

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AL GENOMA BOVINO EN URUGUAY.

A. Postiglioni y S. Llambí. Area Genética. Laboratorio de Análisis Genéticos en Animales Domésticos. F.Veterinaria. Universidad de la República. Email: alipos@adinet.com.uy sllambi@adinet.com.uy

PRESENTACIÓN

Nos dice nuestro Prof. PhD. Dr. Ingman Gustavsson (1998) (1) en el penúltimo Coloquio Europeo en Citogenética de Animales Domésticos realizado en Budapest que, actualmente nos enfrentamos al desarrollo del mapeo físico en animales domésticos; de los mapas de alta resolución, de la aplicación de técnicas de microdissección para establecer bibliotecas genómicas en la búsqueda de genes candidatos y poder aproximarnos a la localización de enfermedades hereditarias en animales, a rasgos productivos (QTLs), al encuentro de nuevos alelos...

Por otro lado, dos años antes, J.E. Womack del Depto. de Patobiología de la Universidad de Texas, nos presentaba el mapa comparativo del bovino, como una nueva herramienta para el clonaje posicional comparativo (2). <http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase.html>

Recientemente, en la Reunión Latinoamericana de Producción Animal (2000), realizada en nuestro país, el Prof. PhD. Ing.Agr. J.F.Medrano nos expresa la importancia de profundizar en el genoma de diferentes razas bovinas a efectos de conocer la variabilidad oculta existente entre ellas (3).

Es en estos términos que desarrollaremos nuestra ponencia en este Simposio de "Genética Bovina", dentro del XXI Congreso Mundial de Buiatría, presentando los lineamientos y resultados que estamos obteniendo con la introducción de diferentes marcadores genéticos en el análisis del genoma bovino de diferentes razas del Uruguay.

ANÁLISIS DEL GENOMA BOVINO

El genoma de los mamíferos contiene alrededor de 3000 millones de bases de ADN es decir 3000eM (1cM=1.000.000pb), distribuidos en 60 cromosomas, de las que solamente alrededor de un 15% forman parte de los genes, mientras que el resto cumple otras funciones, la mayoría relacionada con su regulación, promoviendo su activación o inactivación. El análisis del genoma se realiza basándose en el conocimiento del mapa génico donde se establece la relación existente entre loci o genes, su orden y ubicación en los cromosomas. A su vez, el mapa génico informa acerca de las relaciones de ligamiento o de independencia entre ellos, representando la distancia genética en función de la frecuencia de recombinación meiótica. Actualmente, alrededor de 1500 marcadores se han localizado en mapas de ligamiento (<http://www.cshl.org/gr/>) empleados para generar mapas de loci de trascendencia económica (ETL) (4). Estos se abordan basándose en el clonaje de genes candidatos posicionales comparativos, obtenidos de los mapas genómicos del hombre, ratón a partir del mapa comparativo bovino. Existen estrategias diferentes que identifican al mapa génico: mapa sinténico, mapa de ligamiento, mapa físico, mapa comparativo (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Los mapas genéticos están basados en marcadores moleculares, identificados para la mayoría de las especies de animales domésticos (<http://probe.nalusda.gov:8300animal/index.html>). Estos se utilizan para la localización de loci asociados con enfermedades hereditarias, con la eficiencia productiva, reproductiva, relacionados con loci simples o para identificar regiones de QTL ("quantitative trait loci", loci de características cuantitativas) que afectan la mayoría de las características de importancia económica (12). Debido a las múltiples utilidades de los marcadores moleculares, estos se agrupan en dos categorías: Tipo I, aquellos que codifican para genes muy conservados en mamíferos y mapeados al menos en las especies humano y ratón. Son poco polimórficos y contribuyen en gran manera a la construcción de mapas comparativos entre especies relacionadas (alrededor de 700 loci); Tipo II, aquellos altamente polimórficos, cuyas secuencias no están demasiado conservadas entre las diferentes especies, siendo útiles para mapear loci de QTLs (existen mapeados unos 2200) (4). Por su alto grado de variación, son utilizados para identificación individual, control de parentesco, análisis poblacionales.

El impacto inmediato que tendrán estos mapas en las especies domésticas, será la identificación y clonación de genes o loci responsables de rasgos productivos (ETL) donde se incluyen los loci para rasgos cuantitativos (QTL). Además de poder explicar su base genética tienen la potencialidad de aumentar la tasa y eficiencia de la ganancia genética a través de su utilización en la selección asistida por marcadores (S.A.M.). Por lo tanto, los mejores marcadores en los programas de selección asistida serán aquellos responsables de rasgos de importancia económica. Su identificación es muy compleja, requiriendo un conocimiento de la fisiología de

su expresión, para poder aproximarnos a lo que conocemos como “gen candidato”. Un excelente ejemplo del éxito de un gen candidato fue demostrado por Shuster y col.(13) quien determinó un defecto genético responsable de la deficiencia en la adhesión leucocitaria (BLAD) en bovinos Holsitein debido a una mutación en el aminoácido 128 de la proteína CD18, asignado al cromosoma 1 bovino (2). Los alelos mutantes y normales, pueden ser identificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por fragmentos polimórficos de restricción (RFLPs) brindando un marcador ideal para locus de rasgos económicos (ETL). Por lo general, las bases fisiológicas de las características productivas no están todavía resueltas por lo que los genes candidatos no son tan obvios. Al seleccionar un gen candidato debemos tener en cuenta:

a) su existencia bajo formas polimórficas; b) la determinación de sus genotipos utilizando técnicas moleculares; c) los mecanismos fisiológicos (endócrinos, metabólicos), ya que estos tienen un efecto directo en el/los rasgos de interés. Un gen candidato quizás no sea exactamente un marcador, sino, en muchos casos, el propio gene que afecta directamente el rasgo de interés, como el caso del BLAD (14, 15). En nuestro país, se ha optimizado la técnica de PCR/RFLPs, analizándose la prevalencia de esta enfermedad en nuestros rodeos lecheros. Los primeros datos indican la existencia de alelos portadores para la enfermedad del BLAD (16) Una vez establecidos los marcadores y genes simples, la S.A.M. permitirá realizar una selección temprana basándose en los genotipos de aquellos alelos favorables, aumentando la precisión en la selección. Esta estrategia minimizará la variación ambiental ya que nos aproximaremos a una cuantificación directa de alelos involucrados en una característica cuantitativa y podrá ser utilizada para características de interés en sanidad, producción y reproducción de animales productivos.

MAPAS COMPARATIVOS (ZOO-FISH)

En relación a los mapas comparativos Kappes y col. (4), Barendse y col. (6, 8) (Fig. 1) incorporan un importante número de loci Tipo I y II, demostrando por mapa de ligamiento la presencia de varios rearrreglos en el orden génico dentro de los grupos sinténicos conservados. En el caso del cromosoma 1 bovino (BTA) existen segmentos de homología con el cromosoma 21 humano (HSA) y con el cromosoma 3 (HSA), habiendo identificado el orden para COL 6A1, SOD1, UMPS, CRYG8, CRYA1, TF, por rearrreglos ocurridos en mamíferos ancestrales (6, 8).

