.com/en-us/bull/quick-search>) DairyNZ (<https://www.dairynz.co.nz/animal/animal-evaluation/bull-team/>) World Wire Sires (<http://wwsires.com/>) y Evaluaciones genéticas lecheras (<https://www.geneticalechera.com.uy/>).

Adicionalmente, se analizaron 71 muestras de ADN de animales Holstein uruguayo, no emparentados, previamente extraídas según el protocolo de Green & Sambrook (2012) a partir de sangre entera periférica colectada entre los años 2014 y 2019. Las muestras provenían del banco de ADN del Área Genética-Facultad de Veterinaria y de la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Las muestras fueron cuantificadas con espectrofotómetro Nanodrop ND-1000® (Thermo Scientific™) y estandarizadas a una concentración de 100ng/μL. Las muestras fueron amplificadas por PCR utilizando los primers forward: 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3' y reverse: 5'-ATAATAATAAAAGCAGGATGCTGAAA-3' descritos previamente por Charlier et al. (2012). La reacción fue puesta a punto en un volumen final de 25μL conteniendo: 100ng de ADN genómico, 2.5μL de Buffer de PCR 10X (Mg<sup>2+</sup>: 20mM), 1μM de cada primer, 10mM dNTPs y 0.4μL U-Taq ADN polimerasa (SBS Genetech Co., Ltd., China). La reacción se realizó utilizando termociclador MultiGene II (Labnet International, INC., EEUU). El programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificación y una etapa final de extensión a 72°C por 10 min. Cada ciclo de amplificación estaba compuesto por las etapas de: desnaturalización (94°C, 30 s), hibridación (58°C, 1 min) y extensión (72°C, 2.5 min). Los amplicones obtenidos fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualizados con un sistema de documentación de geles BIOTOP-SC805 y el software BioSens Gel Imaging System V2.0 (Shanghai Bio-Tech Co., Ltd., China).

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas para la muestra de referencia del rodeo comercial utilizando el software libre Genepop 4.2 (Raymond & Rousset, 1995) disponible en: [http://genepop.curtin.edu.au/genepop\\_op1.html](http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html).

## Resultados

### Análisis de catálogos

En el análisis del catálogo de padres de las evaluaciones genéticas lecheras se observó que el 90 % (n=2332) de la contribución genética provino de Estados Unidos, Uruguay y Canadá (Tabla 1). De los 2598 toros analizados, solamente un 14,5 % (n=377) contaba con test genético registrado para SB (Tabla 1). De estos, un 7.4% (n=28) fueron portadores (BY), procedentes de Estados Unidos y Canadá. Al evaluar la descendencia de los toros BY en Uruguay se observaron 2198 hijas incluidas en el sistema de evaluación genética nacional (Tabla 1).

En la evaluación de los catálogos de semen lechero disponible para Uruguay entre los años 2014 y 2018 se observó que la mayor contribución genética al rodeo Holstein provino en esos años desde Estados Unidos, Canadá y Nueva Zelanda (Tabla 2). En términos generales se observó un aumento en el ingreso de semen de toros genotipados, salvo algunas excepciones. Al evaluar la relación del número de toros con test diagnóstico para SB y el número de toros portadores (BY) que ingresaron al país en los años 2014-2018 (Figura 1), puede observarse que en la medida en que aumentó la proporción de toros con test diagnóstico oficial, hubo una disminución en el ingreso de semen de toros BY al país.

**Tabla 1.** Condición genética para el SB de los toros utilizados como padres en los sistemas de evaluación genética lechera de Uruguay hasta el año 2018 según país de procedencia.

