



Journal of Basic & Applied Genetics

(Formerly MENDELIANA)

JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS
REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA



Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX
THOMSON REUTERS
SCOPUS

Included in **SciELO**



BUENOS AIRES - ARGENTINA

CG
AA
BB

COMITÉ EDITORIAL

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro

Área de Investigación en Agronomía
EEA Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria (INTA), Fac. de Ciencias Agrarias,
Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP, y
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET)
Balcarce, Argentina
camadro.elsa@inta.gob.ar

Editores Asociados:

Citogenética Animal

Dra. Liliana M. Mola

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de
Buenos Aires (UBA), y CONICET
Buenos Aires, Argentina
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

Citogenética Humana

Dra. Silvia Ávila

Universidad Nacional de COMAHUE
Hospital Castro Rendón
Neuquén, Argentina
silvia347@gmail.com

Citogenética Vegetal

Dra. Liliana M. Mola

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA,
y CONICET
Buenos Aires, Argentina
limola@ege.fcen.uba.ar; lilimola@yahoo.com.ar

Dr. José Guillermo Seijo

Instituto de Botánica del Nordeste,
Universidad Nacional del Nordeste (UNNE),
y CONICET
Corrientes, Argentina
seijo@agr.unne.edu.ar

Genética de Poblaciones y Evolución

Dr. Jorge Cladera

Instituto de Genética "Ewald Favret",
Centro de Investigación en Ciencias. Veterinarias y
Agronómicas,
INTA
Castelar, Argentina
cladera.jorge@inta.gob.ar

Dra. Noemí Gardenal

Fac de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,
Universidad Nacional de Córdoba (UNC),
y CONICET
Córdoba, Argentina
ngardenal@unc.edu.ar

Dr. Juan César Vilardi

Departamento de Ecología, Genética y Evolución,
Fac. Ciencias Exactas y Naturales, UBA,
y CONICET
Buenos Aires, Argentina
vilardi@bg.fcen.uba.ar

Genética Humana y Genética Médica

Dr. Santiago Lippold

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
(CEMIC)
Buenos Aires, Argentina
sel1@fibertel.com.ar

Genética Médica, Humana y Citogenética

Dra. María Inés Echeverría

Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Cuyo (UNCu)
Mendoza, Argentina
miecheve@fcm.uncu.edu.ar

Dra. Silvia Ávila

Universidad Nacional de COMAHUE
Hospital Castro Rendón
Neuquén, Argentina
silvia347@gmail.com

Genética Molecular (Animal)

Dr. Guillermo Giovambattista

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Fac. de
Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y CONICET
La Plata, Argentina
ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

Genética Molecular (Vegetal)

Dr. Alberto Acevedo

Centro de Investigación de Recursos Naturales,
INTA
Castelar, Argentina
acevedo.alberto@inta.gob.ar

Dr. Andrés Zambelli

Unidad de Negocios Nutrisun–Advanta Semillas SAIC
Balcarce, Argentina
andres.zambelli@advantaseeds.com

Genética y Mejoramiento Animal

Ing. (M. Sc.) Carlos A. Mezzadra

Área de Investigación en Producción Animal,
EEA Balcarce, INTA y
Fac. de Ciencias Agrarias, UNMDP
Balcarce, Argentina
mezzadra,carlos@inta.gob.ar

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES

Dra. Liliana A. Picardi

*Cátedra de Genética, Fac. de Ciencias Agrarias,
Universidad Nacional de Rosario (UNR)
Zavalla, Argentina
lpicardi@fcagr.unr.edu.ar*

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal

Dr. Miguel A. Di Renzo

*Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)
Córdoba, Argentina
mdirenzo@ayv.unrc.edu.ar*

Dr. Ricardo W. Masuelli

*EEA La Consulta, INTA
Fac. de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo
(UNCu), y CONICET,
Mendoza, Argentina
rmasuelli@fca.uncu.edu.ar*

Dra. Mónica Poverene

*Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del
Sur (UNS), y CONICET
Bahía Blanca, Argentina
poverene@criba.edu.ar*

Mutagénesis

Dr. Alejandro D. Bolzán

*Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis,
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE),
y CONICET
La Plata, Argentina
abolzan@imbice.gov.ar; abolzan64@gmail.com*

Mutaciones Inducidas en Mejoramiento Vegetal

Ing. Agr. (M.Sc.) Alberto R. Prina

*Instituto de Genética "Ewald Favret", Centro de
Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas,
INTA
Castelar, Argentina
prina.alberto@inta.gob.ar*

Consultor Estadístico:

Ing. Agr. Francisco J. Babinec

*EEA Anguil, INTA, y
Fac. de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa
(UNLPam)
La Pampa, Argentina
babinec.francisco@inta.gob.ar*

Secretaría de Redacción:

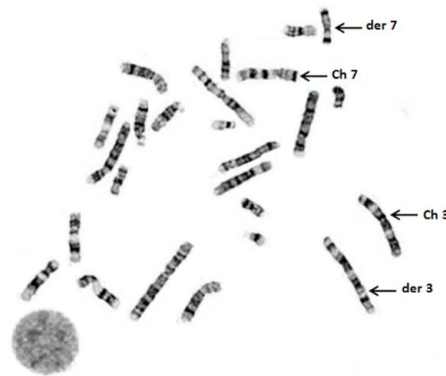
Dra. María de las Mercedes Echeverría

*Fac. de Ciencias Agrarias, UNMdP
Balcarce, Argentina
echeverria.maria@inta.gob.ar*



Mutantes clorofilicos en girasol (*Helianthus annuus*)

Autor: R. H. Rodríguez, Salaberry M.T, Echeverría M.M.



Aberraciones cromosómicas

Autor: Marsá S. *et al.*



Espiguillas de Triticale

Autor: Ferreira V. *et al.*

ÍNDICE

7 - 18

Article 1 - research

MELANOMA, ANCESTRY AND MC1R VARIANTS IN THE URUGUAYAN ADMIXED POPULATION

MELANOMA, ANCESTRALIDAD Y VARIANTES MC1R EN LA POBLACIÓN MESTIZADA URUGUAYA

Hochmann J., Cappetta M., Pérez J., Colistro V., Nicolleti S., Larre Borges A., Ribas G., Martínez Asuaga M., Bertoni B.

19 - 27

Article 2 - research

ANENCEPHALY ASSOCIATED TO TRISOMY 18 WITH HIGH ALFA-1 FETOPROTEIN IN AMNIOTIC LIQUID. ONE CASE REPORTED IN SAN LUIS, ARGENTINA

ANENCEFALIA ASOCIADA A TRISOMÍA 18 CON ELEVADA ALFA-1-FETOPROTEÍNA EN LÍQUIDO AMNIÓTICO. UN CASO REPORTADO EN SAN LUIS, ARGENTINA

Marsa S.M., Della Vedova M.C., Olivera M., Siewert S.E.

29 - 35

Article 3 - research

DYNAMICS OF DNA DAMAGE IN LEUKOCYTES OF THOROUGHBRED EQUINES SUBJECTED TO A STANDARDIZED EXERCISE TEST

DINÁMICA DEL DAÑO EN EL ADN EN LEUCOCITOS DE EQUINOS SANGRE PURA DE CARRERA SOMETIDOS A UN TEST DE EJERCICIO ESTANDARIZADO

Muriel M., Seoane A., Savignone C., Palacios A., Ferreira V., Boffi F.M., Picco S.J.

37 - 51

Article 4 - cultivar registration

REGISTRATION OF CULTIVAR YAVÚ-UNRC
REGISTRO DE CULTIVAR YAVÚ-UNRC

Ferreira V., Grassi E., di Santo H., Ferreira A., Castillo E., Paccapelo H.

41 - 42

Article 5 - short communication

DIFFERENTIAL ESTERASE ACTIVITY IN AERIAL AND ROOT TISSUES FROM 6AS DHR WHEAT LINES AFTER PHYTOHORMONAL TREATMENTS

ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE ESTEARASAS EN TEJIDOS AÉREOS Y RAÍCES DE LÍNEAS DE TRIGO 6AS DHR LUEGO DE TRATAMIENTOS FITORHORMONALES

Tacaliti M.S., Tocho E., Castro A.M.

43 - 48

Obituaries

ING. AGR. (DR.) ANTONIO KRAPOVICKAS
ING. AGR. SAÚL OLIVIO FEHLEISEN
DR. TETSUJI MATAYOSHI

49 - 52

Erratas

MELANOMA, ANCESTRY AND MC1R VARIANTS IN THE URUGUAYAN ADMIXED POPULATION

MELANOMA, ANCESTRALIDAD Y VARIANTES MC1R EN LA POBLACIÓN MESTIZADA URUGUAYA

Hochmann J.¹, Cappetta M.¹, Pérez J.², Colistro V.¹, Nicolleti S.², Larre Borges A.², Ribas G.³, Martínez Asuaga M.², Bertoni B.¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.

²Cátedra de Dermatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.

³Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de Valencia-INCLIVA, Valencia-España.

*Corresponding author: bbertoni@fmed.edu.uy

ABSTRACT

Malignant melanoma (MM) is the most dangerous type of skin cancer and the main cause of death produced by skin diseases. In Uruguay, the incidence rate is 3.8/100,000, one of the highest in Latin America. We analyzed the contribution of ancestry and MC1R as a candidate gene for sporadic melanoma in Uruguay. Our objective was to investigate the possible associations between ancestry and the MC1R gene with sporadic melanoma in the Uruguayan population. To that end, one hundred patients with sporadic MM and 107 controls were recruited. Phenotypic factors and lifestyle were evaluated as risk factors. At the same time, we analyzed five ancestry informative markers, the MC1R variants (R151, R160 and D294H) and five tag-SNPs. Phototype, atypical nevi, sunburns and recreational exposure were the main risk factors for MM in the Uruguayan population. We confirmed 16q as a candidate region for MM. R151C, and R160W showed an important association with risk of melanoma (OR= 3.85, P= 1×10^{-2} ; OR= 10.15, P= 7×10^{-3} , respectively). Furthermore, three novel MC1R haplotypes from the promoter region were detected, and the two most common haplotypes for the coding region were different to the ones found in Europeans through HapMap. However, MC1R coding region haplotypes revealed a highly similar frequency to that of the Spanish population. Our results showed that the chromosomal 16q region confers susceptibility to MM risk in the Uruguayan population. In addition, the admixed genome structure of the MC1R region could be part of the explanation of melanoma etiology.

Key words: melanoma susceptibility, Melanocortin 1 Receptor gene, Red Hair Color (RHC) mutations, ancestry, Uruguayan population.