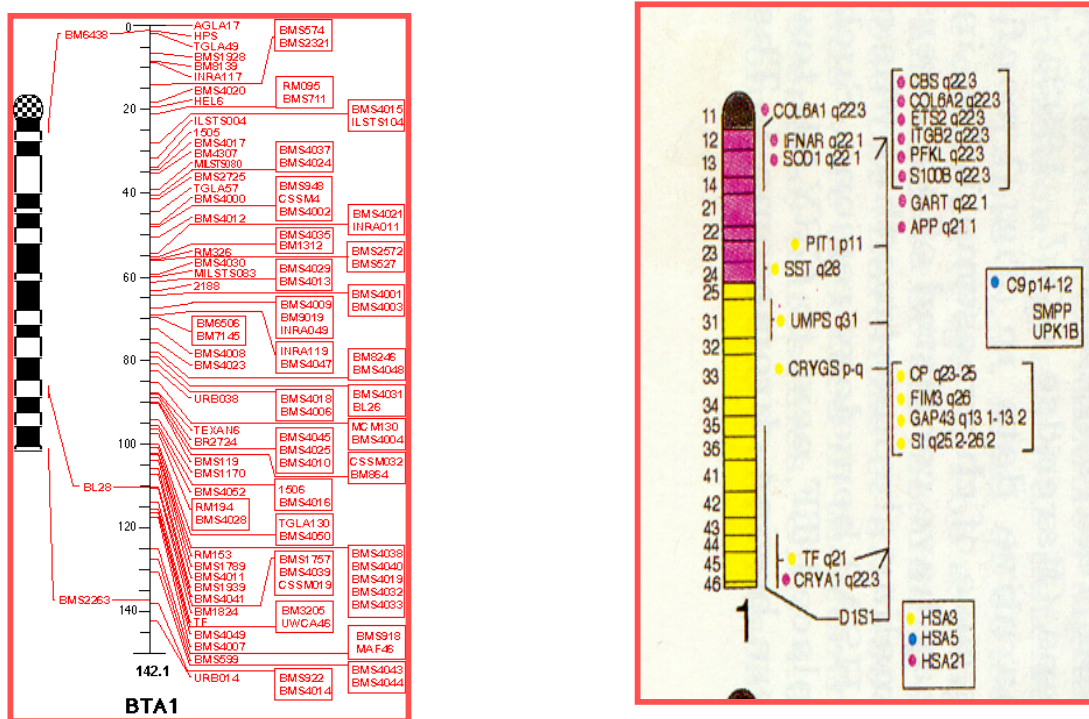


Figura 1. Mapa de ligamiento y comparativo BTA1 (HSA3/HSA21) (Zoo-FISH)

Estos hallazgos se lograron realizar gracias a la existencia de familias de referencia pertenecientes a las Instituciones CSIRO (<http://spinal.tag.csiro.au/>) y Universidad de Texas (<http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase.html>).

El orden lineal de los loci del BTA1 revela entonces, la existencia de importantes rearrreglos cromosómicos originados en lugares inestables de la estructura de la cromatina (17), al realizar mapeo comparativo con los cromosomas HSA3q y 21q. Estos pueden ser investigados al potenciar roturas cromosómicas en el cromosoma BTA1, incorporando agentes mutagénicos a los cultivos celulares.

Solinas-Toldo y col.(11) han realizado "chromosome painting" de los cromosomas bovinos/humanos, habiendo delineado segmentos de homología (Fig.1). Estudios de fragilidad cromosómica potenciada por agentes mutagénicos, y técnicas de aproximación genómica, como el micro-FISH, permitirán acercarnos a la localización de loci en regiones de QTLs de importancia para ser utilizados en el S.A.M.

Dentro de los 30 pares cromosómicos que contiene la especie bovina, podemos jerarquizar, por poseer secuencias directamente relacionadas con ETL, el análisis de los siguientes cromosomas bovinos: BTA1(UMPS, CD18, SOX2, SOD1, AGLA17, TGLA57, relacionados estos últimos con producción lechera), BTA4 (enfermedad de weaver, asociada con rasgos que involucran la producción láctea), ; BTA6 (haplotipos de las caseínas), BTA23 (gen de la prolactina, relacionados también con la producción lechera; BTA X (AR, ZFX, G6PD, SOX3).

Si tuviésemos una región asignada como QTL, como una región del cromosoma 1 (18,19) sería beneficioso concentrar los esfuerzos del mapeo en estas pequeñas regiones. Nos valdríamos de una forma sencilla de reconocimiento del cromosoma 1, como lo es la translocación robertsoniana monocéntrica, 1/29 (20). Para luego aproximarnos a una región específica de QTL, que se puede obtener con bandeó R (4) o con inductores de fragilidad cromosómica (17). Debemos entonces fragmentar regiones de aproximación lógica a los QTLs. y luego introducirnos en el mapeo fino del micro-FISH, para la obtención de sondas específicas de esa región de QTL.

En el análisis genómico de la raza de Criollos del Uruguay, primeramente hemos identificado familias que poseen la translocación robertsoniana 1/29 (21) cuyo origen es debido a rupturas en regiones de fragilidad cromosómica proximales a la región centromérica. Estos sitios de fragilidad pueden ser potenciados por agentes mutagénicos como la afidicolina (APC)(22, 23). Esta micotoxina inhibe a la ADN polimerasa alfa, enzima asociada a la replicación del ADN, cuando se agrega a los cultivos celulares durante las últimas 24 hrs. Frente a estos tratamientos, hemos encontrando regiones específicas de fragilidad, no aleatorias, caracterizadas por crear una inestabilidad estructural relacionadas con sitios de rupturas ocurridas en la formación de aberraciones cromosómicas (24,25,26). El genoma de bovinos resultó sensible a la inducción de la APC demostrando roturas, en regiones particulares del cromosoma 1 en individuos con translocación y normales (1q12-14 y 1q41-42) obteniéndose 18% de fragilidad en rob(1/29); 58% de fragilidad en autosomas y 50% de fragilidad en el cromosoma X a concentraciones de 3uM(24, 25). La región sensible a la APC, correspondería por homología a una región del cromosoma 21 y 3 humano(11), habiéndose identificado en estas regiones los siguientes marcadores: el gen MX1, gen resistente al mixovirus (bovino y humano), localizado a una distancia de 7cM del microsatélite MS bovino BM1824 (6 alelos) (27) el gen CRYA1(humano-bovino) junto al MS MAF46 (5, 6,8).

El paso siguiente consiste en realizar una aproximación directa a una región específica cromosómica por medio del MICRO-FISH (Fig. 2).

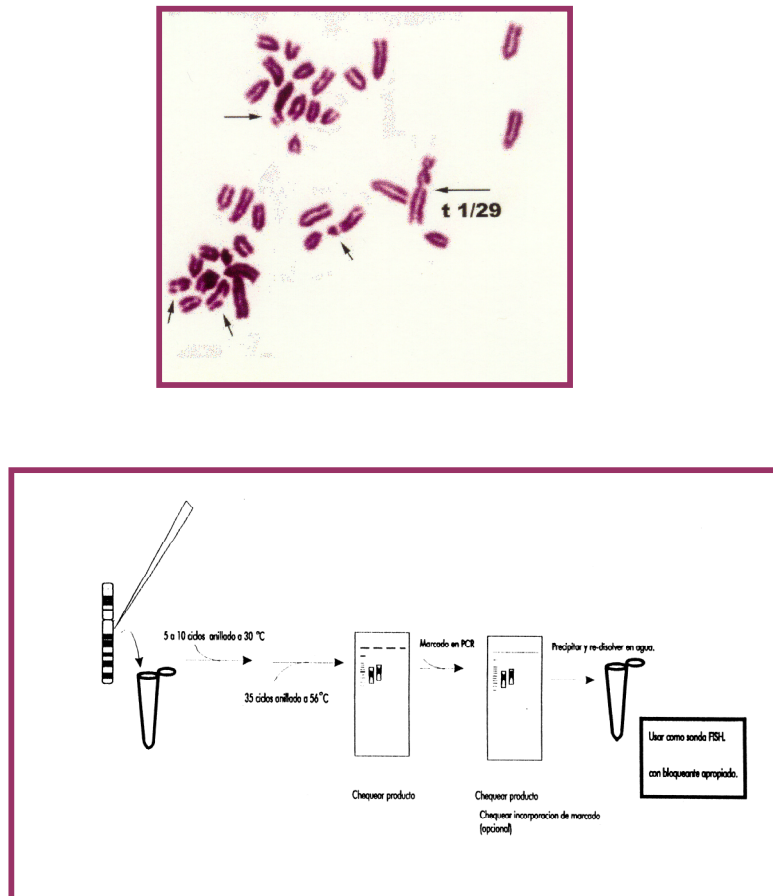


Figura 2. a) Translocación 1/29 en bovinos Criollos del Uruguay. Inducción con APC (0.3uM). b) Esquema de microdissección cromosómica (Micro-FISH).

