

Principales enfermedades genéticas en ganado Holstein.

Síndrome de la Brachyspina

Introducción

Los programas de selección y mejora genética del ganado vacuno Holstein, han contribuido de manera significativa al progreso y al avance cualitativo alcanzado en las producciones de esta raza lechera. En dichos programas, es común que determinados ejemplares sean ampliamente utilizados para inseminación artificial, transferencia embrionaria o fecundación in vitro, por lo que si esos animales son portadores de algún defecto hereditario pueden difundirlo ampliamente en la población, aumentando en consecuencia la probabilidad de que se expresen los genes recesivos y con ellos la aparición de las enfermedades genéticas.

Las enfermedades genéticas se deben a alteraciones en los genes, y pueden ser a nivel de un solo gen, varios genes (poligenes) o muchos genes (cromosomas; como las trisomías o monosomías). La alteración genética puede producir directamente la

enfermedad o bien determinar la resistencia o susceptibilidad a padecerla. El interés del diagnóstico de estas enfermedades se centra en la detección de los animales portadores, sobre todo si se trata de animales empleados como reproductores en los programas de mejora genética, por la gran propagación que provocan de las mismas en la población.

El gran desarrollo alcanzado por la Genética Molecular en las últimas décadas ha conducido a un conocimiento muy avanzado del genoma de las distintas especies animales. Los proyectos genoma tienen por objetivo principal descifrar la secuencia de ADN en las distintas especies en cuestión y la posición relativa de cada gen en los cromosomas. Estos hechos están contribuyendo en gran medida al conocimiento de las mutaciones responsables de las enfermedades genéticas y, al mismo tiempo, aportan los mecanismos necesarios para su diagnóstico y para prevenir su expresión clínica.

Las enfermedades genéticas pueden presentar cierta dificultad para ser diagnosticadas a nivel de campo, ya que en numerosas ocasiones presentan manifestaciones clínicas similares a otro tipo de patologías comunes, y muchas veces cursan con muerte embrionaria o con gestaciones que no llegan a término, lo que complica su diagnóstico. No obstante, conjuntamente con la sintomatología, hay una serie de indicios que pueden alertar al investigador sobre el hecho de que se encuentra ante un caso de anomalía genética, como son los siguientes: aparece en animales con vínculos familiares comunes, se observa en todas las estaciones del año y en diferentes ubicaciones geográficas, se presenta con mayor frecuencia cuando aumenta el nivel de consanguinidad, etc (Tabla 1).

Las enfermedades genéticas de mayor interés diagnóstico actualmente en los programas de mejora genética de la raza Holstein a nivel mundial son las siguientes:



Laboratorio de Genética Molecular. Xenética Fontao, S.A. (Lugo)

María Lourido Fuertes, Paula Escofet Crespo, Carmen García Alba, Héctor Areán Dablanca, Alejandro Fernández Fernández y Javier López Viana

Laboratorio de Genética Molecular. Xenética Fontao, S.A. Fontao-Esperante. Lugo.
xfontao@xeneticafontao.com - xeneticafontao.com

Tabla 1. Principales Enfermedades genéticas que afectan al ganado Holstein. Nomenclatura de los códigos según la World Holstein-Friesian Federation (WHFF)

Nombre	Descripción	Gen	Código	
			Portador	Libre
CVM	Malformación Vertebral Compleja	SLC35A3	CVC	CVF
BLAD	Deficiencia de Adhesión Leucocitaria Bovina	CD18	BLC	BLF
MULEFOOT	Pie de mula o Sindactilia	LRP4	MFC	MFF
DUMPS	Deficiencia de Uridinmonofosfato Sintetasa	UMPS	DPC	DPF
CTIRULINEMIA	Deficiencia de Argininosuccinato Sintetasa	ASS	CNC	CNF
DEF. FACTOR XI	Deficiencia de Factor XI	F11	XIC	XIF
BRACHYSPINA	Síndrome de Brachyspina	Bajo patente	BYC	BYF

- **CVM (Malformación Vertebral Compleja):** Se trata de una enfermedad autosómica letal recesiva, descubierta en Dinamarca en el año 2000, que se manifiesta con reducción del peso corporal, malformaciones en la parte cervical y torácica de la columna y contracción bilateral simétrica de las articulaciones del carpo, además son comunes también malformaciones cardíacas. Es muy frecuente además que se produzcan abortos de fetos CVM, mientras que otros nacen de forma prematura y normalmente muertos. En el año 2001, se descubrió que el defecto genético está causado por una mutación del gen autosómico SLC35A3 y se desarrolló el test de ADN para el análisis de la mutación responsable de la enfermedad.