RESUMEN

El melanoma maligno (MM) es uno de los más peligrosos, y la principal causa de muerte producida por tumores de piel. En el Uruguay, la tasa de incidencia es de 3,8/100.000, una de las más altas de América Latina. En este trabajo analizamos la ancestría y el gen candidato MC1R entre los pacientes con MM del Uruguay. Nuestro objetivo fue investigar la posible asociación entre ancestría y el gen MC1R en pacientes con melanoma esporádico en la población uruguaya. Con tal finalidad, se reclutaron 100 pacientes con MM esporádico y 107 controles. Se evaluó el riesgo de factores fenotípicos y de estilo de vida. Además se analizaron cinco marcadores informativos de ancestría, variantes del gen MC1R (R151, R160 y D294H) y cinco tagSNPs. El fototipo, los nevos atípicos, quemaduras solares y la exposición recreativa fueron los principales factores de riesgo para MM en la población uruguaya. La región cromosómica 16q es candidata para MM, mientras que R151C y R160W mostraron una importante asociación con el riesgo para MM (OR= 3,85, P= 1×10^{-2} ; OR= 10,15, P= 7×10^{-3} , respectivamente). Por otra parte, se detectaron tres nuevos haplotipos en la región promotora y los dos haplotipos más frecuentes en la región codificante son diferentes a los encontrados en la población europea. Sin embargo, los haplotipos de la región codificante presentan una frecuencia muy similar a las encontradas en la población española. Los resultados muestran que la región cromosómica 16q confiere susceptibilidad al riesgo de MM en la población uruguaya. Por otra parte, la estructura genómica mestizada de la región del MC1R podría explicar la etiología del melanoma.

Palabras clave: susceptibilidad a melanoma, gene Receptor de Melanocortina 1, mutaciones Red Hair Color (RHC), ancestralidad, población uruguaya.

Fecha de recepción: 15/05/2015

Fecha de aceptación de versión final: 29/02/2016

INTRODUCTION

Melanoma is the most dangerous type of skin cancer and the main cause of death produced by skin diseases. It develops from melanocytes, but can also begin in other pigmented tissues, such as the lymph nodes, eye or the intestines. The overall incidence of malignant melanoma (MM) has been increasing continuously for the last four decades in European and European descendant populations (Garbe and Leiter, 2009). In Uruguay, the incidence rates adjusted by age is 4.5 and 3.5 per 100,000 in men and women respectively, and it is clearly on the rise since the previous study conducted in 1996 (Barrios *et al.*, 2001).

The etiology of MM remains unclear but it is known that both genetic and environmental factors influence the development of this sporadic disease (Bataille, 2003; Scherer and Kumar, 2010). Familial predisposition to melanoma, which is considered in families with two or more first-degree relatives with MM, is believed to be responsible for approximately 10% of all MM cases (Larre Borges *et al.*, 2009). High-risk alleles are often expressed as familial clusters, whereas lower-risk alleles result in sporadic cases. The CDKN2A and CDK4 are susceptibility genes with high penetrance, which account for approximately 20% to 57% of disease susceptibility in family melanoma (Bloethner *et al.*, 2009; Goldstein *et al.*, 2007).

Melanocortin-1 Receptor (MC1R) is considered to be a susceptibility gene with low penetrance. This gene is implicated in human pigmentation and encodes a G-protein-coupled receptor which is expressed in melanocytes. MC1R is located in chromosome region 16q24, with an open reading frame of 951 bp and, until recently, was thought to be composed of a single exon (MIM #155555).

The MC1R gene is highly polymorphic, with most allelic variation being restricted to European populations, followed by Asian and, finally, African populations (Gerstenblith *et al.*, 2007; Savage *et al.*, 2008). A group of missense mutations have been associated with red hair, fair skin, freckles and poor tanning ability, and these variants are referred to as “red hair colour” (RHC) variants (Duffy *et al.*, 2004; Wong and Rees, 2005). In North European populations, the association between MM, red hair color, fair skin and RHC variants is significant (Bastiaens *et al.*, 2001; Kanetsky *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2000). However, among Southern European populations the association

between RHC variants and melanoma is not clear. In Mediterranean populations, RHC variants are not clearly associated either with skin pigmentation or hair colour, but they show an association with MM (Fernandez *et al.*, 2007; Landi *et al.*, 2005; Stratigos *et al.*, 2006). Melanoma research focused on European or European descendant populations could represent a pitfall to discriminate gene-gene interactions as previously described. In this sense, admixed populations are becoming a source to unveil genes associated to complex disease (Bonilla *et al.*, 2004a; Darvasi and Shifman, 2005). The mixed genome structure could help to discriminate the gene effects in complex diseases such as cancer. However, there is little information on melanoma in Latin America. With respect to sporadic MM, the incidence rate ranges from 1.8 in Peru to 6.5 in Sao Paulo, Brazil, with an average incidence rate estimated in 4.5 for Latin American populations (Erdei and Torres, 2010; Schmerling *et al.*, 2011; Sortino-Rachou and Curado, 2011). These incidence rates are lower than those found in European populations but higher than the ones found in African populations (one of the parental contributors to Latin American admixed populations). However, few studies have been carried out in Latin America to try to get an understanding on the genes involved in sporadic MM. In Uruguay, the presence of germline mutations in the CDKN2A and MC1R genes was reported in families with hereditary melanoma (Larre Borges *et al.*, 2009). The authors also detected RHC variants in these families and a novel CDKN2A mutation was described, which was probably due to a founder effect. These results reinforce the idea that sporadic melanoma should be further investigated.

Our study is the first to analyze risk factors, contribution of parental populations, RHC variants and haplotypes of the MC1R gene and their association with sporadic MM in an admixed Uruguayan population.

MATERIALS AND METHODS

Study population and data collection

A total of 100 consecutive and non-related sporadic MM cases were recruited in a four year period from May 2006 to May 2010 from the Dermatology Department at Clinical Hospital “Manuel Quintela” (Montevideo). The diagnosis of all patients had been confirmed by histopathological

analysis. All patients had not first-grade relatives affected by skin cancers, and underwent skin examination by a trained dermatologist to record the number and type of nevi and to define tumor location. During the same period, a control sample was established with 107 individuals matched by sex- and age, without personal or family history of skin cancer, from the Clinical analysis Laboratory of the same medical institution.

Following informed consent of all participants in the study, blood samples were obtained for DNA extraction, and participants answered an interview-based questionnaire and underwent physical examination to record information about pigmentation characteristics (eye, hair and skin colour, presence of solar lentigines), Fitzpatrick's classification of skin type, personal and family history of cancer, and environmental risk factors such as history of sunburns, sun exposure, dietary habits, chemical exposure, among others.

For statistical analysis we measured the following phenotypic variables: number of atypical, congenital and acquired nevi, and presence of lentigines. Regarding the environmental variables, we considered four categories of sun exposure: i) on vacation until 15 years old; ii) during the rest of the year at 15 years old; iii) on vacation during adulthood; and iv) during the rest of the year during adulthood. Regarding sunburns, we considered four periods of life: before age 10, between ages 10 and 15, between ages 16 and 20, and after age 20.

The protocol of this study and the informed consent were approved by the Ethics Committee of the Medicine School of Universidad de la República; Montevideo, Uruguay.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using FlexiGene® DNA Kit (QIAGEN) and stored at -20°C until analysis.

PV92 (rs3138523) and APOA1 (rs3138522) were genotyped by PCR amplification and conventional agarose gel electrophoresis as described in Bonilla *et al.* (2004b). TSC111025 (rs2065160), SLC24A5 (rs1426654), GC1F (rs4588), and the four genetic variants of MC1R related to the RHC phenotype (R151C, R160W and D294H) were assayed using ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex System (Applied Biosystem). The amplicon primers and the oligonucleotides used for the extension reactions are

described in Supplementary Table 1. The m-fold server was used to assess the secondary structure of the PCR products and the accessibility of the SNaPshot primers (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>).

Five SNPs in the MC1R region selected by Ibarrola-Villava *et al.* (2010), were chosen from the HapMap International Project database by using HaploView v4.2 software (Barrett *et al.*, 2005), and taking into account tagSNPs from the European, African (Yoruba) and Asian (Han Chinese and Japanese) subset of data. According to Ibarrola-Villava's *et al.*, (2010) work, two haploblocks were defined to make interpopulation comparisons (). Block 1 included the SNPs rs8045560, rs2270459 and rs3212346, and was located within the putative promoter region, whereas Block 2 included rs3212363 and rs3212369 and extended along the transcript region. These HapMap SNPs were genotyped by KASPar SNP Genotyping System (Kbiosciences, UK).

Statistical methods

Allele frequencies were calculated by allele count, and the Hardy Weinberg equilibrium was tested for each SNP by using SNPSTAT's software (Solé *et al.*, 2006). The risk of MM associated with SNPs and AIMs or other determinants was estimated by fitting conditional logistic regression models, and was expressed as the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). All p-values cited are two-sided and $p < 0.05$ is regarded as statistically significant after the Bonferroni correction. We used the PLINK (Purcell *et al.*, 2007) and Epi Info v3.5 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) programs in order to calculate the association between the variables. We also used the Haploview v4.3 program to study the association between MC1R haplotypes and their relation to the disease.

Admixture was estimated by the Gene Identity method (Chakraborty, 1985) implemented in ADMIX95 program designed by B. Bertoni (available at <http://www.genetica.fmed.edu.uy/software.htm>).

RESULTS

Two hundred and seven individuals were selected from the Uruguayan population for this study. Cases were represented by 100 patients with sporadic melanoma, and

Table 1. Demographic characteristics, phototypes, sun exposure pattern and type of nevi of the studied sample.

