

## ESTUDIOS DE POLIMORFISMO DEL GEN **PHLDA2** EN BOVINOS CRIOLLOS URUGUAYOS

Balemian N.<sup>1\*</sup>, Artigas R.<sup>1</sup>, Postiglioni A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Mejora Genética Animal. Área Genética Animal. Facultad de Veterinaria.UDELAR. \*narine.bal@gmail.com.

---

### RESUMEN

---

Los bovinos Criollos Uruguayos mostraron alta heterocigosidad ( $He= 0,80$ ) y bajo índice de endogamia ( $F= 0,02$ ) frente a marcadores moleculares de microsátelites y haplotipos específicos en análisis de ADN mitocondrial. En genes mayores, demostramos altas heterocigosidades y frecuencias alélicas equilibradas diferenciándose de las razas comerciales. Presentamos al gen **PHLDA2**, regulador del glicógeno, ubicado en el cromosoma BTA29, en cuya región 3'UTR se han identificado dos variantes alélicas; nucleótidos T para la región ancestral y nucleótidos A, originados de la mutación de los anteriores. Individuos heterocigotas AT han mostrado una impronta gradual materna en humano, ratón, cerdo y recientemente en bovino. Alteraciones en el proceso de regulación de ésta impronta son causales de mortalidad embrionaria temprana. Se analizaron muestras problema de bovinos Criollos (BCU = 17) y una muestra control de bovino Holando Uruguayo (BHU = 4). Se extrajo ADN genómico de sangre periférica, con posterior amplificación de un fragmento de 384 pb, correspondiente a la región 3'UTR. Su secuenciación permitió identificar los alelos T y A en las muestras analizadas. Las frecuencias alélicas y genotípicas resultaron muy diferentes. En las muestras de BHU, la frecuencia del alelo A correspondió al 100%, mientras que en BCU, la frecuencia alélica T correspondió a 0,35 y la de A 0,65. Estas variantes confluyeron en los siguientes genotipos: AA =0,30 y AT =0,70, revelando una heterocigosidad de 0,70. El hallazgo de heterocigotas en nuestra muestra poblacional de BCU nos permite generar diseños de expresión diferencial de este gen asociado a mortalidad embrionaria temprana

---

**Palabras clave:** Bovino criollo; SNPs; Glicógeno.

---

## POLYMORFISM STUDIES OF THE PHLDA2 GENE IN URUGUAYAN CREOLE CATTLE

---

### ABSTRACT

---

Uruguayan Creole cattle submitted to microsatellites markers, have showed high heterozygosity ( $H_e=0,80$ ) and low endogamic coefficient ( $F=0,02$ ), besides specific haplotypes in mtDNA analysis. Mayor genes also demonstrated high heterozygosity and equilibrated allelic frequencies that differed to commercial breeds. We now present the gene PHLDA2, regulator of glycogen in placenta. This particular gene located in BTA29, presents allelic variation in 3'UTR region. The ancestral T nucleotide has mutated to A in some occasions. Heterozygous individuals AT has showed a gradual maternal impronta, in human, mouse, pigs and recently in cattle. Alterations in regulation process of this impronta caused embryo mortality. Samples of Uruguayan Creole cattle (BCU=17) and a control sample of Uruguayan Holando (BHU=4) was analyzed. Genomic DNA of peripheral blood and amplification/sequencing of a particular fragment of 384pb into 3'UTR was analyzed. Both allelic variants A and T and differences in allelic and genotypic frequencies was found. BHU showed only A variant and homozygosis in all the samples. BCU showed a T allelic frequencies of 0,35 either 0,65 to A allelic variant. Genotype frequencies corresponded to AA=0,33 and AT=0,70, with a heterozygosity of 0,70. The identification of heterozygous in our samples of BCU permitted to think experimental designed to differential expression of this gene associated to early embryo mortality.

---

**Keywords:** Creole cattle; SNPs; Gligogen.

---

### INTRODUCCIÓN

El bovino Criollo fue introducido en América en 1493 por los colonizadores Españoles y Portugueses, siendo éstos el producto de múltiples cruas de bovinos Ibéricos y Europeos. El ambiente favorable en el cual fueron introducidos permitió su reproducción y su dispersión por América Central y Sudamérica. Su adaptación a diferentes ambientes permitió la manifestación de una gran variabilidad genética, pero hoy en día solo permanecen pequeñas poblaciones (hatos semi-silvestres) en Sudamérica, especialmente localizadas en la Patagonia Argentina, en el Pantaneiro de Brasil y en el Parque Nacional de San Miguel (Rocha, Uruguay) (De Alba, 2011; Delgado *et al.*, 2011).

