

(Formerly MENDELIANA)



July 2020
Volumen XXXI
No. 1
E-ISSN: 1852-6322

BAG

**Journal of Basic
& Applied Genetics**



Journal of the Argentine Society of Genetics
Revista de la Sociedad Argentina de Genética

www.sag.org.ar/jbag
Buenos Aires, Argentina



BAG

Journal of Basic & Applied Genetics

V. XXXI - No.1

July 2020

Included in:



Cited by:



Comité Editorial

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Mar del Plata
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
Balcarce, Argentina
camadro.elsa@inta.gob.ar

Editores Asociados:

Citogenética Animal

Dra. Liliana M. Mola
Departamento de Ecología, Genética y
Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Buenos Aires
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

Citogenética Vegetal

Dr. Julio R. Daviña
Instituto de Biología Subtropical
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, Argentina
juliordavina@fceqyn.unam.edu.ar

Genética de Poblaciones y Evolución

Dr. Jorge Cladera
Instituto de Genética "Ewald A. Favret"
Centro de Investigación en Ciencias
Veterinarias y Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
cladera.jorge@inta.gob.ar

Dra. Noemí Gardenal
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales
Universidad Nacional de Córdoba
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
Córdoba, Argentina
ngardenal@unc.edu.ar

Dr. Juan César Vilardi
Departamento de Ecología, Genética y
Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Buenos Aires
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina
vilardi@bg.fcen.uba.ar

Genética Humana, Médica y Citogenética

Dra. Silvia Adela Ávila
Hospital Castro Rendón
Universidad Nacional del Comahue
Nuequén, Argentina
silvia347@gmail.com

Dra. María Inés Echeverría
Instituto de Genética
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo
Mendoza, Argentina
miecheve@fcm.uncu.edu.ar

Dra. María Purificación Galindo Villardón
Facultad Medicina, Campus Miguel de Unamuno.

Universidad de Salamanca.
Salamanca, España
pgalindo@usal.es

Dr. Santiago Lippold
Centro de Educación Médica e Investigaciones
Clínicas
Buenos Aires, Argentina
sell@fibertel.com.ar

Dr. José Arturo Prada Oliveira
Facultad de Medicina. Departamento de
Anatomía Humana y Embriología
Universidad de Cádiz.
Cádiz, España
arturo.prada@uca.es

Genética Molecular (Animal)

Dr. Guillermo Giovambattista
Instituto de Genética Veterinaria
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
La Plata, Argentina
ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

Genética Molecular (Vegetal)

Dr. Alberto Acevedo
Centro de Investigación de Recursos Naturales
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
acevedo.alberto@inta.gob.ar

Dr. Andrés Zambelli
Fac. de Ciencias Agrarias, Universidad
Nacional
de Mar del Plata.
Balcarce, Argentina
andres.zambelli@mdp.edu.ar

Genética y Mejoramiento Animal

Dra. Liliana A. Picardi
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Rosario
Zavalla, Argentina
lpicardi@fcagr.unr.edu.ar

Dra. María Inés Oyarzábal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de Rosario
Rosario, Argentina
moyazabr@unr.edu.ar

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal

Dra. Natalia Bonamico
Facultad de Agronomía y Veterinaria
Universidad Nacional de Río Cuarto
Río Cuarto, Argentina
nbonamico@ayv.unrc.edu.ar

Dr. José Crossa
Unidad de Biometría y Estadística
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz
y Trigo (CIMMYT)
México, D.F., México
j.crossa@cgiar.org

Dr. Ricardo W. Masuelli
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas

Mendoza, Argentina
rmasuelli@fca.uncu.edu.ar

Dr. Rodomiro Ortiz
Department of Plant Breeding
Swedish University of Agricultural Science
Uppsala, Suecia
rodomiro.ortiz@slu.se

Dra. Mónica Poverene
Departamento de Agronomía
Universidad Nacional del Sur
Bahía Blanca, Argentina
poverene@criba.edu.ar

Mutagénesis

Dr. Alejandro D. Bolzán
Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas
La Plata, Argentina
abolzan@imbice.gov.ar

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal

Ing. Agr. (M.Sc.) Alberto R. Prina
Instituto de Genética "Ewald A. Favret"
Centro de Investigación en Ciencias
Veterinarias y Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Castelar, Argentina
prina.albertoraul@inta.gob.ar

Consultor Estadístico:

Dr. David Almorza
Facultad de Ciencias del Trabajo,
Departamento
de Estadística e Investigación Operativa
Universidad de Cádiz.
Cádiz, España
david.almorza@uca.es

Ing. Agr. Francisco J. Babinec
Estación Experimental Agropecuaria Anguil
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa
Santa Rosa, Argentina
babinec.francisco@inta.gob.ar

Secretaría de Redacción:

Dra. María de las Mercedes Echeverría
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Mar del Plata
Balcarce, Argentina
echeverria.maria@inta.gob.ar

Diseño y maquetación:

Mauro Salerno
maurosaler92@gmail.com

Corrección de estilo:

Dr. Mariano Santini
marianosantini@yahoo.com.ar

Imágen de tapa:

Miradas pampeanas
Gabriela A. Leofanti

Contenidos

ARTICLE 1
RESEARCH

7 - 13

—

CREUTZFELDT-JAKOB SYNDROME OF GENETIC ORIGIN: SERIES OF CASES IN THE ARGENTINIAN PATAGONIA



ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB DE ORIGEN GENÉTICO: SERIE DE CASOS EN LA PATAGONIA ARGENTINA

Exeni Díaz G., Costa M., Salman J., Ávila S.

ARTICLE 2
RESEARCH

15 - 22

—

ANALYSIS OF GENOTOXICITY IN ERITHROCYTES OF TURTLES (*Phrynops hilarii*) FROM ANTHROPIZED AND NATURAL SITES OF ENTRE RÍOS, ARGENTINA



ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD EN ERITROCITOS DE TORTUGAS (*Phrynops hilarii*) DE SITIOS ANTROPIZADOS Y NATURALES DE ENTRE RÍOS, ARGENTINA

Palma Rojas C., Jara Seguel P., García M., von Brand E., Araya Jaime C.

ARTICLE 3
RESEARCH

23 - 32

—

META-ANALYSIS FOR EVALUATING THE EFFICIENCY OF GENOMIC SELECTION IN CEREALS



META-ANÁLISIS PARA EVALUAR EFICIENCIA DE SELECCIÓN GENÓMICA EN CEREALES

Rueda Calderón M. A., Balzarini M., Bruno C.

ARTICLE 4
RESEARCH

33 - 43

—

IDENTIFICATION OF MOLECULAR ALTERATIONS IN VENEZUELAN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DIAGNOSIS



IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES EN PACIENTES VENEZOLANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Castro Y.C., Utrera R.

ARTICLE 5
RESEARCH

45 - 51

—

ALTERNATIVELY POLYADENYLATED CALPASTATIN TRANSCRIPTS IN BOVINE MUSCLES



TRANSCRIPTOS ALTERNATIVAMENTE POLIADENILADOS DE CALPASTATINA EN MÚSCULOS DE BOVINO

Casale M.F., Silvestro C., Corva P.M., Soria L.A.

ARTICLE 6
RESEARCH

53 - 63

—

GENETIC CHARACTERIZATION THE STOCKS OF *Prochilodus magdalenae* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) USED IN STOCKING PROGRAMS IN COLOMBIA



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE REPRODUCTORES DE *Prochilodus magdalenae* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) USADOS EN PROGRAMAS DE REPOBLAMIENTO EN COLOMBIA

de la Rosa J., Fontalvo P.P., Orozco-Berdugo G., Narváez-Barandica J.C.

CREUTZFELDT–JAKOB SYNDROME OF GENETIC ORIGIN: SERIES OF CASES IN THE ARGENTINIAN PATAGONIA



ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT–JAKOB DE ORIGEN GENÉTICO: SERIE DE CASOS EN LA PATAGONIA ARGENTINA

Exeni Díaz G. ¹, Costa M. ¹, Salman J. ², Ávila S. ^{1,3}

¹ Servicio de Genética, Hospital Provincial Neuquén, Argentina.

² Centro Médico Integral, Neuquén, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

Corresponding author:
Mailén Costa
mailencosta89@gmail.com

 ORCID 0000-0002-1690-8879

ABSTRACT

Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) is an uncommon neurodegenerative disorder with an incidence of 1 per 1,000,000 in humans per year, typically characterized by rapidly progressive dementia, ataxia, myoclonus and behavioral changes. Genetic prion diseases, which develop due to a mutation in the prion protein gene (PRNP), account for an estimated 10 to 15 % of all CJD cases. Familial CJD is transmitted with an autosomal dominant inheritance pattern with high penetrance. Worldwide, the most common mutation is E200K (glutamate to lysine). We report four families with CJD assisted in Neuquén Hospital in 2018. Three of the four index cases had family history of neurological and psychiatric illness, though data was not taken into consideration at the moment of evaluation of the new cases. The most significant data recorded for a genetic consultation was when the problem had started, and it was required by a neurologist. The initial symptoms were persistent insomnia and depression with poor response to habitual psychiatric medication. Impoverishment is fast with visual disorder, myoclonias, ataxia, dementia and loss of language. Pedigree analysis allowed the identification of 144 persons with the gene potential, who can develop the disease at any time in their adulthood. In all cases, mutation E200K was identified. There is a region of increased frequency of CJD. There must be suspicion on patients with neuropsychiatric symptoms and suspected family history (familiar background). Finding of the mutation confirms the diagnosis in patients and allows the identification on pre-symptomatic individuals. Challenge is posed on gene advice and to avoid iatrogenic disorder transmission.

Key words: Familial Creutzfeldt–Jakob Syndrome, PRNP gene, E200K, CJD in Patagonia

Cite this article as:

Exeni Díaz G., Costa M., Salman J., Ávila S. 2020. CREUTZFELDT–JAKOB SYNDROME OF GENETIC ORIGIN: SERIES OF CASES IN THE ARGENTINIAN PATAGONIA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 7-13.

RESUMEN

La enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (CJD) es un desorden neurodegenerativo poco frecuente con una incidencia estimada en 1 por cada 1.000.000 por año, típicamente caracterizado por demencia rápidamente progresiva, ataxia, mioclonos y cambios de comportamiento. Las enfermedades genéticas priónicas se desarrollan debido a mutaciones en el gen de proteína priónica PRNP. Entre el 10 y el 15 % corresponden a formas familiares que se transmiten con patrón autosómico dominante con alta penetrancia. La mutación más frecuente a nivel mundial es la E200K (glutamato por lisina). Se reportan cuatro familias con CJD que fueron atendidas en el Hospital Provincial Neuquén en el año 2018. Tres de los cuatro casos índice tenían historia familiar de trastornos neurológicos y psiquiátricos pero estos datos no fueron jerarquizados en la evaluación inicial del caso. Se consideró la consulta genética por la edad temprana de presentación de la enfermedad. En todos los casos la consulta fue solicitada por el neurólogo. Los síntomas iniciales que presentaron los pacientes fueron insomnio pertinaz y depresión con pobre respuesta a la medicación psiquiátrica habitual. En todos los casos la progresión de la enfermedad fue rápida con desórdenes visuales, mioclonías, ataxia, demencia y pérdida del lenguaje. El análisis de los pedigrées permitió identificar ciento cuarenta personas que potencialmente podrían portar el gen y desarrollar la enfermedad en algún momento de la vida adulta. En todos los casos se identificó la mutación E200K. En la región existe una frecuencia aumentada de CJD. Debe ser investigada en los pacientes con síntomas neuropsiquiátricos e historia familiar sospechosa. Los estudios genéticos confirman el diagnóstico en los pacientes y permite identificarlos en individuos en etapa presintomática. Esto plantea un desafío para el asesoramiento genético familiar y para evitar la transmisión iatrogénica del trastorno.

Palabras clave: Enfermedad de Creutzfeldt–Jakob familiar, gen PRNP, E200K, CJD en Patagonia

Received: 11/10/2018

Revised version received:
07/01/2019 - 03/11/2020

Accepted: 04/05/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.01

ISSN online version: 1852-6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) es un trastorno neurodegenerativo causado por priones en humanos. Se presenta como encefalopatía espongiforme de distribución mundial con una prevalencia de 1 en 1.000.000 de habitantes (Prusiner y Hsiao, 1994; Prusiner, 2001). Las formas familiares (fCJD), que se transmiten con patrón de herencia autosómico dominante con alta penetrancia, dan cuenta de entre el 10 y el 15% de las enfermedades priónicas (Mastrianni, 2003). En las formas hereditarias la proteína priónica, codificada por el gen mutado, es capaz de modificar el plegamiento de otras proteínas normales; esta propiedad hace que esta enfermedad pueda ser transmitida a personas no emparentadas a través de fluidos corporales.

Los priones pueden colonizar diferentes tejidos, pero el único sistema en el cual se ha podido demostrar daño histopatológico, tanto en animales como en humanos, es el sistema nervioso central.

Clínicamente CJD se caracteriza por el desarrollo de una demencia rápidamente progresiva asociada con ataxia mioclónica.

El único gen vinculado con la forma genética es PRNP. Se han descrito más de 40 mutaciones germinales en el gen PRNP pero la más frecuente es c.598G>A-p.Glu200Lys (E200K).

Se describen clusters con alta prevalencia de fCJD en Eslovaquia, Libia, Túnez, Chipre, Alemania, Sicilia, Austria, Japón y Chile (Takada, 2017; Meiner *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Mitrova y Belay, 2002).

Lee *et al.* (1999) estudió el origen de la mutación E200K a partir de los estudios de ancestralidad de 62 familias de 11 poblaciones diferentes. Concluyó que los clusters de Libia, Túnez, Italia, Chile y España comparten un haplotipo mayor; esto sugiere que la mutación podría haberse originado de un mismo evento mutacional, probablemente en la Península Ibérica, y a partir de allí, podría haberse expandido hacia el Mediterráneo y los países de América del Sur.

La sospecha de fCJD se basa en una combinación de síntomas neuropsiquiátricos, historia familiar positiva y mutación en el gen PRNP. Los estudios de neuroimágenes, EEG y examen de LCR pueden ser orientativos y permiten plantear diagnósticos diferenciales con otros trastornos neurodegenerativos (CDC, 2015).

En el reporte del *Centro de Referencia en Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob* de Argentina se informó un aumento de la frecuencia esperada de pacientes con fCJD en la región patagónica en coincidencia con lo detectado en Chile (Begue, 2011). Las acciones del *Centro de Referencia* no incluyeron el asesoramiento genético para los familiares de los casos índices identificados ni la participación de los servicios de genética.

El objetivo de este trabajo es reportar cuatro familias estudiadas durante el año 2018 en el Hospital Provincial Neuquén.

REPORTE DE SERIE DE CASOS

Las cuatro familias fueron estudiadas por el Servicio de Genética del Hospital Provincial Neuquén durante el año 2018.

En la Tabla 1 se resumen los principales hallazgos clínicos, electroencefalográficos y de neuroimágenes presentes en los casos índice.

Familia 1

El caso índice es una mujer de 42 años, oriunda de Neuquén, la mayor de una hermandad de dos. Su padre y madre están sanos, los abuelos maternos fallecieron en la octava década de vida con trastornos cognitivos (Figura 1). En la rama materna los abuelos proceden de Chile y en la rama paterna de Italia. El cuadro se inicia con trastornos del sueño y ansiedad que motivan su consulta con especialista en salud mental y medicación con inhibidores de la recaptación de serotonina sin respuesta terapéutica. Presenta cefalea de intensidad progresivamente en aumento y diplopía. Aproximadamente a los treinta días se agregan mioclonías, ataxia y alteraciones del lenguaje. Se produce marcada pérdida de peso. A los sesenta días del inicio del cuadro la paciente se encuentra en mutismo aquinético. Se realizaron dos estudios de RNM sin alteraciones y EEG con trazado desorganizado y ondas trifásicas. A los noventa días del inicio de los síntomas y luego de descartar otras causas de encefalopatía se solicita la evaluación de Genética.

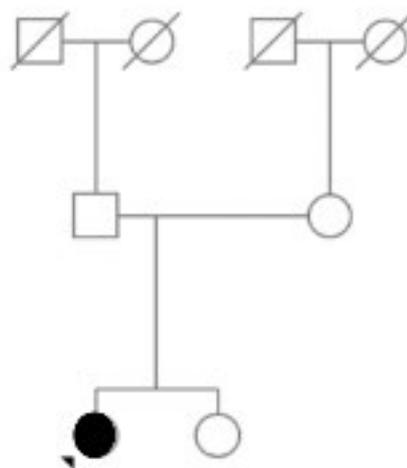


Figura 1. Familia 1

Familia 2

El caso índice es una mujer de 46 años oriunda de Zapala, con antecedente de madre fallecida en la sexta década de vida con probable CJD. La paciente tiene tres hijos mayores de edad y seis tíos por vía materna, uno de ellos fallecido con un cuadro de demencia rápidamente progresiva. Los síntomas iniciales fueron insomnio y ansiedad que se atribuyeron al estrés de su trabajo. Realiza consulta con psicología, luego con psiquiatra y ante la falta de respuesta a la medicación se solicita la evaluación con Neurología. En algunos días se suman trastornos visuales, mioclonías, ataxia y deterioro cognitivo. En los dos meses siguientes pierde la marcha y el lenguaje hasta configurar un cuadro de mutismo aquinético. En ese momento se solicita la evaluación por Genética. El análisis de la genealogía muestra al menos 30 familiares, muchos de ellos en edad fértil, que podrían haber heredado la mutación (Figura 2).

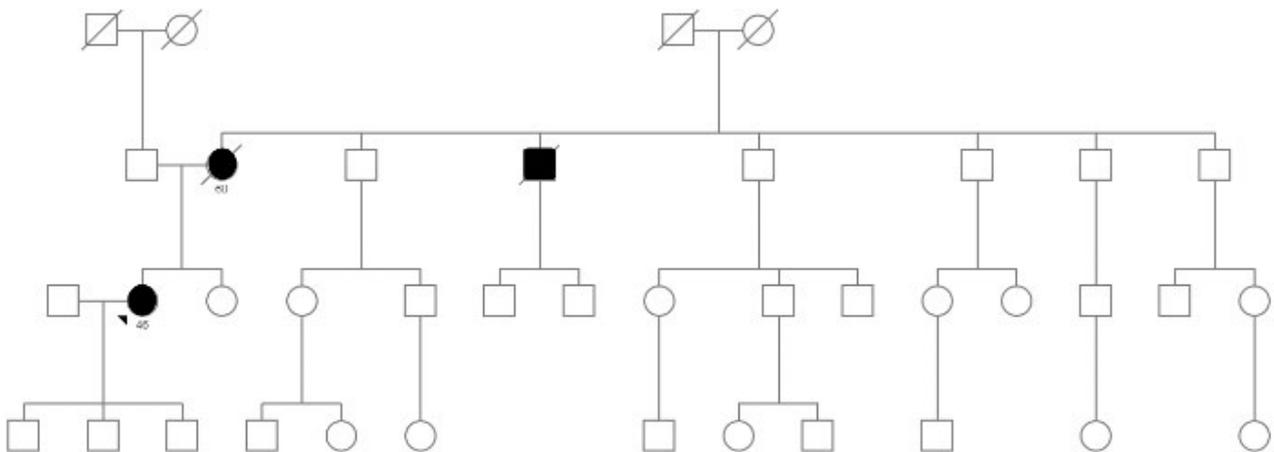


Figura 2. Familia 2

Familia 3

El caso índice es una mujer de 54 años oriunda de Cutral C6 que consulta para asesoramiento genético por haber en su familia varios casos de afectados por CJD, incluyendo su propia madre. La paciente manifiesta querer conocer su riesgo de afección para poder planificar su vida. Su madre falleció de CJD a los sesenta y cuatro años al igual que una tía y tres tíos segundos. Por su propia iniciativa ha conseguido, ocho años después de realizados en el *Centro de Referencia en Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob*, los informes de los estudios de uno de sus tíos fallecidos con la enfermedad; la investigación de la mutación E200K está informada como positiva. Refiere que los síntomas iniciales en su

madre fueron insomnio y trastornos cognitivos con crisis de excitación por lo cual se indica internación en centro de psiquiatría donde permanece por treinta días. Ante su empeoramiento se deriva a un centro de atención clínica donde es evaluada por Neurología y se realiza el diagnóstico de CJD probable. Ya en mutismo aquinético se define tratamiento domiciliario y logra una sobrevivencia de un año. La genealogía de esta familia es extensa y revela al menos 84 personas que podrían ser portadoras de la mutación (Figura 3). Los bisabuelos maternos de la consultante eran de origen chileno y se radicaron en Neuquén en el siglo XIX.

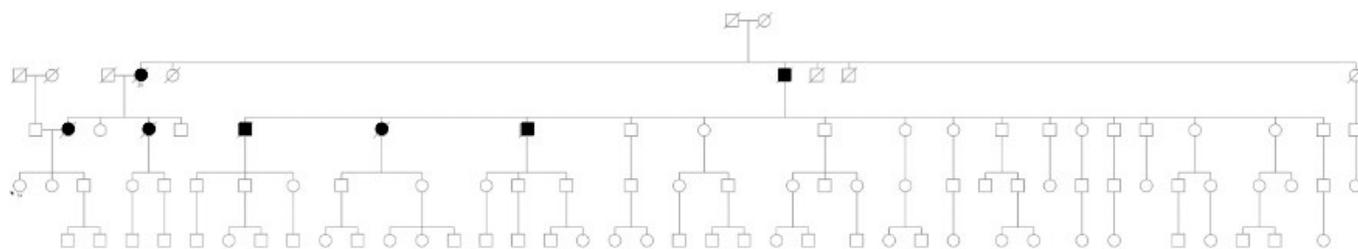


Figura 3. Familia 3

Familia 4

El caso índice es un hombre de 52 años, oriundo de Neuquén, el mayor de cinco hermanos, todos ellos con hijos y nietos. Su padre, de nacionalidad chilena, falleció en la séptima década de vida con un cuadro de demencia que evolucionó con óbito a los tres meses del inicio (Figura 4). Desconocen otros antecedentes familiares. Los síntomas del caso índice se inician con insomnio y depresión. En pocos días se agregan mioclonías y trastornos cognitivos. Evoluciona rápidamente con el óbito a los tres meses del inicio de los síntomas. La RNM muestra patrón característico de CJD y el EEG el patrón de ondas trifásicas. La consulta con Genética fue realizada al mismo tiempo que se solicitaba la evaluación neurológica.

En las cuatro familias se pudo corroborar la segregación de la mutación E200K.

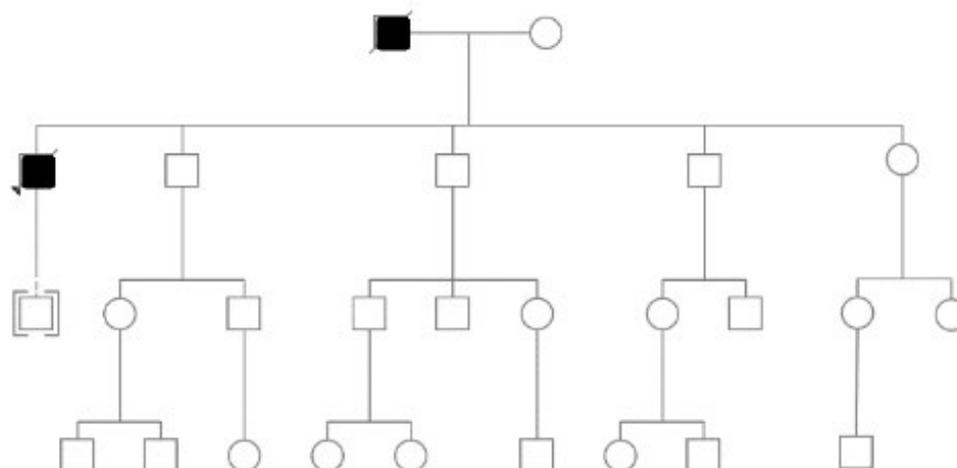


Figura 4. Familia 4

Tabla 1. Síntomas y resultados de estudios complementarios al momento de la confirmación diagnóstica.

Caso Índice	Edad al inicio	Antecedentes familiares	Diagnóstico Inicial	Trastornos visuales	Trastorno del sueño	Mioclónías	Ataxia/ disartría	Otros síntomas	Pérdida de peso	EEG	RNM	Tiempo para diagnóstico
Familia 1	42	No	Síndrome depresivo	Diplopía	Inicio y mantenimiento	Multifocales	sí	Dolor cervical	sí	Desorganizado con ondas trifásicas	Profundización de surcos bifrontales	8 meses
Familia 2	46	Sí	Síndrome depresivo. Estrés	Alucinaciones	Mantenimiento	Multifocales	sí	NR	sí	Desorganizado, lento, difuso con ondas trifásicas	Incremento sutil de la señal de la corteza frontal superior y media izquierda y en región parietooccipital izquierda	1 mes
Familia 3	54	Sí	Deterioro cognitivo, síndrome depresivo	NR*	Inicio	Multifocales	sí	NR	sí	Ondas trifásicas	Profundización de surcos bifrontales	6 meses
Familia 4	52	Sí	Síndrome Depresivo	Alucinaciones	Inicio y mantenimiento	Multifocales	sí	Dolor en miembros inferiores	sí	Desorganizado, ondas trifásicas	Sin alteraciones	1 mes

*NR no reportado.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob tiene una ocurrencia mundial estimada en un caso por millón de habitantes. Existen clusters descriptos con alta prevalencia debido a la segregación de la mutación E200K por un efecto fundador ya planteado por Lee et al (1999) a partir de estudios de ancestralidad. Begue (2011) reporta que el número de casos familiares de la Patagonia es alto y está en relación con el cluster que se reconoce en Chile. Sin embargo esta observación no contempló la intervención de médicos genetistas en el diseño de protocolos de estudio y tratamiento, ni acciones de difusión sobre los equipos de salud para concientizar acerca de la naturaleza de esta patología, de modo de acortar los tiempos diagnósticos, asesorar a las familias de riesgo y evitar la transmisión iatrogénica.

En las cuatro familias que describimos en este reporte hay por lo menos un familiar que se refiere como oriundo de Chile a finales del siglo XIX y comienzos del XX. El intercambio poblacional entre ambos países es frecuente en las provincias limítrofes de modo bidireccional: las fronteras establecidas por los Estados no son las que se establecen en las relaciones interpersonales. La mutación encontrada en las cuatro familias corresponde a la E200K que es la que se ha descripto con mayor frecuencia en Chile.

Los datos reportados en la bibliografía son controversiales en lo que respecta a la penetrancia (Minikel, 2016) pero en tres de las cuatro familias que presentamos se observó un adelantamiento de al menos veinte años en la presentación inicial de los síntomas en los casos índice con respecto a sus progenitores.

La evolución clínica de los individuos de nuestras familias es muy rápida a partir de los primeros síntomas que son fundamentalmente psiquiátricos con insomnio pertinaz, depresión y trastornos visuales, sin respuesta a la medicación habitual. Posteriormente se agrega deterioro cognitivo y ataxia mioclónica.

CONCLUSIÓN

A pesar de haberse reportado el aumento de la frecuencia de CJD en la región patagónica a expensas de casos familiares, esta información no es conocida ampliamente por los profesionales del equipo de salud. Si bien es cierto se había reportado la existencia de casos familiares en la Patagonia pero hasta la descripción de estos casos no se habían implementado estrategias para lograr una sospecha rápida, accesibilidad diagnóstica y abordaje óptimo de los familiares en riesgo de portar y transmitir la mutación. Esto se evidencia porque, a pesar de ser referidos los antecedentes familiares, la posibilidad de enfermedad genética fue considerada sólo cuando se excluyeron otras causantes de encefalopatía

rápidamente progresiva. Siguiendo las pautas de la OMS y del CDC ante la presencia de antecedentes familiares de CJD y síntomas neuropsiquiátricos, se deben tener en cuenta los estudios genéticos en el plan de estudios.

El diagnóstico de fCJD tiene implicancias individuales, familiares y epidemiológicas.

Las implicancias individuales son similares a las descriptas en otras enfermedades neurodegenerativas de inicio en el adulto. Los pacientes que fueron testigos del avance de la enfermedad en sus familiares suelen reconocer en sí mismos los primeros síntomas aún antes que los mismos se hagan evidentes para el entorno.

Desde el punto de vista familiar, cuando se recibe el diagnóstico de CJD, aparece conmoción, confusión y angustia. Los familiares deben aceptar rápidamente la noticia de que su ser querido, saludable hace unas semanas, padece una enfermedad terminal que no tiene tratamiento. La naturaleza genética del trastorno agrega la culpa y la angustia de quienes empiezan a entender que tienen a priori una probabilidad del 50% de portar el gen y una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad en algún momento de la vida. Es esencial la presencia del médico genetista para el asesoramiento genético pre y post test dado el impacto que puede tener tanto un resultado positivo como negativo (Roberts y Uhlmann, 2013).

Desde el punto de vista epidemiológico, la identificación de la propia población como un cluster de CJD plantea un desafío a las autoridades y a los equipos de salud.

A partir de los datos del presente reporte en el sistema de salud de la Provincia de Neuquén se pone en marcha de modo gratuito, el diagnóstico molecular de la mutación E200K en los pacientes con sospecha clínica de fCJD. Se define reforzar las estrategias para sensibilizar a los equipos de salud para la detección de casos sospechosos ante la existencia de antecedente familiar positivo y cuadro clínico compatible, a los fines de realizar los test genéticos dentro de los estudios iniciales. Este aspecto es importante para evitar la demora diagnóstica y la realización de estudios complementarios innecesarios. La realización de las pruebas moleculares en el ámbito de la salud pública garantiza no sólo la accesibilidad a las mismas sino también la posibilidad de perfeccionar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

Se define también trabajar en una red de atención interdisciplinaria para las personas en riesgo de portación del gen; esta red incluirá el acceso al asesoramiento genético pre- y post-test y el acompañamiento psicosocial.

BIBLIOGRAFÍA

- Begue C. (2011) Creutzfeldt-Jakob disease surveillance in Argentina 1997-2008. *Neuroepidemiology* 37 (3-4): 193-202.
- CDC (2015) Creutzfeldt-Jakob disease. <https://www.cdc.gov/prions/cjd/index.html>.
- Kóvac G. (2002) Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J. Neurol.* 249: 1567-1582.
- Lee H.S., Sambuughin N., Cervenakova L., Chapman J., Pocchiari M., Litvak S., Qi H.Y., Budka H., del Ser T., Furukawa H., Brown P., Gajdusek D.C., Long J.C., Korczyn A.D., Goldfarb L.G. (1999) Ancestral origins and worldwide distribution of the P¹⁹⁹L mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (4): 1063-1070.
- Mastrianni J.A. (2003) Genetic Prion Diseases. Gene Reviews[Internet], Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1229/> (accessed October 2018).
- Meiner A, Gabizon R, Prusiner S. (1997) Familial Creutzfeldt-Jakob disease. Codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine (Baltimore)* 76 (4): 227-237.
- Minikel E.V. (2016) Quantifying prion disease penetrance using large populations controls cohorts. *Sci. Transl. Med.* 8 (322): 322-ra329.
- Mitrova E., Belay G. (2002) mutation Creutzfeldt-Jakob disease with E200K in Slovaki: Characterization and development. *Acta Virol.* 46 (1): 31-39.
- Prusiner S. (2001) Neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med.* 344: 1516.
- Prusiner S., Hsiao K. (1994) Human prion diseases. *Ann. Neurol.* 35: 385-395.
- Roberts S., Uhlmann W. (2013) Genetic susceptibility testing for neurodegenerative diseases: Ethical and practice issues neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.* 110: 89-101.
- Rosenmann H, Kahana E., Korczyn A.D., Kahana I., Chapman J., Gabizon R. (1999) Preliminary evidence for anticipation in genetic E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 54 (6): 1328-1329.
- Takada L. (2017) Genetic prion disease: Experience of a rapidly progressive dementia center in the United State and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. Part B* 174B: 36-69.