Phenotypic characteristics	Cases	Controls	p-value	OR (95% CI)
Sex (%)				
Female	60 (60.0)	64 (59.8)	n.s.	1.0 (0.6-1.7)
Male	40 (40.0)	43 (39.2)		
Age (SD)	56.6 (15.0)	62.4 (12.5)	< 0.01	
Phototype I/II (%)	64 (64.0)	17 (15.8)	< 0.001	5.8 (2.9-11.8)
Congenital nevi (%)	20 (20.0)	10 (9.3)	< 0.05	2.5 (1.1-5.6)
Atypical nevi (%)	48 (48.0)	4 (3.7)	< 0.001	10.1 (4.1-24.9)
History of atypical nevi (%)	41 (41.0)	12 (11.2)	< 0.001	4.6 (2.0-10.5)
Acquired nevi (%)			< 0.001	
<5mm	84 (84.0)	80 (73.0)		
>5mm	9 (9.0)	1 (0.9)		
0	7 (7.0)	28 (25.7)		
Acquired nevi (SD)*	30.6 (26.7)	16.6 (15.3)	< 0.001	
Sun exposure (%)				
<15 years old	42 (42.0)	39 (35.7)	n.s.	1.4 (0.7-2.6)
Adulthood	35 (35.0)	33 (30.2)	n.s.	1.1 (0.6-2.1)
Recreational exposure (%)				
< 15 years old Recreational Exp.	67 (67.0)	45 (41.2)	< 0.001	2.8 (1.4-5.3)
Adulthood Recreational Exp.	61 (61.0)	37 (33.9)	< 0.05	2.1 (1.1-3.9)
Sunburns (%)				
Before 10 years old	26 (26.0)	6 (5.5)	< 0.001	4.9 (1.8-13.2)
Between 10-15 years old	36 (36.0)	11 (10.3)	< 0.001	4.1 (1.9-9.2)
Between 15-20 years old	38 (38.0)	23 (21.4)	< 0.05	1.9 (1.0-3.8)
Greater 20 years old	32 (32.0)	18 (16.8)	< 0.05	2.0 (1.0-4.2)
Atypical nevi (%)			< 0.001	
0	53 (53.0)	100 (93.5)		
11-10	36 (36.0)	7 (6.5)		
11-25	9 (9.0)	-		
26-40	2 (2.0)	-		

one hundred and seven individuals without melanoma acted as controls. The average age of the patients was 57 years, slightly younger than the control sample (62 years). Since more female cases were detected during the sampling period, the control sample was matched in this proportion (Table 1).

Risk factors

As it can be seen in Table 1, vacation sun exposure in childhood (OR= 2.76, P= 0.001), phototype I/II (OR=

5.84, P= 1×10^{-9}), presence of atypical nevi (OR= 10.11, P= 1×10^{-9}), congenital nevi (OR= 2.88, P= 0.02), acquired nevi (P= 1.3×10^{-8}), family history of atypical nevi (OR= 4.6, P= 1×10^{-4}), and sunburn at 15 years old (OR= 4.13, P= 0.0008) were the main risk factors for sporadic MM in the Uruguayan population sample.

Ancestry and AIMs analysis

The grandparent's geographical origin could be recorded in 90 cases and 102 controls. In Table 2, it can be seen

Table 2. Geographical origin of the grandparents of cases and controls.

Geographic origin	Cases (%) N=360	Controls (%) N=408
Europe	36.6	17.2
Latin America ^(a)	46.1	63.7
Unknown	17.3	19.1

Table 3. Analysis of admixture in the Uruguayan population. Percentage of the parental population contribution to the population samples.

Origin	Parental population contribution	
	Cases	Controls
European	82.47	76.51
Native American	0.00	3.42
African	17.53	20.07
R2*	0.97	0.99

that European ancestry was more frequent in cases than in the control population, 36.6% and 17.2% respectively ($P < 0.05$). Latin American grandparents were born in Uruguay or other Latin American countries and declared not to belong to any Native American ethnic group.

Five Ancestry Informative Markers (AIMs) were selected and analyzed in order to determine the degree of admixture of the studied sample (Table 3). The selected AIMs exhibited a high level of allele frequency difference among parental populations (European, West African and Native American). All SNP genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium with the exception of GC1F. In the admixture analysis, the European contribution was 82% in MM patients and 77% in controls. No Native American contribution was detected in MM patients and only a 3% contribution was found in controls (Table 3). The individual analysis of AIMs indicated a significant association between PV92 and TSC111025 with MM risk ($P = 0.006$ and $P = 0.027$, respectively). However, for others markers we did not detect any significant association with the disease (Table 4).

RHC and haplotypes variants

Considering the fact that PV92 (16q23.3) is relatively close to MC1R gene (16q24.3), we decided to study this

chromosomal region that overlaps with the MC1R gene. We analyzed three strong RHC variants: R151C, R160W and D294H. Among the patients, homozygous individuals for the R160W and R151C mutants were detected. However, we only detected heterozygous individuals for the D294H mutation. Only the two gene variants R151C and R160W were associated with melanoma risk ($OR = 3.85$, $P = 0.01$ and $OR = 10.15$, $P = 0.007$, respectively). The RHC variants (R151C, R160W, and D294H) were present at frequencies of 2%, 0.5%, and 1% respectively in the control sample (Table 4).

There was only one red haired individual among the control sample, but 10 (9.5%) of MM cases had red hair. Among these ten red-haired cases, eight carried at least one functional MC1R variant.

As for the five tag-SNPs of MC1R studied, no association with MM risk was detected (Table 4). Two haploblocks were constructed in order to compare the results of this study with those obtained in a previous work involving a Spanish population (Ibarrola-Villava *et al.*, 2010). Block 1 corresponds to the SNPs located at the promoter region and Block 2 corresponds to the transcription region of the MC1R gene. The analysis showed no association with MM risk. However, haplotype frequencies in the Uruguayan population were clearly different from those found in the Spanish population (Table 5). In the Uruguayan population we detected seven haplotypes. Three of them are exclusive of our population (TGA, CTG, TTG) because they were not described in any of the studied HapMap populations. The haplotype CGA, which is present in the European and Yoruba populations, was detected at lower frequency. Furthermore, we detected another two haplotypes (CGG, TGG) in the Uruguayan population whose frequencies differ from those in European and Spanish populations. Finally, the remaining haplotype (CTA) was detected only in the controls, with similar frequency to the one found in the European population. On the other hand, the frequencies of the Uruguayan block 2 haplotypes were similar to those of the Spanish population.

Finally, the haplotype (CGCCGGAA) which included the R151C, R160W and D294H loci and the five tag-SNPs previously mentioned was present in frequencies of 18% and 4% among controls and cases respectively (data not shown). This haplotype is a combination of the wild type RHC variants and the most common haplotypes from Block 1 (CGG) and Block 2 (AA), and is protective for the disease ($OR = 0.21$, 95% IC (0.057-0.81), $P = 0.026$).

Table 4. Association between AIMs, RHC variants, SNPs of the MC1R gene and MM risk.

SNP	Allele	Chromosome location	N	Cases MAF	Control MAF	HW E	OR (95 % CI)	p-value
AIMs								
GC1F	G	4q13.3	214	0.420	0.500	0.008	1.32 (0.49- 3.57)	0.220
SLC24A5	G	15q21.1	228	0.270	0.130	1.000	1.22 (0.47- 3.22)	0.004
TSC111025	C	1q32.1	214	0.190	0.320	0.130	2.97 (1.31- 6.70)	0.027
PV92	+	16q23.3	342	0.080	0.180	1.000	3.63 (1.55- 8.53)	0.006
APOA1	-	11q23.3	344	0.040	0.040	1.000	1.01 (0.33- 3.04)	0.990
RHC variants								
R151C	T	16q24.3	414	0.070	0.020	1.000	3.85 (1.25-11.8)	0.011
D294H	C	16q24.3	412	0.030	0.010	1.000	1.95 (0.48-7.91)	0.340
R160W	T	16q24.3	414	0.050	0.005	1.000	10.15 (1.28-80.0)	0.007
MC1R's SNPs								
rs8045560	T	16q24.3	322	0.460	0.480	0.390	0.94 (0.44-1.98)	0.750
rs2270459	T	16q24.3	336	0.040	0.040	1.000	1.37 (0.46-4.03)	0.570
rs3212346	A	16q24.3	336	0.060	0.060	0.010	1.07 (0.42-2.73)	0.890
rs3212363	T	16q24.3	338	0.300	0.300	0.800	1.23 (0.64-2.35)	0.730
rs3212369	G	16q24.3	324	0.180	0.180	0.730	1.32 (0.66-2.65)	0.450

Table 5. Haplotype frequencies of MC1R's SNPs in the HapMap populations (Europe, Africa and Asia), Spain, and Uruguay.

MC1R haplotypes	Populations							
	HapMap			Spain		Uruguay		p-value
	Europeans	Africans	Asians	Cases	Controls	Cases	Controls	
Block 1								
CGG	36.7	54.2	65.0	32.2	33.2	52.1	58.1	1.00
TGG	55.8	3.3	10.5	59.0	59.4	38.2	33.9	0.12
CTA	5.8	21.7	21.8	5.7	6.5	3.6	0.34
CGA	1.7	20.9	3.1	0.5	1.7	1.6	0.87
TGA	4.8	1.6	0.17
CTG	1.3	0.21
TTG	2.2
Block 2								
AA	54.8	3.5	13.1	58.1	56.2	51.2	54.3	1.00
TA	31.3	57.3	65.5	21.6	23.7	31.7	28.7	0.58
AG	13.7	39.2	21.4	20.3	19.9	17.1	17.0	0.87

DISCUSSION

Although numerous studies about the genetic risk factors implicated in sporadic melanoma have been carried out in different populations (Raimondi *et al.*, 2008), most of them were conducted on European populations or European population descendants. As far as we know, our study is the first one to analyze risk factors and also RHC variants and haplotype structure of the MC1R gene in a

hybrid population of Latin America and their associations with sporadic melanoma.

The presence of phototype I and II, solar exposition in childhood during vacations and the atypical nevi are the main phenotypic MM risk factors in the Uruguayan population. These results are consistent with previous studies involving populations of European ancestry, but

also with those obtained in the admixed populations of Argentina and Southern Brazil (Bakos *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2004; Luiz *et al.*, 2012). The solar sunburns suffered until 15 years of age showed an important association with MM risk. However, it is not an important risk factor in Southern Brazil (Bakos *et al.*, 2002), Argentina (Lascano *et al.*, 2004), or even in Southern Europe (Nikolaou *et al.*, 2008), which suggest a different and more risky behavior among the Uruguayan population.

The high incidence of sporadic MM among Europeans or European descendants is well documented as it was previously stated. In the Uruguayan MM patients, an excess of European ancestry was detected by two different approaches. From a demographic point of view, the number of grandparents of European origin among the patients was higher than in controls. Similarly, in two Latin American studies, one performed in Argentina and the other in Brazil, the presence of European grandparents was detected as a risk factor for MM (Bakos *et al.*, 2009; Lascano *et al.*, 2004). A similar approach was developed in a study involving Alabama melanoma patients showing a predominant Celtic ancestry of grandparents (Acton *et al.*, 2004). This observation suggests that an important part of the patients' genome is of European origin. However, in Latin America, personal information is not sufficient to assign a person or group to an ancestral origin. Definition by skin color or ancestry represents a very heterogeneous group of people from the genetic point of view as it was demonstrated in Brazil (Pimenta *et al.*, 2006; Suarez-Kurtz *et al.*, 2007). In our study, we analyzed genetic ancestral contribution and found a slight difference between European ancestry cases were compared with controls. Furthermore, no Native American contribution was detected in the patients. Previous studies found a trihybrid structure of the Uruguayan population with European, Native American and African contributions (Hidalgo *et al.*, 2005; Sans *et al.*, 1997).