Este sirve para la creación de sondas incluyendo la generación de la hibridización “in situ” (FISH) y las bibliotecas microclonadas siendo además muy valioso para el clonaje posicional y la citogenética molecular.(28, 29).

BOVINOS CRIOLLOS DEL URUGUAY (*Recurso Genético Sustentable de animal doméstico*)
“IDENTIFICAR UNA FUENTE DE VARIACIÓN OCULTA”

Una de las fuentes de mayor importancia que nos permite aumentar la ganancia genética en las poblaciones es la riqueza que nos brinda la variación, otorgada por polimorfismos o variantes alélicas de determinadas regiones nucleotíficas. La FAO, 1999, ha creado la “Initiative of Domestic Animal Diversity, IDAD” (30, 31), estimulándonos a aprovechar la riqueza de la variabilidad genética existente en el mundo entre y dentro de las razas, además de tener en cuenta la variación entre poblaciones pequeñas de ganado.

La IDAD ha desarrollado un programa que incluye un inventario global de recursos genéticos animales, metodologías para ayudar a los distintos países a diseñar e implementar estrategias de conservación, y un sistema de información en Internet DAD-IS (<http://dad.fao.org/en/Home.htm>).

Consideramos de importancia conocer y valorizar nuestras razas, tomando en cuenta el proceso de adaptación que estas han experimentado. Existe en ellas un potencial genético oculto, es decir una fuente de variación referida como “variación oculta” o “variación transgresiva” (32) las que podrán ser identificadas y cuantificadas con las nuevas tecnologías genéticas.

Hoy podemos identificar progenitores (análisis de ADN), definir unidades genéticas para la conservación y cuantificar la variabilidad genética de poblaciones (33).

El Uruguay cuenta con una reserva de alrededor de 1000 animales derivados de sus ancestros europeos, la raza de bovinos Criollos, introducida en América en la época de la conquista por los españoles (siglo XIV) (34). La reserva de bovinos Criollos, ubicada en la zona del Fortín de San Miguel (Depto.Rocha) y perteneciente al SE.PA.E. ocupa un ecosistema natural (sierras rocosas, montes indígenas, arroyos), caracterizándose por su variabilidad en la coloración y distribución de manchas en su pelaje, cuernos en forma de lyra, que los asemeja a sus ancestros ibéricos. (Fig. 3).



Figura 3. Fenotipo de bovinos Criollos del Uruguay.

Estudios étnicos con análisis de faneras (forma de cuernos, coloración de capa, pigmentación de mucosas y pezuñas) han demostrado la existencia de los siguientes tipos de pigmentación: 53,5% pigmento castaño; 38.6% pigmento blanco y 7.9% pigmento negro, con 10 variaciones para el pigmento castaño, nueve para el blanco y dos para el negro, presentando todos los animales cuernos en forma de lyra (35).

Los estudios genéticos de variación poblacional nos demuestran una heterocigosidad alta cuando analizamos marcadores moleculares de Tipo I y II (36, 37, 38).

Tabla 1. Frecuencias alélicas y heterocigosis para tres proteínas de la leche (κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina) y dos microsátélites CYP21 BM2113 en bovinos Criollos del Uruguay.

LOCUS	FRECUENCIAS GENICAS		FRECUENCIAS GENOTIPICAS			χ^2	He♦
	A	B	AA	AB	BB		
κ -CN	0.50	0.50	0.27	0.50	0.23	0.04	0.50
β -LG	0.51	0.49	0.26	0.50	0.24	0.05	0.50
α -LA	0.28	0.72	0.07	0.40	0.53	0.12	0.60

CYP 21		BM2113
A = 0.07	F = 0.07	A = 0.23
B = 0.14	G = 0.04	B = 0.03
C = 0.23	H = 0.04	C = 0.03
D = 0.18	I = 0.02	D = 0.13
E = 0.17	J = 0.01	E = 0.37
		F = 0.23
		He = 0.739
He = 0.8527		

He♦ = Heterocigocidad esperada

Por otro lado, estudios de variación genómica dentro y entre razas del Uruguay (Criollo, Holando, Hereford) realizado con la técnica de PCR-RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) ha permitido establecer diferencias y similitudes entre ellas, determinándose bandas de amplificación específicas para cada raza. (Fig.4) (39).

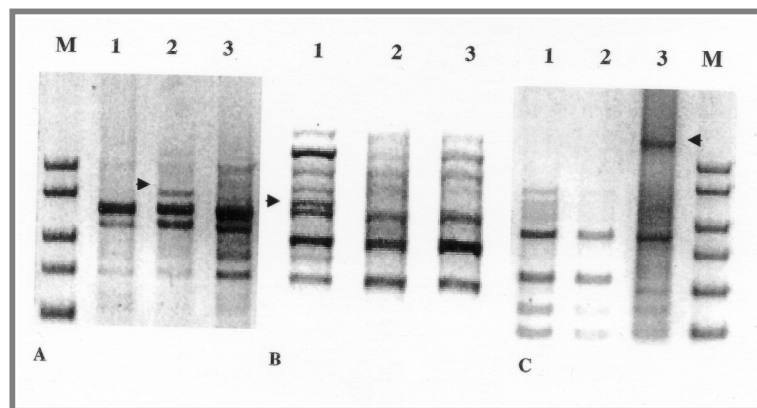


Figura 4. Identificación de "loci" específicos para bovinos Criollos (2); bovinos Holando (1); bovinos Hereford (3)

A modo de síntesis, de las investigaciones realizadas en nuestra reserva de bovinos Criollos resaltamos:

- estudio étnico estableciéndose el castaño, blanco y negro como pigmentación basal (35).
- translocaciones robertsonianas 1/29 (rob:1/29) (21) siendo éste un marcador cromosómico que se ha descrito en posibles razas ibéricas ancestrales y bovinos Criollos venezolanos (40, 41) utilizado, a su vez, en estudios de mapeo génico bovino-humano (29).
- ausencia de cromosoma Y, específico de *Bos indicus*.
- variabilidad genética basada en marcadores moleculares de tipo I y II, habiéndose determinado una Heterocigocidad esperada de media a alta (36, 37).
- determinación de alelos específicos mediante la técnica en "pools" de ADN sometidos a RAPDs (38).

Estos resultados nos permiten justificar su estudio como recurso genético natural de animal doméstico, conservar el banco de ADN existente, continuar con la formación de familias de referencia que permitan realizar estudios de segregación génica a efectos de profundizar en los estudios genómicos (mapeo génico en cromosomas 1 y 29), de una especie tan valorada por su importancia económica y con la caracterización de raza Criolla .

EVALUACIÓN GENÉTICA EN BOVINOS DE LECHERIA.

Selección asistida por marcadores.

