

## AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE PORTADORES DE LA DEFICIENCIA EN LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA EN RAZA HOLANDO

Branda Sica, A<sup>1\*</sup>; Federici, M.T.<sup>1</sup>; Briano, C.<sup>2</sup>; Romero, A.<sup>2</sup>; Llambí, S<sup>3</sup>., Dutra, F.<sup>2</sup>; Dalla Rizza, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

<sup>2</sup> DILAVE “Miguel C. Rubino”, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

<sup>3</sup> Cátedra de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

### Introducción

La deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD) representa un problema a nivel de los tambos por generar inmunodepresión que podría ser la causa predisponente de muchas de las patologías infecciosas reconocidas en terneros. Los animales afectados mueren a causa de la extrema susceptibilidad a las infecciones, causada por la incapacidad de glóbulos blancos (leucocitos) para pasar al espacio extravascular en el tejido infectado. Es una enfermedad autosómica, producto de una mutación puntual en el gen CD18 que codifica una glicoproteína de membrana del leucocito llamada subunidad beta-2 integrina (Shuster y col., 1992). En la raza Holando, la enfermedad es causada por una mutación que provoca un cambio de Adenina (A) a Guanina (G) en el exón 4 de la subunidad beta-2 integrina, donde se produce una sustitución de un aminoácido por otro, del ácido aspártico por glicina en la posición 128 de la proteína del receptor. La mutación afecta el funcionamiento de un receptor proteico en los leucocitos y en la respuesta inmune contra las infecciones. En nuestro país, utilizando el diagnóstico con marcadores de ADN sobre una muestra de 138 bovinos Holando en establecimientos lecheros, se encontró que el 7.2% eran portadores de esta patología, con una prevalencia génica de 0.96%, 13.3% y 36.8% en vacas, toros y terneros, respectivamente (Llambi y col., 2007). Otro muestreo posterior en 253 vacas Holando en el departamento de Colonia confirmó la importancia de BLAD en el país (Kelly y col., 2010). El diagnóstico de BLAD es difícil de realizar por métodos de diagnósticos convencionales, sólo puede confirmarse por técnicas biotecnológicas tales como PCR/RFLP o PCR/Secuenciación.

### Materiales y métodos

Se ha realizado un muestreo en forma aleatoria en 190 vacas de la raza Holando provenientes de predios lecheros de nuestro país. Se realizaron las extracciones de glóbulos blancos a partir de sangre fresca. Se cuantificó y se determinó la calidad de ADN obtenido en el laboratorio del Banco de ADN de la Unidad de Biotecnología, siguiendo normas y protocolos del mismo. Para la realización de este diagnóstico se utilizaron 2 metodologías distintas: (1) **PCR- RFLP**: Se amplificó por PCR una región del gen CD18 (159 pares de bases) y se digirió posteriormente el producto amplificado con la endonucleasa *TaqI* de acuerdo a Llambi y col. (2003), y (2) **PCR-Secuenciación** (MACROGEN, Korea): Se enviaron a secuenciar los amplicones (secuencias *forward* y *reverse*). Se analizaron mediante alineamiento múltiple (software *BioEdit*), restricción virtual (software *NEBcutter*) y análisis visual del SNP por observación de la superposición de los picos de fluorescencia en el electrofenograma respectivo (para el caso de un heterocigota portador de BLAD).