The individual analysis of the AIMs showed a significant association of TSC111025 and PV92 with sporadic melanoma. The former, in the 1q32.1, was described previously in Puerto Rican women when ancestry and skin pigmentation were analyzed (Bonilla *et al.*, 2004b). This region includes gene such as MDM4, a p53 binding protein homolog, (Gene ID: 4194), leucine rich repeat neuronal 2 (LRRN2–Gene ID: 10446) or phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide (PIK3C2B–Gene ID: 5287), all of them related to oncogenic transformation.

On the other hand, PV92 is located in chromosome region 16q23.3 close to the MC1R gene (16q24.3), a candidate gene with a minor effect in the etiology of sporadic melanoma (Kanetsky *et al.*, 2002; Landi *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2000). The R151C, R160W, and D294H variants have been described previously as related to MM susceptibility in Anglo-Saxon populations (Bastiaens *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 1995) and also in the Northern French population (Matichard *et al.*, 2004). These variants also are related to red hair and fair skin (Demenais *et al.*, 2010). In Uruguay, these variants were present at frequencies similar to those of Spanish and French populations (Fernandez *et al.*, 2007; Ibarrola-Villava *et al.*, 2012b; Matichard *et al.*, 2004).

Our data suggest that being a carrier of non-synonymous changes is associated with a much higher risk of melanoma (Ibarrola-Villava *et al.*, 2012a; Ibarrola-Villava *et al.*, 2012b; Scherer *et al.*, 2009). The statistically significant associations for R160W and R151C are consistent with other results from Mediterranean populations (Hu *et al.*, 2014; Fagnoli *et al.*, 2006; Matichard *et al.*, 2004; Valverde *et al.*, 1995). However, in another Spanish population (from Valencia) the only RHC variants associated with statistically significantly increased risk of the disease were R160W and D294H (Scherer *et al.*, 2009).

The haplotype analysis allowed the detection of new genome structures in our samples: three haplotypes in the putative promoter region (TGA, CTG and TTG) that were not described in HapMap populations. The haplotypes TGG and CGG presented a very different frequency distribution to the ones present in Europe, whereas the haplotype frequencies for the MC1R gene region are close to the ones found in European or Spanish populations. These results suggest that the genome structure of the region gives support to? verifies the admixed structure of the Uruguayan population. The frequency spectrum of these haplotype blocks can arise by different mechanisms like admixture and recombination or genetic drift. But also, Uruguayan demographic history suggests a population expansion which could explain the observed haplotype frequencies (Bertoni *et al.*, 2005). The limited number of SNPs only allows to detect a protective haplotype. Moreover, the structure of the region around the MC1R gene seems to be labile to sequence changes. TUBB3 is a tubulin-beta 3 involved in neuronal dendrite formation (Katsetos *et al.*, 2003) at 2.5 kb from the MC1R gene. Recently, Dalziel *et al.* (2010) demonstrated an intergenic

splicing and alternative polyadenylation between these two genes that generate a chimeric protein. The expression level of the chimeric transcript MC1R-TUBB3 depends on concentration of the α -MSH hormone. Whereas the normal MC1R transcript decreases, the chimeric transcript increases its expression with prolonged exposure to the hormone; a situation that resembles the responses to UV exposure (Dalziel *et al.*, 2010).

The relation between ancestry and the MC1R chromosome region could represent an important finding in our population to continue exploring by Admixture Mapping to detect new genes or variants involved in the development of sporadic melanoma (Chakraborty and Weiss, 1988; McKeigue, 1998), but also to describe new variants developed by the admixture structure itself (Zhu *et al.*, 2008).

CONCLUSIONS

Our study provides, for the first time, information on melanoma, ancestry and MC1R gene variants for an admixed population from Latin America. In conclusion, European ancestry and the RHC variants, R151C and R160W, are risk factors for sporadic melanoma. However, further studies of the MC1R haplotype structure of the gene control region would help to clarify the interaction between admixture and the development of the disease.

Abbreviations

AIM: ancestry informative marker; MM: malignant melanoma; MC1R: melanocortin 1 receptor; RHC: red hair colour; OR: odd ratio; SNP: single nucleotide polymorphism.

BIBLIOGRAPHY

Acton R.T., Barton E.H., Hollowell W.W., Dreibelbis A.L., Go R.C.P., Barton J.C. (2004) Ancestry reported by white adults with cutaneous melanoma and control subjects in central Alabama. *BMC Cancer* 4: 47.

Bakos L., Masiero N.C.M.S., Bakos R.M., Burtet R.M., Wagner M.B., Benzano D. (2009) European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 23: 304-7.

Bakos L., Wagner M., Bakos R.M., Leite C.S.M., Sperhake C.L., Dzekaniak K.S., Gleisner A.L.M. (2002) Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int. J. Dermatol.* 41: 557-62.

Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5.

Barrios E., Vasallo J., De Stéfani E. (2001) Patterns of cutaneous malignant melanoma incidence and mortality in Uruguay. *Melanoma Res.* 11 (suppl: S138).

Bastiaens M.T., ter Huurne J., Kielich C., Gruis N., Westendorp R.G., Vermeer B.J., Bavinck J.N. (2001) Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 884-94.

Bataille V. (2003) Genetic epidemiology of melanoma. *Eur. J. Cancer* 39: 1341-1347.

Bertoni B., Jin L., Chakraborty R., Sans M. (2005) Directional mating and a rapid male population expansion in a hybrid Uruguayan population. *Am. J. Hum. Biol.* 17: 801-8.

Bloethner S., Scherer D., Drechsel M., Hemminki K., Kumar R. (2009) Malignant melanoma: a genetic overview. *Actas Dermosifiliogr.* 100 Suppl: 38-51.

Bonilla C., Parra E.J., Pfaff C.L., Dios S., Marshall J.A., Hamman R.F., Ferrell R.E., Hoggart C.L., McKeigue P.M., Shriver M.D. (2004a) Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann. Hum. Genet.* 68: 139-153.

Bonilla C., Shriver M.D., Parra E.J., Jones A., Fernández J.R. (2004b) Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city. *Hum. Genet.* 115: 57-68.

Chakraborty R. (1985) Gene Identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In: Neel J.V., Ahuja Y.

- (Eds.) Genetic microdifferentiation in Man and others animals. Indian Anthropological Association, Delhi University, Anthropology Department: Delhi pp. 171-180.
- Chakraborty R., Weiss K.M. (1988) Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9119-23.
- Dalziel M., Kolesnichenko M., das Neves R.P., Iborra E., Goding C., Furger A. (2010) -MSH regulates intergenic splicing of MC1R and TUBB3 in human melanocytes. *Nucleic Acids Res.* 1-15.
- Darvasi A., Shifman S. (2005) The beauty of admixture. *Nat. Genet.* 37: 118-119.
- Deménais F., Mohamdi H., Chaudru V., Goldstein A.M., Newton Bishop J.A., Bishop D.T., Kanetsky P.A., Hayward N.K., Gillanders E., Elder D.E., Avril M.F., Azizi E., van Belle P., Bergman W., Bianchi-Scarrà G., Bressac-de Paillerets B., Calista D., Carrera C., Hansson J., Harland M., Hogg D., Höiom V., Holland E.A., Ingvar C., Landi M.T., Lang J.M., Mackie R.M., Mann G.J., Ming M.E., Njauw C.J., Olsson H., Palmer J., Pastorino L., Puig S., Randerson-Moor J., Stark M., Tsao H., Tucker M.A., van der Velden P., Yang X.R., Gruis N. (2010) Association of MC1R Variants and Host Phenotypes With Melanoma Risk in CDKN2A Mutation Carriers: A GenoMEL Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 102 (20): 1568-83.
- Duffy D.L., Box N.F., Chen W., Palmer J.S., Montgomery G.W., James M.R., Hayward N.K., Martin N.G., Sturm R.A. (2004) Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 13: 447-61.
- Erdei E., Torres S.M. (2010) A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 10: 1811-1823.
- Fargnoli M.C., Spica T., Sera F., Pellacani G., Chiarugi A., Seidenari S., Carli P., Chimenti S., Peris K. (2006) Re: MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *J. Natl. Cancer Inst.* 98: 144-5; author reply 145-6.
- Fernandez L., Milne R., Bravo J., Lopez J., Avilés J., Longo M., Benítez J., Lázaro P., Ribas G. (2007) MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. *Carcinogenesis* 28: 1659-64.
- Garbe C., Leiter U. (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* 27: 3-9.
- Gerstenblith M.R., Goldstein A.M., Fargnoli M.C., Peris K., Ñ M.T.L. (2007) Comprehensive Evaluation of Allele Frequency Differences of MC1R Variants Across Populations. *Hum. Mutat.* 28: 495-505.
- Goldstein A.M., Chan M., Harland M., Hayward N.K., Deménais F., Bishop D.T., Azizi E., Bergman W., Bianchi-Scarra G., Bruno W., Calista D., Albright L.A.C., Chaudru V., Chompret A., Cuellar F., Elder D.E., Ghiorzo P., Gillanders E.M., Gruis N.A., Hansson J., Hogg D., Holland E.A., Kanetsky P.A., Kefford R.F., Landi M.T., Lang J., Leachman S.A., MacKie R.M., Magnusson V., Mann G.J., Bishop J.N., Palmer J.M., Puig S., Puig-Butille J.A., Stark M., Tsao H., Tucker M.A., Whitaker L., Yakobson E. (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J. Med. Genet.* 44: 99-106.
- Hidalgo P.C., Bengochea M., Abilleira D., Cabrera A., Alvarez I. (2005) Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYP A, HBBG, GC and D7S8. *Int. J. Hum. Genet.* 5: 217-222.
- Hu H.H., Benfodda M., Dumaz N., Gazal S., Descamps V., Bourillon A., Basset-Seguín N., Riffault A., Ezzedine K., Bagot M., Bensussan A., Saiag P., Grandchamp B., Soufir N. (2014) A large French case-control study emphasizes the role of rare Mc1R variants in melanoma risk. *Biomed Res. Int.* 2014: 1-10.
- Ibarrola-Villava M., Fernandez L.P., Pita G., Bravo J., Floristan U., Sendagorta E., Feito M., Avilés J.A., Martin-Gonzalez M., Lázaro P., Benítez J., Ribas G. (2010) Genetic analysis of three important genes in