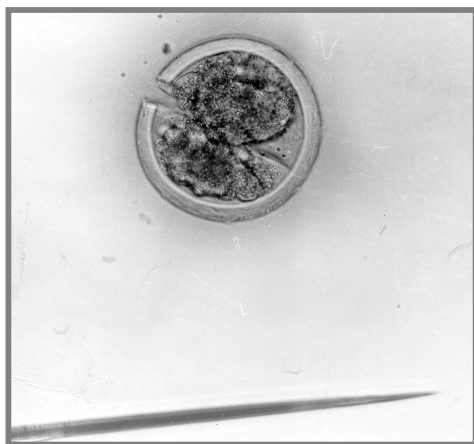
En Centros de Transferencia de Embriones para producción lechera, podemos mencionar diversos ejemplos, donde ya se están aplicando estas tecnologías genéticas en calidad de selección asistida por marcadores (S.A.M.). Al combinar las tecnologías de S.A.M. con aquellas biotecnologías de la reproducción (I.A., T.E., F.I.V. clonaje), se puede reducir el intervalo generacional, aumentando la intensidad de selección, obteniendo un progreso genético más rápido en los programas de mejoramiento bovino (9). Podemos mencionar: 1) sexado de embriones, usando sondas específicas del cromosoma Y; 2) genotipado de proteínas de la leche (κ -caseína, β -lactoglobulinas, α -lactoalbúminas); 3) prolactina; 4) CD-18 correspondiente a la enfermedad de BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency); 5) UMPs (uridine monophosphate synthase); 6) citrulinemia (argininosuccinate synthetase deficiency); 7) hipotiroidismo congénito (thyroglobulina deficiency). Estas últimas enfermedades son autosómicas recesivas, pudiéndose aplicar el diagnóstico de ADN (42).

La eficiencia de la selección depende de la confiabilidad de la evaluación genética. Entre las nuevas tecnologías genéticas, la PCR/RFLP permite amplificar en forma exponencial secuencias específicas de ADN, pudiéndose determinar su presencia o ausencia en el genoma individual. Estos procedimientos se realizan en ADN extraído de semen, sangre o cualquier célula nucleada del animal pudiéndose genotipar variantes alélicas de proteínas de la leche, enfermedades hereditarias, virales, etc. tanto en machos como en hembras. En nuestro Laboratorio, se han optimizado diversas técnicas de PCR/RFLPs para proteínas de la leche (κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina)(38), además de enfermedades hereditarias (16) y complejo mayor de histocompatibilidad (BoLa) (43).

Determinación del sexo

En el año 1991, optimizamos en el Laboratorio de Genética, la técnica de sexado de embriones, utilizando un repetido BRY.1. La biopsia realizada en embriones bovinos, previo a su implantación se procesó por la técnica de (PCR) obteniéndose confiabilidad, certeza y rapidez en el diagnóstico (44, 45, 46).

Además, esta metodología se utilizó para determinar el sexo en Freemartins, es decir la identificación de hembras nacidas de partos heterosexuales, incluyéndose el iniciador autosómico, satélite ADN 1715, optimizándose la técnica que llamamos "amplificación aditiva terminal" (47) (Fig. 5).



Biopsia de embrión bovino (Mórula)



Determinación de sexo BRY 1 (307pb.)

Figura 5. Biopsia de embriones. Determinación del sexo por PCR.

Basándonos en estas tecnologías genéticas, la S.A.M. puede ser realizada en multilocus de biopsias embrionarias previo a su implantación en vacas receptoras, incluyendo los PCR multiplex (evaluación genética múltiple) donde se puede diagnosticar: sexo, genotipar proteínas de la leche, diferentes enfermedades hereditarias. Este método de tipificación genética en multilocus se basa en una amplificación simultánea de secuencias diferentes del ADN bovino(42).

Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria es una de las fallas reproductivas más importantes en bovinos. Se ha demostrado que alrededor de un 40% de los embriones pueden morir en casos de vacas repetidoras.

Se considera vaca repetidora aquella que luego de 3 o 4 servicios no queda preñada siendo normal a los exámenes clínicos y reproductivos(48).

La mayor incidencia de mortalidad embrionaria ocurre entre los 8 y 18 días post inseminación. Dentro de las causas genéticas podemos mencionar las cromosómicas y la presencia de alelos letales, que al encontrarse en doble dosis provocan la muerte temprana del embrión.

Dentro de las anomalías cromosómicas, las translocaciones robertsonianas monocéntricas (1/29) (20, 21), dicéntricas (14/20) (49) producen embriones que mueren por haploidías, poliploidías, aneuploidías. Enfermedades hereditarias provocadas por mutaciones letales autosómicas recesivas, como el caso de la deficiencia en la uridina monofosfato sintasa (DUMPs) provocan la muerte del embrión a edad temprana. Estas pueden ser hoy determinadas por tecnologías que pueden prevenir problemáticas genéticas.

ENFERMEDADES HEREDITARIAS PROCESADAS POR TÉCNICAS MOLECULARES

Bovinos de Leche

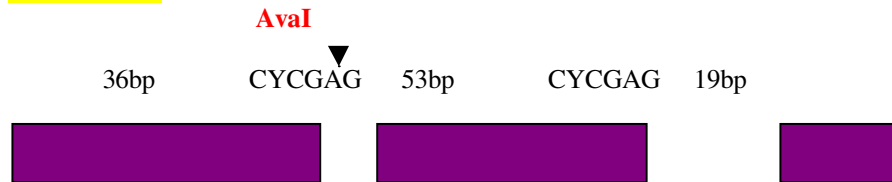
DUMPs (deficiencia de la uridina monofosfato sintasa)

La deficiencia en la uridina monofosfato sintasa (DUMPs) es una enfermedad autosómica recesiva que tiene una relación directa sobre la disminución global de la fertilidad al aumentar la tasa de retorno al servicio por mortalidad embrionaria (40 días post-concepción) (50). Se manifiesta en la raza Holstein-Friesian (variedades colorada y overo) y los animales heterocigotas presentan niveles cercanos al 50% de actividad de la enzima UMPs con acumulación de ácido orótico en orina y leche. Los apareamientos entre animales portadores requieren aproximadamente 3.1 servicios por nacimiento de un ternero frente al promedio de 2.0 servicios cuando se cruzan animales normales (51). La enzima UMPs participa directamente en la ruta sintética de formación "de novo" de nucleótidos (pirimidinas) fundamentales para la biosíntesis de ADN y ARN convirtiendo el ácido orótico en uridin monofosfato (UMP). En la década del 90 mediante las técnicas de aislamiento de ARN mensajero a partir de muestras de animales heterocigotas y posterior secuenciación del ADNc se identifica la presencia de una mutación puntual en el gen que codifica para la UMPs (C→T) que produce la pérdida de un sitio de restricción *Ava*I formando un codón stop con terminación prematura de la cadena polipeptídica (52).

La identificación de la mutación permitió diseñar mediante la técnica de PCR-RFLP un test diagnóstico utilizando la restrictasa *Ava* I con iniciadores específicos que flanquean la región (C→T, codón 405). Mediante esta técnica los animales normales muestran en el análisis de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio la presencia de dos bandas (53pb, 36pb) cuando el amplicón de 108bp es cortado con la enzima *Ava*I mientras que los animales heterocigotas muestran la presencia de 3 bandas (89pb, 53pb, 36pb) (53) (Fig 6).

AMPLICON 108bp

Alelo Normal



Alelo Mutado

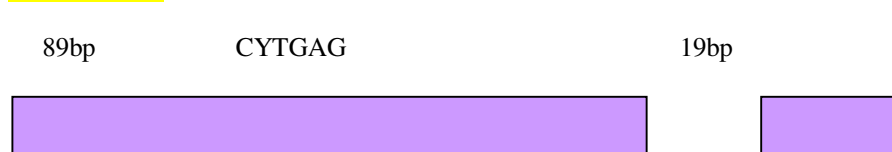


Figura 6. Esquema del diseño de la técnica de PCR-RFLP para el diagnóstico de portadores de la enfermedad hereditaria DUMPs.