### Resultados y Discusión

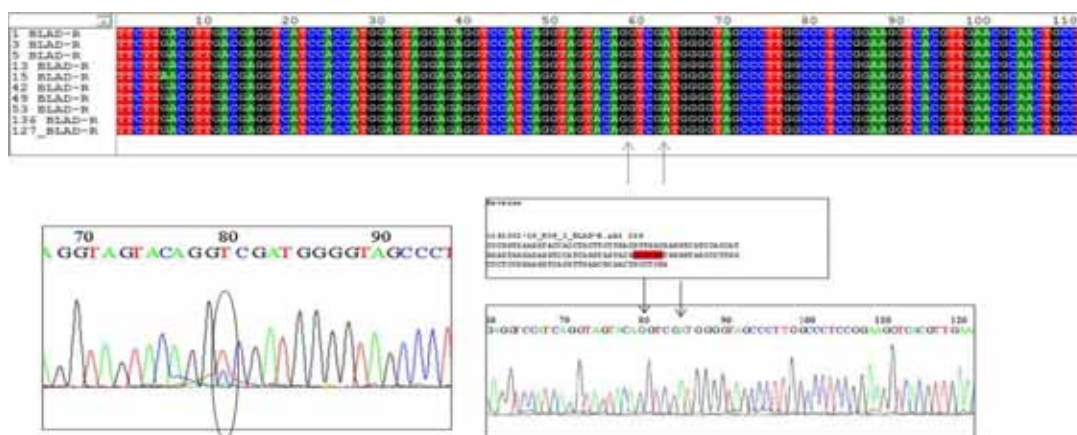
De un total de 190 muestras, se analizaron 94 mediante PCR- RFLP. Los amplicones respectivos se fueron secuenciados y analizados. De este total se confirma un único portador de BLAD para este muestreo aleatorio por PCR- RFLP y secuenciación del amplicón. Se determinaron por PCR- RFLP 23 portadores de BLAD, 2 de ellos mostraron las tres bandas bien claras (159, 109 y

50 pb) y en el resto se observó la banda de 109 pb tenue, lo cual puede deberse a la metodología utilizada, que si bien es sensible, existen muchas variables que pueden influir en la lectura de los resultados tales como las bandas tenues o la digestión incompleta de la enzima. En este último caso, se observaría la banda correspondiente al amplicón no digerido, lo que se puede confundir con la ausencia del sitio de corte de *TaqI* correspondiente a la mutación. En el gel que se muestra a continuación (**Figura 1**) se observa un heterocigota portador de BLAD que presenta las bandas correspondientes de 159, 109 y 50 pb, respectivamente.



**Figura 1.-** Corrida electroforética en gel de agarosa 3% en TBE 0.5X de las amplificaciones de los productos PCR y digestiones con la enzima *TaqI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Gene Ruler Low Range DNA ladder*. Carriles 2-7: Digestiones con la enzima *TaqI*. Carriles 8-12: Amplificación del fragmento 159 pb por PCR. Carril 13: Control negativo de PCR. Carriles 2-6: Animales con patrones de fragmentos de 109 y 50 pb, indicando que corresponde a un homocigota dominante normal (se observó el fragmento de 109 pb muy tenue en el carril 6, debido al PCR del carril 12 que fue bajo). Carril 7: Animal con patrones de fragmentos de 159, 109 y 50 pb, indicando que es **heterocigota portador de BLAD**.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el alineamiento múltiple y la restricción virtual (datos no presentados), métodos con los que no fue posible determinar portadores. Esto se debe a que al secuenciar se lee la base que presenta la señal más intensa, por lo tanto no puede determinarse el alelo mutado del portador. Posteriormente se analizaron todas las secuencias junto a sus electrofenogramas (**Figura 2**), buscando el SNP (mutación) dentro del sitio de corte de *TaqI*. Mediante este método sólo un portador fue detectado. En éste, en la secuencia *reverse* se observó claramente la superposición de la señal de fluorescencia de ambas bases: la de un individuo normal, Timina (en rojo) con mayor intensidad de fluorescencia y la correspondiente a la mutación, Citosina (en azul) de menor intensidad (**Figura 2**). En la secuencia *forward* se encontró la mutación A→G (Adenina a Guanina), no tan clara como en la *reverse*, ya que la calidad al inicio de la secuenciación no es buena (**Figura 3**).