ANALYSIS OF GENOTOXICITY IN ERITHROCYTES OF TURTLES (*Phrynops hilarii*) FROM ANTHROPIZED AND NATURAL SITES OF ENTRE RÍOS, ARGENTINA



ANÁLISIS DE GENOTOXICIDAD EN ERITROCITOS DE TORTUGAS (*Phrynops hilarii*) DE SITIOS ANTROPIZADOS Y NATURALES DE ENTRE RÍOS, ARGENTINA

Castaño G. V.¹, Cabagna Zenklusen M.², Prieto Y.¹, Manzano A. S.¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP-CONICET- UADER), Mater y España, Diamante, Entre Ríos, Argentina.

² Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Paraje el Pozo s/n, Santa Fe, Argentina.

Corresponding author:
Adriana Silvina Manzano
cidmanzano@infoaire.com.ar

ORCID 0000-0002-6862-857X

Cite this article as:

Castaño G. V., Cabagna Zenklusen M., Prieto Y., Manzano A. S. 2020. ANALYSIS OF GENOTOXICITY IN ERITHROCYTES OF TURTLES (*Phrynops hilarii*) FROM ANTHROPIZED AND NATURAL SITES OF ENTRE RÍOS, ARGENTINA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 15-22.

Received: 10/22/2019

Revised version received: 03/03/2020

Accepted: 03/15/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.02

ISSN online version: 1852-6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

ABSTRACT

The micronucleus test (MN) is a biomarker of non-destructive genotoxicity that allows chromosomal damage and other nuclear alterations (NA) to be detected. *Phrynops hilarii* is a freshwater chelonium that inhabits regions of central-northern Argentina. The main objective was to determine the presence of MN and other NA in erythrocytes of natural populations of *P. hilarii* comparing their frequencies between three sites, two anthropized and one of control (cities of Diamante and Paraná) of Entre Ríos, Argentina, during the period 2015-2016. Eighteen individuals (six per sampling site) were evaluated at the sites: 1- PD: Pre-Delta National Park (control), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosystem) and 3- SU: Caleta Club Náutico (urban system). Blood was obtained from the femoral vein. The samples were stained with the May Grünwald-Giemsa method and observed under a microscope with an immersion objective. Micronucleus (MNF) and nuclear alterations (NAF) frequencies were determined every 1000 erythrocytes observed. A significant difference ($p < 0.05$) was found between the PD site and the other sites (AG and SU), both for MNF ($p = 0.0021$) and for NAF ($p = 0.0011$). The highest frequency values corresponded to the AG site (MNF: 3.33 ± 0.62 ; NAF: 4.67 ± 0.56). Finally, biomonitoring with *P. hilarii* was useful, so it could be considered as a bioindicator species to assess the quality of Argentina's environments.

Key words: Genotoxicity biomarkers, micronucleus test, nuclear alterations

RESUMEN

El test de micronúcleos (MN) es un biomarcador de genotoxicidad no destructivo que permite detectar daño cromosómico y otras alteraciones nucleares (AN). *Phrynops hilarii* es un quelonio de agua dulce que habita regiones del centro-norte de Argentina. El objetivo principal fue determinar la presencia de MN y otras AN en eritrocitos de poblaciones naturales de *P. hilarii* comparando sus frecuencias entre tres sitios, dos antropizados y uno de control (ciudades de Diamante y Paraná) de Entre Ríos, Argentina, durante el periodo 2015-2016. Dieciocho individuos (seis por sitio de muestreo) fueron evaluados en los sitios: 1- PD: Parque Nacional Pre-Delta (control), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosistema) y 3- SU: Caleta Club Náutico (sistema urbano). Se extrajo sangre de la vena femoral. Las muestras se tiñeron con el método May Grünwald-Giemsa y se observaron bajo un microscopio con el objetivo de inmersión. Las frecuencias de micronúcleos (FMN) y alteraciones nucleares (FAN) se determinaron cada 1000 eritrocitos observados. Se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el sitio PD y los otros sitios (AG y SU), tanto para FMN ($p = 0,0021$) como para FAN ($p = 0,0011$). Los valores de las frecuencias más altos correspondieron al sitio AG (FMN: $3,33 \pm 0,62$; FAN: $4,67 \pm 0,56$). Finalmente, el biomonitoreo con *P. hilarii* fue útil, por lo que podría considerarse como especie bioindicadora para evaluar la calidad de los ambientes de Argentina.

Palabras clave: biomarcadores de genotoxicidad, prueba de micronúcleos, alteraciones nucleares

INTRODUCCIÓN

El test de micronúcleos (MN) es un biomarcador de genotoxicidad no destructivo que puede aplicarse en distintos tipos de células (epiteliales, sanguíneas, sexuales, entre otras) y organismos (animales, vegetales y humanos), para detectar daño cromosómico (Pastor Benito, 2002; Poletta, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2012; Caraffa *et al.*, 2013). Este test, es un método sensible y rápido que puede realizarse tanto en ensayos de laboratorio como a campo, sin necesidad de sacrificar al individuo en evaluación para la obtención de la muestra (Lajmanovich *et al.*, 2012; Zapata Restrepo *et al.*, 2017). Esto es de gran importancia, ya que puede emplearse en sucesivos muestreos y en especies con escaso número de individuos o en peligro de extinción (Lajmanovich *et al.*, 2012).

Los MN son masas de cromatina con forma de pequeños núcleos cercanos al núcleo principal en las células de la interfase, pudiendo originarse de manera espontánea o como respuesta a la acción de ciertos agentes (Pastor Benito, 2002) como pueden ser los hidrocarburos (Barsiené y Andreikénaité, 2007), metales (Paolín *et al.*, 2010), plaguicidas (Pastor Benito, 2002; Lajmanovich *et al.*, 2014), fármacos (Arranz Gutiérrez, 2016), entre otros. Cuando esto ocurre, el material genético queda excluido de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica, dando lugar a formaciones redondas en el citoplasma de la célula hija. El material genético desprendido puede tener dos orígenes: 1- derivar de cromosomas enteros (efecto aneugénico), donde el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro, al centrómero o al huso mitótico, generando un retraso mitótico y un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, 2- pueden formarse de fragmentos cromosómicos acéntricos que han sido excluidos de los núcleos de las nuevas células (efecto clastogénico) durante la anafase mitótica (Cabagna Zenklusen, 2012).

Numerosos trabajos en fauna han aplicado el test de MN en eritrocitos, para evaluar a través de su frecuencia (FMN) los efectos provocados por distintos agentes en el material genético y en la división celular (Pollo *et al.*, 2012; Caraffa *et al.*, 2013; Latorre *et al.*, 2015). Para determinar el potencial de una especie como organismo bioindicador o centinela se utiliza como valor referencia la frecuencia basal de micronúcleos (FBMN). Este valor refiere al número de MN provocados de manera espontánea como resultado de procesos normales de replicación y/o división celular (Cabagna Zenklusen, 2012; Latorre *et al.*, 2015).

Otras alteraciones nucleares (AN) pueden analizarse al aplicar el test de MN y son utilizadas como un complemento, ya que en varios estudios fueron señaladas como respuesta a la acción de determinados agentes tóxicos (Ayllon y García Vázquez, 2000; Cabagna Zenklusen, 2012; Hayretdağ *et al.*, 2014;

Hernández Guzmán *et al.*, 2015). Se consideran como AN las siguientes características descritas por Carrasco *et al.* (1990): 1- núcleo escotado (KN): invaginación relativamente pequeña en la membrana nuclear y cromatina no condensada; 2- núcleo mellado (EN): presencia de una muesca en el núcleo; 3- lóbulo o brote nuclear (LN): morfología semejante a un MN conectado o unido al núcleo; 4- célula binucleada (BN): célula con presencia de dos núcleos de tamaños semejantes o similares. El mecanismo por el cual se producen las AN no es conocido con claridad. López González *et al.* (2017) mencionaron que cuando la célula detecta una región de ácido desoxirribonucleico (ADN) afectada, se inicia un proceso de reparación y eliminación de la cromatina. La región alterada se mueve a la periferia del núcleo y se elimina por exocitosis. Antes de que el proceso de reparación y eliminación de la cromatina culmine, la membrana nuclear presenta algunas imperfecciones, ocasionando AN.

Los agentes genotóxicos son sustancias que pueden actuar de forma directa o indirecta sobre el material genético (ADN) y provocar efectos a concentraciones subletales (Gutiérrez, 2013). Estos agentes pueden ser liberados al ambiente por distintas actividades humanas, ya sean productivas como la minería, la agricultura y distintos procesos industriales o por actividades urbanas como el vertido de efluentes cloacales, emisiones vehiculares, aguas residuales hospitalarias y de estaciones de combustible, entre otras (Paz *et al.*, 2008; Zuluaga Quintero *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2013; González Torres *et al.*, 2015). Para evaluar el riesgo potencial de poblaciones naturales expuestas a agentes genotóxicos, son utilizadas especies indicadoras o centinelas y distintos biomarcadores, ya que suministran señales de alarma temprana ante la presencia de tóxicos (Cabagna Zenklusen, 2012; Caraffa *et al.*, 2013).

Los reptiles son organismos muy sensibles a cambios en las condiciones del ambiente, por lo que en muchos casos fueron utilizados como indicadores o centinelas de contaminación, debido a que presentan características como: poblaciones persistentes en diferentes hábitats (acuáticos y terrestres), longevidad, posición alta en la cadena alimentaria, alta sensibilidad a contaminantes, amplia distribución geográfica y fidelidad al sitio (Gardner y Oberdorster, 2005; Poletta *et al.*, 2008; Poletta *et al.*, 2013). Dentro de estos, las tortugas han sido propuestas como organismos bioindicadores y/o centinelas para evaluar su exposición a sustancias tóxicas (Andreani *et al.*, 2007; De Solla *et al.*, 2007; De Solla *et al.*, 2008; Latorre *et al.*, 2015).

Phrynops hilarii es un quelonio de agua dulce perteneciente al orden Testudines, suborden Pleurodira y familia Chelidae. La distribución geográfica de la especie abarca algunas regiones de Sudamérica (Latorre *et al.*, 2015).

Particularmente en Argentina se la puede encontrar en áreas de la región centro-norte del país entre las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Córdoba, Misiones, Chaco, Formosa, Santiago del Estero y Mendoza (Derocco *et al.*, 2005). Las áreas que habita pueden presentar distintas condiciones topográficas, fisicoquímicas, entre otras, como lagunas, esteros, arroyos lentos, ríos, cursos fluviales con lecho de fango o arena y bañados asociados a juncos y vegetación flotante; además, se la puede encontrar en áreas antropizadas como arrozales, cuneta al borde de campos cultivados y tajamares, en los cuales se encuentra especialmente expuesta a sustancias tóxicas (Ceí, 1993; Cabrera, 1998; Richard y Waller, 2000; Carreira *et al.*, 2005; Tortato, 2007).

Los estudios de genotoxicidad basados en la aplicación del test de MN y la evaluación de otras AN en reptiles de Argentina, son recientes (Poletta *et al.*, 2008; Poletta *et al.*, 2009; Poletta, 2011; Shaumburg *et al.*, 2012; López González *et al.*, 2013; Shaumburg *et al.*, 2014; Shaumburg *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017). En lo que respecta a tortugas de nuestro país, los datos hallados son escasos y acotados a la descripción de la FBMN y a la FMN en *P. hilarii* y *Trachemys dorbigni* en condiciones de cautiverio, sin indagar en la descripción de otras AN (Boned *et al.*, 2011; López González *et al.*, 2012; Latorre *et al.*, 2015). El objetivo principal de este trabajo fue determinar la presencia de MN y otras AN en los eritrocitos de poblaciones naturales de *Phrynops hilarii* comparando sus frecuencias entre sitios antropizados y control (en las ciudades de Diamante y Paraná) de Entre Ríos, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y sitios de muestreo

El estudio se realizó en un área comprendida entre los departamentos Diamante y Paraná de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Los sitios seleccionados fueron dos zonas antropizadas y una de control: 1- PD: Parque Nacional Pre-Delta (control, 32° 03' 43" S y 60° 38' 39" O), 2- AG: Salto Ander Egg (agroecosistema, 32° 07' 42.64" S y 60° 25.40' 13" O) y 3- SU: Caleta Club Náutico (sistema urbano, 31°42' 55" S y 60° 30' 17" O), durante los meses cálidos (Octubre-Marzo) de los años 2015 y 2016 (Figura 1). Los sitios pertenecen a la ecorregión Delta e Islas del Paraná y Espinal (Burkart *et al.*, 1999), con temperaturas medias anuales inferiores a los 20°C y las precipitaciones medias anuales abarcan un periodo de mayor frecuencia entre los meses de octubre-abril (73% del total anual), sin embargo, en los meses de verano pueden presentarse lapsos de déficit hídrico (Rojas y Saluso, 1987). El uso intensivo de la tierra en estas regiones, le da al paisaje un perfil muy antrópico, debido a que se encuentra principalmente ocupado por

superficies agrícolas, pasturas implantadas y en menor medida, por pasturas y bosques naturales, así como también, por áreas industriales y urbanas, con sitios de parches dispersos de bosques nativos (Aceñolaza y Rodríguez, 2013).

Captura de individuos y extracción de sangre

Se capturaron 18 individuos (seis por sitio de muestreo) con trampas tipo embudo (Aguirre León, 2011) a las que se les agregó cebos atrayentes (trozos de peces). De cada individuo se registró el largo curvilíneo del caparazón (LC, mm) con un centímetro de 1mm de precisión. El peso corporal (MC, kg) de los individuos se registró con balanza manual electrónica con 0,01 kg de precisión. Los animales fueron marcados en el borde de su caparazón mediante la realización de una pequeña muesca con sierra manual para el control de recapturas.

La extracción de sangre se realizó de la vena femoral con jeringas estériles de 1ml previamente heparinizadas (anticoagulante) y aguja TERUMO® 25G 0.5mm, sin anestésicos para evitar la alteración de los componentes de la sangre (Duguay, 1982; Troiano y Silva, 1998; Attademo *et al.*, 2012). Todos los animales luego de la extracción fueron reincorporados a su lugar. Las muestras fueron llevadas refrigeradas al Laboratorio de Muestras Biológicas del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP-CONICET) de la ciudad de Diamante, Entre Ríos, para su posterior procesamiento. Para las actividades y manipulación de los animales se siguieron los Principios Éticos para la Investigación en el Laboratorio, Granja y Animales Silvestres (REFBR-CONICET, 2005), y se contaron con los permisos correspondientes de la Dirección Recursos Naturales de la provincia de Entre Ríos (Resolución N°1721) y de la Administración de Parque Nacionales (N° CRCE 6).

Test de micronúcleos

Para la evaluación de MN y otras AN a través del test de MN, se prepararon extendidos sanguíneos de cada uno de los individuos en portaobjetos limpios y secados al aire. Posteriormente se tiñeron con solución May Grünwald-Giemsa y se observaron en un microscopio Carl Zeiss Axiostar con objetivo de inmersión.

Para el conteo de MN se seleccionaron los eritrocitos intactos y se reconocieron siguiendo los criterios descritos por Fenech (2000), donde señala que el diámetro del MN no debe superar el 1/6 o 1/3 del tamaño del núcleo principal y debe estar separado de este y presentar una morfología, coloración e intensidad similar a la del núcleo principal.

Para determinar la FMN de las muestras por sitio, se realizó el conteo de la cantidad de células que presentaron MN en 1000 eritrocitos observados por frotis de cada individuo (López González *et al.*, 2017).

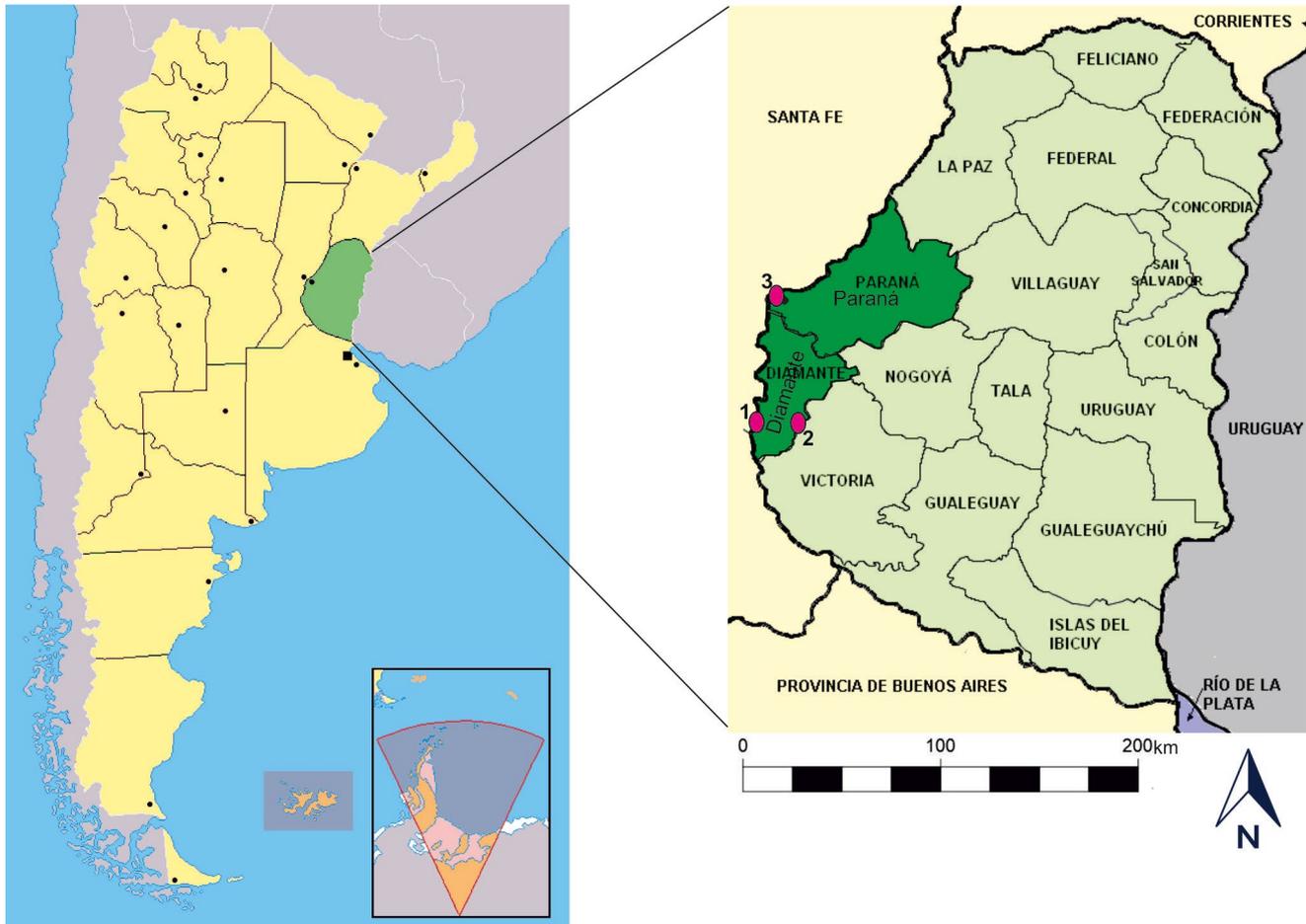


Figura 1. Área de estudio y sitios de muestreo. 1-Parque Nacional Pre Delta (sitio control). 2-Salto Ander Egg (sitio agroecosistema). 3-Caleta Club Náutico (sitio urbano).

La FAN total se obtuvo sumando todas las AN que se observaron en las muestras de los seis individuos de cada área y se expresaron cada 1000 eritrocitos contados por individuo por sitio (Cabagna Zenklusen *et al.*, 2011).

Análisis estadístico

Los datos descriptivos de los individuos a los que se extrajeron las muestras son: media \pm error estándar (EE) y tamaño de la muestra (n). Los datos fueron testeados en cuanto a su normalidad (Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (test de Levene). Para las comparaciones de medias se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico INFOSTAT versión 2012 profesional (Di Rienzo *et al.*, 2012).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se consignan los valores de los parámetros biológicos determinados en los individuos analizados de cada sitio. En los extendidos sanguíneos analizados

se distinguieron tres tipos de AN: eritrocito con brote nuclear (LN), eritrocito con núcleo mellado (EN) y eritrocito con micronúcleo (MN) (Figura 2).

En la Tabla 2 se exponen los valores de la FMN, FAN, LN y EN de los sitios muestreados. En el sitio control (PD), los datos corresponden a los resultados basales de las frecuencias en este sitio.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el sitio PD y los otros sitios (AG y SU), tanto para la FMN ($p = 0,0021$) como para la FAN ($p = 0,0011$), mientras que para los demás parámetros celulares (LN y EN) no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los sitios. Entre las áreas antropizadas, los mayores registros de las frecuencias correspondieron al sitio AG. Además, no se encontró correlación entre los parámetros biológicos (MC y LC de *P. hilarii*) y las frecuencias de MN y de AN de los sitios AG (MC-FMN: $r^2 = 0,62$ y LC-FMN: $r^2 = 0,31$; MC-FAN: $r^2 = 0,24$ y LC-FAN: $r^2 = 0,24$), SU (MC-FMN: $r^2 = -0,72$ y LC-FMN: $r^2 = -0,60$; FAN-MC: $r^2 = -0,03$ y FAN-LC: $r^2 = 0,09$) y PD (FMN-MC: $r^2 = 0,13$ y FMN-LC: $r^2 = -0,39$; FAN-MC: $r^2 = 0,29$ y FAN-LC: $r^2 = 0,10$).

Tabla 1. Parámetros biológicos de *P. hilarii*, peso corporal (MC) y longitud caparazón (LC). Sitios: control (PD), agroecosistema (AG) y sistema urbano (SU). *n*: tamaño de la muestra. Los valores se expresaron como media ± EE.

SITIOS	<i>n</i>	MC (Kg)	LC (mm)
PD	6	2,36 ± 0,38	316,33 ± 9,01
AG	6	1,62 ± 0,64	216,17 ± 34,31
SU	6	1,99 ± 0,49	281,50 ± 26,68

Tabla 2. Parámetros celulares evaluados en *P. hilarii*. FMN: frecuencia de micronúcleos; FAN: frecuencia de alteraciones nucleares; LN: lóbulo nuclear; EN: núcleo mellado; en 1000 eritrocitos contados por muestra. Sitios: control (PD), agroecosistema (AG) y sistema urbano (SU). *n*: tamaño de la muestra. Todos los valores se expresaron como media ± EE. Superíndices a y b en las columnas señalan diferencias significativas entre los sitios ($p < 0,05$). (*) Sin diferencias significativas.

SITIOS	<i>n</i>	FMN	FAN	LN*	EN*
PD	6	0,17 ± 0,17 ^a	0,50 ± 0,22 ^a	0,33 ± 0,21	0
AG	6	3,33 ± 0,62 ^b	4,67 ± 0,56 ^b	1,17 ± 0,40	0,17 ± 0,17
SU	6	2,00 ± 0,36 ^b	2,67 ± 0,42 ^b	0,50 ± 0,22	0,17 ± 0,17

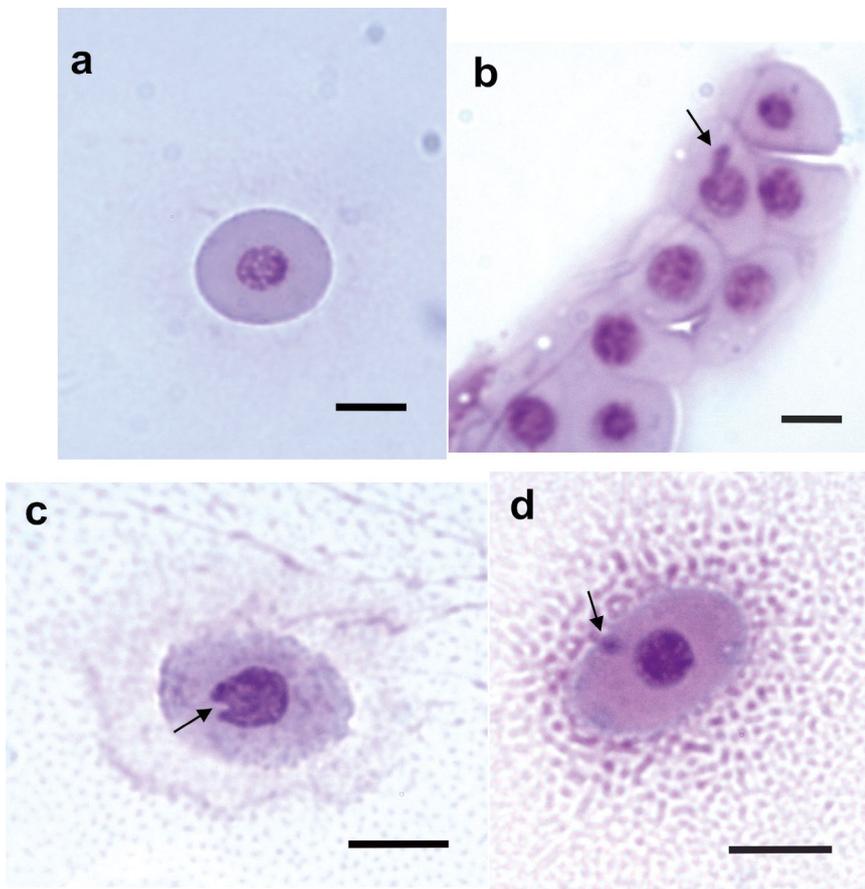


Figura 2. Eritrocitos de *Phrynosoma hilarii*: a) normal; b) eritrocito con brote; c) eritrocito con núcleo mellado; d) eritrocito con micronúcleo. Escala: 5µm.

DISCUSIÓN

Actualmente existe un gran interés en estudios ecotoxicológicos con reptiles, debido a que las características fisiológicas y ecológicas que presentan, permiten evaluar el estado de contaminación de un ambiente (Quiróz Herrera y Palacio Baena, 2017).

Varios autores han aplicado el test de MN (Zúñiga González *et al.*, 2000; 2001; Poletta, 2011; Shaumburg *et al.*, 2012; 2014; Zapata *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017), y de otras AN (Strunjak Perovic *et al.*, 2010; Hayretđag *et al.*, 2014; Hernández Guzmán *et al.*, 2015; López González *et al.*, 2017) en caimanes, serpientes y en otras especies de tortugas.

Los resultados de la FMN obtenidos del sitio PD (control) del presente trabajo fueron tomados como valores basales, al igual que la FAN para dicho sitio, debido a que no hay antecedentes hasta el momento de valores basales en individuos de *P. hilarii* en la naturaleza (Tabla 2). Los datos de FBMN obtenidos, fueron menores en comparación con los reportados por los autores Boned *et al.* (2011) y Latorre *et al.* (2015) para individuos de esta especie en condiciones de cautiverio. Asimismo, se encontró en el trabajo de Zapata *et al.* (2016) que la FBMN obtenida de individuos de *Trachemys callirostris* expuestos a las actividades agrícolas, industriales y mineras fue mayor que el resultado obtenido en el presente estudio; de igual manera ocurrió en el trabajo de Da Silva Silveira (2016), en el cual la FBMN obtenida de las especies: *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y un híbrido entre las especies *C. caretta* y *Lepidochelys olivácea* de áreas expuestas a descargas de contaminantes de residuos sólidos y metales pesados fueron mayores a las del presente trabajo.

Por otra parte, Zúñiga González *et al.* (2000; 2001) informaron valores de la FBMN para varias especies de vertebrados tanto en la naturaleza como en cautiverio, en el cual, detallaron datos para dos especies de tortugas de agua dulce *Macrolemys temminckii* y *Kinosternon subrubrum*, cuyos valores reportados fueron nulos, pudiendo deberse estos resultados al bajo número de individuos analizados, ya que los autores utilizaron un individuo de la primera especie mencionada y dos de la segunda (Poletta, 2011).

En lo que respecta a la FBAN, los datos obtenidos en el presente trabajo son los primeros en tortugas *P. hilarii* de poblaciones naturales, ya que solamente se encontró en la bibliografía el trabajo de Da Silva Silveira (2016), en el cual describe eritrocitos con brotes además de los MN

en las especies anteriormente mencionadas (*C. mydas*, *C. caretta* y un híbrido entre *C. caretta* y *L. olivácea*).

Los autores Matson *et al.* (2005) determinaron la FMN en las tortugas *Emys orbicularis* expuestas a descargas industriales y Borrat *et al.* (2011) en la especie *C. mydas* expuesta a las actividades agrícolas, y Quiroz Herrera y Palacio Baena (2017) en *L. olivácea* para determinar efectos genotóxicos de contaminantes en una zona expuesta a los agroquímicos y metales pesados.

Las FMN obtenidas de las tortugas de los trabajos de Matson *et al.* (2005) y Borrat *et al.* (2011), fueron superiores a los valores obtenidos de los sitios antropizados (AG y SU). No obstante, en el estudio de Quiroz Herrera y Palacio Baena (2017), los resultados de sus análisis fueron bajos en relación a los valores de los sitios AG y SU.

Finalmente, las muestras analizadas de *P. hilarii* del sitio PD tuvieron escasas AN, lo cual, podría asociarse a eventos espontáneos (Cabagna Zenklusen, 2012), ya que las tortugas capturadas en esta área (Parque Nacional), corresponden a un sitio protegido, relativamente alejado de campos agrícolas e industrias.