País	Animales (total)	Animales SD**	Test genético (%/n)	TY <sup>b</sup>	BY <sup>a</sup>	Hijas de toros BY
Canadá	315	261	17% (54)	46	8	643
Estados Unidos	1411	1104	22% (307)	287	20	1555
Nueva Zelanda	90	90	0% (0)	0	0	-
Holanda	71	64	9.8% (7)	7	0	-
Uruguay	606	606	0% (0)	0	0	-
Otros*	105	96	8.5% (9)	9	0	-
<b>Total</b>	<b>2598</b>	<b>2221</b>	<b>14.5% (377)</b>	<b>349</b>	<b>28</b>	<b>2198</b>

\*Otras: Alemania, Argentina, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Francia, Reino Unido, Italia, Suecia. \*\*SD: Sin datos. <sup>b</sup>Animales normales. <sup>a</sup>Animales portadores.

**Tabla 2.** Semen lechero disponible para Uruguay entre los años 2014 y 2018.

País	2014			2015			2017			2018		
	n	SD* (%)	BY <sup>a</sup>									
Canadá	49	30	5	87	25	4	96	11	1	44	9	1
Estados Unidos	299	22	5	296	10	3	270	8	2	294	2	1
Nueva Zelanda	40	100	0	44	100	0	49	100	0	70	100	0
Holanda	13	23	0	19	37	1	30	86	1	24	83	1
Uruguay-Argentina	7	100	0	7	100	0	4	100	0	3	100	0
Otros*	13	31	10	7	57	0	23	30	0	27	70	0

\*Otras: Alemania, Argentina, Australia, Bélgica, Dinamarca, España, Francia, Reino Unido, Italia, Suecia. \*\*SD: Sin datos. <sup>b</sup>Animales normales. <sup>a</sup>Animales portadores.

### Análisis molecular

Mediante PCR-electroforesis se lograron identificar cuatro vacas portadoras de braquiespina. En los animales homocigotas dominantes se observó un solo fragmento de amplificación de 3738pb, mientras que los animales portadores presentaron una banda de 3738pb y otra de 409pb (Figura 2). La frecuencia de portadores en la muestra de vacas analizada fue de 0.06 y la frecuencia del alelo mutado fue de 0.03.

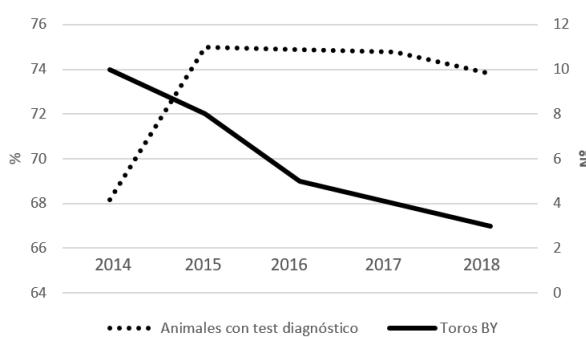
### Discusión

El catálogo de padres de las evaluaciones genéticas lecheras incluye toros Holstein con al menos una hija

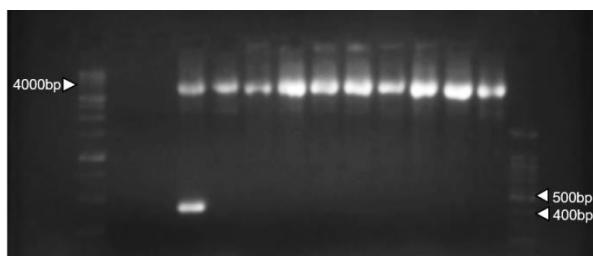
incluida en el sistema de evaluación genética para la raza en Uruguay. De su análisis se desprende un fuerte componente de material genético proveniente de Estados Unidos (Tabla 1), donde presumiblemente se originó la mutación fundadora del SB (Fang et al., 2013). Asimismo, se observa la presencia de un componente importante de genética canadiense (Tabla 1), dónde se han reportado casos de SB en los últimos años (Agerholm, et al. 2010).

