

Informe final publicable de proyecto

Análisis de los haplotipos de fertilidad en bovinos Holstein Friesian uruguayo

Código de proyecto ANII: FMV_3_2022_1_172855

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2025

ARTIGAS SILVA, Rody (Responsable Técnico - Científico)

BRANDA SICA, Andrea (Co-Responsable Técnico-Científico)

FEDERICI RODRIGUEZ, Marfa Teresa (Investigador)

JARA TELLECHEA, Eugenio (Investigador)

VAZQUEZ ODO, Noelia Stephanie (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \\ INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS \\
FACULTAD DE VETERINARIA. FUNDACIÓN MARCO PODESTÁ

Resumen del proyecto

En las últimas décadas, el mejoramiento genético permitió que cada vaca produjera más leche y que aumentara la producción total de los tambos. Sin embargo, a nivel mundial se observa un fenómeno contrario: la fertilidad del ganado lechero ha disminuido de forma marcada. Uruguay no es la excepción. La tasa de preñez se redujo entre 20 y 30 % y el intervalo entre parto y nueva concepción pasó de 131 a 150 días. Las causas son diversas y se relacionan tanto con el manejo como con la genética de los animales. Entre los factores genéticos destacan los defectos hereditarios recesivos que provocan pérdidas embrionarias, fetales o perinatales. Un ejemplo de gran relevancia son los haplotipos de fertilidad en la raza Holstein Friesian, que constituyen un problema silencioso en los sistemas de producción. Hasta ahora se habían identificado 11 haplotipos en esta raza (HH1 al HH7, HH13, HH21, HH25 y HH35). La mayoría genera la muerte embrionaria antes de los 60 días de gestación, lo que se traduce en menor eficiencia reproductiva y mayor descarte de hembras. En este proyecto se determinó la frecuencia y dinámica poblacional de dichos haplotipos en Uruguay, a partir del análisis de una muestra representativa de vacas de rodeos comerciales y de la totalidad de los toros empleados en los programas nacionales de evaluación genética de la raza Holstein Friesian. Los resultados aportaron información estratégica para la toma de decisiones en selección y manejo, contribuyendo a mejorar la reproducción y la sostenibilidad de la producción lechera uruguaya.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Genética Animal

Palabras clave: Fertilidad / reproducción / mortalidad embrionaria /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

1. Antecedentes

En los últimos 20 años Uruguay ha logrado un gran crecimiento económico, con un aumento del PBI de manera prácticamente ininterrumpida, salvo durante la pandemia causada por SARS-CoV-2 (Banco Mundial, 2022). Históricamente hemos sido considerados un país agroexportador, siendo la carne y la leche bovina dos de los principales productos pecuarios. El dinamismo económico, propiciado por el sector agroexportador, ha hecho del mismo una pieza clave de la economía nacional.

La producción de leche se ha mantenido en constante crecimiento en los últimos cinco años, alcanzando máximos productivos en 2019-2020 (2205 millones de litros) en relación al 2012-2013 (2184 millones de litros) (DIEA-MGAP, 2021). A nivel de la economía nacional, el sector lácteo aportó en exportaciones 748 millones de dólares en 2021, siendo la leche en polvo entera el principal producto exportado (65%) (INALE, 2021).

La inseminación artificial ha permitido acelerar el progreso genético de los rodeos. Esto ha dado sustento a un aumento del rendimiento individual por vaca en ordeño y la producción total de leche. Sin embargo, desde hace varios años se ha observado internacionalmente que los indicadores reproductivos siguen una tendencia contraria, tanto en sistemas pastoriles como en sistemas más intensivos (de Nava, 2011), estableciéndose una relación inversa en lo que respecta a producción-reproducción (Rajala-Schultz y Frazer, 2003; Dobson et al., 2007). Varios trabajos reportan correlaciones genéticas positivas (de 0.22 a 0.59) entre nivel de producción de leche y el intervalo entre partos (Zambianchi, 1999). En Uruguay la situación no es diferente, la tasa de preñez del ganado lechero ha caído entre 20 y 30 %, y el intervalo parto-concepción ha aumentado de 131 a 150 días (Meikle et al., 2013).

No solo la fertilidad se ha visto comprometida con el aumento en la producción de leche. El vigor y la longevidad de las vacas ha disminuido, y las alteraciones de la ubre y los trastornos de la locomoción se han disparado. Varios trabajos han demostrado que el incremento en la producción se correlaciona desfavorablemente con un aumento en enfermedades como: cetosis (0.26 - 0.65), quistes ováricos (0.23 - 0.42), mastitis (0.15 - 0.68) y rengueras (0.24 - 0.48) (Oltenacu y Algers, 2005). Esto indica que la producción de leche como único criterio de selección conduce a una fertilidad más pobre y a menor salud animal, afectando seriamente el bienestar de la vaca.