- pigmentation and melanoma susceptibility: CDKN2A, MC1R and HERC2/OCA2. *Exp. Dermatol.* 19: 836-44.
- Ibarrola-Villava M., Hu H.H., Guedj M., Fernandez L.P., Descamps V., Basset-Seguín N., Bagot M., Bensussan A., Saiag P., Fargnoli M.C., Peris K., Aviles J. A., Lluch A., Ribas G., Soufir N. (2012a) MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in southern European populations: results from a meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 48: 2183-91.
- Ibarrola-Villava M., Martin-Gonzalez M., Lazaro P., Pizarro A., Lluch A., Ribas G. (2012b) Role of glutathione S-transferases in melanoma susceptibility: association with GSTP1 rs1695 polymorphism. *Br. J. Dermatol.* 166: 1176-83.
- Kanetsky P.A., Ge F, Najarian D., Swoyer J., Panossian S., Schuchter L., Holmes R., Guerry D., Rebbeck T.R. (2004) Assessment of polymorphic variants in the melanocortin-1 receptor gene with cutaneous pigmentation using an evolutionary approach. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 808-19.
- Kanetsky P.A., Swoyer J., Panossian S., Holmes R., Guerry D., Rebbeck T.R. (2002) A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 770-5.
- Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. (2003) Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55: 77-96.
- Landi M.T., Kanetsky P.A., Tsang S., Gold B., Munroe D., Rebbeck T., Swoyer J., Ter-Minassian M., Hedayati M., Grossman L., Goldstein A.M., Calista D., Pfeiffer R.M. (2005) MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *J. Natl. Cancer Inst.* 97: 998-1007.
- Larre Borges A., Cuéllar F., Puig-Butillé J., Scarone M., Delgado L., Badenas C., Milà M., Malveyh J., Barquet V., Núñez J., Laporte M., Fernández G., Levrero P., Martínez-Asuaga M., Puig S. (2009) CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br. J. Dermatol.* 161: 536-41.
- Lascano A.R., Kuznitsky R., Cuestas E., Mainardi C., Albertini R., Borello A., Kurpis M., Campana R., Palazzo E. (2004) Factores de riesgo para melanoma cutáneo. Estudio de casos y controles en Córdoba, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 64: 504-508.
- Luiz O.C., Gianini R.J., Gonçalves F.T., Francisco G., Festa-Neto C., Sanches J.A., Gattas G.J.F., Chammas R., Eluf-Neto J. (2012) Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of Sao Paulo, Brazil: a case-control study. *PLoS One* 7: e36348.
- Matichard E., Verpillat P., Meziani R., Gérard B., Descamps V., Legroux E., Burnouf M., Bertrand G., Bouscarat F., Archimbaud A., Picard C., Ollivaud L., Basset-Seguín N., Kerob D., Lanténier G., Lebbe C., Crickx B., Grandchamp B., Soufir N. (2004) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure. *J. Med. Genet.* 41: 13e-13.
- McKeigue P.M. (1998) Mapping genes that underlie ethnic differences in disease risk: methods for detecting linkage in admixed populations, by conditioning on parental admixture. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 241-51.
- Nikolaou V.A., Sypsa V., Stefanaki I., Gogas H., Papadopoulos O., Polydorou D., Plaka M., Tsoutsos D., Dimou A., Mourtzoukou E., Korfitis V., Hatzilou E., Antoniou C., Hatzakis A., Katsambas A., Stratigos A.J. (2008) Risk associations of melanoma in a Southern European population: results of a case/control study. *Cancer Causes Control* 19: 671-9.
- Palmer J.S., Duffy D.L., Box N.F., Aitken J.F., O’Gorman L.E., Green A.C., Hayward N.K., Martin N.G., Sturm R.A. (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66: 176-86.
- Pimenta J.R., Zuccherato L.W., Debes A.A., Maselli L., Soares R.P., Moura-Neto R.S., Rocha J., Bydlowski S.P., Pena S.D.J. (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum. Hered.* 62: 190-5.

- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559-575.
- Raimondi S., Sera F., Gandini S., Iodice S., Caini S., Maisonneuve P., Fargnoli M.C. (2008) MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int. J. Cancer* 122: 2753-60.
- Sans M., Salzano F.M., Chakraborty R. (1997) Historical genetics in Uruguay: Estimates of biological origins and their problems. *Hum. Biol.* 69: 161-170.
- Savage S.A., Gerstenblith M.R., Goldstein A.M., Mirabello L., Fargnoli M.C., Peris K., Landi M.T. (2008) Nucleotide diversity and population differentiation of the melanocortin 1 receptor gene, MC1R. *BMC Genet.* 9: 31.
- Scherer D., Kumar R. (2010) Genetics of pigmentation in skin cancer- A review. *Mutat. Res.* 705: 141-153.
- Scherer D., Nagore E., Bermejo J.L., Figl A., Botella-Estrada R., Thirumaran R.K., Angelini S., Hemminki K., Schadendorf D., Kumar R. (2009) Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: a study of 2 European populations. *Int. J. Cancer* 125: 1868-75.
- Schmerling R.A., Loria D., Cinat G., Ramos W.E., Cardona A.F., Sánchez J.L., Martínez-Said H., Buzaid A.C. (2011) Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. *Rev. Panam. Salud Pública* 30: 431-8.
- Solé X., Guinó E., Valls J., Iñesta R., Moreno V. (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928-9.
- Sortino-Rachou A.M., Curado M.P. (2011) Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study- Melanoma cutâneo na América Latina: estudo descritivo de base populacional. *Cancer* 27: 565-572.
- Stratigos A.J., Dimisianos G., Nikolaou V., Poulou M., Sypsa V., Stefanaki I., Papadopoulos O., Polydorou D., Plaka M., Christofidou E., Gogas H., Tsoutsos D., Kastana O., Antoniou C., Hatzakis A., Kanavakis E., Katsambas A.D. (2006) Melanocortin receptor-1 gene polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma in a low-risk southern European population. *J. Invest. Dermatol.* 126: 1842-9.
- Suarez-Kurtz G., Vargens D.D., Struchiner C.J., Bastos-Rodrigues L., Pena S.D.J. (2007) Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet. Genomics* 17: 765-71.
- Valverde P., Healy E., Jackson I., Rees J.L., Thody A.J. (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11: 328-30.
- Wong T.H., Rees J.L. (2005) The relation between melanocortin 1 receptor (MC1R) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. *Peptides* 26: 1965-71.
- Zhu X., Tang H., Risch N. (2008) Admixture Mapping and the Role of Population Structure for Localizing Disease Genes. *Adv. Genet.* 60: 547-569.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all the participants of the study, and Clínica de Lesiones Pigmentarias of the Hospital “Manuel Quintela”. We thank P. Silveira from the Laboratorio de Análisis Clínicos and M. Gardner for her review of manuscript language. This study was supported by grants from the Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (CHLCC), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and partially supported by a grant from the Ministerio de Salud Carlos III (PI10-00405, CP08-00069 to G.R.).

Authors' contributions

BB and MMA conceived and planned the investigation. JH and BB wrote the manuscript; JH and VC performed the statistical analysis; JP, SN and ALB recruited sporadic melanoma cases and controls and performed the clinical examination; JH, GR and MC processed blood samples and/or genotyped the SNPs. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests: The authors have no competing interests

ANENCEPHALY ASSOCIATED TO TRISOMY 18 WITH HIGH ALFA-1 FETOPROTEIN IN AMNIOTIC LIQUID. ONE CASE REPORTED IN SAN LUIS, ARGENTINA

ANENCEFALIA ASOCIADA A TRISOMÍA 18 CON ELEVADA ALFA-1-FETOPROTEÍNA EN LÍQUIDO AMNIÓTICO. UN CASO REPORTADO EN SAN LUIS, ARGENTINA

Marsa S.M.¹, Della Vedova M.C.², Olivera M.³, Siewert S.E.²

¹Laboratorio GENES, San Luis, Argentina.

²Facultad de Química Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina.

³Sanatorio y Clínica Rivadavia, San Luis, Argentina.

smarsa@gmail.com

ABSTRACT

Authors present a case of anencephaly with trisomy 18, diagnosed prenatally by ultrasonographic screening and karyotype of cultured amniotic cells. Elevated levels of alpha-1-fetoprotein (AFP) were found in the amniotic fluid of a 33-year-old woman in the 15th week of gestation. Since fetuses with trisomy 18 are subjected to early fetal loss or premature birth, the more subtle physical features of this condition may not be apparent. Our case supports the premise that anencephaly is part of the trisomy 18 phenotype. Thus, performing karyotype of fetuses with anencephaly should be considered.

Key words: Anencephaly, Alpha-1 fetoprotein, Trisomy 18.

RESUMEN

Se presenta un caso de anencefalia con trisomía 18, diagnosticado prenatalmente mediante *screening* ecográfico y cariotipo en células amnióticas cultivadas. Se encontraron niveles elevados de alfa-1-fetoproteína (AFP) en el líquido amniótico de una mujer de 33 años de edad, en la semana 15 de gestación. Como los fetos con trisomía 18 están sujetos a la pérdida temprana o a un parto prematuro, las características físicas más sutiles de esta condición no suelen ser evidentes. Nuestro caso es compatible con la premisa de que la anencefalia es parte del fenotipo de la trisomía 18. Por lo tanto, se debe considerar la realización del cariotipo en los fetos con anencefalia.

Palabras clave: anencefalia, Alfa-1- fetoproteína, trisomía 18.

Fecha de recepción: 09/03/2015
Fecha de aceptación de versión final: 17/11/2015

INTRODUCCIÓN

Bajo el nombre de defectos del tubo neural (DTN) se agrupan una serie de anomalías congénitas como anencefalia, espina bífida y encefalocele. Este grupo de defectos congénitos se halla entre los más comunes (Main y Mennuti, 1986; Botto *et al.*, 1999), alcanzando niveles de incidencia altos en algunas poblaciones (Langman, 1976). Para efectos del diagnóstico prenatal se debe hacer la distinción de defectos abiertos y cerrados. Un defecto abierto describe una situación en la cual hay comunicación entre el fluido cerebrospinal y el líquido amniótico, mientras que un defecto cerrado hay una piel gruesa que cubre el defecto.