El aumento de las frecuencias de MN y AN observadas en *P. hilarii* de los sitios AG y SU, podrían estar asociadas fuertemente a las actividades náuticas y agrícolas, produciendo un incremento de las alteraciones con respecto a las frecuencias obtenidas en el sitio PD. Estos resultados, coinciden con algunos de los trabajos anteriormente mencionados, como los de Matson *et al.* (2005), Hayretđag *et al.* (2014) y López González *et al.* (2017), ya que en los mismos, los sitios utilizados en sus estudios, expuestos a contaminantes o ensayos de laboratorio por inducción a tóxicos, produjeron un aumento en las frecuencias de MN y AN con respecto a sus controles.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, consideramos que el biomonitoreo realizado con *P. hilarii* fue útil, por lo que podría ser utilizada como especie bioindicadora para evaluar calidad de los ambientes de Argentina. Si bien el número de individuos analizados fue bajo, cabe resaltar que estos animales se encontraban en libertad, expuestos naturalmente a las condiciones de los ambientes que habitan. En este contexto, este trabajo es el primero de este tipo, y consideramos que ampliar el número de individuos y sitios de estudio podría incrementar el valor de los resultados hallados, y es un desafío que nos planteamos para futuros trabajos en el área de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceñolaza P.G., Rodríguez E.E. (2013) Humedales de los tributarios cortos del río Paraná. En: Benzaquén L., Blanco D., Bó R., Kandus P., Lingua G., Minotti P., Quintana R.D., Sverlij S., Vidal L. (Eds.) Inventario de los humedales de Argentina: sistemas de paisajes de humedales del corredor fluvial Paraná-Paraguay. Buenos Aires, Argentina. pp. 245-252.
- Aguirre León G. (2011) Métodos de estimación, captura y contención de anfibios y reptiles. En: Gallina S., López González C. (Eds.) Manual de técnicas para el estudio de la fauna. Volumen I. Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de Ecología, A.C. Querétaro, México, pp. 61-85.
- Andreani G., Santoro M., Cottignoloc S., Fabbri M., Carpené E., Elsaní G. (2007) Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci Total Environ.* 390 (1): 287-294.
- Arranz Gutiérrez P. (2016) Evaluación de la posible capacidad genotóxica de fármacos antihipertensivos: losartán e irbesartán. Tesis de Grado, Universidad del País Vasco.
- Attademo A.M., Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Bassó A., Junges C., Cabagna Zenklusen M. (2012) Plasma b-esterase and glutathione s-transferase activities in the South American reptiles *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) and *Phrynops hilarii* (Testudines, Chelidae). *Water Air Soil Pollut.* 223 (6): 3321-3331
- Ayllon F., García Vázquez E. (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European mirrow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467: 177-186
- Barsiené J., Antdreikénaité L. (2007) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels exposed to crude oil from the North Sea. *Ekologija.* 53:9-15
- Boned M.J., López González E., Latorre M.A., Poletta G.L., Siroski P.A. (2011) Determinación del valor basal de micronúcleos (MN) en la tortuga de laguna (*Phrynops hilarii*). *J. Basic Appl. Genet.* 40: 19
- Borrat V., Villar S., Marquez A., Martínez Souza G., Fallabrino A., Novello A. (2011) Evaluación del estado de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) mediante el uso de biomarcadores de genotoxicidad en el área protegida "Cerro verde e islas de La Coronilla" próximas al canal Andreoni. V Jornada sobre Tartarugas Marinhas do Atlântico Sul Ocidental 27-28 de Noviembre de 2011, Florianópolis, Brasil; pp. 88-92.
- Burkart R., Barbaro N.O., Sánchez R.O., Gómez D.A. (1999) Eco-regiones de la Argentina. Ed. PRODIGIA. Buenos Aires, Argentina.
- Cabagna Zenklusen M.C. (2012) Caracterización hematológica de especies de anfibios anuros con distribución en los ecosistemas del litoral fluvial argentino (provincias de Entre Ríos y Santa Fe). Potencialidad de su utilización como biomarcadores. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina.
- Cabagna Zenklusen M.C., Lajmanovich C.R., Attademo A.M., Peltzer P.M., Junges C.M., Fiorenza Biancucci G., Bassó A. (2011) Hematología y citotóxica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 59 (1): 17-28
- Cabrera R.M. (1998) Las tortugas continentales de Sudamérica austral. Talleres gráficos BR Copias, Córdoba, Argentina.
- Caraffa E., Bionda C., Pollo F.E., Salas N.E., Martino A.L. (2013) Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicol. Argent.* 21(2): 78-84
- Carrasco K.R., Tilbury K.L., Mayers M.S. (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as an in-situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47: 2123-2136
- Carreira Vidal S., Meneghel M., Achaval F. (2005) Notas descriptivas y biológicas. En: Elbert L. (Ed.) Reptiles de Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay, pp. 97-100.
- Cei J.M. (1993) Reptiles del noroeste, nordeste y este de Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, puna y pampas. Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Monografía XIV, Torino.
- Da Silva Silveira E. (2016) Avaliação dos danos mutagênicos através da análise de micronúcleos em eritrócitos de tartarugas marinhas no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil. Monografía, Universidad Estatal de Rio Grande do Sul, en convenio con la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.
- De Solla R., Fernie K.J., Letcher S.G., Chu K.G., Drovillard K.G., Shahmiri S. (2007) Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in canadian areas of concern in the great lakes basin. 1. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in eggs. *Rev. Environ. Sci. Technol.* 41(21): 7252-7259
- De Solla S.R., Fernie K.J., Asphole S. (2008) Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in canadian areas of concern in the great lakes basin. II. Changes in hatching success and hatchling deformities in relation to persistent organic pollutants. *Rev. Environ. Pollut.* 153: 529-536
- Derocco N.N., Alcalde L., Rosset S.D. (2005) Ampliación de la distribución de *Phrynops hilarii* (Pleurodira: Chelidae) en Argentina. *Cuad. herpetol.* 19 (1): 63
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2012) Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Duguay R. (1982) Biology of the Reptilian. Vol. III. New York. Carl Gans (Ed.) Academic Press. New York, pp. 155-188
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455:81-95
- Gardner S.C., Oberdorster E. (2005) Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment. Editorial Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EE.UU.
- González Torres H., Moreno Rossi A., Quintana Sosa M. (2015) Efecto genotóxico de mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina. *Salud Uninorte.* 31: 91-100
- Gutiérrez J. M. (2013) Micronúcleos en peces como indicadores de calidad ambiental en estuarios de la costa uruguaya. Tesis de Pre Grado, Universidad de la República Uruguay, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- Hayrettaş S., Gürkan M., Yakin B.Y., Tok C.V. (2014) A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey. *Biharean Biol.* 8 (1): 53-55
- Hernández Guzmán J., Arias Trinidad A., Islas Jesús R.I., Fraire Vázquez A., De La Cruz Izquierdo R.I., García Guzmán N.C., Ruíz X. (2015) Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist.* 13 (2): 201-211
- Lajmanovich R.C., Peltzer P.M., Attademo A.M., Cabagna Zenklusen M.C., Junges C.M. (2012) Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Rev. Quím. Viva.* 3: 184-198
- Lajmanovich R.C., Cabagna Zenklusen M.C., Attademo A.M., Junges C.M., Peltzer P.M., Bassó A., Lorenzatti E. (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and Glufosinate-ammonium. *Mutat. Res.* 769: 7-12
- Latorre M.A., López González E., Siroski P.A., Poletta G.L. (2015) Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the side-necked turtle (*Phrynops hilarii*). *Acta Herpetol.* 9 (2): 1827-9635

- López González E.C., Latorre M.A., Boned M.J., Poletta G.L., Siroski P. (2012) Determinación de la frecuencia de micronúcleos en dos especies de tortugas acuáticas: (*Phrynops hilarii*) y tortuga pintada (*Trachemys dorsignii*). IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina.
- López González E.C., Latorre M.A., Larriera A., Siroski P.A., Poletta G.L. (2013) Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105: 131-134
- López González E.C., Larriera A., Siroski P.A., Poletta G.L. (2017) Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 136: 84-91
- Matson C.W., Palatnikov G., Izlamzadeh A., Mc Donald T.J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Bickham J.W. (2005) Chromosomal damage in two Species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicol.* 14: 1-13
- Paolín R., Cáceres V., Tello A.V., Torres G.A. (2010) Uso de biomarcadores genotóxicos e histopatológicos para evaluar el efecto de metales en tilapia (*Oreochromis niloticus* L.L) presente en la laguna el Sonso (Valle de Cauca). *Rev. Asoc. Col. Cienc.* 22: 109-121
- Pastor Benito S. (2002) Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología, Barcelona, España.
- Paz M., Magdaleno A., Balbis N., Morehon J. (2008) Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Int. Contam. Ambient.* 24 (2): 79-87
- Poletta G.L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. (2008) *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of Micronucleus and Comet assay. *Mutat. Res.* 650: 202-209
- Poletta G. L., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. (2009) Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caimán (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 672: 95-102
- Poletta G.L. (2011) Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en Caimán *latirostris* (Yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.
- Poletta G.L., Siroski P.A., Amavet P.S., Ortega H.H., Mudry M.D. (2013) Reptiles as animal models: examples or their utility in genetics, immunology and toxicology. En: Lutterschmidt, W (Ed.) *Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea*, Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 407-445.
- Pollo F.E., Salas N.E., Mancini M.A., Martino A.L. (2012) Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol. Argent.* 20 (2): 62-67
- Quiroz Herrera V.H., Palacio Baena J. (2017) Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) en Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 22 (3): 322-330
- Reference Ethical Framework for Biomedics Research (REFBR) (2005). Res. N°1047 Anexo II. Ethical principles for research with laboratory, farm and wild animals. CONICET, Buenos Aires, Argentina.
- Richard E., Waller T. (2000) Categorización de las tortugas de Argentina. En Lavilla E.O., Richard E. y Scrocchi G. (Eds.). *Categorización de los Anfibios y Reptiles de Argentina*. Asociación Herpetológica Argentina, Buenos Aires, Argentina pp. 35-44.
- Rojas A.E.C., Saluso J.R. (1987) Informe Climático de la Provincia de Entre Ríos. Publicación Técnica N° 14. Estación Experimental Agropecuaria Paraná - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA), Paraná, Entre Ríos, Argentina.
- Shaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. (2012) Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84: 99-103
- Shaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. (2014) Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): The effect of age. *Mutat. Res.* 766: 5-9
- Shaumburg L.G., Siroski P.A., Poletta G.L., Mudry M.D. (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 130: 71-78
- Strunjak Perovic I., Lisicic D., Coz Rakovak R., Topic Popovic N., Jardan M., Benkovic V., Tadic Z. (2010) Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicol.* 19: 1460-1465
- Tortato M.A. (2007) Contribuição ao conhecimento de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines, Chelidae) em área de restinga no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas.* 20 (1): 119-122.
- Troiano J.C., Silva M.C. (1998) Valores hematológicos de referencia en tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*). *Analect. Vet.* (18): 47-51
- Zapata L.M., Bock B.C., Orozco L.Y., Palacio J.A. (2016) Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127: 108-116
- Zapata Restrepo L.M., Orozco Jiménez L.Y., Rueda Cardona M., Echavarría S.L., Mena Moreno N., Palacio Baena J.A. (2017) Evaluación genotóxica del agua del Río Grande (Antioquia, Colombia) mediante frecuencia de eritrocitos micronucleados de *Brycon henni* (Characiformes: Characidae). *Rev Biol Trop* 65: 405-414.
- Zuluaga Quintero M., Valencia Ruíz A. M., Ortiz Trujillo I. C. (2009) Efecto genotóxico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB.* 28: 33-41
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Luna Aguirre J., González Rodríguez A., Zamora Pérez A., Gómez Meda B.C., Ventura Aguilar A.J., Ramos Ibarra M.L., Ramos Mora A., Ortiz G.G., Gallego Arreola M.P. (2000) Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species mammals, reptiles and birds: Part two. *Mutat. Res.* 467: 99-103
- Zúñiga González G., Torres Bugarín O., Zamora Pérez A., Gómez Meda B.C., Ramos Ibarra M.L., Martínez González S., González Rodríguez A., Luna Aguirre J., Ramos Mora A., Oliveros Lira D., Gallegos Arreola M. P. (2001) Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Toxicol. Environ. Mutag.* 494: 161-167

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CICYTTP-CONICET por los materiales otorgados y el espacio brindado para la realización de las actividades en el laboratorio de herpetología; a la Administración de Parques Nacionales y a la Secretaría de Medio Ambiente de la provincia de Entre Ríos por los permisos otorgados; a Silvia Etcheverry por el apoyo en el laboratorio; a Estefanía Reyes por la ayuda brindada en los muestreos; y a Agustín Bassó por la explicación en la toma de muestras de sangre. Este trabajo fue realizado en parte con financiamiento de PICT 2016-2772 y PIP 389.

META-ANALYSIS FOR EVALUATING THE EFFICIENCY OF GENOMIC SELECTION IN CEREALS



META-ANÁLISIS PARA EVALUAR EFICIENCIA DE SELECCIÓN GENÓMICA EN CEREALES

Rueda Calderón M. A. ^{1,2}, Balzarini M. ^{1,2}, Bruno C. ^{1,2*}

ABSTRACT

Genomic selection (GS) is used to predict the merit of a genotype with respect to a quantitative trait from molecular or genomic data. Statistically, GS requires fitting a regression model with multiple predictors associated with the molecular markers (MM) states. The model is calibrated in a population with phenotypic and genomic data. The abundance and correlation of MM information make model estimation challenging. For that reason there are diverse strategies to adjust the model: based on best linear unbiased predictors (BLUP), Bayesian regressions and machine learning methods. The correlation between the observed phenotype and the predicted genetic merit by the fitted model provides a measure of the efficiency (predictive ability) of the GS. The objective of this work was to perform a meta-analysis on the efficiency of GS in cereals. A systematic review of related GS studies and a meta-analysis, in wheat and maize, was carried out to obtain a global measure of GS efficiency under different scenarios (MM quantity and statistical models used in GS). The meta-analysis indicated an average correlation coefficient of 0.61 between observed and predicted genetic merits. There were no significant differences in the efficiency of the GS based on BLUP (RR-BLUP and GBLUP), the most common statistical approach. The increase of MM data, make GS efficiency do not vary widely.

Key words: systematic review, random effects model, forest plot, predictive accuracy

RESUMEN

La selección genómica (SG) es usada para predecir el mérito de un genotipo respecto a un carácter cuantitativo a partir de datos moleculares o genómicos. Estadísticamente, la SG requiere ajustar un modelo de regresión con múltiples variables predictoras asociadas a los estados de los marcadores moleculares (MM). El modelo se calibra en una población en la que hay datos fenotípicos y genómicos. La abundancia y la correlación de la información de los MM dificultan la estimación, y por ello existen distintas estrategias para el ajuste del modelo basadas en: mejor predictor lineal insesgado (BLUP), regresiones Bayesianas y aprendizaje automático. La correlación entre el fenotipo observado y el mérito genético predicho por el modelo ajustado, provee una medida de eficiencia (capacidad predictiva) de la SG. El objetivo de este trabajo fue realizar un meta-análisis de la eficiencia de la SG en cereales. Se realizó una revisión sistemática de estudios relacionados a SG y se llevó a cabo un meta-análisis, para obtener una medida global de la eficiencia de la SG en trigo y maíz, bajo diferentes escenarios (cantidad de MM y método estadístico usado para la SG). El meta-análisis indicó un coeficiente de correlación promedio de 0,61 entre los méritos genéticos predichos y los fenotipos observados. No se observaron diferencias significativas en la eficiencia de la SG realizada con modelos basados en BLUP (RR-BLUP y GBLUP), enfoque estadístico más comúnmente usado. El incremento de MM no cambia significativamente la eficiencia de la SG.

Palabras clave: Revisión sistemática, modelos de efectos aleatorios, forest plot, capacidad predictiva

¹ Estadística y Biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Ing. Agr. Félix Aldo Marrone 746. Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

² Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola (UFyMA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina.

Corresponding author:
Cecilia Bruno
cebruno@agro.unc.edu.ar

 ORCID 0000-0002-3674-7128

Cite this article as:

Rueda Calderón M. A., Balzarini M., Bruno C. 2020. META-ANÁLISIS PARA EVALUAR EFICIENCIA DE SELECCIÓN GENÓMICA EN CEREALES. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 23–32.

Received: 03/09/2020

Revised version received: 04/23/2020

Accepted: 04/28/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.03

ISSN online version: 1852-6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

La selección genómica (SG) es una técnica con alto potencial para acelerar la tasa de ganancia genética en vegetales (Heffner *et al.*, 2009). Valiéndose de modelos estadísticos, permite relacionar vasta cantidad de marcadores moleculares (MM) o información genómica a un carácter fenotípico de interés, para predecir luego el mérito genético de cada fenotipo. En SG se parte de una población de entrenamiento o calibración, donde no sólo el genotipo molecular es conocido sino también el fenotipo, y se estiman modelos relacionales, que aprendiendo desde dicha población son luego aplicados a poblaciones de líneas donde no se conoce el fenotipo pero si se desea predecir el mérito genético. Es a partir del modelo estadístico estimado o ajustado que se realizan predicciones para estimar el valor de cría o mérito genético de cada individuo en la población de interés. Así, es posible seleccionar individuos con características promisorias para un determinado carácter, usando sólo la información molecular que usualmente proviene del genotipado con marcadores moleculares distribuidos en todo el genoma de cada individuo (Hawkins y Yu, 2018). La información del genotipo y del fenotipo en la población de entrenamiento también es usada para estimar el efecto de cada marcador sobre el carácter de interés. Aun con gran cantidad de MM, los modelos estadísticos usados en SG permiten ajustar el efecto de todos los marcadores simultáneamente. Si los MM se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación que afecta el carácter, los marcadores serán capaces de capturar una gran proporción de la varianza genética del carácter de interés (Voss Fels *et al.*, 2019) y el modelo estadístico permitirá asociar los MM con el fenotipo (Hawkins y Yu, 2018). El modelo aplicado sobre la población de mejora se usa para predecir el valor genético del individuo desde la información molecular distribuida en todo el genoma (*Genome Estimated Breeding Value*-GEBV) (Bhat *et al.*, 2016; Hawkins y Yu, 2018). La SG tiene la capacidad de utilizar altas cantidades de MM asociados a cada *loci*, incluso de efecto menor (Heffner *et al.*, 2009) y así capturar mayor variación genética.

La eficiencia de la SG en un contexto particular, puede evaluarse a través de las correlaciones entre los fenotipos observados y los méritos genéticos predichos o valor de cría (GEBV). Existen una importante cantidad de estudios primarios de SG en vegetales, y si bien es posible su recopilación a través de la revisión sistemática de literatura, no es común encontrar estudios secundarios o meta-análisis (MA) de esos estudios primarios. La revisión sistemática permite sintetizar la información científica disponible, pero es el MA la técnica que permite incrementar la potencialidad de las conclusiones de los estudios primarios (Ferreira González *et al.*, 2011).

La revisión sistemática involucra una serie de acciones: i) formular la pregunta de investigación a

partir de la cual se realiza un constructo de búsqueda para explorar plataformas digitales; ii) realizar la búsqueda de manera exhaustiva y comprensiva de estudios primarios en diferentes bases de datos; iii) compactar la información obtenida de las diferentes bases de datos a través de un gestor bibliográfico; iv) establecer los criterios de exclusión e inclusión para la selección de estudios primarios; v) determinar la relevancia de los estudios identificados; y vi) extraer los datos en el formato necesario para el MA que se quiera realizar (Pai *et al.*, 2004; Akobeng, 2005; Borenstein *et al.*, 2009; 2010; Sánchez Meca, 2010). El término MA fue introducido por primera vez por Glass (1976), para denotar la síntesis estadística de los resultados de estudios primarios similares respecto al tema objeto de estudio. El MA permite: i) sintetizar los resultados de estudios primarios obtenidos de la revisión sistemática para incrementar la potencia de las pruebas de hipótesis de interés; ii) estimar el tamaño del efecto de interés o efecto global; iii) evaluar heterogeneidad entre estudios; y iv) en caso de que sea necesario, hacer análisis por subgrupos o meta-regresiones para comprender el impacto de factores y covariables sobre el tamaño del efecto en cada estudio primario (Borenstein *et al.*, 2009). El MA permite estimar un efecto global o de síntesis de los estudios primarios. En este trabajo, el efecto que se midió a través del MA de estudios de SG es el tamaño o magnitud de la correlación entre valores fenotípicos observados y méritos genéticos predichos por los modelos de SG en las poblaciones de mejora. El gráfico *Forest Plot*, permite visualizar los resultados del MA a través de intervalos de confianza para el valor esperado del efecto de interés, tanto para cada estudio primario como para el conjunto de éstos. La amplitud de estos intervalos de confianza dependerá de la precisión con que se reportan los resultados de cada estudio primario; ésta es función del tamaño muestral y de la varianza residual. El efecto global es estimado como una media ponderada de los efectos reportados en los estudios primarios, y esta ponderación depende de la precisión de cada estudio. En escenarios de alta heterogeneidad entre estudios respecto al tamaño del efecto objeto de estudio, se realizan análisis por subgrupos de estudios primarios relativamente homogéneos. En los estudios de SG en vegetales, es frecuente que se presenten datos de otras variables que podrían marcar diferencias o generar heterogeneidad entre estudios, como por ejemplo, la cantidad de genotipos evaluados, la cantidad de marcadores moleculares empleados (Wu y Hu, 2012) o los modelos estadísticos usados para la SG. Esta información puede ser considerada para conformar subgrupos para el MA y así comparar el impacto de los distintos niveles de estos factores sobre la correlación objeto de estudio. El objetivo de este trabajo fue realizar un MA de la eficiencia de la SG en cereales y su dependencia con la cantidad de MM y el modelo estadístico usado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la información a través de la revisión sistemática

En la revisión sistemática se seleccionaron palabras clave relacionadas a la pregunta de investigación, y de este compendio de palabras se construyó el siguiente constructo de búsqueda: (GS o “*Genomic Selection*”) y (“*Plant breeding*”) y (*crops*) para obtener la mayor cantidad posible de literatura referente a estudios de SG en mejoramiento vegetal. La búsqueda de estudios primarios fue llevada a cabo en múltiples bases de datos: Scopus, Science Direct, EBSCOhost, Pubmed, JSTOR, Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal “*Redalyc*” y SpringerLink. Se obtuvieron 5014 estudios primarios que mencionaran la SG en vegetales. A través del gestor bibliográfico Zotero se realizó la unificación de los estudios primarios obtenidos en las siete bases de datos electrónicas, así como la eliminación de estudios primarios duplicados, excluyendo 779 estudios primarios.

Luego, se seleccionaron aquellos estudios que contenían las palabras de búsqueda en el título (947 estudios primarios). Seguidamente, se leyeron los resúmenes de los trabajos que pasaron el filtrado del título y se eligieron aquellos que trataran la eficiencia de la SG (se desecharon otros 358 estudios primarios). Los estudios que pasaron la anterior etapa (589 trabajos), fueron leídos de manera completa para seleccionar aquellos estudios donde estaba publicada la información necesaria para la construcción de la base de datos (especies, carácter fenotípico, cantidad de marcadores, métodos de estimación y la precisión de la predicción (*prediction accuracy*), medida a través del coeficiente de correlación “*r*” entre el fenotipo observado y los valores de mejora predichos. Finalmente, la cantidad de estudios primarios seleccionados para la conformación de la base de datos fue de 68. En la Figura 1 se presenta un diagrama de flujo de los pasos mencionados.

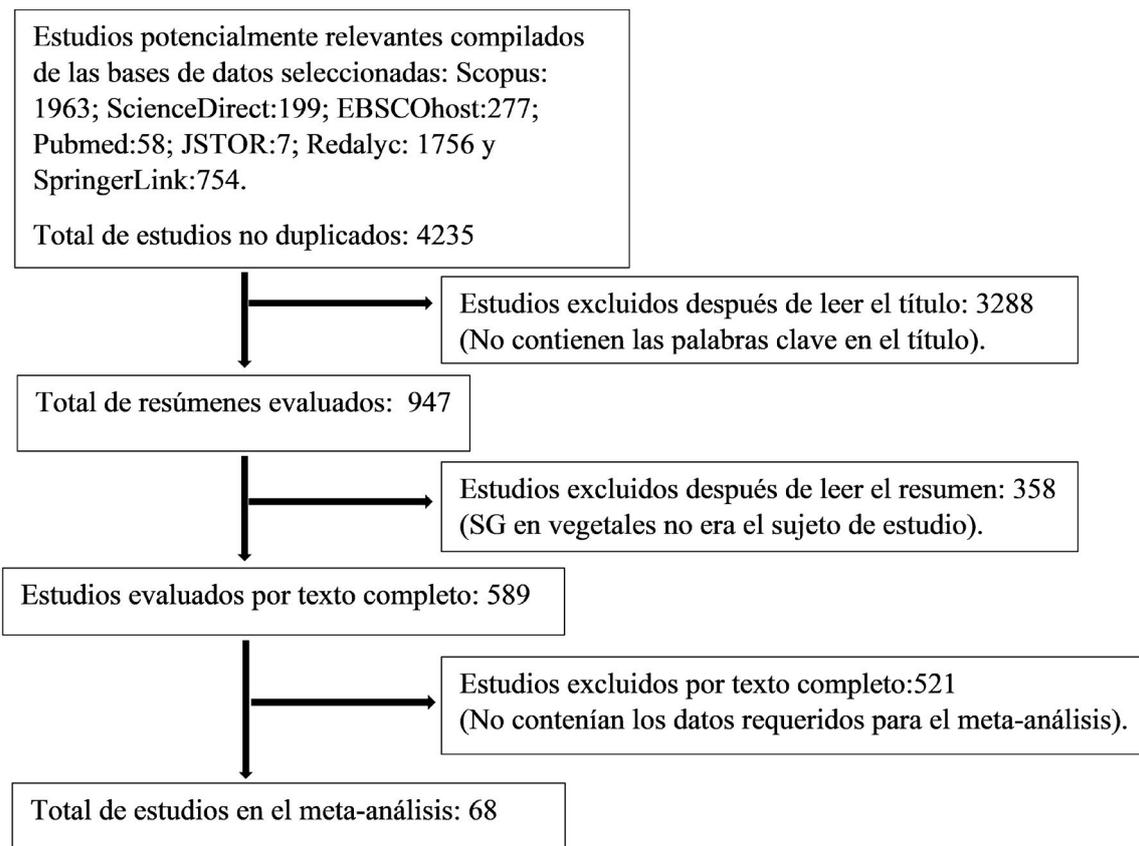


Figura 1. Diagrama de flujo de los criterios de exclusión para el meta-análisis.

Conformación de la base de datos para realizar el meta-análisis

La base de datos quedó conformada por 68 estudios primarios, aunque en algunos de ellos se evaluaron varios casos, *i.e.*, más de un proceso de SG y por tanto se pudieron obtener varios coeficientes de correlación, totalizando 232 casos de SG. La base de datos conformada a partir de los estudios primarios seleccionados contiene la variable “Estudios” para identificar los estudios primarios a través de sus autores y el año de la publicación. Una columna denominada “Subgrupo_Especies” con dos categorías: “cereales” (trigo, maíz, cebada, arroz y centeno) y “otras especies” (césped, soja, colza, remolacha, alfalfa, eucalipto, pera, raigrás, mandioca, caña de azúcar y vid). Para este trabajo se consideraron los datos provenientes de SG en cereales. La columna “carácter” recopila la variable fenotípica analizada en la población de entrenamiento (rendimiento de grano, tiempo de floración, altura de planta, contenido de proteína). La columna “Total_Marcadores” contiene la cantidad de marcadores moleculares usados en cada estudio primario y categorizada en terciles de la distribución de cantidad de marcadores: baja ≤ 1.700 , media $= (1.700; 17.000]$ y alta > 17.000 . La columna “Método_Estimación”, reporta los métodos de estimación usados en la SG que luego son reagrupados en dos categorías: “basados en BLUP” (BLUP, G-BLUP y RR-BLUP) y “otros”, que incluyen “métodos bayesianos o de aprendizaje automático” (M-BL, SVR, RKHS, Bayes A y Bayes B). La última columna contiene el coeficiente de correlación “r” entre el fenotipo observado y el mérito genético predicho por SG reportado en cada estudio primario. Un valor de correlación cercano a uno indica alta eficiencia de la SG.

Los métodos basados en modelos mixtos y consecuentemente en el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) han sido los más usados en SG. El método G-BLUP se caracteriza por asignar la misma varianza a todos los *loci*, es decir, otorga la misma importancia a cada alelo del marcador para obtener el predictor del mérito genético, *i.e.*, como suma los efectos alélicos individuales; algunos marcadores pueden asociarse a efectos nulos (Clark y van der Werf, 2013). Por otra parte, el método RR-BLUP asume que todos los *loci* tienen el mismo efecto, distinto de cero con las mismas varianzas, pero esto no implica que todos los MM tengan el mismo efecto. RR-BLUP estima la matriz de relaciones entre los genotipos a partir de la información provista por los MM, por lo tanto, algunos *loci* pueden aportar al predictor y otros no. Los métodos bayesianos ponderan el efecto de cada *locus* con distinta varianza a diferencia de RR-BLUP. Entre los métodos basados en aprendizaje automático, SVM ha sido uno de los más usados en la SG, dado que al usar una función kernel

para los cálculos como el producto interno, resuelve el problema de estimación con alta dimensionalidad. Por ello, en estos tipos de modelos, la selección de la función kernel se vuelve un factor clave, dado que la misma debe reflejar la distribución característica de la muestra de entrenamiento (Wang *et al.*, 2018).

Meta-análisis

Se estimó la correlación (promedio ponderado de los estudios) entre los valores observados y predichos por el modelo en los estudios de SG realizados en maíz y trigo; especies que representaron más del 50% del total de casos detectados en la revisión sistemática. Se usó un modelo de efectos aleatorios para el MA, ya que se observó alta heterogeneidad entre estudios respecto a los valores de r y la precisión reportada:

$$r_i = \mu + \tau_i + \epsilon_i$$

donde r_i es la correlación observada, μ es la correlación esperada entre el fenotipo observado y el mérito genético predicho, τ_i es un efecto aleatorio asociado a cada estudio primario que se supone con distribución $N(0, \tau)$ y ϵ_i es un término de error aleatorio con distribución $N(0, \sigma^2)$ que mide la precisión dentro de cada caso de SG.

La heterogeneidad entre estudios se evaluó con el estadístico I^2 , que permite cuantificar cuánto de la variabilidad total en el estadístico de interés debe ser atribuida a la variación entre estudios (Higgins *et al.*, 2003). Es una medida independiente del número de estudios incluidos en el meta-análisis y de la unidad de medida utilizada para cuantificar el efecto estudiado. El estadístico I^2 , se expresa como una proporción, un valor cercano a cero indica que la varianza observada es espuria y por lo tanto, los estudios primarios pueden considerarse homogéneos. Higgins *et al.* (2003) sugirieron que valores de I^2 hasta 25% podrían ser indicadores de baja heterogeneidad, entre 25 y 50% de mediana heterogeneidad y más de 75% de alta heterogeneidad. Dado los altos valores encontrados para I^2 , se llevaron a cabo análisis por subgrupos considerando en cada análisis diferentes variables de clasificación, como la cantidad de marcadores moleculares utilizados (“Subgrupo_MM”) y el tipo de método de estimación utilizado para la SG (variable “Método_Estimación”). La estrategia de realizar análisis por subgrupo, además de controlar la heterogeneidad entre estudios, permitió detectar cómo estas variables contribuyen en la estimación global de la eficiencia de la SG. Los meta-análisis se realizaron con los datos transformados a través del z de Fisher, pero los resultados de los efectos globales fueron reportados en la métrica de correlaciones. Los datos fueron analizados usando el software R con el paquete meta (R Core Team 2020).

RESULTADOS

La SG en cereales ha convocado mayor atención que en otras especies agrícolas por el acortamiento aparejado en el ciclo de mejoramiento genético vegetal. Probablemente, este hecho se asocie con la importancia alimentaria de estas especies agrícolas que cuentan con programas de mejoramiento genético vegetal en gran parte del mundo.

Los resultados reportados en la Tabla 1 indican predominancia del uso de los métodos de estimación RR-BLUP y G-BLUP en el ajuste del modelo estadístico

que permitirá obtener las predicciones para la SG. Es importante destacar que se observó alta variabilidad en los reportes de eficiencia de la SG; por ejemplo, en trigo algunas publicaciones reportaban correlaciones menores al 20% mientras que otras reportaban valores de correlaciones en el valor fenotípico observado y el valor genético predicho mayores al 80%. No obstante, en la mayoría de los casos analizados la eficiencia de la SG fue cercana al 60%, que en términos estadísticos es mediana, pero en términos prácticos puede ser suficiente.

Tabla 1. Estudios de selección genómica (SG) en cultivos (n=232) según especie, cantidad de genotipos y de marcadores moleculares en la población de entrenamiento, método de estimación y eficiencia promedio.