Malformación Vertebral Compleja en un ternero Holstein (Agerholm et ál., 2001)

- **BLAD (Deficiencia de Adhesión Leucocitaria Bovina):** Enfermedad autosómica letal recesiva, descubierta en el año 1983, causada por una mutación del gen CD18 bovino, que provoca la ausencia de moléculas integrina $\beta 2$ en la superficie de los leucocitos. Estas moléculas son las responsables de la adhesión leucocitaria a los receptores de las células endoteliales, permitiendo así la migración al tejido perivascular para la eliminación de patógenos invasivos. La deficiencia de integrina $\beta 2$ hace que parte del mecanismo orgánico de defensa inmunológica no sea efectivo, lo que produce la muerte de los terneros por infecciones diversas en los primeros días de vida.

- **DUMPS (Deficiencia de UridinmonoPhosfato Sintetasa):** Se trata de una enfermedad genética autosómica letal recesiva, causada por una mutación en el gen que codifica para el complejo enzimático UMPS (Uridín-5 -MonoPhosfato Sintetasa), que cataliza la biosíntesis de UMP (Uridín-5 -MonoPhosfato), precursor de los nucleótidos pirimidínicos, que son esenciales en la biosíntesis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). La enfermedad es causa de mortalidad embrionaria.

- **MULEFOOT (Pie de mula o Sindactilia):** Es una enfermedad genética de expresividad variable causada por dos mutaciones en el gen autosómico LRP4, que provocan fusión interdigital total o parcial, principalmente en las extremidades anteriores aunque pueden estar afectadas las cuatro extremidades. Cursa con cojeras, dolor, baja resistencia a altas temperaturas, etc.

- **CITRULINEMIA:** Enfermedad genética letal recesiva causada por una mutación en el gen autosómico que codifica para la enzima Arginino-Succinato Sintetasa (ASS). La deficiencia de esta enzima causa alteraciones en el ciclo de la urea, produciéndose una elevada concentración de citrulina en plasma y líquido cerebro espinal. Provoca mortalidad post-natal debido a la intoxicación del animal por acúmulo de amoníaco en sangre.

- **DEFICIENCIA DE FACTOR XI:** Se trata de una enfermedad autosómica recesiva causada por una mutación en el gen F11, que provoca deficiencia de factor XI o precursor de la tromboplastina plasmática, glicoproteína que participa en el proceso de coagulación sanguínea. Su deficiencia produce problemas hemorrágicos y anemia.



A la izquierda, extremidades de un animal con Mulefoot (Duchesne et ál., 2006).

A la derecha, extremidad normal, vista radiográfica y extremidad con Mulefoot (Drögemüller et ál., 2007)

Principales enfermedades genéticas...

- **BRACHYSPINA:** Recientemente se ha identificado una nueva enfermedad genética letal en la raza Holstein, denominada Brachyspina, causante de muerte embrionaria prematura y abortos dentro de los 40 primeros días de gestación. En muy raras ocasiones la gestación llega a término y, cuando esto ocurre, los terneros nacen muertos presentando una reducción drástica del peso corporal, retraso en el crecimiento, un significativo acortamiento de la espina dorsal con malformaciones vertebrales asociadas, extremidades considerablemente largas y delgadas, malformación de órganos internos, en particular del corazón y de los testículos, así como displasia renal y gonadal (Agerholm *et ál.*, 2006).



Ternero Holstein con Síndrome de Brachyspina.
Sección sagital de la columna vertebral.
(Testoni *et ál.*, 2008)

Algunos de los síntomas de esta enfermedad son similares a los del CVM o Malformación Vertebral Compleja (Agerholm *et ál.*, 2001; Duncan *et ál.*, 2001). El diagnóstico clínico diferencial se basa en que los animales con síndrome de la Brachyspina, muestran un peso corporal medio en torno a los 10 kg, con reducción longitudinal de la columna y displasia renal, mientras que los terneros CVM tienen un peso corporal superior, alrededor de 25 kg de media, presentan también reducción de la longitud de la columna, afectando principalmente a la parte cervical y torácica, y no presentan displasia renal.