En general, los casos más frecuentes son de anencefalia con craneorraquisquisis y la espina bífida abierta con mielosquisis, los cuales se evidencian durante el proceso de neurulación, generalmente durante las semanas 3 y 4 después de la fecundación. Estas se originan como consecuencia de una falla primaria del cierre del tubo neural y clínicamente se cataloga como abierto.

Los defectos cerrados acontecen cerca del 10 % de todos los DTN (Ruoslahti *et al.*, 1966). La sangre fetal tiene un nivel normal de AFP en un DTN, la ruta por la que aumentan los niveles de AFP en el líquido amniótico se presume que puede ser por la salida del líquido cefalorraquídeo o por la trasudación o sangrado de capilares fetales directamente expuestos al fluido amniótico. Estas afirmaciones se apoyan en el hecho de que los niveles de AFP en espina bífida cerrada son normales o solo incrementados ligeramente (Ruoslahti *et al.*, 1966).

La etiología de los DTN involucra factores ambientales y genéticos. En el caso de los factores ambientales, se ha identificado la utilización del ácido fólico como un factor protector contra los DTN, por el contrario el abuso del alcohol en el primer mes de embarazo se asocia con los DTN (Campbell *et al.*, 1986). Estudios epidemiológicos han demostrado variaciones geográficas, temporales, en el nivel socioeconómico, en la dieta materna y en la exposición a drogas en la incidencia de los DTN.

Los DTN y su asociación con aneuploidías (trisomía 13, trisomía 18) han sido bien documentadas en la literatura (Flannery y Kahler, 1986; Moore *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 1990; Seller, 1995).

Sin embargo, el papel del diagnóstico cromosómico fetal como análisis de rutina en estos casos aún no han sido completamente aclarados. Ya que los DTN suelen

ocurrir como resultado de herencia multifactorial en lugar de ser secundaria a un desorden cromosómico (Main y Mennuti, 1986; Botto *et al.*, 1999), algunos investigadores consideran que el análisis cromosómico prenatal de rutina no se justifica, en particular en aquellos fetos con defectos aparentemente aislados (Nicolaidis *et al.*, 1992). Por el contrario, otros autores han argumentado que el análisis cromosómico prenatal se indica en vista de la alta prevalencia de anormalidades cromosómicas, a pesar de resultados ecográficos normales, resaltando la importancia de esta información para el consejo genético en un futuro embarazo (Babcock *et al.*, 1995; Harmon *et al.*, 1995; Hume *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1998).

El objetivo de informar nuestro caso clínico es destacar la importancia de realizar el análisis cromosómico prenatal de rutina en los fetos con DTN, en este caso anencefalia, con especial referencia a la utilidad de la ecografía en la detección de los fetos con una subyacente anormalidad cromosómica.

CASO CLÍNICO

Paciente primigesta de 33 años de edad sin antecedentes médico-quirúrgicos de interés, que acude a su primer control ecográfico en la semana 15. Por ecografía se visualizó a nivel cefálico la ausencia de bóveda craneana y la ausencia de una parte importante del cerebro, como así también un aumento en el volumen de líquido amniótico en relación a la edad gestacional. Se realiza además una evaluación completa ecográfica del feto en busca de la presencia de anomalías estructurales, sin encontrarse alguna otra malformación, aparte de la descripta.

A raíz de este hallazgo se realiza el estudio de cariotipo fetal a partir de líquido amniótico, utilizando cultivo de células con Amnio Max Medium, concluyendo que se trataba de una trisomía 18 (47, XY,+18) (Figura 1). Los niveles de alfafetoproteína (AFP) en líquido amniótico fueron muy elevados, superiores a 2,5 MOM (704800.0 UI/ml), resultado confirmado por dilución (mediana por semana: 15 semanas: 15900.0 UI/ml).

DISCUSIÓN

La trisomía 18 es la segunda trisomía autosómica más frecuente, con una incidencia entre uno en 4.000 y uno en

8.000 nacidos vivos (Carter *et al.*, 1985) siendo su prevalencia considerablemente mayor durante el primero y segundo trimestre (Snijders *et al.*, 1994). La trisomía 18 suele darse de forma aislada en la descendencia de padres fenotípicamente normales, y en estos casos el riesgo de recurrencia estimado es del 1 al 2 %.

La supervivencia es reducida de forma que el 90 % fallece en el término de un año. La medición temprana del “pliegue nucal” entre la 10^{ma} y 14^{ava} semana es el marcador más utilizado en la detección precoz de cromosomopatías, identificándose hasta un 83% de trisomías 18 por éste método (Sherod *et al.*, 1997).

Su asociación con el estudio Doppler de la arteria umbilical detectando un índice de pulsatilidad significativamente aumentado (IPAU) proporciona una sensibilidad y especificidad del 90 y 90,4% (Martínez *et al.*, 1997).

El estudio ecográfico en la primera parte del segundo trimestre, entre la semana 14 y 22 de gestación ya permite apreciar en estos fetos varias anomalías asociadas. Las más comunes son: anomalías en la posición de los dedos (89%), quistes del plexo coroideo (43%), anomalías craneales (43%), arteria umbilical única (40%), defectos cardíacos (37%) onfalocele (17%) (Snijders *et al.*, 1995) e higroma quístico o linfangectasia (14%) (Shields *et al.*, 1998). Anomalías del volumen de líquido amniótico (12%) y defectos renales (9%) parecen ser menos frecuentes. En el segundo trimestre es característico también de la trisomía 18 el retardo de crecimiento intrauterino precoz (Sherod *et al.*, 1997). De los fetos afectados por una trisomía 18 el 85% tiene un cromosoma adicional, un 10% son mosaicos y un 5% son por translocación. El origen de la no-disyunción residiría en errores de la meiosis II si se produce por no-disyunción paterna, mientras que en la no-disyunción materna el error se daría en la meiosis I estando relacionado con la edad (Schmidt y Kubli, 1982). La duplicación de sólo el brazo corto del cromosoma 18 no se relaciona con fenotipo anormal ni retraso mental, mientras que las trisomías 18 en mosaico están menos afectadas. Parece por tanto que las características fenotípicas de éste síndrome depende del brazo largo del cromosoma 18.

No se ha determinado con exactitud las causas de DTN. Se ha informado que el 12% de los casos, en promedio, depende de anormalidades cromosómicas (trisomía 18, trisomía 13 o triploidía). Los DTN también se encuentran asociados a síndromes genéticos que incluyen los síndromes de Meckel-Gruber y de Walter-Warburg (autosómicos recesivos), meningocele sacral anterior, sín-

drome Currarino y estenosis anal y, enfermedades de la gestante (diabetes o fiebre) o exposición de la mujer a teratógenos (alcohol, ácido valproico y otros antiepilépticos) (Bronsteen, 2000; Bassuk y Kibar, 2009).

Los DTN son enfermedades multifactoriales, y en más del 97% de los casos se identifica al primer miembro afectado de la familia. Después de haber una persona afectada en el núcleo familiar, el riesgo de repetición del problema en hermanos es del 3%, que aumenta a 10% después de que hay afección de dos hijos previos.

Las formas más frecuentes de DTN son anencefalia y espina bífida. Las formas más raras comprenden iniencefalia, encefalocele y craneorraquisquis (Drugan, 2001). Se observan variaciones de índole geográfica, étnica y cronológica; la incidencia es máxima en Inglaterra y mínima en Japón.

La anencefalia es una malformación letal caracterizada por la ausencia del cráneo y ambos hemisferios cerebrales, producida por falta de cierre del tubo neural rostral entre los 23 y 25 días de gestación. Por su letalidad y porque el fenotipo es bien identificado, constituye una malformación marcadora cuyo comportamiento epidemiológico puede ser analizado con bastante certeza. La anencefalia es más frecuente en niñas en una relación de 4 a 1 con varones.

La incidencia de la anencefalia se presenta en alrededor de 1 de cada 10.000 nacimientos. El número exacto es impredecible, porque en muchos casos de estos embarazos se presenta aborto espontáneo (Cook *et al.*, 2008). El hecho de tener un bebé anencefálico aumenta el riesgo de tener otro hijo con anomalías congénitas del tubo neural (Kinsman y Johnston, 2007).

Alrededor de 75% de los fetos afectados muere intraútero y 25% nacen vivos. De estos últimos, 57% fallece dentro de las primeras horas y alrededor de 15% fallece dentro de los tres días, siendo excepcionales las sobrevividas más largas (Kinsman y Johnston, 2007; Cook *et al.*, 2008; Besio y Besio, 2008).

Los antecedentes epidemiológicos de anencefalia en la Argentina son escasos. Dipierri y Ocampo (1985) determinaron en Jujuy una prevalencia de anencefalia entre 1976-1982 de 2,7/10.000 recién nacidos vivos (RNV) y de 0,87/100 mortinatos. Bronberg *et al.* (2009) estimaron entre 2002-2006 una Tasa de Mortalidad Infantil por Anencefalia (TMIA) de 2,16/10.000 RNV (IC: 1,21-3,11), y esta malformación representa el 6,4% (IC: 4,0-8,8) de las muertes por malformaciones congénitas en el país. En la Argentina, el 99% de los nacidos con anencefalia

fallecen en el primer mes de vida (Bronberg *et al.*, 2009). El trabajo realizado por el RENAC (Registro Nacional de Anomalías Congénitas de Argentina) se restringe a los datos informados por los 98 hospitales, pertenecientes a todas las provincias del territorio nacional, incorporados entre el 1 de noviembre de 2009 y el 30 de junio de 2012. Durante este período se examinaron 294.005 recién nacidos y se informaron 5.743 casos con Anomalías Congénitas, de los cuales 105 presentaron anencefalia con una prevalencia de 3,6/10.000 RNV (IC: 2,9-4,3) (Groisman *et al.*, 2013).

Alrededor de 10 países sudamericanos, en la mayoría de los cuales el aborto por malformaciones congénitas es ilegal, realizan prevención primaria de la anencefalia con fortificación obligatoria con ácido fólico (PAHO/CDC/MOD/UNICEF/INTA, 2003). Sólo Chile (López-Camelo *et al.*, 2005) y la Argentina (Calvo, 2008) han evaluado a nivel nacional la eficacia de estos programas de prevención.