Dicho gen ha sido mapeado en la región media del cromosoma BTA 1q31-36. En el año 1987 la Holstein Association of America declara dicha patología hereditaria e implanta un programa de identificación de animales portadores. En U.S.A en el año 1992 dicho programa identifica 523 (235 machos, 288 hembras) animales registrados en la Holstein Association como portadores de la enfermedad y 3192 (2831 machos, 361 hembras) animales registrados como normales para la patología. En Europa en la Universidad Nijmegen de Holanda se realiza el análisis entre los años 1988 a 1991 de 1226 animales encontrando 414 portadores de DUMPs (51).

Los ancestros identificados como portadores de la enfermedad en U.S.A y Europa provienen principalmente de dos líneas : Toro "Happy-Herd Beautician" con 444 descendientes portadores en U.S.A y 314 en Europa, Toro "Needle-Lane Jon-Red" con 106 descendientes portadores en U.S.A y 84 en Europa. Debido a que el toro "Needle-Lane Jon-Red" ha sido uno de los más populares utilizados en la década del 80 como reproductor Holstein variedad colorada, es que la incidencia se estima en 1-2% mayor con respecto al número de portadores en la variedad Holstein-overo. En países limítrofes como Argentina se determinó la presencia de reproductores portadores de la mutación estimándose la frecuencia en 0.96% para toros y 0.1% en vacas sobre un total de muestras de semen de 104 machos y muestras sanguíneas de 905 vacas (54).

En Uruguay nuestro equipo ha optimizado este diagnóstico con el siguiente juego de iniciadores específicos (53):

S09: 5'GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG3'

S18: 5'GCTTCTAACTGAACTCCTCGAGT3'

El programa del ciclor modificado a 35 ciclos de : 94°C-1 minuto; 62°C-1 minuto, 72°C-30 segundos previa desnaturalización del ADN a 94°C-4 minutos y elongación final a 72°C-5 minutos. Basándonos en este procedimiento hemos comenzado el muestreo en vacas repetidoras de servicio y reproductores machos para poder evaluar la posible presencia de portadores (Fig 7).

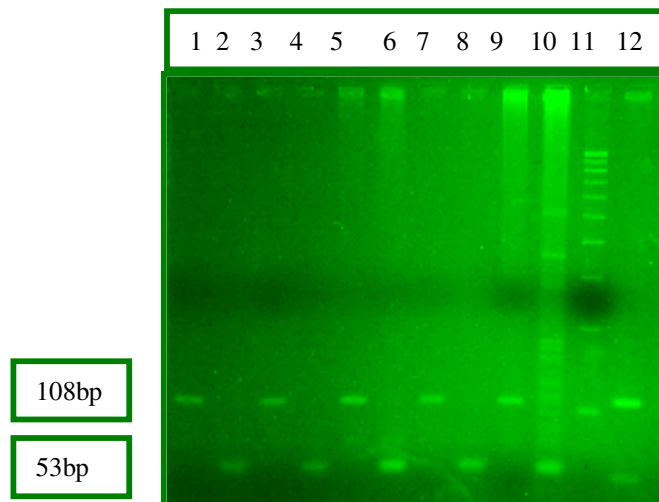


Figura 7. Gel de agarosa al 3% donde se observa el resultado de las primeras hembras Holando-Uruguayo analizadas molecularmente (PCR-RFLP, AvaI) para la identificación de la mutación DUMPs.

Información actualizada y bibliografía sobre esta patología puede encontrarse en la OMIA (On Line Medelian Inheritance in Animals) en la dirección http://www.angis.su.oz.au/bin/Databases/BIRX/birx_doc?omia+636

Citrulinemia

La citrulinemia es una enfermedad autosómica recesiva letal de tipo metabólico producto de la deficiencia en la enzima argininosuccinato sintasa que participa en el ciclo de la urea y cuyo papel fisiológico lo cumple en el hígado (55). Esta patología a sido determinada en la raza Holstein Friesian siendo "Linmack Kriss King" uno de los toros portadores y diseminador de la enfermedad en Australia (56).

El gen ASS que codifica para esta enzima se encuentra mapeado en el BTA11 grupo sinténico U16 (57). Los animales homocigotas recesivos presentan signos clínicos de intoxicación por hiperamonemia con depresión del sistema nervioso central y muerte dentro de los 3-5 días de vida.

Estudios a nivel molecular con técnicas de PCR y secuenciación del ADNc de animales heterocigotas revelaron la existencia de dos puntos de mutación. En el primero de ellos (C→T) se produce un cambio de la arginina por un codón stop con pérdida de un sitio de restricción, AvaII a nivel del 5^{to} de los 9 exónes del gen ASS; la segunda mutación es silenciosa (C→T) no alterando la secuencia aminoacídica pero con ganancia de un sitio de restricción, DdeI, considerándose esta última como un polimorfismo (58).

Información actualizada y bibliografía sobre esta patología puede encontrarse en la OMIA (On Line Medelian Inheritance in Animals) en la dirección http://www.angis.su.oz.au/bin/Databases/BIRX/birx_doc?omia+419

Bovinos de Carne

Síndrome de Hipertrofia Muscular Hereditaria

El síndrome de **hipertrofia muscular hereditaria** se caracteriza por incremento anormal del tejido muscular (20%) con disminución de la cantidad de grasa del organismo (característica doble músculo). Los animales presentan un fenotipo particular con una "doble grupa", surcos intermusculares marcados, finura de la piel y retracción del vientre (59).

A nivel productivo en ganado de carne esta alteración presenta importancia económica por aumento en la producción a pesar de existir problemas con los terneros al nacimiento (partos distócicos por cesárea). A principios del siglo XVIII este síndrome se observó en la raza Frisona, y actualmente se encuentra en las razas Asturiana de los Valles, Piamontesa, Belga Azul, Rubia de Aquitania, (todas ellas seleccionadas como ganado productor de carne) (59, 60) (Fig 8).



Figura 8. Fenotipo "doble músculo" de la raza Belga Azul.

Este síndrome presenta un modo de herencia de tipo autosómico recesivo y el locus génico se representa con la letra **mh**. Este corresponde al gen de la miostatina que es un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento y transformación (TGF β 1). Utilizando ratones "Knocked out" para dicho gen se pudo desarrollar un fenotipo similar al "doble músculo" (60). Mediante la metodología de "genome-scan" con 213 marcadores moleculares tipo II (microsatélites) se determinó que el locus **mh** se localiza en el cromosoma BTA2 a 3.1 cM del microsatélite TCLA44 (60,61).

Con la técnica de secuenciación de ADN se pudo determinar que los animales con hipertrofia muscular presentaban una delección de 11 pb en dicho gen produciendo una terminación prematura de la cadena polipeptídica. Esta región es altamente conservada y en un estudio realizado en 10 razas europeas se identificaron 7 variantes alélicas de las cuales 5 causaban deficiencias en la producción de miostatina (61). Los animales doble músculo son homocigotas para una de estas formas alélicas o heterocigotas para dos formas mutantes. Mediante la utilización de microsatélites ligados al locus **mh** se pudo determinar asociaciones con características de la canal encontrándose que los animales portadores de un solo alelo mh (mh/+) presentaban diferencias significativas en cuanto a una canal más magra y con más peso de la masa muscular (62).

La característica doble músculo nos muestra una heterogeneidad genética presente en una región génica conservada, pudiéndose identificar y genotipar dichas variantes alélicas utilizando las técnicas moleculares de PCR con oligonucleótidos específicos para la identificación de dichas regiones.