Se han identificado varios factores que contribuyen a la marcada pérdida de fertilidad, vinculados principalmente al manejo y a la genética (Liebig et al., 2022). En este último punto cobran relevancia las alteraciones hereditarias responsables de mortalidad embrionaria, fetal y perinatal.

La raza Holstein Friesian es la raza de leche más numerosa de Uruguay y del mundo, donde se han reconocido 46 enfermedades hereditarias con mutación conocida, la mayoría en menos de 10 años (OMIA, 2022), particularmente en lo que respecta a los haplotipos de fertilidad.

Los haplotipos de fertilidad corresponden a regiones cromosómicas (combinación determinada de alelos de genes cercanos y ligados) que en la mayoría de los casos se heredan como bloque y con ellos sus efectos en el fenotipo. Estas regiones se caracterizan por carecer o presentar un déficit de homocigosis, es decir, no se encuentran individuos vivos homocigotas para ese haplotipo o se encuentran muy pocos. La ausencia de individuos homocigotas se debe a que los animales con dos copias iguales del haplotipo mueren durante el desarrollo embrionario producto de un efecto letal del mismo (Calderón et al., 2021).

En la raza Holstein Friesian se han reportado 20 haplotipos con déficits de homocigotas (HH1-17, HH21, HH25 y HH35). Para 11 de ellos (HH1-HH7, HH13, HH21, HH25 y HH35) se ha identificado el gen responsable y la mutación efectora del fenotipo (OMIA, 2022). Se ha observado que esas mutaciones afectan la tasa de preñez y producen un aumento de mortinatos y de abortos espontáneos que agravan la ya crítica situación de pérdida de fertilidad (VanRaden et al., 2011; Fritz et al., 2013; Adams et al., 2016; McClure et al., 2014; Schütz et al., 2016; Fritz et al., 2018; Hozé et al., 2020; Yang et al., 2022; Häfliger et al., 2022).

Haplotipo HH1: produce pérdidas embrionarias en el primer trimestre de gestación. Se debe a una mutación nonsense (c.1741C>T) en el gen APAF1, el cual es esencial para el desarrollo embrionario (Adams et al., 2012). Se estima que esta mutación ha causado más de 525.000 abortos espontáneos en todo el mundo durante los últimos 35 años, con grandes pérdidas económicas para los productores comerciales, valuadas en 420 millones de dólares (Adams et al., 2016). En EE.UU la frecuencia de portadores se estimó en 4.5% (VanRaden et al., 2011).

Haplotipo HH2: la mutación efectora es de muy reciente identificación. Es una delección de una T en el exón 11 del gen IFT80. Esta mutación lleva a un corrimiento en el marco de lectura y una pérdida del dominio WD40, que sirve para la interacción proteína-proteína o proteína /ADN (Yang et al., 2021). IFT80 participa en el desarrollo óseo y en la diferenciación de los osteoblastos, por lo que alteraciones en su estructura son concordantes con el efecto de letalidad embrionaria. La frecuencia de portadores ha sido estimada en EE.UU en 4.6% (VanRaden et al., 2011).

Haplotipo HH3: la mortalidad embrionaria se produce antes de los 60 días de gestación. La mutación responsable es una sustitución de T por C (c.3404T>C) en el exón 24 del gen SMC2 (McClure et al., 2014). SMC2 codifica para una proteína que tiene un papel esencial en la reparación del ADN, la condensación de la cromatina y la segregación cromosómica durante la división celular. La frecuencia de portadores se ha estimado en 4.7% en EE.UU (VanRaden et al., 2011).

Haplotipo HH4: provoca mortalidad embrionaria en el primer mes de gestación. Se debe a una mutación missense (c.869A>C) en el gen GART, responsable de codificar a la enzima fosforibosilglicinamida sintetasa, necesaria para la síntesis de nucleótidos purina. Este haplotipo ha sido reportado con una frecuencia de 3,6% en Francia (Fritz et al., 2013).

HH5: produce mortalidad embrionaria antes de los 60 días de gestación. La mutación responsable es una gran delección de 138Kpb en el gen TFB1M, que codifica para el factor de transcripción mitocondrial B1. La frecuencia de animales portadores de esta mutación se ha observado elevada en poblaciones Holstein de Europa y EE.UU (Schütz et al., 2016).