Especie	Estudios de SG	Genotipos	Marcadores moleculares	Método de estimación†	r§
Trigo	105	372 90 58.798	4.040 234 90.000	RR-BLUP	57
				G-BLUP	31
				Bayesianos	8
				Aprendizaje Automático	9
Maíz	56	300 97 3.273	16.846 125 158.281	RR-BLUP	28
				G-BLUP	19
				Bayesianos	3
				Aprendizaje Automático	6
Soja	5	301 288 301	52.349 79 52.349	G-BLUP	3
				RR-BLUP	1
				Bayesianos	1
				RR-BLUP	37
Otras	66	482 76-3.000	5.604 69-90.000	G-BLUP	13
				Bayesianos	10
				Aprendizaje Automático	6

† Método de estimación más frecuentemente usado en la construcción del modelo de selección genómica (SG).

§ Correlación entre el fenotipo observado y los valores de mejora (*breeding values*) genéticos predichos por el modelo de SG.

La representación gráfica de los resultados se realiza con un *Forest Plot* (Figura 2), cuyas filas representan cada uno de los estudios primarios y la eficiencia de la SG en las especies trigo y maíz agrupadas según el método de estimación del modelo de SG (G-BLUP y RR-BLUP). El tamaño del efecto es la magnitud de la asociación entre el valor fenotípico observado y el valor genético predicho. Así, el gráfico permite visualizar la correlación de interés promedio (cuadrado) de cada estudio primario y su intervalo de confianza (IC) con nivel de confianza del 95%. Mientras menor es la amplitud del intervalo de confianza, mayor es la precisión en la estimación del coeficiente de correlación entre el valor fenotípico observado y el valor genético predicho. El cuadrado que representa el tamaño del efecto de cada estudio primario varía entre estudios para reflejar el peso de cada uno en la estimación del efecto global (correlación promedio ponderada). Un estudio con precisión relativamente buena, tendrá asignada mayor ponderación o peso para generar la estimación global. La precisión está gobernada por el tamaño de la muestra y por la varianza residual del estudio. Al final de la lista de estudios se visualiza el efecto global (rombo). Si la correlación global es estadísticamente distinta de cero, el valor de cría predicho por el modelo se correlaciona con el valor observado y la SG es eficiente. El efecto global de la correlación entre los valores observados y los valores predichos fue de 0,61, con un intervalo de confianza (IC) de [0,59-0,64] que confirma la eficiencia de la SG. La heterogeneidad entre estudios fue alta $I^2=99\%$ y estadísticamente significativa $p<0,001$; como estrategia analítica para controlar parte de la heterogeneidad, se identificaron subgrupos relacionados al método de estimación (Figura 2) y a la cantidad de marcadores moleculares involucrados en la construcción del modelo de SG (Figura 3).

El intervalo de confianza (IC) para G-BLUP fue [0,57-0,66] y para RR-BLUP [0,59-0,64]; en ambos casos no contienen al cero e indican que la eficiencia de la SG es similar entre ellos y que no estuvo condicionada por la selección de uno u otros métodos de estimación basados en BLUP. La superposición de los IC indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de construcción del modelo para predecir mérito genético desde la información genómica.

Los resultados del meta-análisis para trigo y maíz, realizado por subgrupos definidos por la densidad de marcadores moleculares (alta con más de 17.000 MM, media de 1.700 hasta 17.000 MM y baja con 1.700 o menos MM), mostraron similitud de la eficiencia alcanzada con distinta cantidad de marcadores moleculares (cerca del 60%) (Figura 3). Las ponderaciones o pesos reportados para las categorías alta y media fueron 41,1% y 36,1% respectivamente, mientras que las ponderaciones de la categoría de baja densidad de marcadores moleculares fue de 22,8%. Esto evidenció que la mayor contribución

al efecto global de correlación entre los valores observados y predichos, se obtuvieron con densidades de marcadores moleculares medias y altas (Tabla 2).

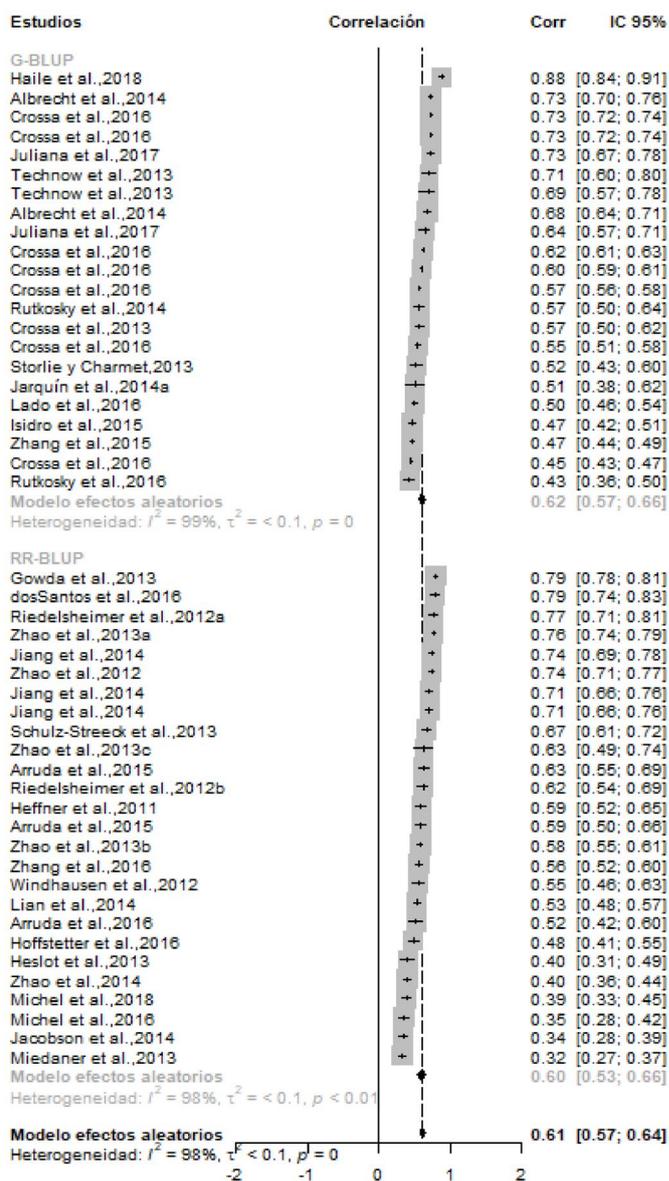


Figura 2. Forest Plot de la eficiencia de SG para los métodos de estimación G-BLUP y RR-BLUP en trigo y maíz. El modelo de meta-análisis ajustado fue un modelo de efectos aleatorios por subgrupos (G-BLUP y RR-BLUP), contemplando de esta forma la heterogeneidad entre estudios primarios y entre grupos. Las correlaciones se presentan ordenadas de mayor a menor dentro de cada método de estimación.

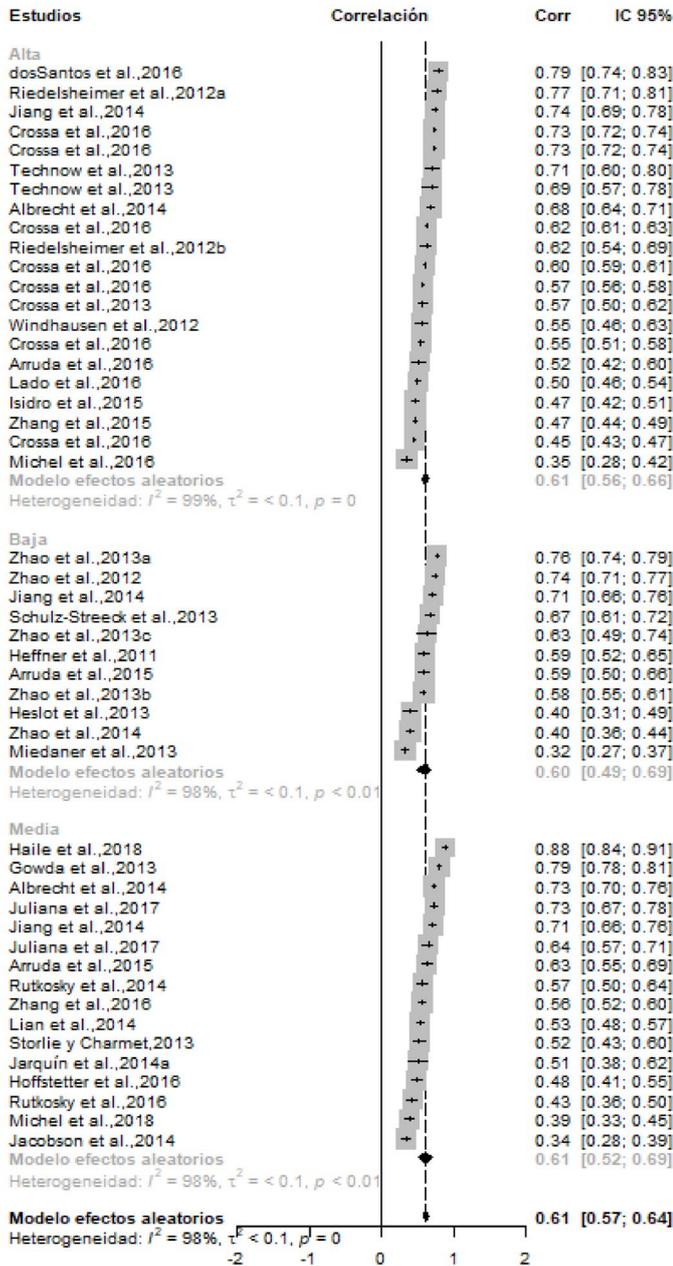


Figura 3. Forest Plot de la eficiencia de SG para distintas densidades de marcadores moleculares categorizadas en: baja (menos de 1.700), media (entre 1.700 y 17.000) y alta densidad de marcadores moleculares, mayor a 17.000 para estudios primarios de trigo y maíz. El modelo de meta-análisis ajustado fue un modelo de efectos aleatorios por subgrupos de densidad de marcadores moleculares (Alta, Baja y Media), contemplando de esta forma la heterogeneidad entre estudios primarios y entre grupos. Las correlaciones se presentan ordenadas de mayor a menor dentro de cada categoría de densidad de marcadores moleculares.

Tabla 2. Estimación de la correlación entre fenotipo observado y mérito genético predicho desde la información molecular de los métodos de estimación más frecuentes de selección genómica y densidad de marcadores moleculares en maíz y trigo (n=122).

	r¶	LI§	LS§	Ponderación (%)
Método de Estimación de SG				
RR-BLUP	0.61	0.59	0.64	69.4
G-BLUP	0.61	0.57	0.66	30.6
Efecto Global	0.61	0.59	0.64	100.0
Cantidad de Marcadores Moleculares				
Mayor a 17.000	0.62	0.58	0.66	41.1
Entre 1.700 y 17.000	0.61	0.55	0.67	36.1
Menor o igual a 1.700	0.6	0.52	0.67	22.8
Efecto Global	0.61	0.59	0.64	100.0

§ LI y LS son el limite inferior y superior del intervalo de confianza del 95% de la correlación.

¶ Correlación entre fenotipo observado y mérito genético predicho desde la información molecular.

‡ Pesos resultantes de un modelo de efectos aleatorios para cada uno de los subgrupos respecto a su efecto global.

DISCUSIÓN

La SG se comenzó a aplicar para la predicción genética en animales (Meuwissen *et al.*, 2001), no obstante, fue adaptada rápidamente en los programas de mejoramiento genético vegetal (Thavamanikumar *et al.*, 2015). Se presenta como una herramienta que permite predecir de manera efectiva, los méritos genéticos de los individuos a partir de información genómica, sin necesidad de observar el fenotipo; así la selección se puede realizar de manera más rápida.

Diferentes modelos estadísticos son usados para asociar la variabilidad genómica a un carácter fenotípico de interés y poder luego predecir el mérito genético de un nuevo individuo. Sin embargo, han manifestado la complejidad a la hora de comparar los resultados de diferentes estudios, además consideran que no siempre se ajusta el modelo más eficiente para un estudio en particular (Wang *et al.*, 2015). Los resultados del meta-análisis conducido en este trabajo, sugieren que no existe una diferencia significativa entre el ajuste del modelo por G-BLUP o RR-BLUP, dos de los métodos más usados para la construcción del modelo de SG.

Dado que los valores de correlación dependen fuertemente de las varianzas de las variables que se correlacionan, y que éstas pueden ser distintas bajo distintos escenarios, el meta-análisis se realizó previa transformación (z de Fisher) de las correlaciones reportadas. La transformación del coeficiente de correlación en la escala z de Fisher permite realizar el meta-análisis en una escala común y luego transformar el tamaño del efecto y los intervalos de confianza logrados a las escalas originales (Borenstein *et al.*, 2009). Algunos autores sugieren que la transformación z de Fisher podría producir un sesgo hacia la derecha (Silver y Dunlap, 1987; Strube, 1988; Field, 2001; 2005). Otros autores sugieren que la transformación logra que el error estándar y, por lo tanto los intervalos de confianza, dependan únicamente del tamaño muestral y no del tamaño de la correlación observada, que puede verse afectada por el error de muestreo (Silver y Dunlap, 1987; Field, 2005). Strube (1988) señaló que a medida que aumenta el número de estudios primarios, el sesgo debido a la transformación es despreciable. En nuestro trabajo el número de correlaciones derivadas de los estudios primarios fue alto ($n=232$ cuando se trabajó con todos los casos y $n=48$ cuando se analizaron las medias de correlaciones por publicación). Mas allá de la existencia de un posible sesgo, las correlaciones promedio, aunque significativas, no fueron altas (aprox. $r=0,6$) sugiriendo que existe espacio para mejorar la capacidad predictiva de los modelos usados en SG en trigo y maíz.

Podría ser importante considerar efectos de interacción entre los efectos de marcadores en los modelos lineales usados para SG con el fin de incrementar la eficiencia de la SG. Conceptualmente estos modelos son entendibles,

pero son computacionalmente difíciles de estimar en la actualidad. Los métodos de base computacional como algunos modelos de regresión de aprendizaje automático podrían ofrecer una herramienta para el tratamiento de interacciones de orden múltiple. Varios métodos de ajustes de modelos de SG abordan los problemas de la alta dimensionalidad y la complejidad computacional capturando diferentes aspectos de la asociación entre el genotipo y el fenotipo. Sin embargo, el desempeño de diferentes métodos depende de la arquitectura genética subyacente del carácter de interés (Resende *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018). Se ha discutido en la literatura que la precisión de la SG depende de la heredabilidad y de la distribución de los genes causales (Desta y Ortiz, 2014) y consecuentemente la heredabilidad del carácter en estudio se relaciona positivamente a la precisión de la predicción. Otro factor importante que debe ser considerado es la interacción genotipo-ambiente ($G \times E$); ya que predicciones sobre el mismo carácter, pero evaluados en varios ambientes, difieren considerablemente debido al efecto que causa esta interacción (Wang *et al.*, 2018). Su *et al.* (2012) usaron predicción genómica con densidades extremas de SNPs y observaron que cuando aumentaron la cantidad de información genómica en un 1438%, la precisión de la predicción aumentó solo en 0,5-1,0%. Aun cuando se conoce que cuanto más marcadores haya mejor será la predicción, la precisión es difícil de mejorar significativamente cuando la densidad inicial de marcadores ya es alta. Los resultados del meta-análisis son consistentes con estas publicaciones. Nakaya e Isobe (2012) realizaron otra revisión de estudios donde se estimaba el mérito genético sobre bases de datos simulados y bases de datos reales, y reportaron que la predicción del valor de cría fue siempre mejor cuando en los modelos se incorporó información provista por marcadores moleculares distribuidos densamente en el genoma respecto a los modelos tradicionales de la construcción del BLUP solo con datos fenotípicos. En otros estudios para caracteres relacionados a calidad de grano en poblaciones biparentales de trigo, se observó que la precisión de los modelos de SG alcanzó una meseta con una densidad de marcadores moleculares que se acercaba a los 256 (Heffner *et al.*, 2011). Para otras especies, como pinos, se observó que la máxima capacidad predictiva se alcanzó en subconjuntos de 564 marcadores moleculares y luego disminuyó (Resende *et al.*, 2012). El mismo fenómeno se observó en otro estudio pero con una densidad de marcadores mucho mayor, ya que se usaron 3490 marcadores moleculares para calibrar los modelos de SG (Oakey *et al.*, 2016). Yang *et al.* (2010) y Wang *et al.* (2017) concluyeron que cuando la densidad de marcadores alcanza un cierto nivel, la predicción genómica no se beneficia.

Entre los métodos estadísticos para ajustar el modelo de SG, el más recomendado en la práctica

de mejoramiento, debido a su robustez y eficiencia computacional es el G-BLUP (Wang *et al.*, 2018). No obstante, algunos algoritmos de aprendizaje de máquinas, como RKHS (*Reproducing Kernel Hilbert Space*) han tomado un papel muy importante en SG (Cuevas *et al.*, 2016). El método G-BLUP asume que todos los efectos de marcador se distribuyen normalmente con igual varianza (Meuwissen *et al.*, 2001) y puede producir resultados similares al método Bayes C (Ferrão *et al.*, 2017). En el trabajo de Gianola (2013) se aprecia que el método de G-BLUP es similar al RR-BLUP, como también se observó en el meta-análisis de este trabajo. Daetwyler *et al.* (2014) calibraron modelos de SG basados en G-BLUP y en regresión bayesiana para predecir la resistencia a la roya en trigo, y concluyeron que el modelo G-BLUP presentó mejor desempeño que la regresión bayesiana. En trigo, los modelos de SG bayesianos han mostrado resultados prometedores en el contexto del análisis de QTL (*quantitative trait loci*), siendo más sensibles al aumento del número de QTL sin disminuir la precisión en contextos de múltiples QTL (Wang *et al.*, 2015).

La precisión que aportan los métodos G-BLUP y RR-BLUP se puede mantener casi constante, independientemente de la cantidad de QTL (Wang *et al.*, 2018). Si bien los modelos Bayes A y Bayes B han mostrado buen desempeño (De los Campos *et al.*, 2009) la estimación de los modelos bayesianos puede llevar mucho tiempo restringiendo su aplicación. Friedman *et al.* (2010) mostraron una mejor alternativa con el algoritmo LASSO, que logra un equilibrio entre la contracción selectiva de los efectos alélicos y la eficiencia computacional. A pesar del buen desempeño de los modelos bayesianos en SG animal (Neves *et al.*, 2014), Xu *et al.* (2017) señalaron que el modelo G-BLUP tiene mejor desempeño que los bayesianos en la predicción de caracteres relacionados con el rendimiento en maíz y también, en la predicción del rendimiento en grano de trigo. En el presente trabajo se observó que la eficiencia de la SG no difiere significativamente entre el uso de G-BLUP o RR-BLUP para el ajuste del modelo, resultado consistente con lo publicado (Dong *et al.*, 2016; Ferrão *et al.*, 2017).

En conclusión, aún cuando los modelos estadísticos usados para SG en cultivos de importancia agrícola han contribuido en la predicción genómica, permitiendo seleccionar genotipos promisorios en etapas tempranas de los programas de mejoramiento genético vegetal, aún es necesario incrementar la capacidad predictiva. Los modelos más usados en maíz y trigo para predecir mérito genético han sido G-BLUP y RR-BLUP, sin diferencias estadísticas en su performance. Si bien la capacidad predictiva aumenta con el número de marcadores usados, la respuesta no es lineal y en algunas situaciones el incremento de estos podría no ser redituable en términos del aumento producido sobre la eficiencia de la SG.

BIBLIOGRAFÍA

- Akobeng A.K. (2005) Understanding systematic reviews and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood* 90 (8): 845-848.
- Bhat J.A., Ali S., Salgotra R.K., Mir Z.A., Dutta S., Jadon V., Tyagi A., Mushtaq M., Jain N., Singh P.K., Singh G.P., Prabhu K.V. (2016) Genomic selection in the era of next generation sequencing for complex traits in plant breeding. *Frontiers in Genetics* 7: 221.
- Borenstein M., Hedges L.V., Higgins J.P.T., Rothstein H.R. (2009) *Introduction to meta-analysis*. John Wiley & Sons. Ltd., Chichester, UK.
- Borenstein M., Hedges L.V., Higgins J.P.T., Rothstein H.R. (2010) A basic introduction to fixed-effect and random-effects models for meta-analysis. *Research Synthesis Methods* 1 (2): 97-111.
- Clark S.A., van der Werf J. (2013) Genomic best linear unbiased prediction (gBLUP) for the estimation of genomic breeding values. In: Gondro C., van der Werf J., Hayes B. (Eds.) *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction*. Springer Protocols, pp. 321-330.
- Cuevas J., Crossa J., Soberanis V., Pérez Elizalde S., Pérez Rodríguez P., de los Campos G., Montesinos López O.A., Burgueño J. (2016) Genomic prediction of genotype \times environment interaction kernel regression models. *The Plant Genome* 9 (3).
- Daetwyler H.D., Bansal U.K., Bariana H.S., Hayden M.J., Hayes B.J. (2014) Genomic prediction for rust resistance in diverse wheat landraces. *Theoretical and Applied Genetics* 127 (8): 1795-1803.
- de los Campos G., Naya H., Gianola D., Crossa J., Legarra A., Manfredi E., Weigel K., Cotes J.M. (2009) Predicting quantitative traits with regression models for dense molecular markers and pedigree. *Genetics* 182 (1): 375-85.
- Desta Z.A., Ortiz R. (2014) Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends in Plant Science* 19 (9): 592-601.
- Dong L., Xiao S., Wang Q., Wang Z. (2016) Comparative analysis of the GBLUP, emBayesB, and GWAS algorithms to predict genetic values in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *BMC Genomics* 17 (1): 460.
- Ferrão L.F.V., Ortiz R., Garcia A.A.F. (2017) Genomic selection: state of the art. In: Campos H., Caligari P. (Eds.) *Genetic Improvement of Tropical Crops*. Springer, pp. 19-54.
- Ferreira González I., Urrutia G., Alonso Coello P. (2011) Revisiones sistemáticas y metaanálisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología* 64 (8): 688-696.
- Field A.P. (2001) Meta-analysis of correlation coefficients: a Monte Carlo comparison of fixed- and random-effects methods. *Psychological Methods* 6 (2): 161-180.
- Field A.P. (2005) Is the meta-analysis of correlation coefficients accurate when population correlations vary? *Psychological Methods* 10 (4): 444-467.
- Friedman J., Hastie T., Tibshirani R. (2010) Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* 33 (1): 1-22.
- Gianola D. (2013) Priors in whole-genome regression: the Bayesian alphabet returns. *Genetics* 194 (3): 573-596.
- Glass G.V. (1976) Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educational Researcher* 5 (10): 3-8.

- Hawkins C., Yu L.X. (2018) Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal* 6 (6): 565-575.
- Heffner E.L., Jannink J.L., Iwata H., Souza E., Sorrells M.E. (2011) Genomic selection accuracy for grain quality traits in biparental wheat populations. *Crop Science* 51: 2597-2606.
- Heffner E.L., Sorrells M.E., Jannink J.L. (2009) Genomic selection for crop improvement. *Crop Science* 49 (1): 1-12.
- Higgins J.P.T., Thompson S.G., Deeks J.J., Altman D.G. (2003) Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327 (7414): 557-560.
- Meuwissen T.H., Hayes B.J., Goddard M.E. (2001) Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. *Genetics* 157 (4): 1819-1829.
- Nakaya A., Isobe S.N. (2012) Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Annals of Botany* 110 (6): 1303-1316.
- Neves H.H.R., Carvalheiro R., O'Brien A.M.P., Utsunomiya Y.T., do Carmo A.S., Schenkel F.S., Sölkner J., McEwan J.C., Van Tassell C.P., Cole J.B., da Silva M.V.G.B., Queiroz S.A., Sonstegard T.S., Garcia J.F. (2014) Accuracy of genomic predictions in *Bos indicus* (Nellore) cattle. *Genetics Selection Evolution* 46 (1): 17.
- Oakey H., Cullis B., Thompson R., Comadran J., Halpin C., Waugh R. (2016) Genomic selection in multi-environment crop trials. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6 (5): 1313-1326.
- Pai M., McCulloch M., Gorman J.D., Pai N., Enanoria W., Kennedy G., Tharyan P., Colford J.M. (2004) Systematic reviews and meta-analyses: an illustrated, step-by-step guide. *The National Medical Journal of India* 17 (2): 86-95.
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.
- Resende M.F.R., Muñoz P., Resende M.D.V., Garrick D.J., Fernando R.L., Davis J.M., Jokela E.J., Martin T.A., Peter G.F., Kirst M. (2012) Accuracy of genomic selection methods in a standard data set of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Genetics* 190 (4): 1503-1510.
- Sánchez Meca J. (2010) Cómo realizar una revisión sistemática y un meta-análisis. *Aula Abierta* 38 (2): 53-64.
- Silver N.C., Dunlap W.P. (1987) Averaging correlation coefficients: should Fisher's z transformation be used? *Journal of Applied Psychology* 72 (1): 146-148.
- Strube M.J. (1988) Averaging correlation coefficients: influence of heterogeneity and set size. *Journal of Applied Psychology* 73 (3): 559-568.
- Su G., Brøndum R.F., Ma P., Guldbbrandtsen B., Aamand G.P., Lund M.S. (2012) Comparison of genomic predictions using medium-density (~54,000) and high-density (~777,000) single nucleotide polymorphism marker panels in Nordic Holstein and Red Dairy Cattle populations. *Journal of Dairy Science* 95 (8): 4657-4665.
- Thavamanikumar S., Dolferus R., Thumma B.R. (2015) Comparison of genomic selection models to predict flowering time and spike grain number in two hexaploid wheat doubled haploid populations. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 5 (10): 1991-1998.
- Voss Fels K.P., Cooper M., Hayes B.J. (2019) Accelerating crop genetic gains with genomic selection. *Theoretical and Applied Genetics* 132 (3): 669-686.
- Wang X., Li L., Yang Z., Zheng X., Yu S., Xu C., Hu Z. (2017) Predicting rice hybrid performance using univariate and multivariate GBLUP models based on North Carolina mating design II. *Heredity* 118: 302-310.
- Wang X., Xu Y., Hu Z., Xu C. (2018) Genomic selection methods for crop improvement: Current status and prospects. *The Crop Journal* 6 (4): 330-340.
- Wang X., Yang Z., Xu C. (2015) A comparison of genomic selection methods for breeding value prediction. *Science Bulletin* 60 (10): 925-935.
- Wu X.L., Hu Z.L. (2012) Meta-analysis of QTL mapping experiments. In: Rifkin S.A. (Ed.) *Quantitative Trait Loci (QTL): Methods and Protocols*. Totowa, NJ, Humana Press, pp. 145-171.
- Xu Y., Xu C., Xu S. (2017) Prediction and association mapping of agronomic traits in maize using multiple omic data. *Heredity* 119 (3): 174-184.
- Yang J., Benyamin B., McEvoy B.P., Gordon S., Henders A.K., Nyholt D.R., Madden P.A., Heath A.C., Martin N.G., Montgomery G.W., Goddard M.E., Visscher P.M. (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Genetics* 42: 565-569.

IDENTIFICATION OF MOLECULAR ALTERATIONS IN VENEZUELAN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DIAGNOSIS



IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES EN PACIENTES VENEZOLANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Castro Y.C.¹, Utrera R.¹

¹Laboratorio Genética Molecular Humana, Universidad Simón Bolívar, Venezuela.

Corresponding author:
Yarlenis Castro
liceyarlenis@gmail.com

 ORCID 0000-0002-0579-5717

Cite this article as:

Castro Y.C., Utrera R. 2020.
IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES EN PACIENTES VENEZOLANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 33-43.

Received: 08/07/2019

Revised version received: 04/23/2020

Accepted: 04/28/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.04

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common neoplasm in pediatric age. In recent years, between 15 and 20% of patients failed in their treatments. Knowledge on cytogenetics and molecular biology has an important impact on the determination of the prognosis and the appropriate treatment scheme. In Venezuela there is limited knowledge regarding the molecular genetics of this onco-hematological alteration. The aim of this work was to evaluate the most frequent genetic alterations in Venezuelan patients with a clinical diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. A cross-sectional, descriptive and prospective study was carried out from 2006 to 2014, in which the translocations *ETV6/RUNX1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL1*, as well as mutations in the *PAX5* and *FLT3* genes were evaluated through the use of different types of PCR. One hundred and thirty patients with a clinical diagnosis of acute lymphocytic leukemia were included in the study. Molecular alterations were identified in 56 patients (43.1%), in which we observed the presence of one or several alterations in conjunction in the same patient. The alterations identified were t(12; 21) (11.5%), t(4; 11) (8.5%), t(1; 19) (10%), t(9; 22) (20.8%), ITD-*FLT3* (14.8%), P80S mutation (4.2%) and S77del (4.2%) in the *PAX5* gene. The prevalence of *BCR/ABL* is one of the highest described so far in cases of ALL where most of the population is made up of pediatric patients. These results represent the first molecular study of ALL in Venezuela, laying the foundations for the diagnosis and monitoring of the disease in its population.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia; Translocations; *ETV6/RUNX1*; *MLL/AF4*; *TCF3/PBX1*; *BCR/ABL1*; *PAX5*; *FLT3*

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en edad pediátrica. En los últimos años, entre el 15 y 20% de los pacientes fracasan en el tratamiento. Conocimientos en citogenética y biología molecular repercuten de manera importante en la determinación del pronóstico y del esquema de tratamiento adecuado. En Venezuela existe un conocimiento limitado en cuanto a la genética molecular de esta alteración onco-hematológica. El objetivo del trabajo fue evaluar las alteraciones genéticas más frecuentes en pacientes venezolanos con diagnóstico clínico de leucemia linfoblástica aguda. Se realizó un estudio transversal, descriptivo y prospectivo de 2006 a 2014, en el que se evaluaron las translocaciones *ETV6/RUNX1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL1*, así como las mutaciones en los genes *PAX5* y *FLT3* mediante el uso de diferentes tipos de PCR. Ciento treinta pacientes con diagnóstico clínico de leucemia linfocítica aguda fueron incluidos en el estudio. Se identificaron alteraciones moleculares en 56 pacientes (43,1%), en los que observamos la presencia de una o varias alteraciones en conjunción en un mismo paciente. Las alteraciones identificadas fueron t(12;21) (11,5%), t(4;11) (8,5%), t(1;19) (10%), t(9;22) (20,8%), ITD-*FLT3* (14,8%), mutación P80S (4,2%) y S77del (4,2%) en el gen *PAX5*. La prevalencia de *BCR/ABL*, es una de las más altas que ha sido descrita hasta ahora en casos de LLA donde la mayor parte de la población está conformada por pacientes pediátricos. Estos resultados representan el primer estudio molecular de la LLA en Venezuela, sentando las bases para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad en su población.

Palabras clave: Leucemia Linfoblástica Aguda; Translocaciones; *ETV6/RUNX1*; *MLL/AF4*; *TCF3/PBX1*; *BCR/ABL1*; *PAX5*; *FLT3*.

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se define clínicamente como la expansión clonal de células progenitoras linfoides (linfoblastos), comprometidas a un linaje, ya sea B o T, transformadas malignamente a través de un bloqueo en un punto de su diferenciación, dando lugar a células inmaduras e indiferenciadas. Estas células inmaduras que se multiplican de forma incontrolada, infiltran la médula ósea, producen un grado variable de pancitopenia y pueden comprometer diferentes órganos y/o sistemas y causar la muerte por hemorragia y/o infección (Teitell y Pandolfi, 2009).

