

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS EN EL URUGUAY: MSUD E ICM.

Kelly L¹; Dutra F²; D'Agosto S; Ravagnolo O.

¹ INIA-Las Brujas. Ruta 48, Km 10. Rincón del Colorado. Las Piedras-Canelones. Uruguay. e mail: lkelly@lb.inia.org.uy;

² DILAVE Lab Reg Este. Treinta y Tres. Uruguay.

Resumen

Recientemente en nuestro país se ha descrito el síndrome ICM hereditario (ICM-MSUD) que incluye tres mutaciones de dos genes diferentes cuya sintomatología es nerviosa. Nuestro objetivo es desarrollar el diagnóstico molecular de estas enfermedades para determinar animales portadores. Se analizaron 14 muestras Hereford de un rodeo problema por presentar dicho síndrome. Las muestras de sangre fueron enviadas por el Dr.M.V. F. Dutra del Rubino Treinta y Tres para realizarle el diagnóstico molecular en el INIA-Las Brujas Unidad de Biotecnología. La técnica para detectar la mutación fue la de PCR-RFLP, tanto para ICM como para el MSUD 248. De los 14 animales testados en la muestra problema para ICM ninguno resultó positivo, pero con respecto a la enfermedad hereditaria MSUD 248 se observaron 5 portadores. Se concluye que el diagnóstico molecular nos permitirá conocer la presencia y la incidencia de estas enfermedades hereditarias en nuestro ganado con el fin de controlarlas mediante la detección de portadores y evitar su diseminación por inseminación artificial.

Introducción

A nivel mundial se describen numerosas enfermedades hereditarias que estarían afectando económicamente la producción (Gentile y Testoni, 2006). De acuerdo a la recopilación realizada por la NCBI-OMIA (National Center for Biotechnology Information-Online Mendelian Inheritance in Animals: <http://omia.angis.org.au>), existen 357 enfermedades y rasgos producidos por un locus simple en bovinos. Por lo cual la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) recomienda analizar varias enfermedades hereditarias como el MSUD (Maple Syrup uridine disease). En Hereford australiano se ha descrito una incidencia de mortandad (0,026%) y de portadores (3%) para el MSUD (Healy y col. 2002). En nuestro país se ha descrito recientemente esta enfermedad (Dutra y Lussich, 2007). El síndrome ICM (Mioclonia Congénita hereditaria): ICM-MSUD es producido por tres mutaciones en diferentes genes que producen sintomatología neurológica en el neonato. Ambas son letales y producidas por una mutación recesiva de un gen autonómico. El ICM es debido a la mutación del receptor de la glicina (neurotransmisor) (Gundlach, 1990). La consecuencia es al cambio de una base de C por A en el lugar 156 del exón 2 de la α 1 subunidad de la glicina que cambia a tyrosina, con la terminación prematura del codón stop. Al haber déficit de la inhibición de los receptores de la glicina en el cordón espinal, aumenta la capacidad neuronal a la respuesta de los estímulos. El MSUD se produce por una mutación del gen E1 α subunidad de la cadena α -cetoácido deshidrogenada. Esta enfermedad se produce por una mutación del exón 9 en Poll Shorthorn

y en el Poll Hereford por una mutación del exón 2 de esa enzima mitocondrial.

Nuestro objetivo es desarrollar el diagnóstico molecular que permita realizar el diagnóstico diferencial de estas enfermedades que integran el síndrome ICM (ICM-MSUD). Esta herramienta biotecnológica nos permitirá conocer la presencia y la incidencia de estas enfermedades hereditarias en nuestro ganado, detectar los portadores con el fin de controlarlas, evitar su diseminación por inseminación artificial y mejora nuestro material genético evitando las pérdidas económicas y garantizando su calidad para la exportación de embriones y semen.

Materiales y Métodos

Se analizaron 14 muestras Hereford por ser posibles portadores de estas enfermedades ya que se había realizado un diagnóstico presuntivo de MSUD en un ternero muerto en ese establecimiento con sintomatología nerviosa. Las muestras de sangre con anticoagulante (EDTA potásico) fueron enviadas por el Dr.M.V. F. Dutra del Rubino Treinta y Tres para realizarle el diagnóstico molecular en el INIA-Las Brujas Unidad de Biotecnología.

La técnica para detectar la mutación fue la de PCR-RFLP, tanto para ICM como para el MSUD 248. Primero se le extrajo DNA mediante la técnica de DNAzol® y se lo evaluó en gel de agarosa al 0,8%. Para el ICM se amplificó un segmento de DNA de 273pb, usando los cebadores: F: 5'CTCCATGGGGAGGATTCTGTATA 3' y el R: 5'GCAAGTGGGTTTAGTTCGTATAC 3', en los que se crea un cambio de la secuencia (mismatch) para crear el corte de la enzima AclI permitiendo detectar la mutación que sustituye T por G. En este caso se reconoce el alelo normal (CC) de 232pb y el mutante de 252pb (AA) según la técnica de Healy y col.2002. Para separar las bandas se corrió en un gel al 3%. En el caso de la mutación del MSUD 248 se amplificó con los cebadores: F: 5'CAGCACCCGCCAGGTGG 3'y el R: 5'GCTGTCTATGAACTCGGCTG 3', dando un amplificado de 94pb. La mutación del exón 2 es reconocida por la enzima BglI, produciendo un fragmento normal de 79pb y uno mutante de 94 cuyo diferente tamaño se observa en un gel de agarosa al 4% (Dennis y Healty, 1999).