Haplotipos HH13, HH21, HH25 y HH35: se trata de los haplotipos de más reciente descripción, por lo que la información disponible aún es muy reducida. Estos haplotipos mostraron asociaciones negativas principalmente con los rasgos de fertilidad en hembras. Los genes asociados a estos haplotipos son: NOTCH3 (neurogenic locus notch homolog protein 3, HH21), RIOX1 (Oxigenasa ribosomal 1; HH25), KIR2DS1 (killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and short cytoplasmic tail 1 -HH13-) y PCDH15 (protocadherin-related 15; HH35). En el caso de los haplotipos HH21 y HH25, las mutaciones son delecciones, de 3pb (c.129_131delTTG) en el gen NOTCH3 y de 30pb (c.396_425del) en el gen RIOX1, respectivamente. En HH13 y HH35, las mutaciones puntuales se deben a una sustitución nucleotídica de G>C (c.2599C>G) en el gen PCDH15 y de C>T (c.475C>T) en el gen KIR2DS1, respectivamente (Häfliger et al., 2022).

Los haplotipos HH6 (gen SDE2) y HH7 (gen CENPU) también han sido reconocidos como causa de mortalidad embrionaria (OMIA, 2022), pero no serán analizados en esta propuesta.

Si bien algunos haplotipos se conocen desde hace algunos años, la distribución poblacional ha sido reportada en pocas poblaciones Holstein Friesian, principalmente por el hecho de que se desconocían las mutaciones efectoras, hasta ahora. La presencia de uno o varios de estos haplotipos en conjunto puede comprometer la performance reproductiva del rodeo, por lo que conocer la distribución poblacional de estos polimorfismos es de importancia a la hora de elegir el semen de los reproductores a utilizar.

2. Problema de investigación

La mayoría de las razas de ganado lechero se han formado a partir de un bajo número de animales fundadores. En los últimos 70 años, su acervo genético se ha reducido aún más, principalmente por dos factores: el uso masivo de un número limitado de toros de élite a través de la inseminación artificial y por una fuerte selección a favor de unos pocos caracteres productivos (Hansen, 2000; Zenger et al., 2007; Fritz et al., 2013; Ma et al., 2019). Como consecuencia, muestran una tasa de endogamia generacional promedio de 1% correspondiente a un tamaño efectivo poblacional de 50, y la mitad de su acervo genético es explicado por solo 10 a 20 ancestros (Fritz et al., 2013). En los últimos años se ha observado que la consanguinidad se ha incrementado después de la reciente implementación de la selección genómica (Makanjuola et al., 2020). Esto aumenta la homocigosis dentro de los rodeos, favoreciendo el surgimiento de defectos hereditarios letales, como es el caso de los haplotipos de fertilidad.

Los problemas de fertilidad son una de las principales causas de refugio en los bovinos (Seegers et al., 1998; Rilanto et al., 2020), y bajo el contexto reproductivo de la raza, las vacas Holstein Friesian tienen más probabilidad de ser refugadas que otras (Rilanto et al., 2020).

En estudios previos, integrantes de este grupo han demostrado la presencia en el país de nueve defectos hereditarios recesivos propios de la raza Holstein Friesian que se encuentran circulando en los rodeos comerciales (Branda Sica et al., 2022; Briano et al., 2021; Artigas et al., 2020; Branda Sica et al., 2019; Branda Sica et al., 2016; Llambí et al., 2003), entre ellos los Haplotipos HH1, HH3, HH4 y HH5. La alta prevalencia de animales portadores para uno o más de los nueve defectos hereditarios detectados sugiere que existen suficientes antecedentes genéticos para explicar, en parte, la baja de la eficiencia reproductiva en las hembras Holstein Friesian en Uruguay (Briano et al., 2021). Los mismos autores estiman que en conjunto se podrían estar produciendo 6000 pérdidas prenatales, producto de las mutaciones letales en homocigosis para las nueve enfermedades detectadas.

Si bien los haplotipos HH1, HH3, HH4, HH5 se identificaron en el país en terneros Holstein Friesian, no son un reflejo directo de la situación del rodeo comercial, puesto que no fue posible determinar cuándo el alelo mutante provenía por línea materna o por el semen utilizado en los establecimientos. Sumado a esto, nada se sabe acerca de la distribución de los haplotipos HH2, HH13, HH21, HH25 y HH35 en Uruguay.

3. Objetivos

Objetivo general:

Analizar la dinámica poblacional de los haplotipos de fertilidad en bovinos de la raza Holstein Friesian de Uruguay.

Objetivos específicos:

Aislar el ADN genómico de los animales muestreados y cuantificar su concentración y pureza.

Optimizar la técnica de PCR para los haplotipos HH13, HH21, HH25 y HH35.

Analizar la presencia de las mutaciones efectoras de los haplotipos HH1 al HH7, HH13, HH21, HH25, HH35.

Analizar el listado de toros padres utilizados en el programa nacional de evaluación genética de la raza Holstein Friesian para los haplotipos HH1 al HH5.