Se caracteriza por tener una distribución bimodal con un primer pico en pacientes menores de 20 años ($\pm 60\%$) y el segundo a partir de los 45 años de edad (20%) (Smith *et al.*, 1999). Representa el 75-80% de las leucemias agudas en edad pediátrica con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años y un 20% en edad adulta (Smith *et al.*, 1999; Wiemels, 2012).

Venezuela es un país con una población aproximada de 33 millones de habitantes, y el cáncer constituye la segunda causa de muerte según el Anuario de Mortalidad 2014, publicado en el año 2015 por el Ministerio del Poder Popular para la Salud. En los registros oficiales, que datan del año 2009, donde se engloban todos los tipos de cáncer sin hacer diferenciación entre ellos, se indicó que el cáncer fue causante de 20.288 defunciones, representando el 15,5% del total registrado. Los datos para el año 2019, mostraron un incremento en la cifra de fallecidos por cáncer del 16,6% con respecto a lo establecido en las proyecciones oficiales. Esta posición en la que se localiza el cáncer en Venezuela se ha mantenido en los últimos 25 años, y sólo ha sido superada por enfermedades del corazón. Aun cuando en Venezuela no existen cifras concretas, las tasas de morbi-mortalidad asociadas con la leucemia en el país son cada vez mayores (Villalta *et al.*, 2019; Capote, 2012).

Hasta hace aproximadamente 45 años la LLA era una enfermedad incurable; pero desde la década del 70 se abrieron nuevas perspectivas, motivado al reconocimiento de una serie de factores que produjeron cambios en el manejo de la enfermedad, como la necesidad de dar profilaxis al sistema nervioso central y el uso de protocolos con poliquimioterapia que, en su conjunto, resultaron en una mejoría de las tasas de curación en muchos países del mundo. Actualmente, utilizando las mismas drogas de manera más apropiada, países desarrollados reportan una tasa de curación entre el 80 y el 85% y algunos centros internacionales de tratamiento e investigación reportan hasta de un 90% (Globocan, 2012; Tirado *et al.*, 2007). En nuestro país la situación se presenta de forma diferente. A pesar que la respuesta inicial se obtiene en el 85% de los casos, la tasa de recaídas medulares es alta (13-15%) (Landolfi *et al.*, 2013). Esto puede deberse a posibles fallas en el

tratamiento de quimioterapia de inducción o a factores inherentes a alteraciones moleculares adquiridas luego de la remisión inicial (Landolfi *et al.*, 2013).

En los últimos años, gracias a la citogenética y a la biología molecular, se han efectuado grandes avances en el conocimiento de los mecanismos que determinan la transformación maligna de las células precursoras de la hematopoyesis. Estos conocimientos se han traducido en un aumento de los métodos de diagnóstico, terapia molecular dirigida, así como también, mejoras en el seguimiento y pronóstico de la enfermedad (Pui *et al.*, 2008; 2011).

Se estima que en el 60% de las leucemias agudas existe una alteración cromosómica como las aneuploidías, rearrreglos estructurales, translocaciones, inversiones, deleciones, monosomías y trisomías (Pui *et al.*, 2011). La identificación de estas alteraciones moleculares específicas es actualmente un elemento indispensable para la estratificación de las leucemias en distintos grupos de pronóstico para su tratamiento adecuado. Asimismo, se sabe que las alteraciones genéticas de las neoplasias son generalmente los agentes causales de la enfermedad, y definen distintos comportamientos biológicos que se traducen en diferentes comportamientos clínicos y finalmente, en pronósticos muy variables (Abdullaev *et al.*, 2000).

El análisis detallado de los rearrreglos citogenéticos en las leucemias, por varios años ha aportado información importante para aclarar las incidencias de anomalías individuales y su significado pronóstico (Jiménez Morales, 2002).

A pesar de los grandes avances que han ido apareciendo en la sociedad referidos a nuevos conocimientos y tratamientos de las leucemias, todavía fallece un porcentaje considerable de niños debido a esta enfermedad o por los efectos secundarios de la terapia; por lo tanto, la leucemia sigue siendo la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en pediatría, razón por la cual en la actualidad se están realizando diversos estudios enfocados a determinar la frecuencia y prevalencia de estas alteraciones en las diferentes poblaciones, así como en supervisar y analizar las diversas anomalías genéticas presentes en las células leucémicas (Pulte *et al.*, 2009).

El conocimiento aún limitado en relación a la genética molecular de la leucemia en pacientes pediátricos venezolanos, pudiera ser la causa de que en algunos niños sus tratamientos sean sobredimensionados, o por el contrario, subestimados. En efecto, el uso de esquemas de quimioterapia muy agresivos aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias secundarias, y con ello mayores dificultades en estos pacientes (Díaz Beveridge y Urtasun Aparicio, 2003). Por ello, se ha hecho necesario el desarrollo y/o mejoramiento de técnicas de diagnóstico más eficientes, como por ejemplo, la detección de marcadores moleculares asociados a pronóstico.

La detección y conocimiento de los marcadores moleculares frecuentes en la LLA como son *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL*, *TCF3/PBX1* y *MLL/AF4* permitirá corroborar el diagnóstico, establecer la gravedad de la enfermedad y contribuir en el desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento; los cuales a su vez, permitirán establecer terapias más adecuadas e individualizadas basadas en las características genéticas propias de las células malignas presentes. También permitirá monitorear los procesos de remisión o agravamiento de la enfermedad, para finalmente aumentar la sobrevivencia y calidad de vida de los pacientes con dicha patología (Woo *et al.*, 2014).

Un punto interesante en este tipo de estudio es que los individuos responden de manera diferente a las drogas, y que a veces los efectos pueden ser impredecibles. Las diferencias en la secuencia del ADN que altera la expresión o función de las proteínas a las que van dirigidas estas drogas, puede contribuir significativamente a la variación en la respuesta de los individuos. Por ejemplo, mientras los niños con la t(12;21) *ETV6/RUNX1* responden bien a terapias basadas en antimetabolitos, los que presentan la t(9;22) *BCR/ABL* no lo hacen de igual manera y en su defecto deben ser tratados con inhibidores de tirosin-kinasa (Pui *et al.*, 2011). Por tal motivo, este estudio molecular de las distintas alteraciones que conducen a la transformación maligna de las células linfoides preparará el camino para el desarrollo de terapias individualizadas dirigidas al defecto genético causante de la proliferación anómala que presenten menores efectos secundarios, evitando así tratamientos excesivos e ineficientes y optimizando de esta manera el tratamiento.

El objetivo de este estudio fue investigar los eventos moleculares más frecuentes, entre ellos, *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL*, *TCF3/PBX1* y *MLL/AF4*, y las alteraciones en los genes *PAX5* y *FLT3*, relacionados a la Leucemia Linfocítica Aguda en pacientes venezolanos con edades comprendidas entre 0 y 66 años (abarcando los grupos etarios más afectados por esta alteración hematológica) diagnosticados clínicamente con LLA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y prospectivo, efectuado entre los años 2006 al 2014, con muestras tomadas bajo previo consentimiento informado, llevado a cabo en forma conjunta entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad Simón Bolívar (USB), el Hospital “Miguel Pérez Carreño”, Hospital “J.M de los Ríos” y el Banco Municipal de Sangre de Caracas, Venezuela.

Pacientes

Se evaluaron 130 pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA, con edades comprendidas entre

0 y 66 años, abarcando ambos géneros. La toma de muestra de los pacientes se llevó a cabo en el servicio de hematología de los centros de salud antes mencionados. Las muestras procesadas fueron obtenidas a través de aspirados de médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP), colectadas en tubos con anticoagulante EDTA, mantenidas a temperatura ambiente. Se lograron recolectar datos de laboratorio en 89 pacientes; asimismo, en sólo 38 órdenes de las 130 se denotó alguna observación donde se indicó si el paciente se encontraba para diagnóstico inicial o si estaba en recaída medular luego de remisión o tratamiento.

Métodos de laboratorio

Extracción de ARNtotal (ARNt) y síntesis de ADNcomplementario (ADNc) por transcripción reversa
Los leucocitos (glóbulos blancos) se obtuvieron mediante el método de separación por gradiente de Ficoll, siguiendo las instrucciones sugeridas por la casa comercial “Amersham Biosciences”. El concentrado de linfocitos se almacenó en Trizol® Reagent (Invitrogen) a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de ARN se realizó según el método de Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987).

La integridad del ARNt se evaluó tanto por cuantificación espectrofotométrica donde además se determinó la pureza, estimando el índice de absorbancia 260:280 nm, así como a través de electroforesis en geles de agarosa bajo condiciones desnaturizantes (Agarosa UltraPure™ RNAsafree, Invitrogen) al 1%, MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05M, EDTA 0,01M, pH 8,0 y formaldehído 37%), obteniendo de esta manera una estimación visual aproximada de la concentración del ARNt. Los geles seleccionados fueron fotografiados y visualizados empleando el equipo y programa “Gel Doc 2000™ Gel Documentation System CCIR”, Quantity One 4.2.1, ambos de BIO RAD.

A partir del ARN mensajero se obtuvo un ADN complementario mediante la reacción de transcriptasa reversa (enzima M-MVL Invitrogen), el cual se usó en cada uno de los casos para amplificar secuencias específicas de las alteraciones moleculares evaluadas.

Reacción de PCR

El ADNc previamente sintetizado se utilizó como molde para las siguientes reacciones de amplificación utilizando en común componentes como: buffer de enzima (Tris-HCL 10 mM pH8,3, KCL 50 mM) 1X, dNTP's 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, TaqADN polimerasa 0,05 U/μL y cebadores 0,75 μM. Todos estos ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador programable Mod TC-100™ (MJ Research Inc.).

a) Amplificación del gen GAPDH mediante PCR convencional (PCR-I) para evaluar la integridad de

los ADNc sintetizados. La secuencia de los cebadores utilizados GAPDHup y GAPDHdown se pueden observar en la tabla 1; las condiciones de la pcr: 35 ciclos 95 °C- 4 min, 95 °C- 30 seg, 50 °C- 1 min, 72 °C- 1 min.

b) Amplificación por PCR anidada (PCR-I, PCR-II) para identificar las quimeras *ETV6/RUNX-1*, *MLL/AF4*, *E2A/PBX-1* y amplificación por PCR convencional para la identificación de la quimera *BCR/ABL* y sus variantes más frecuentes en la LLA (p190 y p210). La secuencia de los cebadores utilizados tanto en PCR-I como PCR-II, según el orden en que se nombraron las quimeras evaluadas se observan en la tabla 1. En cuanto a las condiciones, particularmente para la detección de la quimera *ETV6/RUNX-1*, en la PCR-I se llevó a cabo una PCR con condiciones características de una PCR "Touch Down", la cual se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizó un ciclo a 94 °C 3 min, 8 ciclos de hibridación a 50 °C 45 seg donde por cada ciclo se disminuyó 1° C la temperatura y una extensión a 72 °C 45 seg. En la segunda etapa se realizaron 35 ciclos 94 °C 45 seg, 60 °C 45 seg, 72 °C 1 min y extensión final 72 °C 3 min. Para el resto de las translocaciones, las condiciones solo variaron en la temperatura de hibridación 60 °C (*MLL/AF4*), 65 °C (*TCF3/PBX1*) y 55 °C (*BCR/ABL1*) y el tiempo de extensión final para *BCR/ABL* que fue de 10 min, para las otras quimeras fue de 4 min.

c) Amplificación por PCR convencional para la detección de duplicaciones en tándem en los exones 14 y 15 del gen *FLT3* y PCR-RFLP para la detección de la mutación D835 en el exón 20 del mismo gen. Para la ejecución del último ensayo mencionado, posterior a la amplificación por PCR se llevó a cabo la digestión del producto amplificado con la enzima EcoRV (Promega). Se amplificaron las muestras de 54 del total de pacientes evaluados con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA. Dentro de estas 54 muestras escogidas, estuvieron todas aquellas que resultaron ser positivas para la translocación *MLL/AF4*, esto debido a que una de las características que distingue a las LLA generadas por alteraciones del gen *MLL* es la alteración del gen *FLT3* (Armstrong *et al.*, 2002; 2003; Stam *et al.*, 2005). El resto de los pacientes se distribuyeron de la siguiente manera: pacientes positivos para el resto de las translocaciones evaluadas *ETV6/RUNX-1*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL-1* y pacientes cuya muestra no amplificó para ninguna de las alteraciones cromosómicas antes mencionadas. Para el ensayo de detección de duplicaciones en tándem se utilizó una concentración final de MgCl₂ de 1Mm y los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante corridas electroforéticas de geles de agarosa al 3%, para garantizar la visualización de las bandas correspondientes a los fragmentos presentes de las ITD. La secuencia de los cebadores utilizados se presentan en la tabla 1, mientras que las condiciones de la pcr fueron las mismas para las

dos amplificaciones, 35 ciclos 94 °C 4 min, 95 °C 30 seg, 51 °C 1 min, 72 °C 1 min y extensión final por 7 min.

d) AS-PCR para la detección de la mutación puntual P80R en el gen *PAX-5*. Para este ensayo solo se analizaron 24 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA, debido a que al momento de realizar el análisis de esta mutación, la cantidad disponible de muchas de las muestras de pacientes evaluados era insuficiente. Para ello, fueron seleccionados pacientes positivos de cada una de las translocaciones evaluadas previamente: *ETV6/RUNX-1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX-1*, *BCR/ABL-1* y pacientes cuyas muestras no amplificaron para ninguna de las alteraciones cromosómicas evaluadas. La secuencia de los cebadores se observan en la tabla 1 y las condiciones de pcr: 95 °C 4 min, 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C 7 min durante 35 ciclos.

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio. Todas las reacciones contaron con controles positivos y negativos. Asimismo, los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el servicio comercial de Macrogen Inc. Korea y se corrió BLAST para la coincidencia nucleotídica (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast>). Para cambiar la secuencia a reverso complementario en los casos donde se tuvo que secuenciar con el Oligo antisentido se utilizó el software en línea http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html; para realizar alineamientos y traducción de secuencias se utilizó y <http://bio.lundberg.gu.se/>. Además se utilizaron los software SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) y PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>) para determinar si las mutaciones encontradas podrían ejercer un efecto negativo en la función de la proteína afectada, y predecir si la sustitución o delección de un aminoácido tenía un impacto en la función biológica de la proteína.

RESULTADOS

Se evaluó la integridad, tanto de los ARNt extraídos como del ADNc sintetizado de las 130 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de leucemia linfocítica aguda (LLA), para confirmar si cumplían con la cantidad de ARN necesario para el proceso de análisis de las alteraciones moleculares. Se encontró que en algunos casos, la cantidad de ARNt obtenida fue baja, sin embargo esto no afectó los posteriores análisis realizados sobre las muestras. Aún en los casos de muestras que presentaron una degradación parcial fue posible realizar los ensayos posteriores por PCR, ya que los fragmentos amplificados se encontraban delimitados en un promedio de tamaño comprendido entre 200/800 pb. Por otra parte, en los casos que contenían abundante cantidad de ARNt, debido a la cuantiosa cantidad de células inmaduras, se procedió a la preparación de las diluciones respectivas para así evitar que las reacciones

de amplificación posteriores se vieran inhibidas por exceso de muestra.

De 130 pacientes, 86 eran varones. El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de 0 a 10 años, 89 pacientes (68,5%); seguido del grupo de 11 a 18 años, 31 pacientes (23.8%). El grupo de menor incidencia lo ocuparon pacientes con edad mayor a 18 años, 10 pacientes (7.7%).

El promedio del total de los pacientes según presentación del gen de fusión u otra alteración génica se presenta en la Tabla 2.

Tabla 1. Secuencia de cebadores para amplificación por PCR

Cebador	Secuencia
GAPDHup	5'catcaagaaggtggtgaa3'
GAPDHdown	5'gggtcttactcctggag3'
ETV6.1	5'cactcctggattcaaacagtc3'
RUNX1.1	5'agccgagtagtttcatcattgc3'
ETV6.2	5'tcatcgggaagacctggctta3'
RUNX1.2	5'agcacggagcagaggaagtgc3'
MLL.1	5'ccgcctcagccacctac3'
AF4.1	5'cgacctcagctcagtgaca3'
MLL.2	5'aggaccgcaagaaaaga3'
AF4.2	5'ctcactcaaatctcagc3'
TCF3.1	5'ttctcgtccagccctctacc3'
PBX1.1	5'gccacgcttccgctaac3'
TCF3.2	5'ctacgacgggggtctccac3'
PBX1.2	5'catgtgtccagccgatgat3'
BCR	5'accgatgttccggacaaaagc3'
B2B	5'acagattccgctgaccatcaataag3'
C5e	5'ataggatccttgcaaccgggtctgaa3'
CA3	5'tgtgactggcgtgatgtagttgcttg3'
FLT3ITDup	5'cgtttaaccctgtaattgtca3'
FLT3ITDdown	5'agctgggtcatcatcttgattct3'
FLT3D835up	5'gccaagggaatggaatttctg3'
FLT3D835down	5'atcaaccggaatgccaggta3'
PAXwt (normal)	5'agacaggaagcatcaagtc3'
PAXmut (mutado)	5'agacaggaagcatcaagcg3'
PAXcomún	5'atagtgccactggtccg 3'

Tabla 2. Características de los pacientes según presentación del gen de fusión u otra alteración génica

Translocación	Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 130 (%)	Pacientes edad pediátrica (0-17) N= 121 (%)	Pacientes edad adulta (≥18) N= 9 (%)	SEXO Predominante (%)
t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1)	27 (20.8)	25 (19.2)	2 (1.5)	Masculino (66.7)
t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1)	15 (11.5)	14 (10.7)	1 (0.8)	Masculino (66.7)
t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1)	13 (10)	13 (10)	0	Masculino (61.5)
t(4;11) (q21;q23) (MLL-AF4)	11 (8.5)	10 (7.7)	1 (0.8)	Masculino (63.6)
Alteraciones moleculares en otros genes	Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 54 (%)	N= 45 (%)	N= 9 (%)	
ITD-FLT3	8 (14.8)	7 (12.9)	1 (1.9)	Masculino (62.5)
	Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 24 (%)	N= 19 (%)	N= 5 (%)	
Mutación P80S (PAX5)	2 (8.3)	1 (4.2)	1 (4.2)	Masculino (50) Femenino (50)
S77del (PAX5)	1 (4.2)	1 (4.2)	0	Masculino (100)

Alteraciones moleculares evaluadas

A) *Translocación ETV6/RUNX1*: Se detectó este transcrito en 15/130 (11,5%) pacientes evaluados. En el subgrupo correspondiente a los pacientes en edad pediátrica comprendida entre 0 y 18 años, se encontró la translocación *ETV6/RUNX1* en 14/15 (93,3%) de ellos. Mientras que en la población adulta se halló positividad para esta translocación en 1/15 (6,7%), paciente femenino de 66 años de edad. La edad promedio de los pacientes pediátricos positivos para *ETV6/RUNX1* (14) fue de 8 años, de los cuales 10/14 (71,4%) fueron masculinos y 4/14 (28,6%) fueron del género femenino.

Doce de las muestras evaluadas positivas para la quimera *ETV6/RUNX1*, presentaron el mismo punto de corte descrito y señalado en los estudios realizados en otros países en relación a la translocación *ETV6/RUNX1*, el cual incluyó la unión del extremo 3' del exón 5 del gen *ETV6*, con el extremo 5' del exón 3 del gen *RUNX1* (Paciente A-Figura 1). Contrariamente, 3 de las muestras de los pacientes con LLA evaluados presentaron un punto de corte distinto al clásicamente señalado en la bibliografía. En este último caso, el punto de corte se ubicó entre el exón 5 del gen *ETV6* y el exón 4 del gen *RUNX1* (Paciente B- Figura 1). Este nuevo punto de corte encontrado en estos pacientes venezolanos, no ha sido aún reportado en las investigaciones de otros países.

B) *Translocación MLL/AF4*: Se detectó esta alteración en 11/130 (8,5%) del total de pacientes evaluados. La edad promedio fue de 6,1 años, de los cuales 7/11 (63,64%) fueron del sexo femenino y 4/11 (36,36%) del sexo masculino. Del total de pacientes pediátricos que se evaluaron en este estudio (120 - 92,3%), se encontró la translocación *MLL/AF4* en 10 (8,3%) de ellos, con edades comprendidas entre 0 y 12 años. Mientras que de la población adulta fueron evaluadas 10 muestras de pacientes con LLA (7,7%), detectando positividad para esta translocación en un paciente femenino (10%), de 19 años de edad.

En todas las secuencias obtenidas de las muestras positivas para esta translocación se verificó la posición del punto de corte, el cual estuvo ubicado entre el final del exón 8 del gen *MLL* y el inicio del exón 5 del gen *AF4*, lo cual representa el punto de corte descrito en la literatura para la translocación *MLL/AF4*. Al realizar el análisis *in silico*, en lo que respecta a la traducción de secuencia para cada una de las muestras analizadas, se observó que se mantuvo el marco de lectura, y por ende, se llevó a cabo la traducción de la proteína quimérica *MLL/AF4* en todos los casos detectados y evaluados.

C) *Translocación BCR/ABL1*: Este transcrito fue detectado en 27/130 (20,8%) muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LLA, de las cuales 22 (16,9%) fueron positivas solo para la variante p190 de la translocación *BCR/ABL*,

2 (1,5%) fueron positivas solo para la variante p210 de la translocación *BCR/ABL*, y 3 (2,3%) presentaron ambas variantes (p190 y p210) simultáneamente. La edad promedio de los pacientes con esta translocación, independientemente de la variante presente fue de 10 años, donde el sexo masculino fue prevalente, encontrándose 18/27 (66,7%) pacientes positivos del sexo masculino; mientras que el sexo femenino por su parte representó el 33,3% (9/27 pacientes) de las muestras positivas encontradas para la translocación *BCR/ABL*. Haciendo énfasis en la edad y género de los pacientes positivos encontrados para cada variante, se obtuvo que para la variante p190 (e1a2) la edad promedio fue de 10,4 años, encontrándose 17 pacientes de sexo masculino (68%) y 8 pacientes de sexo femenino (32%). Por su parte, de los 5 pacientes positivos para la variante p210, la edad promedio fue de 15,8 años donde el sexo masculino prevaleció representando el 80%, mientras que el sexo femenino solo representó el 20% del total de muestras positivas para esta variante.

En lo que respecta a las muestras positivas para la variante p190, en todas las secuencias se observó que la posición del punto de corte estuvo ubicado entre el exón 1 del gen *BCR* y el exón 2 del gen *ABL1*, lo cual representa el punto de corte descrito en la literatura para la translocación *BCR/ABL* variante p190. Por su parte, en la secuencia de todas las muestras positivas para la variante p210, se obtuvo un punto de corte generado por la unión del exón 13 del gen *BCR* con el exón 2 del gen *ABL1* (variante b2a2).

D) *Translocación TCF3/PBX1*: Se detectó esta translocación en 13/130 (10%) del total de pacientes analizados, mostrando la mayoría de las muestras positivas una banda con un tamaño aproximado de 289 pb (9/13), mientras que 4/13 pacientes positivos mostraron una banda de 200 pb aproximadamente. De las 13 muestras de pacientes positivos, 8/13 (61,5%) fueron del sexo masculino, mientras que 5/13 (38,5%) fueron del sexo femenino. Todos los pacientes positivos encontrados en este estudio para esta translocación pertenecen al grupo pediátrico con edades comprendidas entre 3 y 13 años con un promedio de edad de 6 años.

Post-secuenciación se observó que la porción de la secuencia que fue reconocida correspondió al exón 3 del gen *PBX1*. Destacando que el cebador con el que se envió a secuenciar fue el correspondiente al gen *TCF3* en segunda ronda (*TCF3.2*), el cual se encuentra ubicado en el exón 14 del gen *TCF3*. Por lo tanto, se dedujo que la ausencia de región perteneciente al gen *TCF3* en la secuencia de los pacientes positivos para la translocación *TCF3/PBX1*, pudo deberse a que el cebador (*TCF3.2*) con el cual fueron enviadas a secuenciar estas muestras, se encuentra ubicado a solo 7 bases nucleotídicas del extremo 3' del exón 14. Por lo que, al encontrarse cercano al final del exón había pocas probabilidades de detectar parte de

la secuencia del gen *TCF3*. De esta manera, la posición del punto de corte para las muestras positivas para esta alteración, estuvo ubicado entre el exón 14 del gen *TCF3* y 7 el exón 3 del gen *PBX1*.

E) Alteraciones en el gen *FLT3*: Para el análisis de detección de las duplicaciones internas en tándem (ITD), se evaluaron 54 pacientes, donde se pudo detectar duplicaciones internas en tándem (ITD) en 8/54 (14,8%) de los pacientes, de los cuales 5/8 (62,5%) de ellos fueron positivos para la translocación *MLL/AF4*. Dentro de este grupo, también se encontraron pacientes positivos para la translocación *ETV6/RUNX1* 1/5 (20%); translocación *TCF3/PBX1*2/5 (40%) y pacientes con la translocación *BCR/ABL*12/5 (40%), las cuales estuvieron en conjunción con el transcrito *MLL/AF4*. Los otros 3/8 pacientes positivos ITD no presentaron ninguna de las alteraciones moleculares aquí evaluadas. Asimismo, 5/8 (62,5%) pacientes ITD positivos fueron del sexo masculino y 3/8 (37,5%) fueron del sexo femenino, en donde la edad promedio fue de 10,8 años, presentándose un adulto (12,5%) con una edad de 56 años y siete niños (87,5%) con edades desde 0 hasta 10 años. Por otra parte se destaca que, la mayoría de los pacientes positivos para las mutaciones ITD/*FLT3* presentaron un alto porcentaje de blastos linfoides (datos no mostrados) en comparación con los valores normales.

Ninguno de los pacientes analizados para la mutación D835 en el exón 20 del gen *FLT3* presentó el patrón mutado, concluyendo así, que entre los pacientes evaluados para esta mutación no hubo heterocigotos.

F) Alteraciones en el gen *PAX5*: 12/24 (50%) de las muestras evaluadas para la mutación P80R, presentaron un patrón de heterocigosis para dicha mutación. En el análisis de secuencia de estas muestras se observó que

ninguna presentó la mutación P80R, sin embargo, dos de las muestras evaluadas presentaron una sustitución de la base C por T en la posición 686 de la hebra transcrita, conduciendo a un codón TCT que sustituye al codón CCT en el ARNm, el cual codifica al aminoácido Serina en lugar de Prolina, dando origen a la mutación P80S. Adicionalmente, uno de estos dos pacientes presentó una deleción del triplete AGC el cual codifica para el aminoácido serina en posición 77 de la proteína (Panel A-Figura 2).

A su vez, se observó en uno de los pacientes positivos para la mutación P80S, la presencia de dos mutaciones silenciosas (la ubicación de estas mutaciones están señaladas con flechas de color verde en el panel A de la Figura 2). Así se tiene para este paciente, el triplete GGC en lugar de GGA generando el aminoácido Glicina en posición 76 de la proteína, y el triplete ATA en lugar de ATT generando el aminoácido Isoleucina en posición 83 de la proteína en ambos casos. Por su parte, en el panel B de la Figura 2 se pueden observar las diferencias en la secuencia que presentan las muestras de los pacientes en comparación con la proteína tipo silvestre (wt-wild type) y con la proteína que se genera por la mutación reportada en la bibliografía (mutación P80R).

Es importante resaltar que en ambos pacientes (C y D), además de la mutación puntual presente en el gen *PAX5*, también presentaron positividad para otras de las alteraciones evaluadas (Tabla 3).

En otro orden de ideas, se evidenció mediante el uso de la herramienta bioinformática SIFT, que la mutación P80S es considerada perjudicial para el funcionamiento de la proteína *PAX5* (ENSP00000350844), asimismo, el uso de PROVEAN permitió evidenciar que la deleción S77del es considerada perjudicial para el funcionamiento de la proteína *PAX5*.

Tabla 3. Coexistencia de alteraciones moleculares

Paciente	Alteraciones Moleculares	Edad (años)	Sexo
A	ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1	4	M
C	BCR/ABL variante p210; P80S (PAX5)	34	F
D	MLL/AF4; ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1, ITD FLT3; P80S (PAX5)	3	M
F	ETV6/RUNX1; BCR/ABL variante p190	66	F
G	ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1	8	M
H	TCF3/PBX1; BCR/ABL variante p190	4	F
I	MLL/AF4; BCR/ABL variante p210	12	M
J	MLL/AF4; BCR/ABL variante p190	2	F
K	MLL/AF4; BCR/ABL variante p190 y p210; ITD FLT3	10	M
L	MLL/AF4; TCF3/PBX1; ITD FLT3	5	M
M	MLL/AF4; ITD FLT3	5	F
N	MLL/AF4; BCR/ABL variante p190	11 meses	F
O	MLL/AF4(previo); BCR/ABL variante p190; ITD FLT3	3 meses	M

DISCUSIÓN

La leucemia linfocítica aguda sigue siendo la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes, aunque la tasa de supervivencia se ubica en casi el 90% (Conter *et al.*, 2010; Pui *et al.*, 2011). Las muestras biológicas utilizadas para el diagnóstico de la LLA en la mayoría de los casos, están compuestas por múltiples clones con distintas alteraciones genéticas, lo cual puede influir categóricamente en la respuesta a tratamiento, y a su vez en el riesgo de reaparición del cuadro leucémico (Mullighan *et al.*, 2008). Se ha determinado que tanto en pacientes pediátricos como en pacientes adultos, el proceso de transformación es usualmente iniciado por una translocación cromosomal, creando un gen de fusión con una actividad aberrante. Algunos de estos genes de fusión pueden interferir en el nivel transcripcional (*MLL/AF4*, *ETV6/RUNX1*, *E2A/PBX1*), mientras que otros pueden activar rutas de señalización que promueven la oncogénesis (*BCR/ABL1*) (Mullighan *et al.*, 2008).

Algunos investigadores consideran que estas alteraciones cromosómicas son un epifenómeno del proceso oncogénico sin relación con su causa. Sin embargo, este criterio cambió completamente cuando, mediante las técnicas de biología molecular, se puso en evidencia la existencia de genes específicos comprometidos en las translocaciones cromosómicas presentes en la mayor parte de las leucemias y que son activados por la alteración (Pui *et al.*, 2011).

En nuestro estudio se observó un predominio de pacientes de sexo masculino tanto incluidos en el estudio, como con presencia de alteraciones moleculares, lo que es similar a lo reportado en la bibliografía (Pui *et al.*, 2015). Aunque el sexo y la etnia no son utilizados en la estratificación de riesgo, tienen importancia pronóstica. De hecho, se ha determinado que el sexo masculino presenta peor pronóstico en comparación con el sexo femenino (Hunger *et al.*, 2012).