Información actualizada y bibliografía sobre esta patología puede encontrarse en la OMIA (On Line Medelian Inheritance in Animals) en la dirección http://www.angis.su.oz.au/bin/Databases/BIRX/birx_doc?omia+1480

Síndrome Chediak-Higashi (CHS1)

Esta patología genética presenta un modo de herencia autosómico recesivo observándose en diferentes especies de mamíferos (humanos, bovinos, gatos, roedores y visones). Desde el punto de vista clínico se presenta una hipopigmentación oculocutánea (albinismo parcial), predisposición a sufrir hemorragias (bajo nivel de agregación plaquetaria), resistencia disminuída a las infecciones y trastornos neurológicos (63). En bovinos el CHS ha sido descrito en las razas Hereford, Brangus y Negra Japonesa (Wagyu) no encontrándose trastornos neurológicos ni disminución de defensas (64). En las dos primeras razas bovinas la enfermedad se manifiesta con síntomas más severos. A nivel celular se observa formación anormal de gránulos citoplasmáticos en los leucocitos y disminución del número de gránulos densos plaquetarios. Esto es debido a una disfunción en la regulación de la fusión/fisión de organelos vesiculares citoplasmáticos (lisosomas primarios, melanosomas, gránulos densos plaquetarios, gránulos citolíticos) a nivel de distintos

La clasificación de los mismos ha sufrido una constante evolución debido a la manifestación citogenética variable y a su desigual frecuencia de aparición en las poblaciones estudiadas. Actualmente se dividen en dos grandes grupos: **A**) sitios frágiles “raros” (frecuencia de aparición 1 en 20 personas) y **B**) sitios frágiles “comunes” (frecuencia poblacional alta y en bajo número de placas metafásicas, menos de un 5%). Esta clasificación los subdivide en función a los agentes inductores que adicionados al medio de cultivo permiten incrementar su frecuencia para un mejor análisis citogenético. De acuerdo a esto tenemos que los sitios frágiles “raros” son sensibles al ácido fólico, mientras que los sitios “comunes” (antiguamente denominados Hot-spots) son inducidos en su mayoría por la sustancia química afidicolina (inhibidor de la ADN polimerasa alfa) y potenciados por la acción de la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) (Ej. FRA 3B, FRA 16D) (17).

En el año 1991 mediante la técnica de clonaje posicional se aísla el gen FMR1 localizado en el FRAXA y se comienza la profundización en el estudio molecular en pacientes afectados, sitio frágil en el cromosoma sexual X (69). Dicho gen presenta en su extremo 5' una región polimórfica de trinucleótidos repetidos crípticos **CGG** interrumpidos por tripletes **AGG** en las posiciones 10 y 20. El trinucleótido **CGG** sufre expansiones (mutación dinámica) con metilaciones del gen FMR1 dando lugar al síndrome X frágil (70).

A nivel autosómico se han identificado sitios frágiles asociados con expansiones de trinucleótidos y con regiones repetidas tipo microsatélites. En el cromosoma 16q13.1 (sitio frágil 16A) se localizó una región polimórfica de repetición CGG (individuos normales con 16-49 repetidos, individuos portadores del FRA16A con 1000-1900 repetidos), (17). No se han descrito alteraciones fenotípicas relacionadas a los individuos portadores del mismo aunque faltarían realizar estudios genealógicos y observar el fenotipo de los individuos homocigotas. En la región 16q22.1 se localizó un sitio frágil (FRA16B) que a nivel molecular presenta una región rica en bases AT con repeticiones variable (microsatélite) pero a la fecha no se ha podido correlacionar esta región con alteraciones fenotípicas.

En el cromosoma 11q23.3 se localizó un sitio frágil relacionado con el síndrome de Jacobsen (retardo mental grave). En esta región cromosómica se encuentra el proto-oncogén CBL-2 que presenta repeticiones CGG en su extremo 5'. Dentro de los genes ligados al cromosoma X, con expansiones de trinucleótidos se encuentra el codificante para el receptor de andrógenos (AR). La expansión del triplete CAG (38-68 repeticiones) es responsable de la atrofia muscular espinobulbar humana (enfermedad Kennedy). A su vez la presencia de una mutación por inserción en la región de expansión CAG (exón 1) produce en humanos un síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos manifestándose intersexualidad en los pacientes, ya que presentan un cariotipo 46,XY con fenotipo y comportamiento psicosexual femenino. Estudios realizados con técnicas de FISH utilizando sondas génicas muestran el cambio de posición en el orden de los genes AR, F9 y PGK1 de tal forma que en humanos el mapa de estos tres genes ligados al X es centrómero-AR-PGK1-F9-qter mientras que en la especie bovina el mapa es centrómero-PGK1-AR-F9-qter (71).

El gen AR ha sido localizado por técnicas de hibridización “in situ” (FISH) en la región Xq 24-25 del bovino y la secuenciación parcial de dicho gen, muestra una similitud de secuencia con el gen humano del 79.5% y con el gen del ratón de un 97.2% (71).

En bovinos, Halnan en 1972 describe la presencia de fracturas cromosómicas en un autosoma mediano y las relaciona con problemas de fertilidad en dichos animales (72). A partir de esa fecha diversos grupos de investigadores a nivel mundial han observado en distintas razas bovinas la presencia de fragilidad cromosómica a nivel de autosomas y del cromosoma sexual X, relacionándolas con alteraciones de la fertilidad así como patologías hereditarias tales como la paraqueratosis hereditaria, el síndrome de calvicie de terneros y enanismo (73, 74, 75, 76, 77). Estudios realizados en bovinos de la raza Holando-Uruguayo muestran la existencia de un sitio de fragilidad en la región Xq 3.1 manifestándose en forma espontánea y con una frecuencia del 2.97% en cultivos linfocitarios (78, 79). Posteriores estudios de expresión de fragilidad utilizando dos medios de cultivos distintos (RPMI 1640 y TC199) en poblaciones de vacas con problemas de fertilidad y vacas normales a nivel reproductivo muestran una expresión significativamente aumentada del sitio frágil Xq 3.1 cuando se comparan ambos medios (1.8% frente a 0.9%) (80). Mediante la utilización del inductor químico afidicolina, en cultivos linfocitarios de bovinos se determina la presencia de cinco sitios frágiles a lo largo del cromosoma X, correspondiendo uno de ellos con la región Fra Xq3.1 (25) (Fig 10).



Figura 10. a) Esquema del cromosoma BTA X indicando los sitios frágiles (medida relativa proximal centromérica). b) Cromosoma X bovino inducido con APC (0.3 uM).

A nivel molecular, Monteagudo y col, 1999 estudiando bovinos con fragilidad del cromosoma X (FRA Xq 3.1) y animales normales observan diferencias significativas en el contenido de tripletes CGG sobre muestras de ADN no digerido (técnica de Dot-slots) (81). Actualmente nuestro laboratorio se encuentra desarrollando una estrategia molecular para la identificación de secuencias del gen FMR1 en el genoma bovino mediante la utilización de iniciadores específicos y secuenciación de los fragmentos amplificados (fig 11). Los sitios frágiles localizados en la especie bovina son la muestra citológica de la posible existencia de expansiones de trinucleótidos a nivel molecular. En humanos estas expansiones se producen en regiones transcricionalmente activas pudiendo inactivar o impedir la transcripción correcta de uno o más genes, afectando los valores fenotípicos, a través de la acumulación de estas secuencias en varias generaciones (82). Hoy en día podemos decir que a pesar de los avances obtenidos a nivel citológico y molecular en medicina humana y en distintas especies animales, la fragilsitología (rama de estudio de los sitios frágiles) como la define Ahuja en 1989 permanece en constante avance y nos enfrenta a curiosos y complejos mecanismos hereditarios de los seres vivos (83).

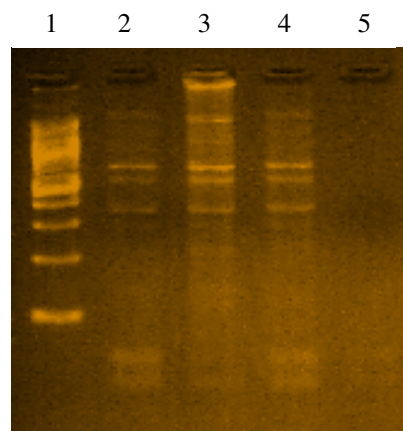


Figura 11. Amplificaciones en bovinos Holando Uruguayo con iniciadores específicos para el estudio del gen FMR1. 1: marcador de peso molecular, 2,3,4 ADN bovino amplificado, 5 control negativo.