Evaluar los parámetros poblacionales de los haplotipos HH1 al HH5, HH13, HH21, HH25, HH35.

4. Justificación

Mediante la ejecución de la propuesta de investigación se pretende lograr información crítica, para que los productores tomen decisiones informadas al momento de inseminar las vacas de sus rodeos, realizando apareamientos selectivos y eligiendo el mejor toro que más se adecúe a la realidad genética de su establecimiento. Esto permitiría mejorar en parte, la performance reproductiva de sus vacas, disminuyendo las tasas de refugio y aumentando la rentabilidad de la empresa.

Además, para el caso de los Haplotipos HH13, HH21, HH25, y HH35, se desarrollaron técnicas de genotipado que no estaban disponibles en el país. Con la propuesta de investigación se obtuvo información acerca del comportamiento poblacional de los haplotipos HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HH13, HH21, HH25 y HH35. Se lograron protocolos originales de genotipado basados en tecnologías de PCR y secuenciación.

Los resultados aportaron información estratégica para la toma de decisiones en selección y manejo, contribuyendo a mejorar la reproducción y la sostenibilidad de la producción lechera uruguaya. Además, se cuantificó que, de acuerdo con Briano et al. (2021), las mutaciones recesivas podrían ocasionar unas 6000 pérdidas prenatales anuales, lo que se traduce en aproximadamente 17 millones de pesos (casi U\$S 400.000) en pérdidas económicas.

La información generada tiene un alto valor de transferencia para productores, veterinarios clínicos, laboratorios de diagnóstico y programas de mejoramiento genético, además de contribuir a la formación de recursos humanos y a la consolidación de capacidades científicas y tecnológicas en Uruguay.

Metodología/Diseño del estudio

Animales: Se seleccionaron 250 vacas no emparentadas de tambos provenientes de diferentes regiones del país (protocolo CEUA 1526). Estudios similares habían sido realizados por Albertino et al. (2022) con un número semejante de animales en Brasil.

Toma y almacenamiento de muestras: Se extrajeron muestras de sangre entera periférica (5 mL) de los animales (según formulario de protocolo CEUA N°1526), que se colocaron en tubos con EDTA

Aislamiento de ADN: El ADN se extrajo utilizando el kit comercial "Quick-DNA Miniprep Plus Kit" (Zymo Research), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración y la pureza mediante un espectrofotómetro de microvolumen (DeNovix DS-11) y la integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

Genotipado para haplotipos HH13, HH21 y HH35: Se amplificaron mediante PCR fragmentos que contenían las mutaciones puntuales reportadas en los genes KIR2DS1, NOTCH3 y PCDH15, respectivamente. Las condiciones de reacción se optimizaron en un volumen final de 25 µL que contenía: 1X buffer, 2.5 mM MgCl2, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada cebador, 1 U de Taq polimerasa y 100 ng de ADN. El programa de termociclado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, temperatura de hibridación específica por 30 s, 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5 %. Los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciación comercial (Macrogen Inc., Corea)

Genotipado para haplotipo HH25: Se empleó una PCR múltiple con cebadores específicos para detectar la delección de 30 pb en el gen R10X1. Los productos se corrieron en gel de agarosa al 2 % y se visualizaron bajo luz UV para determinar el tamaño esperado.

Genotipado para haplotipos HH1 al HH5: Se utilizó el chip bovino GeneTitan (Genexa®), que incluyó sondas específicas para estos haplotipos.

Análisis de los datos: Los resultados de secuenciación y genotipado se analizaron para confirmar la presencia de las mutaciones descritas por VanRaden et al. (2011), Fritz et al. (2013), Adams et al. (2016), McClure et al. (2014), Schütz et al. (2016), Fritz et al. (2018), Hozé et al. (2020), Yang et al. (2022), Häfliger et al. (2022).

Parámetros poblacionales: Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas, y se evaluó el equilibrio de Hardy–Weinberg mediante el test exacto de Fisher. Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa de licencia libre Genepop 4.2 disponible en http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html

Análisis del listado de padres: Se analizaron los registros de 3028 toros Holstein, nacionales e importados, nacidos entre 1964 y 2016, pertenecientes al catálogo de padres actualizado a diciembre de 2021, publicado por Evaluaciones genéticas lecheras, disponible en <https://www.geneticalechera.com.uy/> (descargado 12/05/22). El catálogo incluyó todos aquellos toros con al menos una hija en el sistema de evaluación nacional. Cada toro fue analizado utilizando la metodología descrita por Artigas et al. (2020) utilizando las bases de datos abiertas de Holstein Association USA (<http://www.holsteinusa.com/>), ABS Global (<https://bullsearch.absglobal.com/en-us/bull/quick-search>), DairyNZ (<https://www.dairynz.co.nz/animal/animal-evaluation/bull-team/>), World Wire Sires (<http://wwsires.com/>) y Evaluaciones genéticas lecheras (<https://www.geneticalechera.com.uy/>). Se registró país de procedencia de los toros, número de animales sin datos para los haplotipos (SD), el número de animales libres (T), número de animales portadores (C), número de hijas de los portadores. Los registros fueron analizados para los Haplotipos HH1 al HH5, que es la información que se encontraba disponible