En un principio, se desconocía la causa de la enfermedad y a los animales detectados se les realizaban análisis para diagnosticar una posible afección por BVD (Diarrea Vírica Bovina), con resultados negativos. Ante la sospecha de estar ante una nueva enfermedad genética, se realizaron pruebas de ADN para determinación de filiación, lo que permitió comprobar que en todos los terneros afectados sus progenitores estaban emparentados entre sí por un ascendiente común. El conocimiento de la relación parental ratificó, por lo tanto, la sospecha de que el síndrome de la Brachyspina bovina podría tratarse de una enfermedad genética heredable y, hoy en día, se sabe que es una enfermedad autosómica recesiva.

En los años 2006 y 2007, se publicaron los primeros casos de terneros afectados con el síndrome de la Brachyspina, diagnosticados en Dinamarca, Ho-

landa e Italia (Agerholm *et ál.*, 2006; Agerholm & Peperkamp, 2007; Testoni *et ál.*, 2008). Posteriormente, en el año 2010, se detectó un nuevo caso en Canadá (Agerholm *et ál.*, 2010). Desde marzo de 2011, La Holstein Association USA, la incluye en el listado de genes recesivos no deseados y publica, con actualización diaria, una relación con los animales portadores y libres de la enfermedad. En cuanto a la nomenclatura, la WHFF (World Holstein-Friesian Federation), acordó emplear los códigos "BYC" y "BYF" para describir, respectivamente, a los animales testados portadores y libres de Brachyspina.

El origen de la enfermedad parece remontarse, según investigaciones de la CRV (Cooperative Cattle Improvement Association), al toro Sweet Haven Tradition (USAM0001682485) y a sus hijos Bis-May Tradition Cleitus (USAM0001879085) y Rothrock Tradition Leadman (USAM0001983348). Otros toros portadores de Brachyspina muy empleados en selección genética e inseminación artificial a nivel mundial, publicados en los listados de la Holstein Association USA, son Ramos (DEUM000253642), Sandy-Valley Bolton-ET (USAM0131823833), Wa-Del Convincer-ET (USAM0002249055) o Lutz-Brookview Michael-ET (USAM0133389654).

Aunque la raza Holstein tiene menos índice de consanguinidad que otras razas lecheras, los datos obtenidos en Europa sugieren que en una selección aleatoria de apareamientos, 2 de cada 1000 animales de esta raza podrían sufrir el síndrome de la Brachyspina. Las pérdidas económicas ocasionadas por la muerte embrionaria, mortinatalidad o deformidades físicas producidas por la enfermedad, hace necesario desarrollar un método diagnóstico para la identificación genética de animales portadores de Brachyspina.

Los primeros estudios genómicos de esta enfermedad genética se realizaron en la Universidad de Lieja. Las muestras de ADN extraídas en terneros afectados con Brachyspina fueron genotipadas empleando chips de Illumina, Inc. (HG-60K SNP panel y USDA-60K SNP panel), que presentan dos paneles diferentes de SNPs (Polimorfismos de un Solo Nucleótido). Los genotipos obtenidos permitieron encontrar un haplotipo que aparecía en homocigosis en todos los terneros afectados. Este descubrimiento hizo posible el desarrollo de un primer test para la identificación de animales portadores de la enfermedad, que presentaba una fiabilidad de aproximadamente el 95%, ya que estaba basada en el análisis de marcadores asociados (SNPs). En Mayo de 2011, investigadores de la Universidades de Copenhague (Dinamarca) y Lieja (Bélgica), descubrieron y patentaron la secuencia que contiene la mutación genética responsable de la enfermedad, desarrollando un test de ADN directo para el análisis de la mutación responsable de la Brachyspina, que permite la identificación de los animales portadores con un 100% de fiabilidad.

Diagnóstico del síndrome de la Brachyspina en España

En el Laboratorio de Genética Molecular de Xenética Fontao, disponemos ya de la Licencia para el diagnóstico genético de los animales portadores del síndrome de la Brachyspina (No. 61/485,915 - Detecting the Brachyspina mutation,). Además, hemos desarrollado dos Test de ADN para el diagnóstico conjunto de las principales enfermedades genéticas que afectan al ganado Holstein, uno en el que incluimos BLAD, Mulefoot, Brachyspina y CVM y, otro, con DUMPS, Citrulinemia y Deficiencia de Factor XI.