Son innumerables las investigaciones que han permitido conocer el espectro de frecuencia con la que se presenta esta patología en distintas partes del mundo, lo que ha permitido a su vez ampliar tanto el conocimiento que se tiene sobre la enfermedad, así como también establecer comparaciones entre las distintas poblaciones donde se ha reportado su incidencia. En el presente estudio se realizó la determinación de las alteraciones genéticas utilizando diferentes tipos de PCR en muestras de 130 pacientes con diagnóstico clínico de leucemia linfocítica aguda, en donde 56 de estos pacientes tuvieron una o varias alteraciones genéticas. Las alteraciones moleculares que identificamos en orden de frecuencia fueron: *t(9;22)(q34;q11)*, *t(12;21)(p13;q22)*, *t(11;19)(q23;p13.3)* y *t(4;11)(q21;q23)* además de mutaciones en el gen *FLT3* y *PAX5*, en su mayoría relacionadas con mal pronóstico. A pesar de nuestro pequeño tamaño de muestras, los datos aquí obtenidos nos indican la

importancia que representa la identificación en forma rutinaria de todas estas alteraciones.

Hasta el momento son pocas las publicaciones que han reportado coexistencia de transcritos en pacientes con LLA. La coexistencia de alteraciones se ha visto con mayor frecuencia entre las translocaciones *BCR/ABL* y *TCF3/PBX1* (Jiménez Morales *et al.*, 2008; Devaraj *et al.*, 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 3) indican una alta frecuencia de coexistencia de alteraciones genéticas en pacientes venezolanos 13/130 (10%). La información aquí obtenida aporta datos relevantes en cuanto a la heterogeneidad clonal y la diversidad de cambios presentes en pacientes LLA y a su vez aporta una idea en lo que respecta a los efectos que cada una de estas alteraciones podría ejercer a nivel de las células linfoides y a nivel de la hematopoyesis en general.

La frecuencia del gen de fusión *ETV6/RUNX1* en este estudio (11,5%), estuvo por debajo de lo reportado en gran parte de la literatura (25%) (Pui *et al.*, 2008). Sin embargo, trabajos realizados en México (7,2%) (Guerra *et al.*, 2016) y Tailandia (4,2%) (Limsuwanachot *et al.*, 2016), también han reportado porcentajes más bajo de lo frecuente. Aunque la mayoría de las publicaciones asocian esta alteración con un pronóstico favorable, particularmente en la población pediátrica, existen estudios que demuestran lo contrario; de hecho, hay evidencia que la presencia de anomalías cromosómicas secundarias tales como la delección del alelo *ETV6* no translocado, la duplicación del cromosoma 21, alteraciones genéticas submicroscópicas en los genes *EBF1*, *PAX5*, *BTLA*, *NR3C1*, *TOX*, *BMF*, *TBL1XR1* y *BTG1*, influirían adversamente en el curso clínico de los pacientes *ETV6/RUNX1*⁺ (Mullighan *et al.*, 2008). Varios de los genes antes mencionados están asociados con la resistencia a drogas y a casos de recaída en pacientes con LLA *ETV6/RUNX1*⁺ (Lindqvist *et al.*, 2015).

Comparando la frecuencia obtenida en la población venezolana para el oncogén *BCR/ABL1* con lo observado en otros países, podemos decir que tenemos una frecuencia alta de presentación de este oncogén (específicamente la variante p190 fue la que se presentó con mayor porcentaje), particularmente tomando en cuenta que la mayor parte de la población estudiada estuvo conformada por pacientes pediátricos (Limsuwanachot *et al.*, 2016; Carranza *et al.*, 2013). De manera interesante, se lograron detectar pacientes que presentaron ambas variantes al mismo tiempo (p190 y p210), todos pertenecientes a la población pediátrica. Este último hallazgo es de relevancia para nuestra población, ya que la conjunción de ambas variantes ha sido observada con mayor frecuencia en pacientes con leucemia mieloide crónica (Ayatollahi *et al.*, 2018), además de que nos conduce a no restringir la identificación del gen de fusión *BCR/ABL1* en pacientes LLA, solo a la variante p190 por ser la más común.

Por otra parte, el porcentaje de presentación de mutación es ITD en el gen *FLT3* en concordancia con la presencia del oncogen *MLL/AF4* en varios de los pacientes incluidos en este estudio, se correlacionan con lo establecido en la bibliografía donde se ha indicado la estrecha relación entre la expresión alterada del gen *FLT3* y las alteraciones en *MLL*. También se ha observado la actividad aumentada de *FLT3* en conjunción con otros genes de fusión t(12;21) *ETV6/RUNX1* y t(9;22) *BCR/ABL1* (Chillon *et al.*, 2012) (Tabla 3). Otro estudio ha resaltado que la asociación de mutaciones en *FLT3* conjuntamente a alteraciones en el gen *MLL*, se presentan en pacientes con diagnóstico de leucemias bifenotípicas, las cuales cursan con leucocitosis alto porcentaje de blastos en médula ósea y mal pronóstico (Xu *et al.*, 2005). La expresión alterada de *FLT3* puede predecir el pronóstico de las LLA t(4;11)⁺, generando respuestas negativas, evidenciadas por una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más corta. Este impacto de pronóstico negativo en los pacientes LLA portadores de tales mutaciones en dicho gen, viene dado a que la presencia de mutaciones (*FLT3*/ITD) genera activación constitutiva del receptor *FLT3* y puede desempeñar un papel en la supervivencia o la proliferación de blastos leucémicos (Woo *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2012). Lo anteriormente dicho sugiere que la vigilancia constante del perfil de expresión de *FLT3* en pacientes LLA, podría conducir a un mejor seguimiento en relación con el protocolo de terapia.

Montes *et al.* (2014) modelaron el efecto de *FLT3* en células de sangre de cordón humano (CD34) transducidas con *MLL/AF4* y un *FLT3* mutado. Observaron que, aunque los ratones no desarrollaron leucemia, se presentó una expansión transitoria de las células de la sangre del cordón CD34 que expresaban *MLL/AF4* tras la activación de *FLT3*.

Por su parte, la mutación P80S encontrada en el gen *PAX5* se clasificó como una mutación con cambio de sentido (*missense mutation*), cuya sustitución de una única base genera un nuevo codón el cual codifica un aminoácido diferente, generando alteración de la estructura proteica, que viene dada por sustitución de un aminoácido no polar por un aminoácido polar, que puede establecer enlaces de hidrógeno con el agua, atenuación de la capacidad de unión al ADN y de la actividad de transactivación por la ubicación tanto de la mutación P80S como de la delección S77del en el dominio *paired* (este dominio puede funcionar como activador o represor de la transcripción) de la proteína (Woo *et al.*, 2014).

Aunque las características clínicas, tales como el tipo de leucemia, edad, alta carga tumoral, infiltración al SNC, entre otras, han sido tradicionalmente usadas para estimar el pronóstico de los pacientes, las alteraciones genéticas específicas ofrecen una forma más directa y quizá más segura para determinar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la detección

eficiente de fusiones génicas es de importancia crítica para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo después del tratamiento. Además, se recomienda el uso de metodologías más sensibles como la PCR en tiempo real, análisis por microarreglos, identificación de SNPs (Pui *et al.*, 2015), tecnologías como la secuenciación de genoma completo de siguiente generación (GWAS) y NGS, de tal manera que se permita establecer un diagnóstico certero y oportuno, además de contribuir al desarrollo de fármacos dirigidos a inhibir la función de proteínas oncogénicas y al diseño de esquemas de tratamiento específicos que permitan mejorar la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y disminuir las probabilidades de desarrollar efectos colaterales o resistencia a drogas antineoplásicas. De tal forma que la leucemia debe ser considerada y por ende, tratada como una enfermedad compleja (Pui *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Mediante el uso de protocolos modernos de tratamiento en la LLA, se ha logrado mejorar hasta 80% la sobrevida libre de enfermedad, estos logros se deben principalmente al uso de terapias basadas en el riesgo, lo que implica dar un tratamiento con una intensidad específica para cada paciente en función del riesgo de recaída; de esta manera los pacientes no son subtratados ni sobretatados, lo cual disminuye los efectos colaterales y por lo tanto aumenta las probabilidades de curación. Sin embargo, en Venezuela la clasificación de riesgo de los pacientes con LLA con base a las características moleculares es aún limitado. Este trabajo presenta un panorama general de la frecuencia de las anomalías genéticas más comunes descritas en otras poblaciones, y aunque hasta el momento no ha sido posible determinar el valor pronóstico de ellas en los pacientes venezolanos, estamos encontrando datos interesantes con respecto a la frecuencia de las alteraciones moleculares más relevantes en pacientes con LLA, lo cual plantea la urgente necesidad de realizar, tanto estudios multidisciplinarios en el que se aplique la combinación de herramientas citogenéticas y moleculares, como la necesidad de poner en práctica la aplicación de tecnologías moleculares más avanzadas de forma rutinaria, que permitan conocer las características genéticas de la LLA en los pacientes venezolanos, para desarrollar un algoritmo de diagnóstico que conduzca a una mejor clasificación genética de los pacientes por estratificación de riesgo, y por ende conlleven al desarrollo de mejores esquemas de tratamiento.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La limitación de este estudio está relacionada con el diseño descriptivo y observacional. Sin embargo, es la

base para iniciar un estudio en el que se busque la asociación de las alteraciones citogenéticas con las características clínico-biológicas de la enfermedad a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev F., Rivera Luna R., Roitenburd Belacortu V., Espinosa Aguirre J. (2000) Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch. Med. Res.* 31: 526-531.
- Armstrong S.A., Kung A.L., Mabon M.E., Silverman L.B., Stam R.W., den Boer M.L. (2003) Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell.* 3 (2): 173-183.
- Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B., Pieters R., den Boer M.L. (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* 30 (1): 41-7.
- Ayatollahi H., Keramati M.R., Shirdel A., Kooshyar M.M., Raiszadeh M., Shakeri S. (2018) BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran. *Caspian J. Intern. Med.* 9 (1): 65-70.
- Capote L. (2012) Perfil epidemiológico y control del cáncer en Venezuela. *Academia Nacional de Medicina* 4 (44).
- Carranza C., Granados L., Morales O., Jo W., Villagran S., Tinti D., Villegas M., Antillón F., Torselli S., Silva G. (2013) Frequency of the ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, TCF3-PBX1 and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations. *Cancer Genet.* 206 (6): 227-32.
- Chillon M.C., Gomez Casares M.T., López Jorge C.E., Rodriguez Medina C., Molines A., Sarasquete M.E., Alcoceba M., Miguel J.D.G.S., Bueno C., Montes R., Ramos F., Rodríguez J.N., Giraldo P., Ramírez M., García Delgado R., Fuster J.L., González Díaz M., Menéndez P. (2012) Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germlineacute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26 (11): 2360-2366. doi:10.1038/leu.2012.161.
- Chomczynski P., Sachi N. (1987). Single step method of RNA isolation by aid guanidiniumthiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Conter V., Aricò M., Basso G., Biondi A., Barisone E., Messina C. (2010) Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24 (2): 255-64. doi: 10.1038/leu.2009.250.
- Devaraj P.E., Foroni L., Kitra Roussos V., Secker Walker L.M. (1995) Detection of BCR-ABL and E2A-PBX1 fusion genes by RT-PCR in acute lymphoblastic leukaemia with failed or normal cytogenetics. *Br. J. Haematol.* 89 (2): 349-55.
- Díaz Beveridge J., Urtasun Aparicio R. (2003) Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. *An. Med. Interna (Madrid)* Vol. 20 (5): 257-268.
- Globocan (2012) Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012 <http://www-dep.iarc.fr> (referencia electrónica).
- Guerra Castillo F.X., Ramos Cervantes M.T., Rosel Pech C., Jiménez Hernández E., Bekker Méndez V.C. (2016) PCR detection of relevant translocations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 54 (3): S302-S308.
- Hunger S.P., Lu X., Devidas M., Camitta B.M., Gaynon P.S., Winick N.J. (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* 30 (14): 1663-9.
- Jiménez Morales S. (2002) Caracterización molecular de la leucemia aguda linfoblástica infantil. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
- Jiménez Morales S., Miranda Peralta E., Saldaña Álvarez Y., Pérez Vera P., Paredes Aguilera R., Rivera Luna R. (2008) BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: Prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk. Res.* 32 (10): 1518-22.
- Kang H., Wilson C.S., Harvey R.C. (2012) Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 119: 1872-1881.
- Landolfi C., Corredor M., Fernandez I., García R., González S., Latuff J., Rodríguez P., Tersek Y., Tovar E., Urdaneta B., Acosta M., Araujo C., Catalayud J., Collazo M., Costa M., Cova J., DiStefano M., Díaz M., Duerto M., García R., González L., López J., Lugo I., Mejía M., Pachano S., Ramírez F., Rojas V., Salazar E., Salazar M., Sánchez M., Sánchez P., Vizcaíno J., Zavastra M., Chacín M., Gross A., Oliveros A., Prado A., Travieso B., Aponte B., Castro Y., Cedres S., Deninzon L., Mendoza F., Ramírez R., Soto A. (2013) I Consenso Venezolano sobre leucemia aguda de la infancia y adolescencia. Sociedad Venezolana de Hematología.
- Limsuwanachot N., Siriboonpiputtana T., Karntisawiwat K., Chareonsirisuthigul T., Chuncharunee S., Rerkamnuaychoke B. (2016) Multiplex RT-PCR Assay for Detection of Common Fusion Transcripts in Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia Cases. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17 (2): 677-84.
- Lindqvist C.M., Nordlund J., Ekman D., Johansson A., Moghadam B.T., Raine A. (2015) The mutational landscape in pediatric acute lymphoblastic leukemia deciphered by whole genome sequencing. *Hum. Mutat.* 36: 118-128.
- Montes R., Ayllon V., Prieto C., Bursen A., Prella C., Romero Moya D. (2014) Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells. *Leukemia* 28 (3): 666-674. doi:10.1038/leu.2013.346.
- Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X., Ma J., Miller C.B., Shurtleff S.A. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322 (5906): 1377-80. doi: 10.1126/science.1164266.
- Pulte D., Gondos A., Brenner H. (2009) Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st Century. *Blood* 113 (7): 1408-11.
- Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J. Clin. Oncol.* 29 (5): 551-65.
- Pui C.H., Robison L.L., Look A.T. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-43.
- Pui C.H., Yang J.J., Hunger S.P., Pieters R., Schrappe M., Biondi A. (2015) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* 233 (27): 2938-48.
- Smith M.A., Ries L.A., Gurney J.G. (1999) Leukemia. In: Ries L.A., Smith M.A., Gurney J.G. (Eds.) *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. NIH Pub. N° 99-4649., pp. 17-34. Also available online. Last accessed October 19, 2010.
- Stam R.W., den Boer M.L., Schneider P., Nollau P., Horstmann M., Beverloo H.B. (2005) Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106 (7): 2484-90.
- Teitell M.A., Pandolfi P.P. (2009) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu. Rev. Pathol.* 4: 175-98.
- Tirado L., Mohar A. (2007) Epidemiología de las Neoplasias Hematológicas. *Rev. Inst. Nal. Cancerol.* 2: 109-120.
- Villalta D., Sajo Castelli A.M., Ovalles P. (2019) Pronósticos de la mortalidad e incidencia de cáncer en Venezuela año 2019. Sociedad Anticancerosa de Venezuela.

- Wiemels J. (2012) Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem. Biol. Interact.* 196: 59-67.
- Woo J., Alberti M., Tirado C. (2014) Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental Hematology & Oncology* 3: 16.
- Xu B., Li L., Tang J.H., Zhou S.Y. (2005) Detection of FLT3 gene and FLT3/ITD mutation by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Di Yi Jun Yi Da XueXueBao* 25 (10): 1207-10.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la Beca “Misión Ciencia” para estudios de postgrado y Fonacit Venezuela (proyecto G2001000784) por su apoyo financiero. A los Doctores y asistentes de los distintos centros hospitalarios por su colaboración y disposición en la obtención de muestras e historias clínicas de los pacientes, lo cual hizo posible la realización de esta investigación.



ALTERNATIVELY POLYADENYLATED CALPASTATIN TRANSCRIPTS IN BOVINE MUSCLES



TRANSCRIPTOS ALTERNATIVAMENTE POLIADENILADOS DE CALPASTATINA EN MÚSCULOS DE BOVINO

Casale M.F.¹, Silvestro C.¹, Corva P.M.², Soria L.A.¹

¹ Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Cátedra de Genética,
Buenos Aires, Argentina.

² Universidad Nacional de Mar
del Plata, Facultad de Ciencias
Agrarias, Departamento
de Producción Animal, Buenos
Aires, Argentina.

Corresponding author:
Liliana A. Soria
Isoria@fvvet.uba.ar

ORCID 0000-0001-7402-4943

Cite this article as:

Casale M.F., Silvestro C., Corva
P.M., Soria L.A. 2020. ALTERNATIVELY
POLYADENYLATED CALPASTATIN
TRANSCRIPTS IN BOVINE MUSCLES.
BAG. Journal of Basic and Applied
Genetics XXXI (1): 45-51.

Received: 09/30/2019

Revised version received: 03/05/2020

Accepted: 04/30/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.05

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

Calpastatin activity has a key role in the tenderization process that occurs during *post-mortem* storage of meat under refrigerated conditioning. The regulation of calpastatin (*CAST*) expression is highly complex, the gene has four putative promoters and at least three different polyadenylation sites, and it is also alternatively spliced. We investigated the presence of alternative polyadenylation (APA) isoforms of *CAST* transcripts in three muscles (*infraspinatus*, *triceps brachii* and *semitendinosus*) of two bovine breeds (Angus and Brahman). The 3' RACE-PCR was used to specifically amplify the different APA sites. The amplified fragments were cloned and sequenced. Sequencing confirmed the existence of three expected polyadenylation sites corresponding to short, medium and long polyadenylated transcripts. Also, transcripts with a novel APA site were found in the three muscles of both breeds. Because the same APAs isoforms were found between muscles and breeds, we could hypothesize a possible contribution to the relative abundance of different isoforms, probably in coordination with promoter preference and alternative splicing. This knowledge would be useful in the design of future experiments to analyze differential expression of *CAST* isoforms and their contribution to the definition of beef tenderness.

Key words: Beef cattle, Alternative polyadenylation, 3' RACE-PCR

RESUMEN

La actividad de la calpastatina tiene un rol clave en el proceso de tiernización *postmortem* de la carne durante su almacenamiento refrigerado. La regulación de la expresión de calpastatina (*CAST*) es altamente compleja; el gen tiene cuatro potenciales promotores, diferentes sitios de poliadenilación de transcritos y también *splicing* alternativo. En este trabajo se investiga la presencia de isoformas de transcritos de *CAST* alternativamente poliadenilados (APA) en tres músculos (*infraspinatus*, *triceps brachii* y *semitendinosus*) de dos razas bovinas (Angus y Brahman). Se utilizó la técnica de 3' RACE-PCR para amplificar específicamente los diferentes sitios APA. Los fragmentos amplificados fueron clonados y secuenciados. La secuenciación confirmó la existencia de tres sitios de poliadenilación conocidos. Un nuevo sitio APA fue identificado en transcritos de los tres músculos y en ambas razas. Dado que cualitativamente no hubo variación en la presencia de isoformas definidas por APA entre músculos y razas de terneza contrastante, podría hipotetizarse una posible contribución a la abundancia relativa de distintas isoformas, probablemente en forma coordinada con la elección de promotores y el *splicing* alternativo. Este nuevo conocimiento podría ser de utilidad para el diseño de experimentos de análisis de expresión diferencial de isoformas de calpastatina, para ponderar la contribución de las mismas a las variaciones en terneza de la carne.

Palabras clave: Bovinos para carne, Poliadenilación alternativa, 3' RACE-PCR

INTRODUCTION

The calpain/calpastatin system is an endogenous, calcium-dependent proteinase system. Calpain is involved in the breakdown of protein myofibrils; calpastatin inhibits calpain activity and, therefore, partially regulates *postmortem* proteolysis in muscle (Koochmarai *et al.*, 1996). This enzyme complex affects some meat quality traits; particularly it plays an important role in meat tenderization (Shackelford *et al.*, 1995). *Bos indicus* breeds (*e.g.* Brahman) are well known for their higher calpastatin activity in muscle, which inhibits protein degradation and results in tougher beef (Whipple *et al.*, 1990; Pringle *et al.*, 1997).

The bovine calpastatin (*CAST*) gene consists of 35 exons spanning at least 130 kb on chromosome 7 (Bishop *et al.*, 1993; Raynaud *et al.*, 2005a). Four alternative promoters direct the expression of four different transcripts isolated from different tissues, named Type I, II, III, and IV, which differ in their 5' ends (Raynaud *et al.*, 2005a). Moreover, differences in transcript length can also be originated by alternative polyadenylation sites and alternative exon splicing (Cong *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2005b; Natrass *et al.*, 2014).

The polyadenylation (poly A) reaction of mammalian pre-mRNAs proceeds in two stages: first the cleavage of pre-mRNA and then the addition of poly(A) tail to the newly formed 3' end. Polyadenylation is important for translation efficiency, stability, and cellular localization of mature mRNA (Elkon *et al.*, 2013). Many eukaryotic genes contain more than one polyA (pA) site, leading to the generation of distinct mRNA isoforms from the same gene through alternative polyadenylation (APA) (Tian *et al.*, 2017). The APA sites of *CAST* are located in the 3' untranslated region (3'UTR), leading to alternative transcripts, all with the same coding frame but with variable 3'UTRs (called UTR-APA). It should be noted that although the UTR-APA isoforms do not affect the coding frame, they might lead to changes in mRNA half-life or translation efficiency, since longer 3'UTRs can have more microRNA binding sites, more RNA-binding protein recognition sites, or altered RNA secondary structure (Millevoi and Vagner, 2010; Mayr, 2016).

Three polyadenylated variants in the 3' UTR have been described for bovine *CAST* transcripts, named: short, medium and long (Cong *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2005b).

The medium form is 789 bp longer than the short one, whereas medium and long forms differ in 1089 bp. Until now, there is no conclusive information about potential associations between promoter use and alternative polyadenylation sites. However, the type III isoform seems to be expressed in combination with all the three reported 3' UTRs (Raynaud *et al.*, 2005b).

A potential association between the relative abundance of *CAST* isoforms and beef tenderness

has been reported. Not only breed differences in beef tenderness but also among muscles of the same breed have been extensively documented (Rhee *et al.*, 2004; Calkins and Sullivan, 2007). Therefore, we took muscle samples of three muscles: *infraspinatus* (more tender), *triceps brachii* and *semitendinosus* (tougher), from a *Bos taurus* breed (Angus) and a *Bos indicus* breed (Brahman) that is known to produce consistently tougher beef compared to European breeds.

The objective of this study was to analyze the presence of APA variants of *CAST* in samples of the muscles and breeds mentioned above.

For this purpose we used the method known as "Rapid Amplification of 3'-cDNA End" (3' RACE) (Frohman *et al.*, 1988) and sequencing to detect and characterize transcripts that differ in their 3' UTR length.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Within 1 h after slaughter, muscle samples (2 g) were taken from *infraspinatus*, *triceps brachii* and *semitendinosus* of 2 Angus steers (364±17 kg final body live weight and 19 months of age on average) and 2 Brahman steers (408±12 kg final body live weight and 42 months of age on average) and stored in liquid nitrogen or at 4 °C as needed. The steers were slaughtered at two local private abattoirs: *Carnes del Salado SA* (Castelli, Buenos Aires, Argentina) and *Don Rafael SRL* (Santo Tomé, Corrientes, Argentina) for Angus and Brahman respectively. The animals were slaughtered after a 24 h rest in paddocks without feed but with access to water, according to the Handbook of Procedures for Animal Welfare of the National Service for Animal Health (*Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA*) of Argentina.

RNA isolation

Approximately 100 mg of muscle tissue pulverized in a small amount of liquid nitrogen with a cooled pestle were mixed in 1 mL of TRIzol reagent (Life Technologies Corporation, CA, USA) and homogenized with the help of a mixer (Velp Scientifica®, Usmate, MB, Italy). The supernatant (aqueous phase containing the RNA) of each homogenate was obtained according to the manufacturer's protocol. The aqueous phase was mixed with ethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and total RNA was purified with RNA Clean & Concentrator®-5 kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) as per the manufacturer's instructions. RNA quality and concentration were determined by the OD_{260/280} value (>1.7) with a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and confirmed by electrophoresis in agarose gels (0.8%)

stained with GelRed® Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA).

Reverse transcription -3' rapid amplification of cDNA ends-PCR

The 3' rapid amplification of cDNA ends or 3' RACE (Frohman *et al.*, 1988) is widely used to isolate the cDNA of unknown 3' flanking sequences. The 3' RACE technique was used to specifically amplify the different polyadenylation sites of *CAST* transcripts (Figure 1).

The oligodT used to generate the cDNA included an adapter sequence that was complementary to the *CAST* antisense primer (Table 1 and Figure 1). Two µg of RNA were used to produce first strand cDNA using 200 U of M.MLV Reverse transcriptase enzyme (Promega, Madison, WI, USA), 40 U of Recombinant Rnasin (Promega, Madison, WI, USA), 5 mM of DTT (Promega, Madison, WI, USA), 2.5 µM of oligodT-adapter (Table 1) and 10 pmoles of dNTPs (Promega, Madison, WI, USA).

Two specific sense oligonucleotides (Cast-e28 and Cast-e30) (Table 1) were designed to ensure the amplification of 3'UTRs of different length, as described by Raynaud *et al.* (2005b) and also predicted with Poly (A) Signal Miner software (Liu *et al.*, 2003).

Table 1. Oligonucleotide sequences used for cDNA synthesis (3' RACE-PCR).

Name	Sequence (5'-3')
Adapter-oligodT ₁	<u>CCCGTCGACATGTACCAGTCCAAGCTTA</u> GCGGCCGCATAGTTTTTTTTTTTTTTTTT
Cast antisense	GGGCAGCTGTACATGGTCAGG
Cast-e28 (sense)	TTCCAGTGCCGAAGCACCTAGG
Cast-e30 (sense)	AACTAGGGAGGGTCTGATATCCGAC

¹The underlined portion of the Adapter-oligodT sequence corresponds to the antisense primer sequence that was used in 3' RACE-PCR.

The different end-point PCR reactions were performed with 3µL of cDNA, 10 pmoles of antisense oligonucleotide (Cast-antisense) which hybridizes to the adapter region of the adapter-oligodT (Table 1), 10 pmoles of the corresponding sense primer (Cast-e28 or Cast-e30), 2 U of Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 2mM of Cl₂Mg and 10 pmoles of dNTPs. Cycling conditions were 94 °C 5 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min; followed by a final 2 min extension at 72 °C. Since there was no certainty about any preferences in

polyA sites among muscles or breeds, all the obtained amplicons were considered. However, special attention received the amplicons of approximately 300 bp and 1100 bp (primer Cast-e28) and 1055 bp (primer Cast-e30) which corresponds to previously described APA variants (Raynaud *et al.*, 2005b).

Amplified PCR products were observed by 1.5% agarose gel electrophoresis with GelRed® Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). Selected bands were eluted with the PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and cloned in the pGEM-T-easy system (Promega, Madison, WI, USA) and *Escherichia coli* DH5alpha competent cells according to the manufacturer's protocol. Forward and reverse sequences (using Sp6 and T7 primers) were generated from each cloned amplicon in an Applied Biosystems 3100 DNA Sequencer. These sequences were then comparatively analyzed by BLASTn and aligned to the reference genomic sequence of calpastatin (71,657 bp, Genbank accession AH014526.2) for the identification of the different polyadenylation sites.

RESULTS

The presence of alternatively polyadenylated calpastatin transcripts in three bovine muscles (*infraspinatus*, *triceps brachii* and *semitendinosus*) from two cattle breeds (Angus and Brahman) was analyzed.

The 3'RACE-PCR system was designed in order to obtain amplicons of approximately 350 bp and 1200 bp for short and medium transcripts with the Cast-e28 oligonucleotide; and 1100 bp for the long polyadenylated transcript using with the Cast-e30 oligonucleotide. In the PCR that included the forward primer Cast-e28, four intense bands (approximately 350, 400, 800 and 1200 bp) were observed on the agarose gel, whereas in sample no. 6 a product of approximately 1300 bp was also amplified (Figure 2A). Figure 2B shows two intense bands (800 and 1100 bp) obtained by PCR amplification with forward primer Cast-e30. All these bands were eluted, cloned and sequenced to confirm their identity. Positive clones of 347, 390, 1108 and 1142 bp were obtained (Figure 1). Sequencing confirmed the existence of three expected polyadenylation sites at positions 69783, 70573 and 71657 of the *CAST* reference sequence (GenBank accession AH014526.2) corresponding to short (347 bp) and medium (1142 bp) polyadenylated transcripts amplified with Cast-e28; and long (1108 bp) polyadenylated transcripts amplified with Cast-e30 (Figure 3). These results are in agreement with the APA sites reported by Cong *et al.* (1998), Raynaud *et al.* (2005b) and Natrass *et al.* (2014). Interestingly, PCR performed with Cast-e28 produced a novel APA site that was present in the three muscles of both breeds.

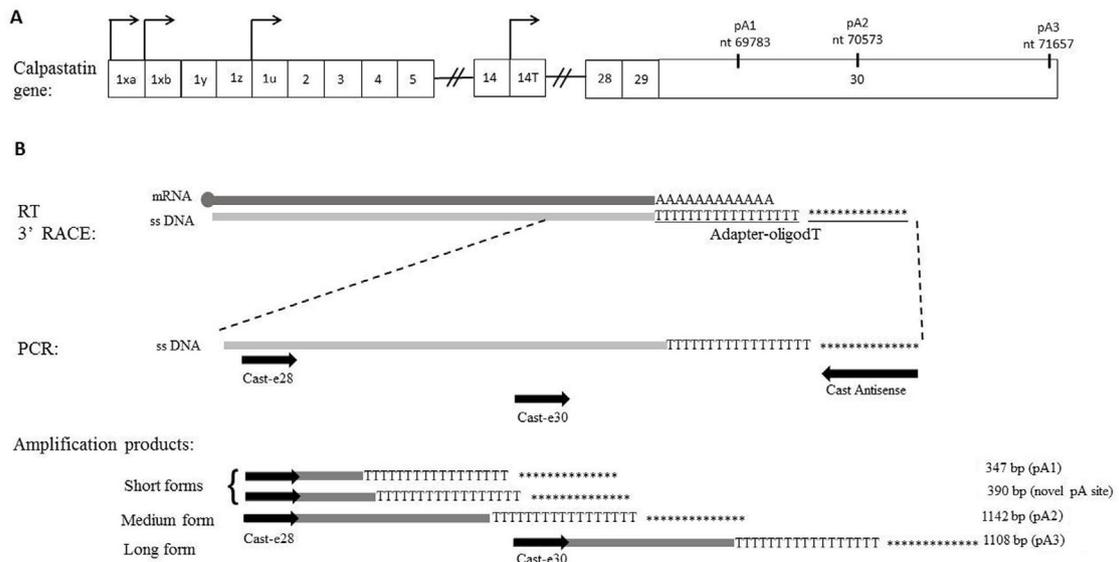


Figure 1. A. Schematic representation of calpastatin gene showing the four transcription start sites, exons and previously described polyadenylation sites (indicated as pA1, pA2 and pA3). B. Scheme of reverse transcription 3'RACE-PCR technique with the four amplification products obtained. "*****" corresponds to sequence GATACGCCGCGATTGCAACCTGACCATGTACAGCTGCC. Cast antisense primer is complementary to the adapter-oligo dT. The PCR products are aligned with their corresponding forward primer (Cast-e28 or Cast-e30).