Bronberg *et al.* (2011) proporcionan información epidemiológica básica sobre la prevalencia de anencefalia en la Argentina entre 1998-2007, período crítico de transición en el proceso de fortificación obligatorio con ácido fólico, demostrando que en la Argentina el riesgo de muerte por anencefalia descendió un 53 % y, que a nivel regional, el mayor descenso se observó en Cuyo (69 %) y el menor en el Noreste argentino (35 %) (Bronberg *et al.*, 2011). Cabe mencionar que esta fuente no incluye las anencefalías interrumpidas por terminación selectiva de los embarazos (Tairou *et al.*, 2006), porque el aborto por esta causa es ilegal en la Argentina y son muy pocos los pedidos de interrupción prenatal por anencefalia que se plantean judicialmente.

Por otra parte, el reporte del RENAC, correspondiente a 78 hospitales de todas las provincias del país, que ingresaron progresivamente durante el período comprendido entre noviembre de 2009 y diciembre de 2011, informa que se examinaron 182.070 recién nacidos, de los cuales 3.234 presentaron anomalías congénitas estructurales mayores, calculándose una prevalencia de trisomía 18 de 1,32/10.000 RNV (IC: 0,62-2,01) (RENAC-Ar, 2012).

A través del caso presentado queremos valorar la importancia de la ecografía prenatal durante el primer trimestre. La detección precoz ecográfica de malformaciones fetales, sobre todo cuando coexiste más de una, nos debe de hacer sospechar la existencia de una cromosomopatía lo que obliga a hacer una evaluación diagnóstica intrauterina exacta para establecer la conducta a seguir y dar la información pre y postnatal adecuada. Los hallazgos ecográficos

forman parte del fenotipo de la trisomía 18, como lo confirmó el cariotipo fetal al practicar la amniocentesis.

Las anomalías cromosómicas han sido reportadas en 2,5 a 10,26% de fetos y recién nacidos con DTN (Drugan *et al.*, 1989; Hume *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1998; O'Reilly y Shields, 2000; Sepulveda *et al.*, 2004; Stoll *et al.*, 2007).

Las anomalías cromosómicas se presentan en 0,66 a 5,56% de los casos de anencefalia (Drugan *et al.*, 1989; Hume *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1998; Sepulveda *et al.*, 2004; Stoll *et al.*, 2007). Moore *et al.* (1988), en la serie de pacientes que recoge describe una frecuencia de DTN del 7%, y de onfalocelo del 5,9% en la trisomía 18. Snijders *et al.* (1995) encuentra una frecuencia de exonfalos u onfalocelo en el 17% de fetos con trisomía 18 ó 13, mientras que en los que no hay evidencia de estas trisomías era de 0,05%. Es decir que el riesgo de cromosomopatía en fetos con exonfalos es 340 veces mayor.

Varios estudios han demostrado que los DTN se presentan en 6-11% de casos de trisomía 18 (Moore *et al.*, 1988; Passarge *et al.*, 1966; Flannery y Kahler, 1986). La trisomía 18 se ha asociado con espina bífida, encefalocelo y anencefalia. La mayoría de los defectos del tubo neural reportados asociados con trisomía 18 son espina bífida. Ocasionalmente se han registrado encefalocelo y anencefalia. A nivel mundial son pocos los casos clínicos en que se han reportado anencefalías y/o encefalocelos asociados a trisomía 18 (Menashi *et al.* 1977, Merrild *et al.* 1978, Nisani *et al.* 1981, Ramos *et al.* 1985, Seller, *et al.* 2004, Chen 2005).

Hasta donde tenemos conocimiento no se tienen registros de anencefalia asociada a trisomía 18 en Argentina, siendo nuestro caso clínico el primero descrito en nuestro país.

Se considera que las aneuploidías, y en concreto la trisomía 18, está presente con mayor frecuencia en los casos en los que existe una anencefalia, y máxime si hay anomalías congénitas múltiples (Hume *et al.*, 1996).

Durante el segundo trimestre se han utilizado distintos parámetros predictivos como método de *screening* para la trisomía 18, como el estriol no conjugado, la AFP, HCG, combinados con la edad materna, siendo el primero el que mejor valora el riesgo (Palomaki *et al.*, 1995).

El incremento de los niveles de alfa-fetoproteína sérica materna (MS-AFP) se ha asociado con ciertas anomalías morfológicas del feto como defectos de la pared abdominal (onfalocelo, gastrosquisis, eventración completa), defectos del tubo neural (anencefalia, espina bífida, encefalocelo) y otras malformaciones (teratoma sacro coxígeo) (Gremm *et al.*, 1997). Niveles superiores a 2 MOM (múltiplos de

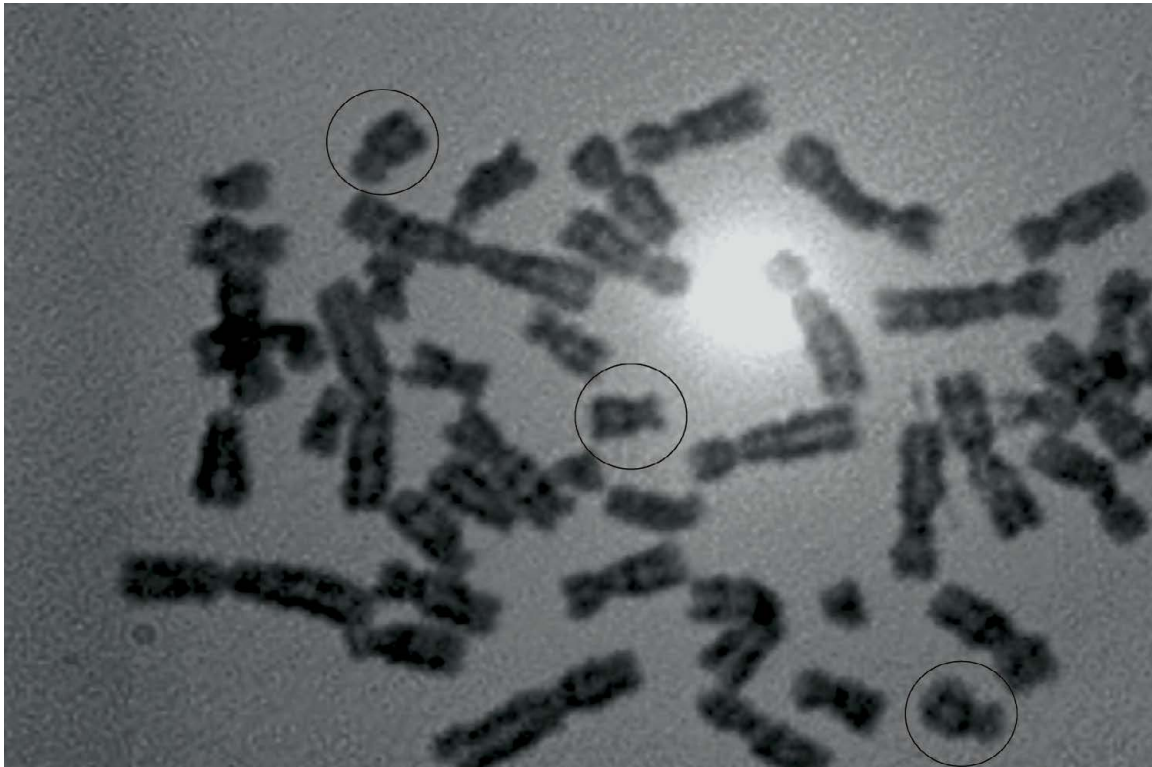


Figura 1. Microfotografía de una Metafase obtenida a partir del cultivo del líquido amniótico del feto analizado. Aumento 1000 x. Los tres círculos encierran los tres cromosomas 18.

la mediana) de AFP sérica o AFP en líquido amniótico (LA-AFP) serían indicadores de anomalías morfológicas en el feto. La determinación de la actividad positiva de acetilcolinesterasa en el líquido amniótico es todavía más específica.

La relación existente entre los niveles altos de AFP y los defectos del tubo neural, se sospechó 30 años atrás, cuando Brock *et al.* (1976) informaron de anencefalia y espina bífida con niveles altos de AFP antes y después de la semana 24 de gestación. Entre las semanas 8 y 13 de gestación se dan cambios muy rápidos en los niveles de AFP en el líquido amniótico por lo que es muy difícil la interpretación clínica de esta medición y muy dependiente del cálculo de la edad gestacional de la paciente (Wathen, 1993). Solamente un 2% de las AFP elevadas están relacionadas con malformaciones fetales, fundamentalmente con defectos del tubo neural (Moína *et al.*, 2001).

Además una tercera parte de las pacientes con la primera muestra elevada tendrá un valor normal en la segunda determinación (Verpyck *et al.*, 1999). La AFP no es un marcador diagnóstico ni específico de los DTN u otras malformaciones congénitas, y su valor debe ser interpre-

tado junto con los resultados de otros análisis bioquímicos en el suero materno, ecografía, etc., con el fin de optimizar el diagnóstico prenatal, disminuyendo así las posibilidades de falsos positivos y negativos. La determinación de la AFP en el líquido amniótico es un método confiable para la detección de un posible DTN u otra anomalía congénita pero la amniocentesis conlleva un riesgo de daño fetal y no puede ser usada para un programa de tamizaje. Utilizando los marcadores anteriormente expuestos se puede seleccionar aquellos casos en los cuales es necesario realizarles una amniocentesis.

Históricamente, las anomalías del sistema nervioso central fueron el primer grupo de malformaciones fetales que se detectaron por ecografía prenatal. La anencefalia fue la primera anomalía fetal en diagnosticarse por este método (Hendricks *et al.*, 1988); suele realizarse entre las semanas 11 y 12, aunque hay informes de casos diagnosticados desde la octava semana.

Ahora bien el estudio ecográfico nos permite apreciar éstas malformaciones antes de que los resultados analíticos estén disponibles. Nuestro planteamiento es poder realizar un diagnóstico ecográfico exacto basándonos en las imágenes

visualizadas. Es aquí donde se debe establecer el diagnóstico diferencial con otras entidades nosológicas que cursan con varias anomalías morfológicas asociadas: extrofia cloacal, ectopia cordis o pentalogía de Cantrell, síndrome de Wiedemann Beckwith, anomalías del tallo corporal y síndrome de brida amniótica (Gremm *et al.*, 1997).

Finalmente el síndrome de banda amniótica requiere la visualización de láminas o bridas amnióticas que se unen al feto y que son las causantes de las anomalías fetales presentes: anencefalia, gastrosquisis, onfalocele, extrofia vesical y en miembros desde anillos constrictivos a amputaciones de miembros o dedos. El cariotipo es normal. Hay casos descritos en el que se combina éste síndrome con la pentalogía de Cantrell y exencefalia (Bognoni y Quartuccio, 1999; Schuppler *et al.*, 1994; Peer *et al.*, 1993).