CONCLUSIONES.

En esta ponencia hemos intentado transmitir los lineamientos, resultados y proyecciones que estamos realizando en el estudio del genoma bovino en relación a intereses que surgen en nuestro país, contribuyendo con pequeños aportes a la bibliografía nacional e internacional.

Surgen investigaciones originales como: a) mapeo fino en regiones específicas de los cromosomas BTA1 y BTAX; b) encuentro de "loci" específicos en razas Hereford, Criolla, Holando; c) análisis de variación genética y distribuciones alélicas de marcadores moleculares Tipo I (genes de importancia económica) y Tipo II (secuencias polimórficas, microsátelites) en raza Holando y Criollos del Uruguay

Además, se realiza una transferencia inmediata al medio productivo acerca de: a) diagnóstico de enfermedades hereditarias, genotipados de proteínas de la leche, determinación del sexo, identificación individual, basados en marcadores moleculares; b) análisis citogenéticos en animales de interés zootécnico.

Las metodologías cito-moleculares podrán ser diseñadas en familias de referencia, frente a determinadas problemáticas de origen genético, a efectos de prevenir su difusión.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Gustavsson I (1999) Time for revival of clinical cytogenetics? 13th European Colloquium of Animal Cytogenetics (Budapest) *Hungarian Journal of Animal Production* 48: 117-120
- 2 Womack JE (1996) The bovine gene map: A tool for comparative candidate positional cloning. *Archivos de Zootecnia* 45: 151-164
- 3 Medrano JF (2000) Conservación y uso de recursos genéticos animales en Latinoamérica. *Reunión Latinoamericana de Producción Animal. Congreso Uruguayo de Producción Animal (publicación electrónica)*
- 4 Kappes SM, Keele JW, Stone RT y col (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome *Genome Research* 7: 235-249
- 5 Bishop MD, Kappes SM, Keele, JW y col (1994) A genetic linkage map from cattle. *Genetics* 136: 619-639
- 6 Barendse W, Armitage SM, Ryan AM y col (1993) A genetic map of DNA loci on Bovine Chromosome 1. *Genomics* 18: 602-608
7. Arruga MV (1994) Mapeo genético. *Tratado de Veterinaria Práctica. Bovis.* 60: 9-76
- 8 Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM y col (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics.* (6)227-35
- 9 Bishop MD, Hawking GA, Beefer CL (1995) Use of DNA markers in animal selection. *Theriogenology* 43: 61-70
- 10 Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, y col (1994) A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome.* 288-297
- 11 Solinas-Toldo S, Lengauer C, Fries R (1995) Comparative Genome map of human and cattle. *Genomics* 27: 439-496
- 12 Georges M, Andersson A (1996) Livestock genomics comes of age. *Genome Research* 6:907-921
- 13 Shuster DE, Kehrl ME y col (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 9225-9929
- 14 Notter DR. (1995) Genetic improvement of fertility using correlated traits and molecular markers. *In: Anais XI Congresso Brasileiro de Reproducao Animal* 121-130
- 15 Notter DR (1999) Farm animal genetic resources for the new millenium. *Canadian Farm Animal Genetic Resources : The New Millennium. Symposium Proc, Charlottetown, Canada.*

16. Llambí S, Guevara G, Rincón G y col (2000) Diagnóstico molecular de portadores de la enfermedad hereditaria BLAD en bovinos Holando-Uruguayo utilizando la técnica de PCR/RFLP (1^{er} comunicación) *XXI Congreso Mundial de Buiatría (en prensa)*
- 17 Sutherland GR, Baker E, Richards R (1998) Fragile sites still breaking. *TIG 14(12)501-506.*
- 18 George M, Nielsen D, Mackinnon M y col (1995) Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics 139:907-920.*
- 19 Vaiman D, Schibler L, Oustry A y col (1997) A cytogenetically anchored genetic map of bovine chromosome 1 obtained by integrating flow-sorted chromosome-derived microsatellite markers into the international bovine map. *Cytogenet.Cell Genet. 79:204-207.*
- 20 Gustavsson I (1969) Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas 63: 68-169.*
- 21 Postiglioni A, Llambí S, Gagliardi R, De Bethencourt M (1996) Genetic Characterization of a Sample of Uruguayan Creole Cattle. I. Cytogenetic Characterization of a Sample of Uruguayan Creole Cattle. *Archivos de Zootecnia 45: (70-71).*
- 22 Glover TW, Berger C, Coyle J (1984) DNA polymerase inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet. 67: 136-142.*
- 23 Riggs PK, Kuczek T, Chrisman CL, Bidwell CA (1993) Analysis of aphidicolin-induced chromosome fragility in the domestic pig (*Sus scrofa*) *Cytogenet Cell Genet 62: 110-116.*
- 24 Postiglioni A, Llambí S, Núñez R, y col (1998) Expresión de sitios frágiles comunes (CrS) en el genoma de los bovinos Criollos del Uruguay. *XVI PANVET 98. TL.b116, pp262.*
- 25 Llambí S, Guevara K, Rincón G, y col (1999) Aphidicolin-induced fragile sites in *Bos taurus* lymphocyte cultures. A preliminary study. 13 European Colloquium of Animal Cytogenetics.(Budapest) *Hungarian Journal of Animal Production 48: 117-120.*
26. Mayr B, Korb H, Kiendler S, Brem G (1998) Reciprocal X;1 translocation in a calf. *Genet. Sel. Evol. 30: 305-308.*
- 27 Ellinwood NM, Berryere TG, Fournier BP, y col. (1999) MX1 maps to cattle chromosome 1. *Animal Genetics 30: 161-168.*
- 28 Mühlmann-Díaz CA, Bedford JS (1995) Chromosome microdissection. *Radiation Research.Congress Lectures. Ed. Hagen,U.Harder,H.Streffler,H.J. II: 468-471.*
- 29 Schmutz SM, Berryere TG, Moker JS y col (1994) Gene mapping from a bovine 1;29 DNA library prepared with chromosome microdissection. *Mammalian Genome 5: 138 141.*
- 30 FAO (1992) Convention on Biological Diversity. DAD-IS (<http://dad.fao.org>)
- 31 FAO (1999) Executive Brief: The global strategy for the management of farm animal genetic resources. Domestic Animal Database Information System, *DAD-IS* (<http://dad.fao.org>)
- 32 Tanksley SD McCouch SR (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science 277:1063-1066.*
- 33 Mace GM, Smith, TM, Bruford MW, Wayne R.(1996) An overview of the issues. *In Molecular Genetic Approaches in Conservation. Ed. T.B. Smith and R.K. Wayne. Oxford Univ. Press, NY.*
- 34 Primo A.T. (1992) El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Archivos de Zootecnia 41(extra): 421-432.*
- 35 Fernández G, Rodríguez M, y col (2000) Estudio étnico de una muestra de bovinos Criollos del Uruguay. II. Análisis de las faneras. *Archivos de Zootecnia (en prensa)*
- 36 Postiglioni A, Rincón G, Kelly L, y col (1998) Caracterización genética de los bovinos Criollos del Uruguay. II. Estudio de su variabilidad genética. *Archivos de Zootecnia 47:(178-179), 225-231.*
- 37 Postiglioni A, Rincón G, Llambí S y col (1998) Análisis de la estructura genética de los bovinos Criollos del Uruguay. Su relación con razas ibero-americanas. *XVI PANVET 98. TL.b116,pp.262.*
- 38.Postiglioni A, Rincón G, Barrera J, y col (2000) Distribución diferencial de variantes alélicas de proteínas lácteas (κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina) en razas bovinas del Uruguay. *XXI Congreso Mundial de Buiatría. (en prensa)*
- 39 Rincón G, D Angelo M, Gagliardi R,y col (2000) Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD's and microsatellites markers *Research in Veterinary Science (en prensa)*
40. Randel-Figueiredo T, Iannuzzi L (1991) A cattle breed close to 58 diploid number due to high frequency of rob(1:29) *Hereditas 115: 73-78.*
41. Muñoz MG, Ocanto D, y col (1995) Incidence of 1/29 translocation in Venezuelan Creole pure and crossbreed cows used in reproductive programs. *Theriogenology 43: 1055-1060.*