La primera introducción de bovinos en Uruguay fue llevada a cabo por Hernando Arias de Saavedra a comienzos del siglo diecisiete y luego por las Misiones

Jesuitas del Alto Uruguay. A fines del siglo diecinueve se introdujeron varias razas comerciales, reduciéndose así la gran población de bovino criollo a una única población semi-silvestre de aproximadamente 600 cabezas en 650 hectáreas en el Parque San Miguel (Rocha), en un área de bosques nativos y humedales. Arredondo (1958) documentó la creación de la población fundadora la cual consistía de 35 individuos comprendida por vacas, toros y terneros traídos de diferentes regiones con ambientes similares (Armstrong, 2004).

Las principales características de las razas criollas son la mansedumbre, la diversidad de pelajes, la presencia de cuernos, la alta fertilidad, la gran habilidad materna, la gran longevidad, la piel y las mucosas bien pigmentadas, la inserción alta de la cola que se relaciona con ausencia de partos distócicos y el alto vigor híbrido que presentan en cruces con razas comerciales (Martinez *et al.*, 2000; De Alba, 2011).

La conservación de estas poblaciones es de gran importancia ya que son consideradas un recurso de alelos raros con un uso potencial en programas de reproducción. Para la población de bovinos Criollos Uruguayos, trabajos anteriores con marcadores microsatélites demostraron poseer una alta heterocigosidad ( $H_e=0,80$ ) y un coeficiente de endogamia de  $F=0,02$  (Armstrong, 2005). Trabajos posteriores referidos a la secuencia del mtDNA, nos permitieron identificar haplotipos específicos para esta población que habita en condiciones semi-silvestre (Armstrong, 2013). La alta diversidad genética de estos bovinos Criollos se potencian con los resultados obtenidos en fragmentos génicos asociados a las proteínas de la leche. Para el caso de la K-caseína, se identificaron frecuencias dialélicas similares ( $A=0,5$ ;  $B=0,5$ ), a diferencia de la alta frecuencia del alelo A ( $A=0,9$ ) encontrada en la raza comercial Holando uruguayo (Rincón *et al.*, 2006). El gen PHLDA2 (Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 2) es un gen que se expresa de forma materna en la placenta de varios mamíferos (humano, cerdo, bovino entre otros). Se encuentra ubicado en el cromosoma BTA29. Su proteína interviene en la regulación del glicógeno, conservando el reservorio energético extraembrionario de la placenta (Sikora *et al.*, 2011). Estudios recientes en células somáticas bovinas han mostrado niveles reducidos de PHLAD2 asociados al sobrecrecimiento de la placenta, sugiriendo que los niveles de expresión de este gen afectan el crecimiento de la misma en bovinos y otros mamíferos (Sikora *et al.*, 2012). En la región 3'UTR de este gen, los autores han identificado dos variantes alélicas, una ancestral donde se ubica el nucleótido T y una mutación reciente que sustituye el nucleótido T por A (con un rol en la regulación del glucógeno). Individuos heterocigotas AT, han mostrado una impronta gradual materna, en humano, ratón, cerdo y recientemente en bovino (Sikora *et al.*, 2012). Alteraciones en el proceso de regulación de este gen se han

asociado a mortalidad embrionaria temprana. Se realizó el estudio de polimorfismo de la región 3'UTR del gen PHLDA2 en una muestra de bovinos criollos uruguayos a los efectos de obtener datos que reflejen su diversidad genética.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se concurrió a la reserva genética de bovinos Criollos ubicada en el Parque Nacional de San Miguel (Rocha, Uruguay), con la finalidad de tomar muestras a la categoría terneros (machos y hembras) de una misma generación. Estos eran hijos de diferentes madres sometidas a monta natural. Para la colección de material biológico se utilizó tubos de vacutainer con anticoagulante EDTA (10.8mg/6ml). Se amplificaron y secuenciaron 17 muestras de ADN genómico de bovinos Criollos y 4 muestras de ADN genómico de Holando uruguayo del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria (UDELAR). Estos últimos actuaron como control de diversidad genética de los bovinos Criollos.

Metodologías de genética molecular.

Las muestras de ADN genómico se cuantificaron con espectrofotómetro Nanodrop ND1000. El par de primers forward y reverse que flanquean la región que contiene la mutación en estudio identificada con el reference SNP cluster ID rs42194502 fueron:

PHLDA2\_F1\_FOR: 5'-GCAGGAGATGTCGCTTTCAC-3'

PHLDA2\_F1\_REV: 5'-CTTTATTGGAATGGTGGTGGAG-3'

Las reacciones de PCR necesarias para la secuenciación se realizaron en un volumen total de 25µl. Se utilizaron: 1 µl de ADN, 1 µl de cada uno de los primers y 12,5 µl de Immomix (Bioline)