**Figura 2.-** Alineamiento de 10 secuencias *reverse* utilizando el software BioEdit. Electrofenogramas de las muestras normal (derecha) y portadora de BLAD (izquierda). En esta última se observan dos picos de fluorescencia superpuestos (T- rojo y C- azul) en el nucleótido señalado en círculo, indicando que el individuo es portador de BLAD. Sobre el electrofenograma derecho se muestra la secuencia *forward* obtenida señalando con un recuadro rojo el sitio de corte de la enzima *TaqI*.

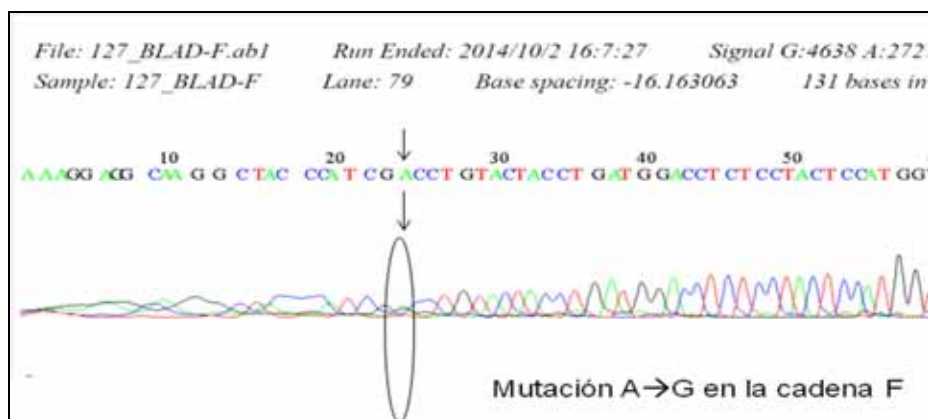


Figura 3.- Localización de la mutación en la secuencia *forward*, indicando la superposición de los picos, Adenina (en verde) y Guanina (en negro).

### Conclusiones y Perspectivas

Se compararon distintas metodologías de diagnóstico de la enfermedad BLAD: RFLP y análisis de secuencias. Tanto el alineamiento como la restricción virtual se demuestra que no son viables debido a que la secuencia leída corresponde a la señal de mayor intensidad, quedando invisible la mutación existente en los portadores. Sólo el análisis caso a caso de la secuencia junto al electrofenograma dan una información fiable de la existencia de portadores de esta enfermedad.

Se propone que el diagnóstico utilizando PCR- RFLP sea confirmado con el análisis de la secuencia, o sustituido por esta tecnología para un análisis de rutina. En la actualidad, con la disminución de los costos de la secuenciación, este método se vuelve una alternativa viable y económica, en relación al alto costo de las enzimas de restricción y de la agarosa, la gran laboriosidad y subjetividad del PCR- RFLP.

Se logró por métodos precisos y sensibles la confirmación del diagnóstico de un animal portador BLAD en una muestra de 94 animales tomados al azar, proporcionando una información más actualizada de incidencia de esta enfermedad en Uruguay. Se propone realizar un estudio más extensivo para determinar las frecuencias alélicas en ganado de leche en Uruguay.

### Bibliografía

Kelly L., Dutra F., Trenchi G., Llambí S., Rivero R., Moraes J., D'Agosto S., Peraza P., Ravagnolo O., Dalla Rizza M. (2012). Diagnóstico molecular de enfermedades bovinas hereditarias presentes en el Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 48(188) 3-11.

Llambí S., Guevara K., Rincón G., Zaffaroni R., de Torres E., Barrera J., Arruga M.V., Rodríguez V., Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiência na adesão leucocitaria em uma população de bovinos da raça holandesa, no Uruguai. *Ars. Veterinaria*. 19:52–56.

Llambí S., Nicolini P., Kelly L., de Torres E. (2007). Frecuencia de la enfermedad hereditaria BLAD en vacas Holando-Uruguayo con control de mastitis. *Jornadas Técnicas Veterinaria-UdelaR V<sup>o</sup>*, Montevideo. Uruguay, páginas 26-27.

Shuster D.E., Bosworth B.T., Kehrlí M.E. (1992). Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene*. 114:267-271.