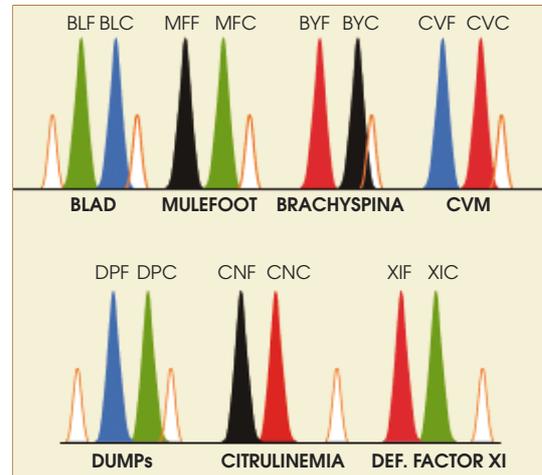
Principales enfermedades genéticas...

La metodología empleada en el Laboratorio para estos análisis genéticos, consiste en la amplificación mediante PCR multiplex (Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple), de las secuencias específicas de ADN que contienen las mutaciones responsables de estas enfermedades. Para la detección de esas mutaciones empleamos a continuación la técnica de "Primer Extension Analysis", utilizando el ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit de Applied Biosystems. Finalmente, los resultados del producto de las reacciones de PCR y SNaPshot, se visualizan mediante electroforesis capilar de fragmentos de ADN marcados por fluorescencia, en el

análizador genético 3500xL Dx Genetic Analyzer de Applied Biosystems. El posterior análisis de los polimorfismos se lleva a cabo empleando el software de análisis GeneMapper™ Software 4.1, que permite el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados y la asignación de la nomenclatura alélica de los marcadores de forma automática.



Analizador genético 3500xL Dx Genetic Analyzer (Laboratorio de Genética Molecular. Xenética Fontao, S.A.)



Representación de los Test de ADN desarrollados en el Laboratorio de Xenética Fontao (Resultados analizados con el Software Genemapper 4.1 de Applied Biosystems)

Bibliografía

- AGERHOLM, J. S., BENDIXEN, C., ANDERSEN, O., ARNBJERG, J., 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 283-289.
- AGERHOLM, J. S., MC EVOY, F., ARNBJERG, J., 2006. Brachyspina syndrome in a Holstein calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 418-422.
- AGERHOLM, J. S., PEPERKAMP, K., 2007. Familial occurrence of Dutch and Danish cases of the bovine brachyspina syndrome. *BMC Vet. Res.* 3:8.
- AGERHOLM, J. S., DELAY, J., HICKS, B., FREDHOLM, M., 2010. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. *Can. Vet. J.* 51: 1349-1350.
- DUCHESNE, A., GAUTIER, M., CHADI, S., GROHS, C., FLORIOT, S., GALLARD, Y., CASTE, G., DUCOS, A., EGGEN, A., 2006. Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics* 2006, 88: 610-621.
- DROGEMULLER, C., LEEB, T., HARLIZIUS, B., TAMMEN, I., DISTL, O., HOLTERSHINKEN, A., GENTILE, M., DUCHESNE, A., EGGEN, A. 2007. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genetics* 8(5): 23.
- DUNCAN, R. B., CARRIG, C. B., AGERHOLM, J. S., BENDIXEN, C., 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 333-336.
- TESTONI, S., DIANA, A., OLZI, E., GENTILE, A. 2008. Brachyspina syndrome in two Holstein calves. *Vet. J.* 2008; 177: 144-146.

Recuerda...

COLOCACIÓN DE MARCAS AURICULARES A LOS ANIMALES

Recordamos a todos los ganaderos, de selección o no, de la obligación que tienen de marcar todos sus animales y registrarlos en el libro de explotación en un plazo que viene fijado por el Real Decreto 1980/1998 de 18 de septiembre, por el que se establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina. Concretamente en su Artículo 6 dice:

Artículo 6.

Asignación, distribución y colocación de las marcas.

1. Las marcas auriculares serán asignadas a la explotación, distribuidas y colocadas en los animales del modo que determine la autoridad competente.
2. No se podrá quitar ni sustituir ninguna marca auricular sin la autorización de la autoridad competente.
3. En el caso de pérdida o deterioro de una marca auricular, ésta será sustituida por una nueva con el mismo código de identificación que la sustituye.
4. Las marcas auriculares se colocarán dentro de un plazo de treinta días a partir del nacimiento del animal y, en cualquier caso, antes de que el animal abandone la explotación en que ha nacido sin perjuicio de las excepciones que, en virtud de lo dispuesto en el apartado 2 del artículo 4 del Reglamento (CE) 820/97, puede determinar la Comisión Europea.
5. Ningún animal nacido después del 1 de enero de 1998 podrá ser objeto de movimiento o intercambio si no va identificado con las marcas descritas en el presente Real Decreto.