Resultados, análisis y discusión

1. Catálogos de toros y semen disponible

El análisis de 3028 toros incluidos en catálogos de padres (2021) mostró que 1471 animales (48,6%) contaban con información sobre haplotipos de fertilidad (HH1–HH5), mientras que en el resto no se disponía de este dato. Entre los que sí tenían información, se detectaron portadores de todos los haplotipos, lo que confirma que estas variantes deletéreas continúan presentes en los núcleos de selección.

De forma complementaria, se revisaron 5136 registros de catálogos de semen comercializados en Uruguay entre 2014 y 2023. La proporción de toros sin información genética aumentó con el tiempo, constituyendo una limitante para la toma de decisiones. Se observó la desaparición de HH4 desde 2016, mientras que HH5 se mantuvo en niveles relevantes, alcanzando un pico de 11,4% en 2021 y descendiendo a 5,7% en 2023.

2. Muestreo poblacional y banco de ADN

Se muestrearon 250 animales para el estudio específico de HH13, HH25 y HH35. El ADN se aisló con éxito en todos los casos, con concentraciones entre 80 y 100 ng/µL, y se conformó un banco de ADN representativo de la raza Holstein uruguaya, con animales seleccionados para evitar parentesco de padre y madre.

3. Genotipado con chip de SNPs (HH1–HH5)

Se amplió el análisis a 431 animales mediante un chip de 75.000 SNPs. El genotipado reveló portadores para 4 haplotipos:

- HH1 = 1,16%
- HH2 = 1,8%
- HH3 = 1,16%
- HH4 = 0%
- HH5 = 4,1%

Estos resultados confirmaron la ausencia de HH4 en la población y la mayor frecuencia de HH5 en comparación con los demás haplotipos.

4. Desarrollo de herramientas moleculares (HH13 y HH35)

Se diseñaron y validaron primers originales para HH13 y HH35. Se realizaron 500 reacciones exitosas, obteniéndose secuencias legibles en 226 animales para HH13 y 243 animales para HH35.

5. Resultados poblacionales para HH13 y HH35

Genotipos para HH13 (n=226):

CC = 0,92

CT = 0,08

TT = 0,00

Alelos: C = 0,96; T = 0,04 (alelo deletéreo)

HH35 (n=243):

CC = 0,82

CG = 0,15

GG = 0,03

Alelos: C = 0,90; G = 0,10 (alelo deletéreo)

Se detectaron 6 homocigotos recesivos viables (2,5%).

6. Limitaciones técnicas en HH25

No se logró optimizar la PCR para HH25 debido a problemas en las temperaturas de melting de los primers diseñados, dada la complejidad de la región del gen dónde se encuentra la delección.

Discusión

Los resultados obtenidos permiten una visión integrada sobre la situación de los haplotipos de fertilidad en la raza Holstein en Uruguay, con implicancias científicas, productivas y tecnológicas.

Catálogos y semen comercial

El análisis de catálogos nacionales de toros y semen demostró la permanencia de haplotipos deletéreos en animales de amplia difusión. La desaparición de HH4 desde 2016 confirma que, bajo presión de selección, es posible eliminar variantes desfavorables en pocos años. Sin embargo, la persistencia de HH5, con picos superiores al 10%, pone de manifiesto que los mecanismos de control aplicados no han sido suficientes para evitar su diseminación. La falta de información genética en más de la mitad de los toros representa un problema crítico. La transparencia en los catálogos es esencial para que los productores puedan elegir animales que no comprometan la eficiencia reproductiva de sus rodeos. Esta opacidad no solo dificulta la gestión técnica, sino que también erosiona la confianza en los programas de mejoramiento genético y en las instituciones que los promueven.

Banco de ADN y genotipado masivo

La conformación de un banco de ADN de alta calidad es un aporte estratégico, pero el verdadero derrame hacia la mejora genética provino del genotipado con chip de SNPs de 250 animales. Estos datos constituyeron uno de los primeros aportes masivos para las evaluaciones genómicas de la raza Holstein en Uruguay, marcando un hito en la transición hacia un sistema de selección basado en información molecular.

Los resultados confirmaron la presencia de portadores para HH1, HH2, HH3 y HH5, con ausencia total de HH4. La mayor frecuencia de HH5 refuerza la necesidad de centrar las estrategias de control en este haplotipo, ya que implica un riesgo reproductivo mayor. Si bien HH1–HH3 tienen bajas frecuencias, su monitoreo sigue siendo necesario para evitar reintroducciones por semen importado.

Desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas

El diseño de primers y el desarrollo de protocolos específicos para HH13 y HH35 constituyen un logro significativo. Antes de este proyecto, no existían métodos internacionales validados para genotipar estas variantes. La creación de estas herramientas no solo mejora la capacidad diagnóstica en Uruguay, sino que también posiciona a la investigación nacional en la vanguardia internacional.

La disponibilidad de estas pruebas permite identificar portadores en rodeos nacionales, lo cual es clave para planificar esquemas de cruzamiento más seguros. Su aplicación puede traducirse en una reducción de pérdidas económicas asociadas a abortos y fallas reproductivas, y en una mejora de la competitividad de la lechería nacional.

Resultados poblacionales: HH13 y HH35

El hallazgo de HH13 con una frecuencia alélica del 4% es preocupante, ya que en estudios europeos se había reportado una presencia aún menor (Häfliger et al., 2022). Esto sugiere que en Uruguay existe un riesgo mayor de diseminación, especialmente si no se implementan estrategias de control adecuadas.

En el caso de HH35, la frecuencia de 10% y la detección de homocigotos recesivos viables confirman la penetrancia incompleta reportada previamente. Este resultado es crítico, ya que indica que la mutación no se comporta como letal absoluto y que los animales homocigotos pueden sobrevivir, perpetuando el haplotipo en la población. La presencia de homocigotos tiene implicancias directas en la planificación reproductiva, ya que incrementa el riesgo de pérdidas embrionarias y de fallas en la eficiencia productiva.

Limitaciones en HH25

La imposibilidad de optimizar la PCR para HH25 muestra los desafíos técnicos de trabajar con variantes nuevas, principalmente aquellas localizadas en regiones génicas complejas con un alto contenido de GC. No obstante, los intentos realizados constituyen un punto de partida para futuros desarrollos metodológicos.

Impactos económicos, sociales y ambientales

Los hallazgos del proyecto tienen impactos en tres niveles:

Económico: la permanencia de haplotipos deletéreos en la población implica pérdidas reproductivas que se traducen en menor eficiencia y mayores costos por animal. Las fallas de concepción y las muertes embrionarias aumentan la cantidad de servicios necesarios por preñez y reducen la vida útil de las vacas, afectando directamente los ingresos de los productores.

Social: el proyecto aportó datos clave para las primeras evaluaciones genómicas de la raza en Uruguay, lo que fortalece la capacidad nacional en genética bovina. Además, consolidó vínculos entre la academia, los criadores y las instituciones, generando un impacto positivo en la formación de recursos humanos y en la confianza del sector productivo hacia la ciencia nacional.

Ambiental: al mejorar la eficiencia reproductiva mediante un manejo genético más preciso, se reduce el impacto ambiental de la lechería. Menos fallas reproductivas implican un uso más eficiente de alimentos, agua y superficie, disminuyendo la huella ambiental por litro de leche producido.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se conformó un banco de ADN representativo de la raza Holstein Friesian uruguaya, con muestras de alta calidad, que constituye un insumo estratégico para futuros estudios de genética bovina.

Se desarrollaron y validaron protocolos moleculares originales para los haplotipos HH13 y HH35, generando herramientas inéditas a nivel internacional para su diagnóstico.

El genotipado masivo de 431 animales con chip de SNPs aportó los primeros datos crudos para las evaluaciones genómicas de la raza Holstein en Uruguay, marcando un hito para el país en la implementación de programas de selección asistida por marcadores.

Los análisis poblacionales confirmaron la ausencia de HH4, pero demostraron la presencia de HH1, HH2, HH3, HH5, HH13 y HH35 en la población nacional. Entre ellos, HH5 y HH35 presentan las frecuencias más elevadas y constituyen los principales riesgos reproductivos.

El haplotipo HH35, con una frecuencia alélica del 10% y presencia de homocigotos recesivos viables, confirma la penetrancia incompleta de la mutación y su impacto sobre la eficiencia reproductiva.

El haplotipo HH13, con una frecuencia alélica del 4%, también se considera preocupante por su potencial de diseminación y por el riesgo reproductivo que implica.

En conjunto, los resultados demuestran que la persistencia de haplotipos deletéreos en la población Holstein uruguaya representa un desafío productivo y sanitario que requiere atención sistemática.

Recomendaciones

Los datos obtenidos en este proyecto permiten realizar múltiples recomendaciones, como derrames de la propuesta, que se listan esquemáticamente a continuación:

Monitoreo sistemático: implementar programas continuos de genotipado de haplotipos de fertilidad en rodeos nacionales, con énfasis en HH5, HH13 y HH35.