De la totalidad de toros con información genética que conforman parte del acervo genético de la raza, se detectaron 28 animales portadores del SB (7.4%). El número de toros BY podría ser mayor, dado el bajo número de animales con información genética

disponible en las bases de datos públicas respecto a su estatus genético para la enfermedad, incluyendo al 100% de los toros uruguayos (Tabla 1). La alta proporción de toros sin test diagnóstico en el catálogo de padres puede ser explicada por el hecho de que este incluye toros anteriores a que el test diagnóstico para la mutación fuera publicado (Charlier et al. 2012). A pesar de ello, la proporción de toros portadores utilizados en Uruguay fue superior al 4.9% reportado por Fang et al. (2013) en toros Holstein de China.



**Figura 1.** Ingreso de semen de toros con test diagnóstico (%) y BY (n) a Uruguay. Evolución entre los años 2014 y 2018.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Marcador de peso molecular 1000bp. Carril 2: control negativo. Carril 4: Animal portador. Carriles 5 al 13: animales homocigotos normales. Carril 14: Marcador de peso molecular 100pb.

Los animales BY del catálogo de padres contribuyeron genéticamente en los programas de mejoramiento Holstein, dejando un gran número de hijas (n=2198) en los sistemas de evaluación genética (Tabla 1). Dado que el mecanismo de herencia de la enfermedad es autosómico recesivo, debemos asumir que al menos el 50% de las hijas (n=1099) fueron portadoras de SB, lo que indicaría la presencia del alelo mutante en el núcleo de selección uruguayo. Dado que la totalidad de hijas (n=2198) fueron evaluadas para características de producción de leche, estas dejaron descendencia a nivel nacional. Dentro de los toros BY utilizados en Uruguay se destaca la presencia de Rothrock Tradition Leadman (008HO02024), descendiente directo de Sweet Heaven Tradition y uno de los principales difusores del alelo mutante en el mundo (Fang et al., 2013).

En el análisis de los catálogos de semen lechero disponible para Uruguay entre los años 2014 y 2018 (posterior a la publicación del test molecular de diag-

nóstico para identificar portadores), se puede observar claramente como el porcentaje de toros sin datos (SD) disminuye. En el caso de Canadá de 30% a 9% y de 22% a 2% para Estados Unidos (Tabla 2). Sin embargo, para Nueva Zelanda, Uruguay y Argentina, el 100% de los animales se mantiene sin test genético disponible. Por otro lado, los toros genotipados provenientes de Holanda y del ítem “otros” disminuyen notoriamente a pesar de que aumenta el ingreso de semen de dichas procedencias (Tabla 2).

En la medida en que aumentó el número de toros genotipados para el SB entre los años 2014 y 2018, disminuyó el ingreso de animales portadores al país. A pesar de ello, entre el 2015 y el 2018 se observó una tendencia en la disminución de animales testeados para SB (Figura 1). Esto se explica por un aumento en el ingreso de semen de Nueva Zelanda y Holanda con escasa información disponible en cuanto al estatus genético para la enfermedad (Tabla 2).

A pesar de que el SB fue identificado hace 14 años, los reportes del alelo mutado en las poblaciones no son muchos. En este trabajo se lograron identificar por PCR y electroforesis vacas portadoras del SB, obteniéndose fragmentos de amplificación (Figura 1) congruentes a los reportados por Charlier et al. (2012) y Fang et al. (2013).

La frecuencia de vacas portadoras encontrada en este trabajo fue menor a la reportada en Holanda (0.07, Charlier et al., 2012), similar a la reportada en Estados Unidos (0.06, Van Raden et al. 2011) y mayor a la encontrada en China y en Holstein nórdico (0.02, Fang et al. 2013 y 0.04, Sahana et al. 2013, respectivamente). En Polonia Ruś y Kamiński (2015) reportan un porcentaje de animales portadores de 10%, mayor al documentado en otros países.