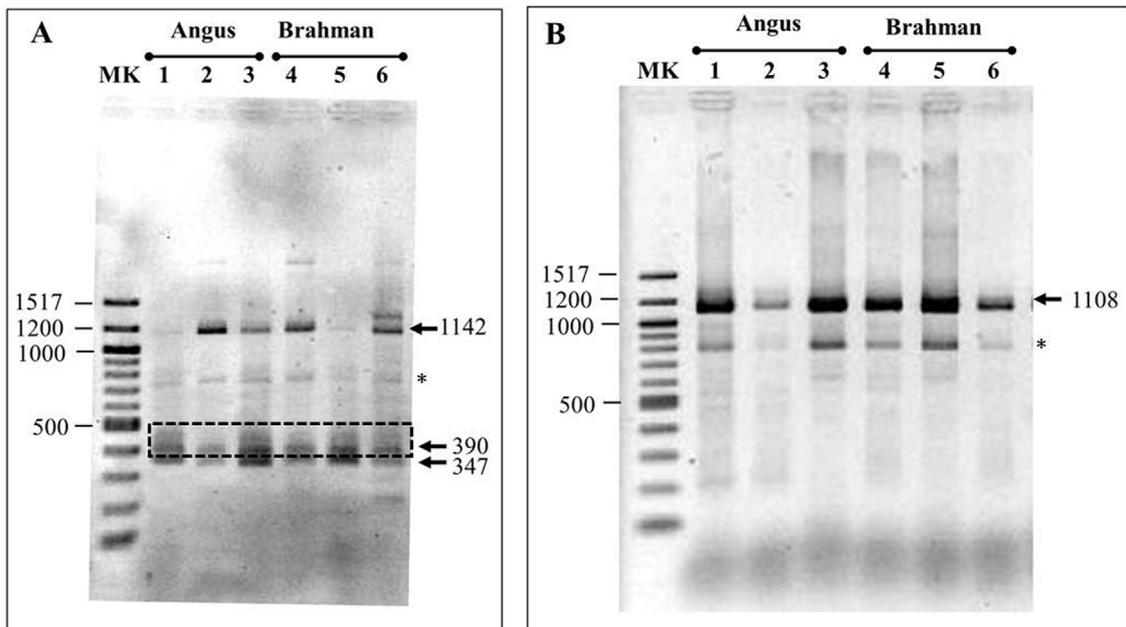


Figure 2. 1% agarose gel electrophoresis showing alternatively polyadenylated *CAST* transcripts amplified by 3' RACE-PCR, using forward primers Cast-e28 (A) or Cast-e30 (B). Staining was performed with GelRed® Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). Each line was loaded with 10 µl of the PCR. Lanes 1 and 4: *Infraspinitus*, 2 and 5: *Triceps brachii*, 3 and 6: *Semitendinosus*. MK: Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England BioLabs, Hitchin, UK). Spurious fragments are indicated with a star (*). The amplicon corresponding to a novel pA site is indicated with a box.

This APA site is located in position 69817 of the reference sequence AH014526.2 (Figure 3) and corresponds to a 390 bp amplicon (Figure 2). Sequencing determined that the 800 bp (Figure 2A and B) and 1300 bp (Figure 2A, lane 6) bands corresponded to a spurious amplicon. The

expression of the four different polyadenylated mRNA isoforms was confirmed in the 12 samples included in this study (Figure 2) and in all the samples that were analyzed for the implementation of the methodology (data not shown).



Figure 3. Sequence of the distal region of the calpastatin gene (Exons 28 to 30). Numbers on the left correspond to coordinates of reference sequence AH014526.2. Exons 28, 29 and 30 are shadowed. Non relevant parts of intron were removed and its base pairs annotated between brackets. Primers Cast-e28 and Cast-e30 are indicated with arrows. Known polyadenylation signals (pA1, pA2 and pA3) are indicated with a star (★); a circle (●) indicates a novel polyadenylation site.

DISCUSSION

There is still little information about the expression of *CAST* isoforms with different polyadenylation sites in different muscles or breeds, and its potential effects on beef quality traits. Nattrass *et al.* (2014) quantified two polyadenylation variants of *CAST* (those designated here as short and long, respectively) in the *longissimus lumborum* muscle of Angus and Brahman steers. The steers had been genotyped for the *CAST*:c.2832 A>G SNP, one of the first genetic markers for beef tenderness to be commercially available (Barendse, 2002). The findings of that study showed that a lower concentration of mRNA terminating at the proximal site (short) was significantly associated with the favorable allele for beef tenderness (A). These results supported the conclusion that *CAST*:c.2832 A>G SNP may be in linkage disequilibrium with regulatory sequences which have

a role in the post-transcriptional processing of *CAST* transcripts, leading to reduced levels of calpastatin protein in muscles of individuals carrying the favorable allele. No association between *CAST*:c.2832 A>G SNP and polyadenylated forms were found in our samples since all the samples tested were homozygous for the A allele (data not shown).

A general correlation between the level of gene expression and the relative abundance of 3' UTR isoforms have been reported (Ji *et al.*, 2011). The correspondence between APA and gene expression may be the consequence of the coupled usage of alternative promoters and polyA sites, previously reported for some genes (Costessi *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2007). Since mRNAs with short 3'UTRs are generally more stable due to avoidance of destabilizing elements binding to that region (Mayr and Bartel, 2009) and the escape from cellular mechanisms degrading long 3'UTRs (Hogg

and Goff, 2010), a comparatively higher expression of short 3'UTR isoforms would lead to a higher steady concentration of mRNA, and the opposite would also hold true.

The results reported here did not allow us to establish a connection between alternative polyadenylation of CAST and calpastatin activity. However, they show that alternative polyadenylation, probably coupled with the usage of alternative promoters, adds more complexity to the analysis of beef tenderization both between breeds and between muscles within a breed. According to Raynaud *et al.* (2005b), the type III isoform is the most abundantly expressed transcript in muscle, and it would also present polyadenylation variants.

Three known APA transcripts and a novel isoform of the bovine CAST gene were identified in three muscles that differ in tenderness, of two cattle breeds with known variation in calpastatin activity. Thus, variability in beef tenderness does not seem to be simply due to the presence or absence of a given APA form. Moreover, the biological significance and implications for muscle physiology of at least four alternative polyA sites are not well understood.

New research would be needed for the relative quantification of each isoform and the evaluation of their effects on calpastatin activity and ultimately, on beef tenderness. All known APA isoforms should be comparatively quantified in order to get a better understanding of the contribution of CAST expression to the variability in beef tenderness, both among breeds and muscles within a breed. The knowledge of the new isoform would help in the design of qPCR experiments and reinforces the concept that a complex gene such as CAST should be also evaluated through full length RNA sequencing to detect the potential associations between APA, alternative splicing and alternative promoter selection.

BIBLIOGRAPHY

- Barendse W.J. (2002) DNA markers for meat tenderness. International Patent Publication WO 02/064820.
- Bishop M.D., Koohmaraie M., Killefer J., Kappes S. (1993) Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.* 71 (8): 2277.
- Calkins C.R., Sullivan G. (2007) Ranking of beef muscles for tenderness. Beef Research in www.beefresearch.org/CMDocs>PE_Fact_Sheets (accessed March 2020).
- Cong M., Thompson V.F., Goll D.E., Antin P.B. (1998) The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* 273 (1): 660-666.
- Costessi L., Devescovi G., Baralle F.E., Muro A.F. (2006) Brain-specific promoter and polyadenylation sites of the beta-adducin pre-mRNA generate an unusually long 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* 34: 243-253.
- Elkon R., Ugalde A.P., Agami R. (2013) Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat. Rev. Genet.* 14 (7): 496-506.
- Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8998-9002.
- Hogg J.R., Goff S.P. (2010) Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 143 (3): 379-389.
- Ji Z., Luo W., Li W., Hoque M., Pan Z., Zhao Y., Tian B. (2011) Transcriptional activity regulates alternative cleavage and polyadenylation. *Mol. Syst. Biol.* 7: 534.
- Koohmaraie M. (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 43: 193-201.
- Liu H., Han H., Li J., Wong L. (2003) An Insilico method for prediction of polyadenylation signals in human sequences. *Proceedings of 14th International Conference on Genome Informatics (GIW 2003)*, pp. 84-93.
- Mayr C., Bartel D.P. (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138 (4): 673-684.
- Mayr C. (2016) Evolution and Biological Roles of Alternative 3'UTRs. *Trends Cell Biol.* 26 (3): 227-237.
- Millevoi S., Vagner S. (2010) Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res.* 38 (9): 2757-2774.
- Natrrass G.S., Café L.M., McIntyre B.L., Gardner G.E., McGilchrist P., Robinson D.L., Wang Y.H., Pethick D.W., Greenwood P.L. (2014) A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 92 (2): 443-455.
- Pringle T.D., Williams S.E., Lamb B.S., Johnson D.D., West R.L. (1997) Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. *J. Anim. Sci.* 75 (11): 2955-2961.
- Raynaud P., Jayat Vignoles C., Laforêt M.P., Levéziel H., Amarger V. (2005a) Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 437 (1): 69-77.
- Raynaud P., Gillard M., Parr T., Bardsley R., Amarger V., Levéziel H. (2005b) Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* 440 (1): 46-53.
- Rhee M.S., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M. (2004) Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *J. Anim. Sci.* 82 (2): 534-550. doi:10.2527/2004.822534x.
- Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. (1995) Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 3333-3340.
- Tian B., Manley J.L. (2017) Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (1): 18-30.
- Winter J., Kunath M., Roepcke S., Krause S., Schneider R., Schweiger S. (2007) Alternative polyadenylation signals and promoters act in concert to control tissue-specific expression of the Opitz Syndrome gene MID1. *BMC Mol. Biol.* 8: 105.
- Whipple G., Koohmaraie M., Dikeman M.E., Crouse J.D., Hunt M.C., Klemm R.D. (1990) Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 68 (9): 2716-2728.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research supported by the National Agency of Science and Technology (ANPCyT) of Argentina, Grant PICT 2014-1298. Angus and Brahman steers were provided by the Integrated Experimental Farm (Chacra Experimental Chascomús, Argentina) and a private beef cattle ranch (Don José, Virasoro, Corrientes, Argentina) respectively.

GENETIC CHARACTERIZATION THE STOCKS OF *Prochilodus magdalenae* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) USED IN STOCKING PROGRAMS IN COLOMBIA



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE REPRODUCTORES DE *Prochilodus magdalenae* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) USADOS EN PROGRAMAS DE REPOBLAMIENTO EN COLOMBIA

de la Rosa J., Fontalvo P.P., Orozco–Berdugo G., Narváez–Barandica J.C.

Grupo de investigación de
Biodiversidad y Ecología Aplicada
(GIBEA), Universidad del
Magdalena, Santa Marta, Colombia.

Corresponding author:
Paulin P. Fontalvo
paupol001@gmail.com

 ORCID 0000-0002-5860-3328

Cite this article as:

de la Rosa J., Fontalvo P.P., Orozco–Berdugo G., Narváez–Barandica J.C. 2020. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE REPRODUCTORES DE *Prochilodus magdalenae* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) USADOS EN PROGRAMAS DE REPOBLAMIENTO EN COLOMBIA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 53–63.

Received: 12/05/2019
Revised version received: 02/28/2020
Accepted: 03/30/2020

General Editor: Elsa Camadro
DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.06
ISSN online version: 1852–6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

ABSTRACT

Prochilodus magdalenae is an endemic fish species of Colombia known as an important resource of commercial interest for many communities related to fishing activities as a livelihood activity. However, population deterioration has been observed in natural environments due to factors such as overfishing, fragmentation of ecosystems, among others. This makes it necessary to characterize the genetic diversity of *P. magdalenae* in the productive systems of some fish farms, which are used to restocking in other basins of Colombia and, thus, to propose technical and scientific criteria that allow the development of management strategies for the conservation of this species. Therefore, in 2013, caudal fin tissue was collected from 1044 individuals in seven fish farms, which were processed in the laboratory. Through the use of seven microsatellites, genetic metrics such as: observed and expected heterozygosity, number of alleles, fixation indexes, F statistics, Bayesian grouping and AMOVA were evaluated. We observed low heterozygosity, correlated with inbreeding processes, which contrast with the high values obtained in the expected heterozygosity index and the number of alleles detected in *P. magdalenae* productive systems. A moderate genetic differentiation between fish centers was detected and the existence of three genetic groups was observed through the Bayesian analysis. Despite the low diversity reported regarding the others species of the same genus, populations held in Bocachico captivity have the potential to restore the diversity of wild populations. Therefore, it is suggested that each fish station should establish batches of breeders separately, based on their genetic information so that there is congruence between the released individuals and those that inhabit the natural environment.

Key words: Bocachico; Reophilic fish; Magdalena Basin; Genetic structure; Fish farms.

RESUMEN

Prochilodus magdalenae es una especie de pez endémico de Colombia conocido por ser un importante recurso de interés comercial y para muchas comunidades relacionadas a las actividades pesqueras como actividad de sustento. No obstante, se ha observado un deterioro poblacional en ambientes naturales debido a factores tales como sobrepesca, fragmentación de ecosistemas, entre otros. Esto hace necesario caracterizar la diversidad genética de *P. magdalenae* en los sistemas reproductores de algunos centros piscícolas, que son usados para hacer repoblamientos en otras cuencas de Colombia y así proponer criterios técnicos y científicos que permitan el desarrollo de estrategias de manejo para la conservación de esta especie. Por lo anterior, en el año 2013 se recolectó tejido de aleta caudal de 1044 individuos en siete centros piscícolas, que fueron procesados en laboratorio y a través del uso de siete *loci* de microsatélites se evaluaron métricas genéticas tales como: heterocigosidad observada y esperada, número de alelos, índices de fijación, estadísticos F, agrupamiento bayesiano y AMOVA. Se encontró baja heterocigosidad observada, correlacionada con procesos de endogamia, que contrastan con los altos valores obtenidos en el índice de heterocigosidad esperada y la cantidad de alelos detectados en los sistemas de reproductores de *P. magdalenae*. Se detectó una moderada diferenciación genética entre centros piscícolas y se observó la existencia de tres grupos genéticos a través del agrupamiento bayesiano. Pese a la baja diversidad reportada con respecto a otras especies del mismo género, las poblaciones mantenidas en cautiverio de Bocachico tienen potencial para restaurar la diversidad de las poblaciones silvestres. Por lo que se sugiere que cada estación piscícola debe establecer lotes de reproductores por separado, en función de su información genética para que exista una congruencia entre los individuos liberados y aquellos que habitan en el medio natural.

Palabras clave: Bocachico; Peces Reofílicos; Cuenca del Magdalena; Estructura genética; Estaciones piscícolas.

INTRODUCCIÓN

Colombia se reconoce como uno de los países con mayor abundancia en recursos hídricos en América (IDEAM, 2014). Es así como esta ventaja ecológica representa un importante núcleo tanto económico, como cultural y biológico, dada la diversidad de especies que albergan los diferentes cuerpos de agua (Jiménez-Segura *et al.*, 2010). Dentro del grupo de especies de peces que habitan en las principales cuencas hidrográficas del país, se destaca la presencia de *Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1879, conocida como Bocachico (Maldonado Ocampo *et al.*, 2005). Esta especie es endémica de los ríos Atrato, Magdalena y Sinú (Mojica *et al.*, 2012) y es importante no sólo por su rol ecológico dentro del ecosistema, sino también por representar un valioso ingreso económico para las comunidades ribereñas asociadas a la pesca como actividad de sustento.

Esta especie ha sido catalogada en estado de amenaza debido a factores tales como la sobreexplotación de recursos, disminución de la calidad del agua y/o fragmentación de hábitat (Mojica *et al.*, 2012). Problemáticas que se hacen más visibles cuando se analiza la situación de su pesquería, ya que los datos de desembarcos pesqueros han mostrado una tendencia decreciente, teniendo en cuenta que en el año de 1992 se capturaron 24870 toneladas (CCI, 2006) y en 2016 su captura no sobrepasó las 2000 toneladas (SEPEC, 2016). Cabe resaltar que menos del 50% de los individuos capturados no alcanza la maduración, ya que la pesca se hace más intensa durante su época de migración reproductiva (CCI, 2006; Martínez *et al.*, 2006). Estos factores han alterado los procesos biológicos y ecológicos de la especie a tal punto que, para mitigar el impacto sobre las poblaciones de *P. magdalenae* en la cuenca del Magdalena, se han implementado medidas tradicionales como la veda, prohibición de artes de pesca, tallas reglamentarias y los repoblamientos (Machordom *et al.*, 1999). Esta última medida busca minimizar el riesgo de extinción de la especie mediante: i) preservación del acervo genético hasta que se puedan aliviar los factores que limitan su supervivencia en medio natural; ii) incremento de la biomasa; y iii) trasladar individuos entre hábitats para la recuperación de las poblaciones frente a extinciones locales (Waples y Drake, 2004).

No obstante, las medidas implementadas no han sido suficientes y los programas de repoblamiento para la conservación de esta especie han tenido poco éxito. Estudios genéticos a nivel poblacional en el Bocachico han mostrado que la especie presenta un rango en el índice de heterocigosidad observada (H_o) entre 0,08 y 0,27 (Guevara Rincón, 2014; Orozco y Narváez, 2014; Fontalvo *et al.*, 2018). Estos datos resultan ser bajos para *P. magdalenae* cuando se comparan con la variabilidad reportada en otras especies del mismo género, endémicas de Brasil como: *Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz,

1829, que presenta un H_o de 0,56 (Galzerani, 2007) o *Prochilodus costatus* Valenciennes, 1850, cuyos valores de H_o oscilan entre 0,45 y 0,56 (Carvalho Costa *et al.*, 2008; Silva, 2011). Resultados que han sido producto de la implementación de tecnologías como las escaleras de pasos para peces, o programas de repoblamientos con base en criterios genéticos para el adecuado manejo del recurso pesquero en Brasil (Hatanaka *et al.*, 2006; Carvalho Costa *et al.*, 2008). Este contexto muestra que la baja diversidad genética observada en las poblaciones de *P. magdalenae*, también puede estar asociada al manejo inadecuado de individuos en los programas de repoblamiento que se desarrollan en los ríos Magdalena y Cauca, entre otros (Guevara Rincón, 2014; Fontalvo *et al.*, 2018). Lo anterior subyace en que los repoblamientos en Colombia no están debidamente regulados ya que se desconocen los parámetros técnicos y científicos que permitan implementar una metodología efectiva (Arrieta Echeverry, 2013). De acuerdo a Povh *et al.* (2008), la introducción descontrolada de peces en medio natural de forma inadecuada y sin criterio técnico, produce una disminución de la variabilidad genética provocando una erosión a nivel molecular en las poblaciones naturales receptoras. Adicionalmente, la traslocación arbitraria entre cuencas fomenta el rompimiento de la integridad genética de los grupos y desmejora el acervo que manejan los centros piscícolas que se encargan de los repoblamientos. Esto genera que se disminuya el tamaño efectivo poblacional de reproductores utilizados para diferentes actividades piscícolas (Machordom *et al.*, 1999). Por ello, es imprescindible implementar las estrategias necesarias para el manejo reproductivo, biológico y ambiental, que son esenciales para que los programas de reintroducción sean exitosos y restauren las poblaciones impactadas por las modificaciones ambientales.

Para que un proceso de repoblamiento sea exitoso es necesario contar con información genética proveniente de poblaciones en medio natural y de aquellas mantenidas en cautividad, que son usadas para ejecutar dichos programas en el Bocachico. Para lograr este objetivo, los marcadores moleculares más utilizados a la actualidad son los microsatélites. Estas herramientas moleculares permiten obtener información precisa de la diversidad y estructura genética de poblaciones de peces, dada su naturaleza neutral y codominante (Abdul Muneer, 2014; Aung *et al.*, 2010; Fontalvo *et al.*, 2018; Lopera-Barrero *et al.*, 2010; Orozco y Narváez, 2014; Petersen *et al.*, 2012; Povh *et al.*, 2011). Es así como a través de los microsatélites se busca analizar el estado de la diversidad y estructura genética de *P. magdalenae* en siete centros piscícolas pertenecientes a diferentes cuencas hidrográficas de Colombia. De esta manera, se espera proponer criterios técnicos para desarrollar estrategias efectivas de manejo, como aporte significativo para la conservación de los recursos ícticos en Colombia, siendo el Bocachico

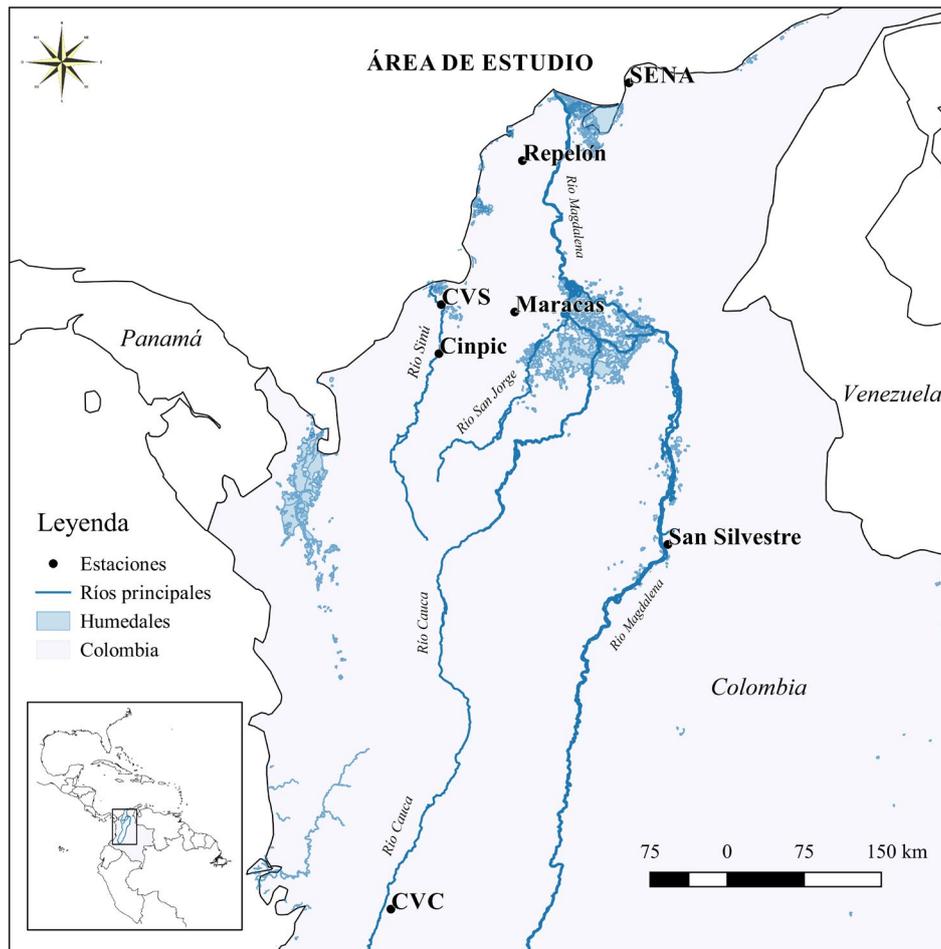


Figura 1. Ubicación de las estaciones piscícolas donde se realizó el muestreo en Colombia.

un modelo de referencia para otras especies de peces reofílicos en peligro de extinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y colección de muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo durante el año 2013 en siete centros piscícolas de Colombia, los cuales se encargan de mantener en cautividad reproductores de Bocachico. Se recolectaron en total 1044 individuos distribuidos en cada centro piscícola de la siguiente manera: 43 individuos provenientes del río San Jorge en la Estación Piscícola de Maracas (Maracas); 380 individuos provenientes del río Magdalena en el Centro Agroindustrial (Sena); 447 individuos provenientes del río Magdalena en la Estación Piscícola de Repelón (Repelón); 24 individuos provenientes del río Magdalena en la Estación Piscícola de San Silvestre (San Silvestre); 39 individuos provenientes del río Cauca en la Estación Piscícola de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC); 54 individuos provenientes del río Sinú en la Estación Piscícola de la Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge (CVS);

y finalmente en el Centro de Investigación Piscícola CINPIC (CINPIC) se recolectó tejido de 57 individuos provenientes del río Sinú (Figura 1). En cada una de las estaciones se tomaron muestras de tejido de la aleta caudal, y se fijaron en etanol al 96 % para su posterior análisis en laboratorio.

Fase de laboratorio

El ADN genómico se obtuvo siguiendo el protocolo del kit MasterPure™ (Epicentre Biotechnologies®). Se comprobó la presencia de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, en una corrida a 80 voltios durante 30 minutos y las muestras fueron teñidas con GelRed® (Biotium). Siete loci de microsatélites (Tabla 1) diseñados previamente para la especie *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837 (Rueda *et al.*, 2011), fueron utilizados mediante amplificación cruzada en *P. magdalenae* para obtener los genotipos. El proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó siguiendo la metodología de Rueda *et al.* (2011) y Orozco y Narváez (2014). El volumen final utilizado para la reacción de PCR fue de 10 µl, el cual contenía 0,25 U de Taq polimerasa, 0,2 µM de cada cebador, 200 µM de dNTPs,

Tabla 1. Descripción de microsatélites publicados por Rueda *et al.* (2011) y resultados generales obtenidos por *locus* en *P. magdalenae* en el presente trabajo.

Locus	Motivo de repetición	Secuencia del primer	T (°C)	N _A	R _A	Rango de tamaños alélicos en pb
PL3	(CA) _n	F: 5'-TCTGAGCTGTGAGGAATGGA-3' R: 5'-AGAGCGCTCAAGCACAAGAT-3'	50	17	9,619	179-211
PL14	(CA) _n	F: 5'-TGCCCAACACTGAAACTGAG-3' R: 5'-CTCATCAACCTGCCTGGAAT-3'	61	22	12,970	102-146
PL23	(CA) _n	F: 5'-TTGGCTACTTCCCCAAACAC-3' R: 5'-GGGGAAGTAGTTTGACGATGC-3'	59	18	10,409	214-248
PL28	(CA) _n	F: 5'-GAAGCTTGGGCTCTTGACAT-3' R: 5'-CGTTTGCCTCTAGCCTTTTG-3'	59	24	9,173	217-259
PL34	(CA) _n	F: 5'-GAGCGGATTCTCCACATGAT-3' R: 5'-TAATGTGCTCCCTCCCACAG-3'	56	18	8,933	180-210
PL64	(CA) _n	F: 5'-AGAGCAACACAGGGAGGAGT-3' R: 5'-ACGCTCTGCTCAGCCATACT-3'	62	16	9,208	152-190
PL119	(CA) _n	F: 5'-GAAAAAGGCTAGGGGACTGG-3' R: 5'-GAGGAAAATTGCCTTTTGTAGG-3'	58	27	14,530	151-203

F: Cebador directo; R: Cebador reverso; T (°C): Temperatura de anillamiento utilizada para amplificar los *loci* en el presente trabajo; N_A: Número de alelos; R_A: Riqueza alélica calculada mediante rarefacción con el programa FSTAT (Goudet, 1995)

2 mM de MgCl₂, 1 X de reacción buffer y 100 ng de ADN previamente cuantificados mediante espectroscopia de fluorescencia (*Qubit Fluorometric Quantitation*). Los ciclos utilizados para las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s para la temperatura de anillamiento (Tabla 1), 30 s a 72°C y una temperatura de extensión final de 72°C por 10 minutos. Se utilizó el termociclador con gradiente de temperatura ESCO-SWIFT MaxPro para llevar a cabo las reacciones.

Se utilizó el equipo de electroforesis capilar QIAxcel Advanced (QIAGEN) con el kit de alta resolución (*High Resolution Kit* QIAGEN) y la escalera de peso molecular con una concentración determinada (DNA SizeMarker 50-800 bp v2.0 QIAGEN), para obtener el tamaño de cada producto de la amplificación. Estos tamaños fueron detectados mediante el uso del programa ScreenGel QIAxcel v1.0 QIAGEN, que a su vez permitió cuantificar el peso de cada alelo y de esta manera el genotipo de cada individuo.

Análisis de datos para diversidad genética

A partir de la matriz de datos con el genotipo de cada individuo, se generaron los archivos de entrada utilizados en los análisis posteriores mediante el uso del programa MSTOOLS (Park, 2001). Para detectar la presencia de alelos nulos o de posibles errores en la genotipificación se usó el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004). El desequilibrio de ligamiento por pares de *loci* y por estación piscícola, fue comprobado usando

pruebas exactas de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) con 10000 *batches*/1000 iteraciones (Guo y Thompson, 1992) con el programa GENEPOP (Rousset, 2008). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) por *locus* y por estación piscícola, considerando la unión aleatoria de gametos como hipótesis nula (Guo y Thompson, 1992) con el programa GENEPOP (Rousset, 2008).

A nivel de *locus* se estimaron los índices de número de alelos (N_A) y rango de tamaños alélicos en pares de bases (pb) con el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006), mientras que el índice de riqueza alélica (R_A) fue calculada mediante el método de rarefacción que ofrece el programa FSTAT (Goudet, 1995). Por otro lado, a nivel poblacional en cada una de las estaciones piscícolas se estimaron los índices de diversidad correspondientes a: promedio de número de alelos (N_a), promedio de número efectivo de alelos (n_e), heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) con el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006). El coeficiente de endogamia (F_{IS}) en cada estación fue calculado con el programa FSTAT (Goudet, 1995).

Análisis de datos para estructura genética

Para estimar los valores de estructura genética entre pares de poblaciones se usó el estadístico G''_{ST} de Hedrick (Meirmans y Hedrick, 2011) con el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006). Para verificar la existencia de poblaciones diferenciadas genéticamente de *P. magdalenae* entre cuencas fluviales, se realizó un

análisis molecular de varianza (AMOVA) con el programa ARLEQUÍN 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Con esta prueba se analizó la distribución de la variabilidad genética considerando el lote de reproductores de cada centro piscícola y la cuenca hidrográfica a la que pertenece. Por esta razón, los agrupamientos se realizaron de la siguiente manera: las estaciones Sena, Repelón y San Silvestre pertenecientes al río Magdalena como el primer grupo; las estaciones CINPIC y CVS pertenecientes al río Sinú como el segundo grupo; y las estaciones CVC del río Cauca y Maracas del río San Jorge como un tercer y cuarto grupo respectivamente.

Teniendo en cuenta que el patrón migratorio de *P. magdalenae* puede implicar flujo genético entre las diferentes cuencas, es posible que esto se vea reflejado en la información genética de los reproductores de cada centro piscícola. Por ello, se realizó un análisis de agrupamiento bayesiano con el programa STRUCTURE 2.3.3 (Hubisz *et al.*, 2009), el cual permitió identificar la presencia de grupos genéticos entre las estaciones piscícolas estudiadas. En este sentido, el número de subpoblaciones K se estimó considerando 20 corridas independientes de $K = 1 - 10$, que fueron llevadas a cabo con 500000 repeticiones de MCMC y 150000 periodos de *burn-in* usando la ubicación de muestreo como *prior* de información, frecuencias de alelos correlacionados y mezcla. Estos parámetros fueron seleccionados ya que el modelo de mezcla asume la probabilidad de que un individuo pueda heredar una fracción del genoma de un antepasado en una población K , y la frecuencia de alelos correlacionados permite simular que diferentes poblaciones pueden tener frecuencias alélicas similares (Falush *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta la presencia de alelos nulos previamente reportados por el programa MICRO-CHECKER, se utilizó la opción RECESSIVEALLELES que le permite suponer al programa que el alelo recesivo no puede ser observado en estado homocigoto, aunque podría estar presente (Rico *et al.*, 2017).