Catálogos transparentes: exigir a las empresas proveedoras de semen la publicación completa de información genética de los toros, garantizando que los productores puedan tomar decisiones informadas.

Selección asistida: fomentar el uso de toros libres de haplotipos deletéreos en programas de inseminación artificial, priorizando la reducción progresiva de HH5 y HH35.

Capacitación de productores y técnicos: difundir los resultados y entrenar en el uso de información genómica como herramienta para mejorar la eficiencia reproductiva y productiva.

Fortalecimiento institucional: promover la articulación entre universidades, INIA, la Sociedad de Criadores Holando y empresas privadas para sostener programas de diagnóstico y control a largo plazo.

Proyección internacional: aprovechar el desarrollo de herramientas moleculares originales (HH13 y HH35) como una oportunidad para posicionar a Uruguay en redes internacionales de investigación en genética bovina.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Monitoring of recessive defects associated with low reproductive performance in dairy cattle in Uruguay	Andrea Branda-sica, Rody Artigas, Elena De Torres, Evangelina Kinley, Paula Nicolini, María Teresa Federici, Silvia Llambí.	https://doi.org/10.5455/ovj.2023.v13.i10.8	https://ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=64439&biblioteca=vazio&busca=64439&qFacets=64439	Finalizado
Presentación en evento	Prevalencia de Haplotipos de Fertilidad en bovinos Holstein Friesian de Uruguay	Artigas, Rody 1 *; Federici, María Teresa 2 ; Menchaca, Carolina 1 ; Llambí, Silvia 1 ; Jara, Eugenio 1 ; Branda Sica, Andrea 2 .	https://ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=65138&biblioteca=vazio&busca=65138&qFacets=65138	https://ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=65138&biblioteca=vazio&busca=65138&qFacets=65138	Finalizado

Referencias bibliográficas

Adams, H.A, Sonstegard, T.S, VanRaden, P.M, Null, D.J, Van Tassell, C.P, ...& Lewin, H.A. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle. J Dairy Sci. 2016 Aug;99(8):6693-6701. doi: 10.3168/jds.2015-10517. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27289157.

Artigas, R., Federici, M. T., Vázquez, N., Alcántara, M., Ramírez, ... & Llambí, S. (2020). Identificación por catálogo y detección molecular de bovinos Holstein portadores de braquiespina en Uruguay. FAVE Sección Ciencias Veterinarias, 19(2), 50-54.

Banco Mundial (2022). Disponible en <https://datos.bancomundial.org/indicador/NY.GDP.MKTP.PP.CD?end=2020&locations=UY&start=2000&view=chart> (consultado: 10/05/2022).

Branda Sica, A., Paula Nicolini, Artigas, R., Federici, M.T., Llambí, S. (2022). Optimization of Real-Time PCR-melting for detection of the Cholesterol-deficiency mutation in Holstein Friesian cattle. Revista Científica Luz, v.: 32 (2022). ISSN: 2477944X.

Branda Sica, A., Nicolini, P., Federici, M. T., & Llambí, S. (2019). Identification of Holstein cows carriers of complex vertebral malformation by high resolution melting curves (HRM). Archives of Veterinary Science, 24(4).

Branda, A., Federici, M. T., Dutra, F., Romero, A., Briano, C., ... & Llambí, S. (2016). Identificación de terneras Holando portadoras de BLAD y Citrulinemia en la región Este de Uruguay por PCR-RFLP y secuenciación. Veterinaria (Montevideo), 52(202), 3-3.

Briano-Rodriguez, C., Romero, A., Llambí, S., Branda Sica, A., Federici MT. ... & Quintela, F. D. (2021). Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay. Ciência Rural, 51.

Calderón, J.P, Gutiérrez, G.A & Garay, GL. (2021). Presencia de haplotipos reproductivos y su efecto en una población de vacunos lecheros en la costa central del Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 32(3), e16215.

De Nava, G. (2011). Un manejo reproductivo controlado en tambos de Uruguay. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Montevideo, Uruguay.

DIEA (2021). Anuario estadístico agropecuario. Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias (DIEA), Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (2022). Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presento-anuario-estadistico-agropecuario-2021>

Dobson, H., Smith, R.F., Royal, M.D., Knight, C.H., & Sheldon, I.M. (2007). The high producing dairy cows and its reproductive performance. Reprod Domest Anim 42:17-23.

Federici, MT., Artigas, R., Guerra, S., Branda Sica, A., Vázquez ... & Llambí, S. (2021). Detection of the Brachyspina mutation in Uruguayan Holstein cows using real time PCR and melting curve analysis. *Ciência Rural*, 51.