Resultados

De los 14 animales testados para ICM ninguno fue positivo, pero con respecto a la enfermedad hereditaria MSUD 248 se observaron 5 portadores. Los resultados se observan en foto 1 para el ICM y la 3 y 4 para MSUD 248.

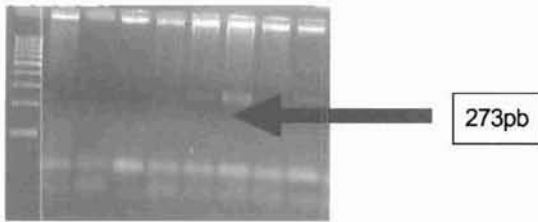


Fig. 1: PCR-ICM. Fragmento de amplificación ICM: 273pb, corresponde próximos a la banda de 300pb del marcador 100bp ladder (línea 1: 100pb, 200, 300, 400, 500). 94pb

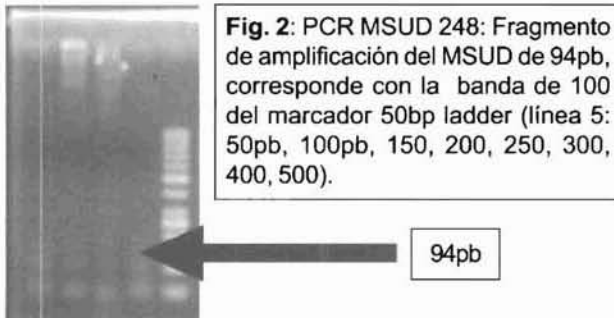


Fig. 2: PCR MSUD 248: Fragmento de amplificación del MSUD de 94pb, corresponde con la banda de 100 del marcador 50bp ladder (línea 5: 50pb, 100pb, 150, 200, 250, 300, 400, 500).

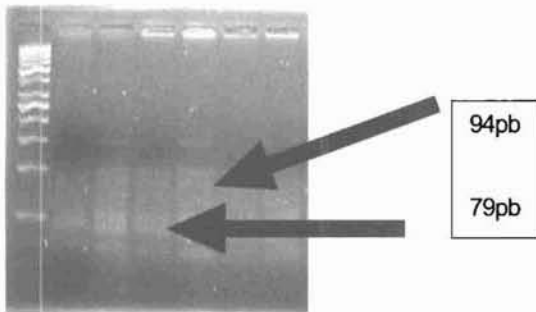


Fig. 3: Corte MSUD: Corte con la enzima de restricción *Bgl* I, presentando los portadores el alelo 79 y 94 entre las bandas del marcador de peso molecular 50bp ladder (línea 5: 50pb, 100pb, 150, 200, 250, 300, 400, 500).

Conclusión

Se concluye que:

- De acuerdo al diagnóstico molecular que los animales problemas testados confirmaron la presencia de la enfermedad hereditaria MSUD 248 en Bovinos Hereford del Uruguay observándose 5 portadores de la muestra problema de 14 animales.
- Esta herramienta biotecnológica nos permitirá controlar la

diseminación de estas enfermedades hereditarias en nuestro ganado.

Summary

Maple syrup urine disease (MSUD) and inherited congenital myoclonus (ICM), two autosomal recessive disorders caused by three mutations in two different genes, were recently recognized in Poll Hereford cattle in Uruguay. A polymerase chain reaction procedure (PCR-RFLP) was developed for detection of heterozygotes for the ICM and MSUD 248 mutations in genomic DNA. From 14 cows of the same problem herd where ICM-MSUD was diagnosis in 2006, 5 were heterozygotes for MSUD 248 and none for ICM. This survey demonstrates that the mutation responsible for MSUD 248 is present in the Uruguayan Poll Hereford population. PCR-RFLP test could be used to diagnosis of maple syrup urine disease in affected newborn calves and in selection of Poll Hereford seed stock, thus avoiding the diffusion of this genetic disease.

Referencias Bibliográficas

<http://omia.angis.org.au> (14/04/08)

Gentile A.; Testoni S. 2006. Desórdenes hereditarios en el bovino. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 8-10 de Junio de 2006: 105-109. Centro Veterinario Paysandú. Uruguay.

Dennos J.A. y Healy P.J. 1999. Definition of the mutation responsible for maple syrup urine disease in poll shorthorn and genotyping poll shorthorn and poll Hereford for maple syrup urine disease alleles. Research Veterinary Science. 67: 1-6.

Healy P.J.; Denis J.A.; Windsor P.A.; Pierce K.D. Schofield P.R. 2002. Genotyping cattle for inherited congenital myoclonus and maple syrup urine disease. Aust. Vet. J. Vol. 80(11):695-697.

Dutra F. y Lussich M. 2007. Edema neuroaxial (posiblemente, maple syrup urine disease) en terneros Polled Hereford en Uruguay. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 7 al 9 de Junio de 2007: 306-307. Centro Veterinario Paysandú. Uruguay.

Kelly, E.L.; Mortari, N.; De Andrés, D.; Postiglioni, A. 2002. Estudio de la estructura genética de la raza Holando Uruguayo mediante marcadores genéticos. Comparación intraracial. Veterinaria. N° 37(147-148): 7-15.