Finalmente, para establecer el número de poblaciones (K) presentes, se siguió el método propuesto por Evanno *et al.* (2005). Este valor fue calculado mediante el uso del programa STRUCTURE HARVESTER 0.56.3 (Earl y VonHoldt, 2012) y fue resumido y graficado con el programa Clumpak (Kopelman *et al.*, 2015).

RESULTADOS

Diversidad genética

Todos los *loci* evaluados fueron 100% polimórficos para *P. magdalenae* en los diferentes centros piscícolas estudiados. Todas las poblaciones presentaron desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todos los *loci* ($p < 0,01$). Estas desviaciones se dieron por causa del déficit de heterocigotos observados y la identificación de alelos nulos en todos los *loci* por el

programa MICRO-CHEKER, que se refleja en los valores positivos registrados en el índice F_{IS} (Tabla 2). Un total de 142 alelos fueron reportados en las poblaciones evaluadas, siendo el *locus* PL119 el que registró mayor número de alelos con 27, mientras que el *locus* PL64 sólo detectó 16 (Tabla 1). La mayor riqueza alélica (R_A) fue reportada en el *locus* PL119 con 14,530 alelos, mientras que la menor R_A fue observada en el *locus* PL34 con 8,933 (Tabla 1).

Los resultados por estación piscícola mostraron que el menor número promedio de alelos por *locus* fue registrado en los individuos evaluados en Maracas con un total de 8,714 alelos, mientras que la estación Sena fue la que presentó mayor promedio de alelos por *locus* con 17,429. Este mismo patrón se observó en el número efectivo de alelos n_e (Tabla 2). En general, una baja heterocigosidad observada (H_o) se evidenció en las poblaciones de los siete centros piscícolas, siendo Maracas la que registró menor valor de H_o (0,109), mientras que la estación San Silvestre fue la que presentó mayor H_o (0,268). Contrario a esto, la heterocigosidad esperada (H_e) registró altos valores en general, donde la estación Sena obtuvo mayor valor de H_e (0,884), mientras que la estación CVS fue la de menor valor (0,792) (Tabla 2). Todas las poblaciones de las diferentes estaciones piscícolas presentaron valores altos de endogamia ($F_{IS} > 0,697$).

Estructura genética

El resultado de la prueba G''_{ST} de Hedrick mostró que entre los diferentes centros piscícolas hay diferenciación genética significativa, aunque no existen patrones claros en cuanto a la distribución desigual de la variabilidad genética del Bocachico. Al analizar los valores de G''_{ST} pareados en cada estación, se pueden observar fluctuaciones que van desde aquellos que presentan muy poca diferenciación genética como Repelón y San Silvestre con 0,076, hasta aquellos que presentan moderada diferenciación como CVC y CVS con 0,509 (Tabla 3).

El resultado obtenido por el análisis AMOVA mostró que, cuando se agruparon las estaciones piscícolas por cuenca de origen de los reproductores, el mayor porcentaje de variación se localizó entre individuos dentro de las poblaciones y no entre los grupos. Este resultado sugiere una falta de estructuración genética entre los grupos conformados, que se evidencia en los índices de fijación obtenidos por el análisis (Tabla 4).

Por otro lado, el resultado obtenido mediante agrupamiento bayesiano, sugirió la coexistencia de tres grupos genéticos ($K = 3$) en los siete centros piscícolas estudiados. De este modo, las poblaciones de los centros piscícolas de Maracas y CVS mostraron mayor frecuencia para el *clúster* azul oscuro, mientras que las estaciones de Repelón, San Silvestre, CVC y CINPIC presentaron mayor frecuencia para el *clúster* azul claro. Finalmente, los

Tabla 2. Parámetros de diversidad genética poblacional detectada en cada centro piscícola.

Población	N	Na	ne	Ho	He	F_{IS}
Maracas	43	8,714 (0,892)	5,526 (0,996)	0,109 (0,035)	0,795 (0,024)	0,859 (0,046)
Sena	380	17,429 (1,587)	9,422 (1,074)	0,191 (0,045)	0,884 (0,015)	0,786 (0,049)
Repelón	447	15,286 (1,769)	8,257 (1,599)	0,236 (0,055)	0,851 (0,025)	0,729 (0,060)
San Silvestre	24	11,143 (1,335)	8,149 (1,091)	0,268 (0,065)	0,864 (0,018)	0,697 (0,070)
CVC	39	11,857 (1,870)	7,463 (1,460)	0,199 (0,056)	0,837 (0,027)	0,763 (0,066)
CVS	54	10,000 (1,414)	5,808 (1,136)	0,232 (0,039)	0,792 (0,033)	0,707 (0,048)
CINPIC	57	12,000 (0,976)	7,010 (0,674)	0,181 (0,035)	0,849 (0,015)	0,788 (0,040)

N: Tamaño de muestra, Na: número promedio de alelos, ne: número promedio efectivo de alelos, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, F_{IS} : índice de endogamia, Entre paréntesis: Desviación estándar.

Tabla 3. Valores estimados de estructura genética por pares de poblaciones a partir del índice G''_{ST} de Meirmans y Hedrick (2011). Valores de G''_{ST} por debajo de la diagonal y valores de significancia por encima de la diagonal.

	Maracas	Sena	Repelón	San Silvestre	CVC	CVS	CINPIC
Maracas	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Sena	0,436	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Repelón	0,297	0,222	0,000	0,002	0,002	0,002	0,002
San Silvestre	0,234	0,119	0,076	0,000	0,002	0,002	0,002
CVC	0,401	0,313	0,317	0,298	0,000	0,002	0,002
CVS	0,333	0,409	0,383	0,266	0,509	0,000	0,002
CINPIC	0,315	0,262	0,123	0,115	0,269	0,410	0,000

El gradiente de color azul indica que: a mayor tonalidad mayor grado de estructura entre pares de poblaciones.

Tabla 4. AMOVA realizado en las estaciones Sena, Repelón y San Silvestre como el primer grupo, CINPIC y CVS como el segundo grupo y las estaciones CVC y Maracas como tercer y cuarto grupo respectivamente.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	(%) variación	*Promedio índices de fijación	p-valor
Entre grupos	76,446	0,032	1,024	F_{IS} : 0,754	<0,001
Entre poblaciones dentro de los grupos	111,046	0,106	3,368	F_{SC} : 0,034	<0,001
Entre individuos dentro de las poblaciones	4985,153	2,277	72,121	F_{CT} : 0,010	0,022
Entre individuos	701,000	0,742	23,487	F_{IT} : 0,765	<0,001

*Índices de fijación calculados para los agrupamientos realizados por cuenca hidrográfica de origen. F_{IS} : coeficiente de endogamia permutado entre individuos dentro las poblaciones; F_{SC} : coeficiente de diferenciación permutado entre individuos y poblaciones, dentro de los grupos; F_{CT} : coeficiente de diferenciación permutado entre poblaciones dentro de los grupos; F_{IT} : coeficiente de endogamia permutado entre poblaciones y entre grupos.

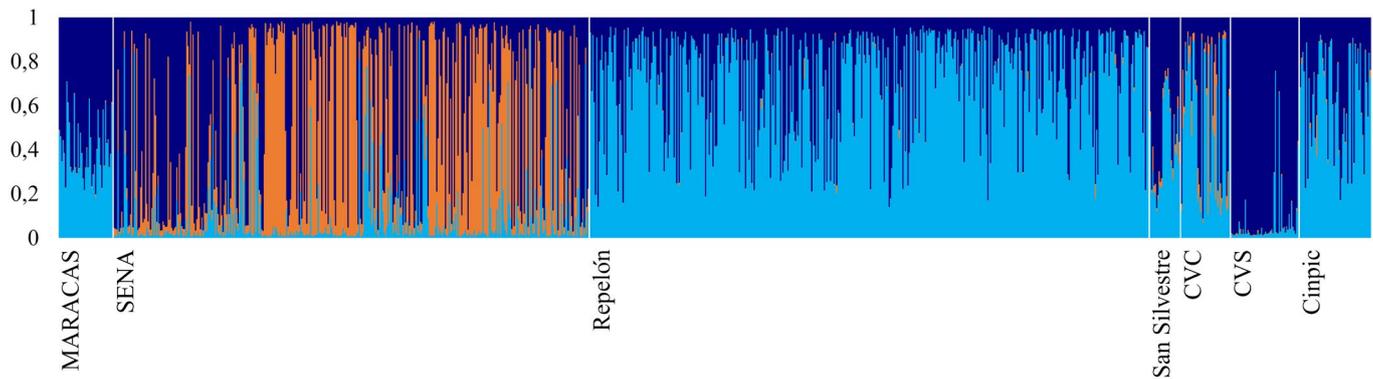


Figura 2. Estructura genética poblacional estimada con marcadores moleculares microsatélites en *P. magdalenae* a partir del agrupamiento bayesiano.

individuos de la estación Sena fueron los que tuvieron mayor mezcla entre los tres *clústeres* encontrados, con mayor representación del *clúster* naranja (Figura 2). Estos resultados muestran que no existe relación entre los grupos genéticos formados y los ríos donde fueron recolectados los individuos de cada piscícola: Maracas (río San Jorge), Sena, Repelón y San Silvestre (río Magdalena), CVC (río Cauca) CVS y CINPIC (río Sinú).

DISCUSIÓN

Diversidad genética

El éxito de los programas de repoblamiento de peces en Colombia, depende en gran medida de la variabilidad genética presente en las poblaciones analizadas, por lo que el uso de marcadores moleculares microsatélites permitió detectar con alta eficiencia los alelos presentes en cada uno de los centros piscícolas. Sin embargo, la baja variabilidad observada (H_o) y los altos valores de endogamia (F_{IS}) encontrados en las estaciones estudiadas, pueden ser resultado no sólo de factores históricos que han afectado a las poblaciones de Bocachico en medio natural. En conjunto con problemáticas como la fragmentación de hábitat (Orozco y Narváez, 2014; Fontalvo *et al.*, 2018) y la sobrepesca (Mojica *et al.*, 2012; SEPEC, 2016), se suma la selección arbitraria de individuos para el establecimiento de los sistemas de reproductores en cada centro, que ocasionaría un efecto fundador. Este último, consiste en la pérdida de variación genética cuando se conforma una población a partir de un bajo número de individuos, lo que causa altos niveles de endogamia (Caujapé Castells, 2006).

Pese a las diferentes problemáticas que experimentan las poblaciones de esta especie, se ha demostrado que la diversidad genética puede recuperarse dentro de las estaciones piscícolas, luego de un buen manejo reproductivo considerando aspectos moleculares. En este sentido, se ha documentado que las progenies

bien manejadas en el Bocachico han presentado mayor calidad genética con respecto a los parentales y esta variabilidad ha sido correlacionada positivamente con la tasa de fertilización, producción de peso y sobrevivencia (Torregroza Espinosa *et al.*, 2015). Esto sugeriría que una buena calidad genética a nivel poblacional reflejará mejores caracteres productivos en los peces seleccionados como reproductores. Por lo anterior, se considera que las poblaciones evaluadas en este trabajo son un recurso genético con alto potencial, dados los valores de heterocigosidad esperada (H_e) registrados, lo que resulta ser de vital importancia a la hora de definir criterios de selección de reproductores para los programas de repoblamiento (Lopera-Barrero *et al.*, 2015).

Los valores de heterocigosidad esperada, son explicados con base en la riqueza alélica detectada por los *loci* (8,933 - 14,530, Tabla 1), y han mostrado similitud con lo reportado para *P. magdalenae* (8,1 - 11,5) por otros autores (Santacruz, 2003; Orozco y Narváez, 2014). Sin embargo, es importante mencionar que la cantidad de individuos con que se inicia un centro piscícola, influye directamente sobre el polimorfismo de los *loci* de las siguientes generaciones (Teija *et al.*, 2006). Es fundamental que los individuos a utilizar para conformar una estación piscícola (alevines o adultos), tengan una caracterización genética previa para garantizar una buena distribución genética en las generaciones posteriores. En general se ha recomendado que los reproductores presenten una heterocigosidad entre 0,3 y 0,6 (Torregroza Espinosa *et al.*, 2015), con un límite de endogamia de 5%, considerando un número mínimo efectivo de animales de 100 en una proporción 1:1. De esta manera, se espera propender a disminuir la homogenización del acervo genético de esta especie para evitar una depresión por endogamia (Bengtsson *et al.*, 1995). Esto maximiza la necesidad de considerar aspectos genéticos y reproductivos dentro del direccionamiento

de los programas de repoblamiento, dados los riesgos del manejo inadecuado que ya se han reportado (Wasko *et al.*, 2004; Porta *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007) y que además implica necesariamente el realizar un cambio en la composición genética de las poblaciones que son mantenidas en cautividad.

Aunque se realizaron los análisis correspondientes para minimizar el impacto de los alelos nulos en las poblacionales, no se descarta que el déficit de heterocigotos observado pueda ser producto de este fenómeno, así como la desviación detectada en el EHW. Estos patrones asociados a la presencia de alelos nulos y las desviaciones en EHW, ya han sido reportados para el género *Prochilodus* (Hatanaka *et al.*, 2006; Orozco y Narváez, 2014; Fontalvo *et al.*, 2018), y resulta alarmante debido a que los reproductores evaluados presentan niveles de heterocigosis muy pobres. Esto podría ser un espejo de lo que está sucediendo en medio natural, como consecuencia de los repetidos programas de repoblamiento mal direccionados. Sin embargo, los resultados obtenidos por los diferentes índices de diversidad, muestran que estas poblaciones de Bocachico tienen gran potencial para recuperar la diversidad de las poblaciones que se encuentran habitando en medio silvestre.

Estructura genética

Mediante aproximaciones bayesianas realizadas con el programa STRUCTURE, se encontró que existen tres grupos genéticos diferenciados distribuidos entre los diferentes lotes de reproductores (Figura 2). Estos resultados fueron congruentes con lo que se ha reportado para las poblaciones silvestres de *P. magdalenae*, donde se evidencia la co-existencia de tres poblaciones genéticas en la cuenca del Magdalena (Orozco y Narváez, 2014; Fontalvo *et al.*, 2018). Dado que *P. magdalenae* es considerado un pez migratorio de larga distancia (Jiménez-Segura *et al.*, 2010; Aguirre Pabón *et al.*, 2013) sus poblaciones silvestres han experimentado una fuerte diferenciación, que ha sido detectada a través del uso de marcadores moleculares microsatélites. Dicha diferenciación ha sido atribuida a varias causas donde se destaca la presencia de barreras artificiales en toda la longitud del río (Jiménez-Segura *et al.*, 2014), que ha limitado la dispersión de la especie durante su proceso migratorio (Fontalvo *et al.*, 2018).

Este trabajo muestra que los grupos detectados no fueron genéticamente homogéneos, lo que indica que entre las estaciones existe flujo, a pesar de que los lotes de reproductores son obtenidos de diferentes ríos. Lo anterior implica que al menos un individuo recolectado en cada estación muestreada fue asignado a uno de los tres grupos. Sin embargo, este comportamiento no fue evidente en las muestras recolectadas en las estaciones piscícolas del río San Jorge (Maracas) y

Sinú (CVS y CINPIC), donde sólo fue posible identificar dos *clústeres* poblacionales. Mientras que la estación piscícola que presentó más mezcla ($K=3$) fue la del Sena, en la cual los reproductores fueron obtenidos de parte baja de la Cuenca del río Magdalena. Este aspecto tiene implicaciones importantes, debido a que esta especie usualmente necesita migrar desde las zonas de inundación más bajas de los ríos (zona de alimentación y maduración), hacia las partes altas, donde realiza el proceso reproductivo (Jiménez-Segura *et al.*, 2010; Mojica *et al.*, 2012). Por ende, la coexistencia de tres poblaciones en la parte baja de la cuenca del río Magdalena (ciénagas y cauce principal del río) (Orozco y Narváez, 2014), podría explicar la conformación genética de este lote de reproductores. Es fundamental aclarar que entre algunos lotes de reproductores existe una distancia geográfica considerable (CVC y SENA= Aprox. 1000 km), siendo los animales capturados directamente en el río Cauca y el Magdalena respectivamente. Pese a la separación entre ambas piscícolas es posible que entre las poblaciones existiese un flujo génico en el ambiente natural previo a la conformación de los lotes de reproductores, lo que explicaría su similitud genética, circunstancia confirmada con el resultado de G''_{ST} (0,313) que mostró una baja diferenciación.

Adicionalmente, estos procesos de sub-estructuración en poblaciones silvestres de Bocachico, se mantienen bajo la hipótesis de ondas reproductivas (Jorgensen *et al.*, 2005; Orozco y Narváez, 2014). Esta hipótesis plantea que, aunque las poblaciones coexisten en un mismo hábitat, el proceso de desove se realiza en tiempos diferentes. Esto hace que las estaciones piscícolas que quieran implementar programas de repoblamiento, tengan que garantizar en la conformación de sus lotes, la presencia reproductores representantes de cada uno de los grupos genéticos encontrados en cada cuenca. Este aspecto es de vital importancia debido a que puede inducir la pérdida de genes importantes en la adaptación al ambiente que limiten la capacidad de supervivencia de los organismos liberados (Sønstebo *et al.*, 2007).

Este precedente es un indicativo de que se debe respetar la integridad genética de cada cuenca, evitando eventos de reintroducción de organismos entre cuencas diferentes, ya que estudios realizados en el género, han mostrado el efecto que puede tener las malas praxis en cuanto al manejo reproductivo sobre el lote de reproductores. Lopera-Barrero *et al.* (2007) mediante el seguimiento de un programa de repoblamiento realizado con la especie *P. lineatus*, demostraron que la utilización de estrategias reproductivas incorrectas contribuyen a la baja variabilidad genética de las poblaciones de esta especie. Eventualmente Povh (2007) demostró también que la diversidad genética de poblaciones de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, en cautiverio fue menor que la de las poblaciones silvestres, por causa de un manejo reproductivo deficiente de los animales. Por

estas razones, se sugiere que el manejo reproductivo y genético de las poblaciones de Bocachico destinadas a programas de repoblamiento, no puede ser realizado de manera homogénea. Cada estación piscícola debe establecer lotes de reproductores por separado en función de su información genética para que exista una congruencia entre los organismos liberados y aquellos que habitan en medio natural.

CONCLUSIONES

Los diferentes programas de conservación, son estrategias enfocadas a la recuperación y/o protección de recursos fuertemente impactados que se encuentran bajo algún grado de amenaza. Esto sugiere que las poblaciones presentan algún tipo de riesgo para su continuidad en el ambiente natural. Sin embargo, estas estrategias muchas veces son ejecutadas sin ningún criterio técnico-científico que soporte su uso, como es el caso de los repoblamientos realizados con especies nativas (Merino *et al.*, 2013).

Con base en los hallazgos de este trabajo, se recomienda la implementación de los siguientes pasos para la aplicabilidad de esta estrategia en Colombia: i) la realización de una caracterización genética total de los lotes de reproductores y su afinidad con las poblaciones en medio natural sujetas al programa de repoblación; ii) Evitar el uso de reproductores de diferentes cuencas que pueden erosionar el acervo genético de la población receptora, con la posible eliminación de información genética valiosa para la adaptabilidad de las poblaciones; iii) Implementar lotes de reproductores por separado que respeten la integridad genética de las poblaciones halladas en medio natural; y iv) Identificar genéticamente a cada individuo (uso de microchips) dentro del lote de reproductores para darle un manejo reproductivo adecuado y dirigido, que tenga como finalidad incrementar los niveles de variabilidad genética de la población de Bocachico dentro de cada sistema de reproductores.

Finalmente, la conservación de todo el sistema ecológico donde habita la especie objetivo es necesaria para que exista un verdadero éxito en un programa de repoblamiento y no se produzcan efectos negativos en la ictiofauna del sistema. De esta forma, las medidas conjuntas de conservación de la diversidad genética y del ecosistema acuático son necesarias para que estos programas tengan éxito, y así garantizar la continuidad de los recursos ícticos en Colombia, siendo el Bocachico un modelo de referencia para otras especies de peces reofílicos en peligro de extinción.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Muneer P.M. (2014) Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International* 1: 1-14.
- Aguirre Pabón J., Narváez Barandica J., Castro García L. (2013) Mitochondrial DNA Variation of the Bocachico *Prochilodus Magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystem* 23 (4): 594-605.
- Arrieta Echeverry J. (2013) Evaluación de La Variabilidad y Estructura Genética de La Población Silvestre y Cultivada de Bocachico *Prochilodus Magdalenae* (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) en la Cuenca del río Sinú y en dos Estaciones Piscícolas del Departamento de Córdoba, Colombia. Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena, Colombia.
- Aung O., Nguyen T., Poompuang S., Kamornrat W. (2010) Microsatellite DNA Markers Revealed Genetic Population Structure among Captive Stocks and Wild Populations of Mrigal, *Cirrhinus Cirrhosus* in Myanmar. *Aquaculture* 299 (1-4): 37-43.
- Bengtsson B., Weibull P., Ghatnekar L. (1995) The Loss of Alleles by Sampling: A Study of the Common Outbreeding Grass *Festuca Ovina* over Three Geographic Scales. *Hereditas* 122: 221-38.
- Carvalho Costa L., Hatanaka T., Galetti J. (2008) Evidence of Lack of Population Substructuring in the Brazilian Freshwater Fish *Prochilodus Costatus*. *Genetics and Molecular Biology* 31 (1): 377-80.
- Caujapé Castells J. (2006) Brújula para Botánicos Desorientados en la Genética de Poblaciones. Las Palmas.
- CCI (2006) Pesca y Acuicultura: Colombia, Bogotá. Corporación Colombia Internacional-INCODER.
- Earl D., VonHoldt B. (2012) STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-61. doi:10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study. *Molecular Ecology* 14: 2611-20. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin Ver. 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. (2003) Inference of Population Structure: Extensions to Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567-87.
- Fontalvo P., Orozco G., Narváez J. (2018) Diversity and Genetic Structure of *Prochilodus Magdalenae* (Pisces:Prochilodontidae) Upstream and Downstream Betania Dam, Colombia. *Intrópica* 13 (2): 87-100.
- Galzerani F. (2007) Análise da Variabilidade Genética de *Prochilodus Argenteus* (Pisces, Prochilodontidae) do Rio São Francisco, Região de Três Marias, através de Marcadores Microsatélites. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.
- Goudet J. (1995) FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices.

- Guevara Rincón L. (2014) Evaluación de la Estructura Genética de la Población Silvestre y Cultivada del Bocachico *Prochilodus Reticulatus* (CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) Asociada a la Cuenca del río Catatumbo y a Centros Piscícolas en el Departamento del Norte de Santander. Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia.
- Guo S., Thompson E. (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48: 361-72.
- Hatanaka T., Henrique Silva F., Galetti P.M. (2006) Population Substructuring in a Migratory Freshwater Fish *Prochilodus Argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, Dordrecht 126 (1-2): 153-59.
- Hubisz M., Falush D., Stephens M., Pritchard J. (2009) Inferring Weak Population Structure with the Assistance of Sample Group Information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-32. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
- IDEAM (2014) Estudio Nacional Del Agua. Bogotá, D.C.
- Jiménez Segura L., Palacio J., Leite R. (2010) River Flooding and Reproduction of Migratory Fish Species in the Magdalena River Basin, Colombia. *Ecology of Freshwater Fish* 19: 178-86.
- Jiménez-Segura L., Restrepo Santamaría D., López Casas S., Delgado J., Valderrama M., Álvarez J., Gómez D. (2014) Ictiofauna y Desarrollo del Sector Hidroeléctrico en la Cuenca del Río Magdalena-Cauca, Colombia. *Biota Colombiana* 15 (2): 3-25.
- Jorgensen H., Hansen M., Bekkevold D., Ruzzante D., Loeschcke V. (2005) Marine Landscape and Population Genetic Structure of Herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology* 14: 3219-34.
- Kopelman N., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N., Mayrose I. (2015) CLUMPAK: A Program for Identifying Clustering Modes and Packaging Population Structure Inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15 (5): 1179-91. doi:10.1111/1755-0998.12387.
- Lopera-Barrero N., Lima E., Filho L., Goes E., Castro P., Zardin A., Poveda Parra A., Ribeiro R. (2015) Genetic Variability of Broodstocks of Restocking Programs in Brazil. *Revista MVZ Cordoba* 20 (3): 4677-87. doi:10.21897/rmvz.38.
- Lopera-Barrero N., Ribeiro R., Jacometo C., Oliveira S., Streit D., Blanck D. (2007) Análise Genética de Estoques de Curimba (*Prochilodus Lineatus*) destinados a Programas de Repovoamento. *Memórias 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Jaboticabal, Brasil. A556.
- Lopera-Barrero N., Ribeiro R., Povh J., Sirol R., Mangolin C. (2010) Avaliação Genética de Populações Naturais e de Estoques de um Programa de Repovoamento de Pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) utilizando Marcadores Microsatélite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62 (4): 954-63. doi:10.1590/S0102-09352010000400027.
- Machordom A., García Marín J., Sanz N., Almodóvar A., Pla C. (1999) Allozyme Diversity in Brown Trout (*Salmo Trutta*) from Central Spain: Genetic Consequences of Restocking. *Freshwater Biology* 41: 707-17.
- Maldonado Ocampo J., Ortega Lara A., Usma J., Galvis G., Villa Navarro F., Vásquez L., Prada Pedreros S., Ardila C. (2005) Peces de Los Andes de Colombia. Bogotá D.C., Instituto de Investigación de Recursos Biológicos, Alexander Von Humboldt.
- Martínez H., Narváez J., Rivera R., Solano O. (2006) Evaluación de la Selectividad del Trasmallo en la Pesquería Artesanal de la zona Deltaica Estuarina del Río Sinú, Caribe Colombiano. *Intrópica* 3 (1): 29-37.
- Meirmans P., Hedrick P. (2011) Assessing Population Structure: FST and Related Measures. *Molecular Ecology Resources* 11: 5-18.
- Merino M., Bonilla S., Bages F. (2013) Diagnóstico del Estado de la Acuicultura en Colombia. En: Flores A. (Ed.) *Autoridad*, Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Mojica J., Usma J., Álvarez León R., Lasso C. (2012) Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia, Bogotá, D.C. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Moreira A., Hilsdorf A., Silva J., Souza V. (2007) Genetic Variability of Two Nile Tilapia Strains by Microsatellites Markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 521-26.
- Orozco G., Narváez J. (2014) Genetic Diversity and Population Structure of Bocachico *Prochilodus Magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin and its Tributaries, Colombia. *Genetics and Molecular Biology* 37 (1): 37-45.
- Park S. (2001) MStools (Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion). Smurfit Institute of Genetics Trinity College, Dublin, Ireland.
- Peakall R., Smouse P. (2006) GenALEX 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-95. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.
- Petersen R., Garcia J., Mello G., Liedke A., Sincero T., Grisard E. (2012) Análise da Diversidade Genética de Tilápias Cultivadas no Estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando Marcadores Microsatélites. *Boletim do Instituto de Pesca* 38 (4): 313-21.
- Porta J., Porta J.M., Matínez Rodríguez G., Alvarez M.C. (2006) Genetic Structure and Genetic Relatedness of a Hatchery Stock of Senegal Sole (*Solea Senegalensis*) Inferred by Microsatellites. *Aquaculture* 251 (1): 46-55.
- Povh J. (2007) Avaliação da Diversidade Genética e do Manejo Reprodutivo do Pacu, *Piaractus Mesopotamicus*. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil.
- Povh J., Lopera-Barrero N., Ribeiro R. (2008) Importancia del Monitoreo Genético de Programas de Repoblamiento de Peces mediante Marcadores Moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria* 35 (1): 25-35.
- Povh J., Ribeiro R., Lopera-Barrero N., Jacometo C., Vargas L., Gomes P., Lopes T. (2011) Microsatellite Analysis of Pacu Broodstocks used in the Stocking Program of Paranapanema River, Brazil. *Scientia Agricola* 68 (3): 308-13. doi:10.1590/s0103-90162011000300006.
- Rico C., Cuesta J., Drake P., Macpherson E., Bernatchez L., Marie A. (2017) Null Alleles Are Ubiquitous at Microsatellite Loci in the Wedge Clam (*Donax Trunculus*). *PeerJ* 5: e3188. doi:10.7717/peerj.3188.
- Rousset F. (2008) GENEPOP'007: A Complete Re-Implementation of the GENEPOP Software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103-6. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Rueda E., Sommer J., Scarabotti P., Markariani R., Ortí G. (2011) Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellite Loci in the Migratory Freshwater Fish *Prochilodus Lineatus* (Characiformes:Prochilodontidae). *Conservation Genetics Resource* 3 (4): 681-84.
- Santacruz B. (2003) Evaluación de la Variabilidad Genética con Marcadores Microsatélites del Bocachico *Prochilodus Magdalenae* (Steindachner 1878) en el río Sinú, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
- SEPEC, Sistema Estadístico Pesquero Colombiano (2016) Informes Gráficos de Capturas Desembarcadas. Filtros utilizados para la especie *Prochilodus Magdalenae* en la Cuenca del Magdalena. Desarrollado por la Universidad del Magdalena con el apoyo del INVEMAR, Colombia.
- Silva A. (2011) Estrutura Genética Populacional de *Prochilodus Costatus Valenciennes 1850* (Characiformes, Prochilodontidae) No Alto São Francisco. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

- Sønstebo J., Borgstrøm R., Heun M. (2007) Genetic Structure of Brown Trout (*Salmo Trutta L.*) from the Hardangervidda Mountain Plateau (Norway) Analyzed by Microsatellite ADN: A Basis for Conservation Guidelines. *Conservation Genetics* 8: 33-44.
- Teija A., Johanna R., Jorma P., Mats B. (2006) Impacts of Effective Population Size on Genetic Diversity in Hatchery Reared Brown Trout (*Salmo Trutta L.*) Populations. *Aquaculture* 253: 244-48.
- Torregroza Espinosa A., Narváez J., Orozco G. (2015) Variabilidad Genética en la Producción de Larvas de *Prochilodus Magdalenae* usadas en Programas de Repoblamiento en el río Magdalena, Colombia. *Hidrobiológica* 25 (2): 187-92.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. (2004) MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-38. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- Waples R., Drake J. (2004) Risk-Benefit Considerations for Marine Stock Enhancement: A Pacific Salmon Perspective. In: Leber K.M., Kitada S., Blankenship H.L., Svasand T. (Eds.) *Stock Enhancement and Sea Ranching: Developments Pitfalls and Opportunities*, 2nd Ed. Blackwell, Oxford.
- Wasko A., Martins C., Oliveira C., Senhorini J.A., Foresti F. (2004) Genetic Monitoring of the Amazonian Fish *Matrinchá* (*Brycon Cephalus*) Using RAPD Markers: Insights into Supportive Breeding and Conservation Programmes. *Journal of Applied Ichthyology* 20 (1): 48-52.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los entes financiadores por el apoyo recibido mediante la ejecución de los proyectos “Programa de genética de conservación para el Bocachico en la cuenca media y baja del río Magdalena” (convenio número 137-09 Ecopetrol-Universidad del Magdalena) y “Evaluación de la ecología molecular de los Bocachicos (*Prochilodus* spp.) asociado a los ríos que drenan al Caribe Colombiano” (con código de Colciencias 1117-489-25459). Así mismo, se agradece a cada una de las personas que integran el laboratorio de Biología Molecular del grupo de investigación de Biodiversidad y Ecología Aplicada (GIBEA) de la Universidad del Magdalena, que hicieron parte de este trabajo.



SAG

50° ANIVERSARIO

**Sociedad
Argentina
de Genética**

1969-2019