Federici, MT., Branda Sica, A., Artigas, R., Briano, C., Dutra, F., & Llambí, S. (2018). High-resolution melting (HRM) curve analysis: new approach used to detect BLAD and DUMPS in Uruguayan Holstein breed. *Archives of Veterinary Science*, 23(4).

Fritz, S., Capitan, A., Djari, A., Rodriguez, SC., Barbat, A. ... & Boichard, D. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS One*. 2013 Jun 7;8(6):e65550.

Fritz, S., Hoze, C., Rebours, E., Barbat, A., Bizard, M. ... & Capitan, A. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 101:6220-6231, 2018.

Albertino, LG, Albuquerque, ALH, Ferreira, JF, Oliveira, JPM, Borges, AS,... Oliveira-Filho JP. Allele frequency of APAF1 mutation in Holstein cattle in Brazil. *Front Vet Sci*. 2022 Feb 23;9:822224.

Häftiger, IM., Spengeler, M., Seefried, FR., Drögemüller, C. Four novel candidate causal variants for deficient homozygous haplotypes in Holstein cattle. *Sci Rep*. 2022 Mar 31;12(1):5435.

Hansen, L. B. Consequences of selection for milk yield from a Geneticist's viewpoint. *J. Dairy Sci*. 83, 1145–1150 (2000).

Hozé, C., Escouflaire, C., Mesbah-Uddin, M., Barbat, A., Boussaha, M. ... Capitan, A. Short communication: A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 2020 Jan;103(1):607-612.

INALE (2021). Situación y perspectiva de la lechería uruguaya. Informes INALE, 20. Disponible en: https://www.inale.org/tipo_de_informe/situacion-prespectivas/

Llambí, S., Guevara, K., Rincón, G., Zaffaroni, R., de Torres, E., ... & Postiglioni, A. (2003). Frequencia da deficiência na adesão leucocitaria em uma população de bovinos da raça holandesa, no Uruguai. *Ars Veterinaria*, 19, 52-56.

Ma, L. et al. Genome changes due to artificial selection in U.S. Holstein cattle. *BMC Genomics* 20, 1–14 (2019).

Makanjuola, B. O. et al. Effect of genomic selection on rate of inbreeding and coancestry and effective population size of Holstein and Jersey cattle populations. *J. Dairy Sci*. 103, 5183–5199 (2020).

Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien, M.L., Artegoitia, V., ... & Chilbroste, P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*, 17, 1:141-152.

Oltenu, PA, Algers, B. (2005). Selection for increased production and the welfare of dairy cows. *Ambio*, 34:311-315.

Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Sydney School of Veterinary Science, {10/05/2022}. Disponible en: <https://omia.org/>

Liebig, B., Bishop, J., McSweeney, K., Van Campen, H., Gonzalez-Berrios, C., ... Thomas, M. (2022). Direct genomic value daughter pregnancy rate and services per conception are associated with characteristics of day-16 conceptuses and hormone signaling for maternal recognition of pregnancy in lactating Holstein cows. *Applied Animal Science*, 38:2.

McClure, MC, Bickhart, D., Null, D., Vanraden, P., Xu, L... & Sonstegard, TS. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2, and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92769.

Rajala-Schultz, P.J., and Frazer, G.S. (2003). Reproductive performance in Ohio dairy herd in the 1990s. *Anim Reprod Sci* 76:127-142.

Rilanto, T. et al. Culling reasons and risk factors in Estonian dairy cows. *BMC Vet. Res*. 16, 173 (2020).

Seegers, H., Beaudeau, F., Fourichon, C. & Bareille, N. Reasons for culling in French Holstein cows. *Prev. Vet. Med*. 36, 257–271 (1998).

Schütz E, Wehrhahn C, Wanjek M, Bortfeld R, Wemheuer WE, Beck J, Brenig B. The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5). Results from a Complete Deletion of TBF1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *PLoS One*. 2016 Apr 29;11(4):e0154602.

VanRaden, P.M., Olson, K.M., Null, D.J., Hutchison, J.L. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci* 94:6153-61.

Yang Y, Si J, Lv X, Dai D, Liu L ... Zhang Y. Integrated analysis of whole genome and transcriptome sequencing reveals a frameshift mutation associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Anim Genet*. 2022 Feb;53(1):137-141.

Zambianchi AR. (1999). Efectos genéticos en producción lechera. *Rev Brasil Zoot*, 28:1263-1267.

Zenger, K. R., Khatkar, M. S., Cavanagh, J. A. L., Hawken, R. J. & Raadsma, H. W. Genome-wide genetic diversity of Holstein Friesian cattle reveals new insights into Australian and global population variability including impact of selection. *Anim. Genet*. 38, 7–14 (2007).

Licenciamiento

Reconocimiento-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-ND)