Los productos de amplificación se enviaron a MACROGEN para su secuenciación. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Bioedit. Hall, T.A; (1999).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se amplificó y secuenció el fragmento génico correspondiente a la región 3'UTR del gen PHLDA2 ubicado en el cromosoma 29 bovino. Este gen presenta 2 exones, siendo solo uno de ellos codificante para proteína. El SNP estudiado se encuentra en el extremo 3' UTR del mismo, en la posición 893 del cromosoma (Sikora *et al*, 2012). Las secuencias alineadas mostraron la presencia de los dos SNPs descritos por Sikora *et al.*, en el año 2012. En las muestras de bovino Criollo (n=17) se observó presencia de las dos variantes alélicas, siendo la mayoría de los individuos heterocigotas A/T (n=12) y el resto (n=5) homocigotas A/A. El alelo A mostró una frecuencia de 0,65 y el alelo T una frecuencia de 0,35. El genotipo AA

fue de 0,30 y el AT de 0,70. Los animales de tipo Holando (n=4) mostraron únicamente la presencia del alelo A, siendo todos los individuos homocigotas (Tabla I). Magge *et al.*, (2010) encuentran una frecuencia del alelo A=0,90 y una  $H_e=0,18$  en la raza Irish Holstein Friesian. Estos resultados apoyan nuestros datos preliminares, obtenidos con sólo 4 muestras de Holando uruguayo. En BCU nuestros resultados apoyan el concepto de diversidad genética de esta población, dado el número de individuos heterocigotas. Nuestros resultados potencian la alta variación genética presente en esta raza a diferencia del ganado Holando, donde para otros genes, también se han identificado heterocigosidades menores a las esperadas (Postiglioni *et al.*, 2000). Los resultados preliminares obtenidos, corresponden al hipotetizado, dado que ésta es una raza Criolla que habita en condiciones semi-silvestres, sometida esencialmente a la selección natural

**Tabla I.** Frecuencias alélicas y genotípicas para el gen PHLDA2 en muestras de Bovinos Criollos Uruguayos y Holando Uruguayo (*Allelic and genotype frequencies of PHLDA2 gene, in samples of Uruguayan Creole cattle and Uruguayan Holando*)

Número individuos	Bovino Criollo Uruguayo	Holando Uruguayo
Heterocigotas	12	0
Homocigotas A/A	5	4
Homocigotas T/T	0	0
Total	17	4
Frecuencias alélicas		
Frecuencia alelo A	0,65	1
Frecuencia alelo T	0,35	0
Frecuencias Genotípicas		
Genotipo A/A	0,3	1
Genotipo A/T	0,7	0
Genotipo T/T	0	0

## CONCLUSIONES

En este trabajo obtuvimos resultados que potencian la alta diversidad genética que presenta nuestro Bovino Criollo. La tendencia de disminución en la frecuencia del alelo ancestral T, en ambas razas analizadas, y en particular la presencia de ambos alelos en los BCU, nos permiten ahondar nuestros estudios asociados a la expresión diferencial en la regulación del glicógeno extraembrionario, provocando mortalidad embrionaria temprana.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Dra. Llambí por concurrir y extraer las muestras sanguíneas a bovinos Criollos ubicados en el Parque Nacional de San Miguel (Rocha), además del personal del SE.PA.E. por el arreado y control de los animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, E. (2004). Análisis de la diversidad genética del bovino Criollo Uruguayo mediante microsatélites. Tesis de Maestría, 41-44.
- Armstrong, E. A. Iriarte, A.M. Martínez, M. Feijoo, J.L. Vega-Pla, J.V. Delgado and A. Postiglioni (2013). Genetic diversity analysis of the Uruguayan Creole cattle breed using microsatellites and mtDNA markers. *Genetics and Molecular Research* 12 (2):1119-113.
- Armstrong E., Postiglioni A., Martínez A., Rincón G., Vega-Plá J.L. (2005). Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*)
- Arredondo H. (1958). Santa Teresa y San Miguel. La restauración de las fortalezas. La formación de sus parques. Editado por la imprenta "El siglo ilustrado", Montevideo.
- De Alba, J. 2011. El libro de los bovinos Criollos de América. BBA (México).
- Delgado *et al.* (2011). Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics*. doi:10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.
- Magge *et al.*, (2010) DNA sequence polymorphisms in a panel of eight candidate bovine imprinted genes and their association with performance traits in Irish Holstein-Friesian cattle. *BMC Genetics* 2010, 11:93.
- Martínez *et al.*, (2000). El Ganado Criollo en Argentina. *Arch. Zootec.* 49: 353-361.
- Postiglioni *et al.*, 2000. Analysis of the population structure of Uruguayan Creole cattle as inferred from milk major gene polymorphisms XXI Congreso Mundial de Buiatría. (CD).
- Rincón G., Armstrong E., Postiglioni A. (2006). Analysis of the population structure of Uruguayan Creole cattle as inferred from milk major gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 3, 491-495.
- Sikora, K.M., Magee, D.A., Berkowics, E.W., Lonergan, P., Ewans, A.C.O., Carter, F., Comte, A., Waters, S.M., MacHugh, D.E., and Spillane, C. (2012). PHLAD2 is an imprinted gene in cattle. *Animal Genetics* 43, 587-590.