42. Schwerin M, Parkanyi V, Roschlau K, y col (1994) Simultaneous genetic typing at different loci in bovine embryos by multiplex polymerase chain reaction .. *Animal Biotechnology*. 5(1), 47-63
- 43 Kelly L, D'Ángelo M, Giovambattista G y col (2000) Estudio de los polimorfismos del gen BoLA DRB3.2 en bovinos Criollos del Uruguay. XXI Congreso Mundial de Buiatría (en prensa)
- 44 Postiglioni A, Setiabudi R, Gustavsson I (1991) Determinacao do sexo de embriões bovinos pelo método de reacao de cadeias de polimerase. In: IX Congreso Brasileiro de Reproducao Animal, 9:59.
- 45 Postiglioni A, Larocca C, Lopes R y col. (1991) Sex determination of preimplanted bovine embryos using the PCR System (COMMUNICATION). *Rev.Bras.Reprod.Anim.*, 15(3-4):199-205.
- 46 Postiglioni A, Larocca C, Carbo A y col. (1994) Determinación del sexo por amplificación del ADN en embriones bovinos pre-transferencia. *Revista Veterinaria*. 29:(124),4-9.
- 47 Llambí S, Postiglioni A. (1997) Diagnóstico Molecular de Freemartinismo en bovinos Holando-Uruguayo.(Técnica de PCR) *Mendeliana* 12 (2): 104-110.
- 48 Gatica R. (1996) Vaca repetidora y mortalidad embrionaria. XXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. D.1-D.16.
- 49 Schmutz SM, Moker JS, Pawlyshyn B y col. (1997). Fertility effects of the 14:20 Robertsonian Translocation in cattle. *Theriogenology* 47: 815-823.
- 50 Robinson J, Drabek M, Dombrowski D, Clark J (1983) Consequences of UMP synthase deficiency in cattle *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 321-323
- 51 Shanks R, Greiner M (1992) Relationship between genetic merit of holstein bulls and deficiency of uridine 5' monophosphate synthase *Journal of Dairy Science* 75:2023-2029
- 52 Robinson J, Dombrowski D, Harpestad G, Shanks R (1984) Detection and prevalence of UMP synthase deficiency among dairy cattle *Journal Heredity* 75: 277-280
- 53 Schwenger B, Schober S, Simon D (1993) DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene *Genomics* 16: 241-244
- 54 Poli M, Dewey R, Semorile L y col (1996) PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle *Journal of Vet Med Seria A* 43(3): 163-168
- 55 Healy P, Harper P, Denis J (1990) Bovine citrullinaemia- A clinical, pathological, biochemical and genetic study *Australian Veterinary Journal* 67:255-258
- 56 Healy P, Dennis J, Camilleri L y col (1991) Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King *Australian Veterinary Journal* 68:155
- 57 Arruga M (1994) Situación actual y estrategias utilizadas para el mapeo génico bovino. *Bovis* 60: 11-28
- 58 Dennis J, Healy P, Beaudet A, Obrian W (1989) Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency *Proc Natl Acad Sci* 86: 7947-7951
- 59 Baro J (1999) Síndrome de hipertrofia muscular hereditaria: el gen de la miostatina es un QTL Marcadores genéticos moleculares de aplicación en medicina veterinaria *Oficina Publicaciones Facultad Veterinaria Montevideo DL.317.518:15-16.*
- 60 Grobet L, Royo L, Poncelet D y col (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle *Nature Genetics* 17:71-72
- 61 Antoniou E, Grosz M (1999) PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation *Animals Genetics* 30: 231-232
- 62 Casas E, Keele J, Shackelford S y col (1998) Association of muscle hypertrophy locus with carcass in beef cattle *J Anim Sci* 76:468-473
- 63 Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T y col (2000) Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu) *Animal Genetics* 31:13-19
- 64 Kunieda T, Ide H, Nakagiri M y col (2000) Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28 *Animal Genetics* 31:87-90
- 65 Sutherland G, Hecht F (1985) Fragile sites on human chromosomes *New York Oxford University Press Vol 13*
- 66 Jordan B (1991) Fragile X-Linked mental retardation and the difficulties of reverse genetics *BioEssay* 13 (5):243-251
- 67 Yunis J, Soreng A (1984) Constitutive fragile sites and cancer *Science* 226: 1199-1204
- 68 Tewari R, Juyal R, Thelma B y col (1987) Folate-sensitive fragile sites on the X-chromosome heterochromatin of the Indian mole rat, *Nesokia indica* *Cytogenet Cell Genet* 44 (1):11-7

- 69 Kremer E, Pritchard M, Lynch M y col (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)_n *Science*. 252:1711-1714
- 70 Fu Y, Kuhl D, Pizzuti A y col (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetics instability: resolution of the Sherman paradox *Cell* 67 (6): 1047-1050
- 71 Baranov R, Brunner M, Schwerin M (1997) Presence of evolution rearrangement inside of bovine X chromosome detected by androgen receptor gene localisation *Cytogenet Cell Genet* 77:37
- 72 Halnan C (1972) Autosomal deletion and infertility in cattle *Vet.Rec.* 91:572
- 73 Basrur P, Stoltz J (1966) Chromosome studies in bovine quintuplets *Chromosoma (Berl)* 19:176-187
- 74 El-Nahass E, Syrjalla A, Michel.Mann H, Paufler S (1974) Mosaik einer X-chromosomen-aberrations als wahrscheinliche ursache der sterilitat bei eimen rind *Tierarztl Wscr.* 81:405-406
- 75 Genest P, Guay P (1979) Structural abnormalities of X-chromosome in a heifer *Can J Comp Med* 43:110-111
- 76 Hanada H, Muramatsu S (1980) A case of subfertile cow with structural abnormalities of the X chromosome *Ann Genet Sel Anim* 12: 209-213
- 77 Uchida Y, Freeman V, Basrur P (1986) The fragile X in cattle *Am J Med Genet* 23:557-562
- 78 Llambí S, Postiglioni A (1994) Localization of the fragile X chromosome break points in Holstein-Friesian Cattle (bos taurus) *Theriogenology Vol 42 N°5:789-794*
- 79 Llambí S (1995) Estudios citogenéticos y amplificación de ADN in vitro en Holando-Uruguayo (Bos taurus) con problemas reproductivos *Tesis de maestría PEDECIBA Universidad de la República :1-115*
- 80 Rincón G, Llambí S, Postiglioni A (1997) The X chromosome fragility expression in Holstein-Friesian cattle: a preliminary study *Genetics Selection and Evolution 4 Vol 29:395-401*
- 81 Monteagudo L, Postiglioni A, Llambí S, Arruga V (1999) Detection of Chromosome breaks and genetic pathology by molecular genetics *Hungarian Journal of Animal Production. Vol 48 (1): 150-152*
- 82 Halley D, Oostra B, Niermeijer M (1998) The fragile X syndrome *J Med Genet* 35 (7):579-589
- 83 Ahuja Y (1989) Chromosome fragile sites *Genome* 31:453-455