La proporción de vacas portadoras de SB en Uruguay (presente estudio) y en otros rodeos Holstein del mundo es importante (Ruś y Kamiński, 2015) y la utilización de toros BY puede elevarlas significativamente. Recientemente Cole et al. (2016) demostraron que los animales BY presentaban un mayor rendimiento de grasa en la leche. Al utilizar toros con alto mérito genético para esa característica, quizás se pueda haber favorecido la dispersión del SB por diferentes países. En el mismo trabajo, y en las condiciones de producción de Estados Unidos, los autores demostraron que el SB es la condición genética que más pérdidas económicas produce en la raza Holstein. A pesar de ello, la eliminación de toros BY de alto mérito genético muchas veces es inviable económicamente, ya que presentan otros genes favorables para características productivas. Dirigir los apareamientos (evitando cruzar portadores) sería una estrategia alternativa para mantener la performance productiva del rodeo. Pero para esto es fundamental aplicar técnicas de diagnóstico molecular que permitan identificar a los animales BY.

Este trabajo representa la primera evidencia de animales BY en el núcleo de selección genética Holstein del país. Asimismo, se comprobó molecularmente la presencia del alelo mutante en el rodeo comercial de la raza. A pesar de la disminución del ingreso de semen de animales portadores, el alelo BY persiste en el rodeo comercial uruguayo. Situaciones similares pueden producirse en la región, por lo que la puesta a punto de técnicas de diagnóstico podrían ser necesarias para reducir la frecuencia del alelo deletéreo y minimizar las pérdidas embrionarias a causa del SB.

### Agradecimientos

Al Ing. Ignacio Aguilar por el asesoramiento brindado en las bases de datos. A la Comisión de investigación y desarrollo científico (CIDECA) de la Facultad de Veterinaria, UdeLaR por la beca de iniciación a la investigación científica. A la CSIC-Udelar y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

### Bibliografía

Agerholm J, Delay J, Hicks B, Fredholm M. 2010. First confirmed case of the bovine brachyphina syndrome in Canada. *Can. Vet. J.* 51: 1349-1350.

Agerholm JS, Peperkamp K. 2007. Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyphina syndrome. *BMC Vet. Res.* 3:8, DOI: 10.1186/1746-6148-3-8.

Agerholm JS, Mcevoy E, Arnbjerg J. 2006. Brachyphina syndrome in a Holstein calf. *J. Vet. Diagn. Investig.* 18: 418-422.

Charlier C, Agerholm J, Coppieters W, Karlsson-Mortensen P, Li W, Gerben DJ, Fasquelle C, Karim L, Cirera S, Cambisano N, Ahariz N, Mullaart E, Georges M, Fredholm M. 2012. A deletion in the Bovine FANCI Gene Compromises Fertility by Causing Fetal Death and Brachyphina. *PLoS One* 7: e43085

Cole JB, Null DJ, Vanraden PM. 2016. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *J. Dairy Sci.* 99: 7274-7288.

Fang L, Li Y, Zhang Y, Sun D, Liu L, Zhang Y, Zhang S. 2013. Identification of brachyphina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. *J. Vet. Diagn. Investig.* 25: 508-510

Green M and Sambrook J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. En: (4th Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2028 pp.

Li Y, Fang L, Zhang S, Liu L, Zhu Y, Xue J, Xiaoqing L, Qiao L, Sun D. 2016. A novel Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for the Identification of Brachyphina Syndrome Carriers in Chinese Holstein Cattle. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* 5:3, DOI:10.4172/2325-9590.1000200

Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Sydney School of Veterinary Science, University of Sydney. OMIA Number: {9913}: {24-03-2015}. URL: <https://omia.org/>

Ruśc A, Kamiński S. 2015. Detection of Brachyphina carriers within Polish Holstein-Friesian bulls. *Pol. J. Vet. Sci.* 18: 453-454.

Raymond, M. and Rousset, F. 1995. Genepop (Version 1.2): Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.

Sahana G, Nielsen US, Aamand GP, Lund MS, Guldbrandtsen B. 2013. Novel harmful recessive haplotypes identified for fertility traits in Nordic Holstein cattle. *PLoS One* 8: e82909.

Testoni S, Diana A, Olzi E, Gentile A. 2008. Brachyphina syndrome in two Holstein calves. *Vet. J.* 177:144-146.

Vanraden PM, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 94: 6153-6161.