Por lo expuesto, en etapas tempranas de la gestación el tamizado sistemático ecográfico nos proporciona una atractiva posibilidad en la detección de anomalías estructurales congénitas. El diagnóstico ecográfico de estos síndromes malformativos podría realizarse por la minuciosa y repetida inspección de la cabeza y cuerpo fetal en cortes longitudinal y transversal durante el primer trimestre. La amniocentesis es aconsejable siempre que se aprecien varias anomalías asociadas, como en el caso que nos ocupa, para el estudio del cariotipo fetal, y decidir con todo ello, la conducta a seguir en función del pronóstico y la severidad de las anomalías encontradas.

CONCLUSIONES

Ante la detección de DTN en un feto o en un recién nacido, es muy importante determinar si éstos se presentan aislados o formando parte de un cuadro polimalformativo o un síndrome, ya que el asesoramiento a la familia sobre el riesgo de repetición va a ser muy distinto. Pero, además, porque las alternativas para la prevención van a ser también diferentes. Así, si el DTN es aislado, se debe ofrecer a la mujer una suplementación periconcepcional con ácido fólico en sus siguientes gestaciones. Por el contrario, si el DTN es parte de un síndrome, en nuestro caso una trisomía 18, el riesgo de repetición del síndrome no se altera aunque la mujer siga un tratamiento con ácido fólico. Por ello, consideramos sumamente importante reconocer aquellos casos en los que los DTN son parte del espectro clínico de manifestación del síndrome, para poder ofrecer una información adecuada a la familia.

BIBLIOGRAFÍA

- Babcook C.J., Goldstein R.B., Filly R.A. (1995) Prenatally detected fetal myelomeningocele: is karyotype analysis warranted? *Radiology* 194: 491-494.
- Bassuk A., Kibar Z. (2009) Genetics Basis of Neural Tube Defects. *Semin. Pediatr. Neurol.* 16: 101-110.
- Besio M., Besio F. (2008) Estatuto ontológico y ético del feto anencefálico: Una perspectiva filosófica. *Rev. Med. Chile* 136: 183-188.
- Bognoni V., Quartuccio A. (1999) First-trimester sonographic diagnosis of Cantrell's pentalogy with exencephaly. *J. Clin. Ultrasound.* 27: 276-278.
- Botto L.D., Moore C.A., Khoury M.J., Erickson J.D. (1999) Neural-tube defects. *N. Engl. J. Med.* 341: 1509-1519.
- Brock D.J.H. (1976) Prenatal diagnosis-chemical methods. *Br. Med. Bull.* 32: 16-20.
- Bronberg R., Alfaro E., Chaves E., Dipierri J. (2009) Mortalidad infantil por malformaciones congénitas en Argentina: análisis del quinquenio 2002-2006. *Arch. Argent. Pediatr.* 107: 203-211.
- Bronberg R., Alfaro E., Chaves E., Andrade A., Gili J., López Camelo J., Dipierri J. (2011) Mortalidad infantil por anencefalia en la Argentina. Análisis espacial y temporal (1998-2007). *Arch. Argent. Pediatr.* 109: 117-123.
- Bronsteen R. (2000) Anomalías del Sistema Nervioso Central. En: Malone J. (Ed.) *Clínicas de Perinatología: Anomalías Congénitas*. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 807-829.
- Calvo E. (2008) Fortificación con ácido fólico y defectos del tubo neural. *Arch. Argent. Pediatr.* 106: 291-292.
- Campbell R.L., Dayton D.H., Sohal G.S. (1986) Neural tube defects: A review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. *Teratology* 34: 171-187.

- Carter P.E., Pearn J.H., Bell J., Martin N., Anderson N.G. (1985) Survival in trisomy 18. Life tables for use in genetic counselling and clinical paediatrics. *Clin. Genet.* 27: 59-61.
- Chen C.P. (2005) Central nervous system anomalies associated with fetal trisomy 18. *Prenat. Diagn.* 25: 419-421.
- Cook R.J., Erdman J.N., Hevia M., Dickens B.M. (2008) Prenatal management of anencephaly. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 102: 304-308.
- Dipierri J.E., Ocampo S.B. (1985) Anencefalia en la Provincia de Jujuy (República Argentina). *Mendeliana* 7: 49-55.
- Drugan A., Johnson M.P., Dvorin E., Moody J., Krivchenia E.L., Schwartz D., Evans M.I. (1989) Aneuploidy with neural tube defects: another reason for complete evaluation in patients with suspected ultrasound anomalies or elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Fetal Ther.* 4: 88-92.
- Drugan A. (2001) Detección sistemática de defectos del tubo neural. En: Evans M. (Ed.) *Clínicas de Perinatología: Pruebas para detectar alteraciones metabólicas y genéticas.* McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 267-275.
- Flannery D.B., Kahler S.G. (1986) Neural tube defects in trisomy 18. *Prenat. Diagn.* 6: 97-99.
- Gremm B., Sohn C., Beldermann F., Bastert G. (1997) Increased AFP in maternal serum as an indication for invasive diagnosis. *Zentralbl Gynakol* 119: 560-566.
- Groisman B., Bidondo M.P., Barbero P., Gili J.A., Liascovich R. (2013) RENAC: Registro Nacional de Anomalías Congénitas de Argentina. *Arch. Argent. Pediatr.* 111: 484-494.
- Harmon J.P., Hiatt A.K., Palmer C.G., Golichowski A.M. (1995) Prenatal ultrasound detection of isolated neural tube defects: is cytogenetic evaluation warranted? *Obstet. Gynecol.* 86: 595-599.
- Hendricks S.K., Cyr D.R., Nyberg D.A. (1988) Exencephaly: clinical and ultrasonic correlation to anencephaly. *Obstet. Gynecol.* 72: 898-901.
- Hume R.F., Drugan A., Reichler A., Lampinen J., Martin L.S., Johnson M.P., Evans M.I. (1996) Aneuploidy among prenatally detected neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 61: 171-173.
- Kennedy D., Chitayat D., Winsor E.J.T., Silver M., Toi A. (1998) Prenatally diagnosed neural tube defects: ultrasound, chromosome and autopsy or postnatal findings in 212 cases. *Am. J. Med. Genet.* 77: 317-321.
- Kinsman S.L., Johnston M.V. (2007) Congenital anomalies of the central nervous system. In: Kliegman R.M., Behrman R.E., Jenson H.B., Stanton B.F. (Eds.) *Nelson Textbook of Pediatrics.* 18th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; chap 592.
- Langman J. (1976) *Embriología Médica.* Editorial Interamericana, 3ª ed., México.
- López-Camelo J.S., Orioli I.M., Dutra M., Nazer-Herrera J., Rivera N., Ojeda M.E., Canessa A., Wettig E., Fontannaz A.M., Mellado C., Castilla E.E. (2005) Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am. J. Med. Genet. A.* 135: 120-125.
- Main D.M., Mennuti M.T. (1986) Neural tube defects: issues in prenatal diagnosis and counselling. *Obstet. Gynecol.* 67: 1-16.
- Martínez J.M., Antolín E., Borrell A., Puerto B., Casals E., Ojuel J., Fortuny A. (1997) Umbilical doppler velocimetry in fetuses with trisomy 18 at 10-18 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.* 17: 319-322.
- Menashi M., Ornoy A., Cohen M.M. (1977) Anencephaly in trisomy 18: related or unrelated? *Teratology* 15: 325-328.
- Merrill U., Schiøler V., Christensen F, Wolny E., Edeling C.J. (1978) Anencephaly in trisomy 18 associated with elevated alpha-1-fetoprotein in amniotic fluid. *Hum. Genet.* 45: 85-88.

- Moína M.J., Cárdenas M., Agramunt G., Venta R., Alvarez E.V. (2001) Utilidad de la alfafetoproteína sérica materna como parámetro de riesgo del embarazo. *Prog. Obstet. Ginecol.* 44: 252-260.
- Moore C.A., Harman J.P., Padilla L.M., Castro V.B., Weaver D.D. (1988) Neural tube defects and omphalocele in trisomy 18. *Clin. Genet.* 34: 98-103.
- Nicolaides K.H., Snijders R.J., Gosden C.M., Berry C., Campbell S. (1992) Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet* 340: 704-707.
- Nisani R., Chemke J., Cohen-Ankori H., Nissim F. (1981) Neural tube defects in trisomy 18. *Prenat. Diagn.* 1: 227-231.
- O'Reilly G.C., Shields L.E. (2000) Karyotyping for isolated neural tube defects: a report of two cases. *J. Reprod. Med.* 45: 950-952.
- PAHO/CDC/MOD/UNICEF/INTA (2003) Flour fortification with iron, folic acid and vitamin B12. Regional Meeting Report, Santiago, Chile.
- Palomaki G.E., Haddow J.E., Knight G.J., Wald N.J., Kennard A., Canick J.A., Saller D.N.Jr., Blitzler M.G., Dickerman L.H., Fisher R. (1995) Risk-based prenatal screening FOR trisomy 18 USING ALPHA-fetoprotein, unconjugated o estriol AND human chorionic gonadotropin. *Prenat. Diagn.* 15: 713-723.
- Passarge E., True C.W., Sueoka W.T., Baumgartner N.R., Keer K.R. (1966) Malformations of the central nervous system in trisomy 18 syndrome. *J. Pediatr.* 69: 771-778.
- Peer D., Moroder W., Delucca A. (1993) Prenatal diagnosis of the pentalogy of Cantrell combined with exencephaly and amniotic band syndrome. *Ultraschall Med.* 14: 94-95.
- Ramos C., Palacios S., Ayuso C., Sanchez Cascos A. (1985) Prenatal diagnosis in a fetus with anencephaly and trisomy 18. *An. Esp. Pediatr.* 23: 278-280.
- RENAC-Ar: Registro Nacional de Anomalías Congénitas en Argentina. Reporte Anual 2012. Datos de los años 2009-2011. Ministerio de Salud de la Nación (<http://www.anlis.gov.ar/cenagem/wp-content/uploads/2013/11/REPORTE-2012.pdf>).
- Rodriguez J.I., García M., Morales C., Morillos A., Delicado A. (1990) Trisomy 13 syndrome and neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 36: 513-516.
- Ruoslahti E., Tallberg T., Seppala M. (1966) Origin of proteins in amniotic fluid. *Nature* 212: 841-843.
- Schmidt W., Kubli F. (1982) Early diagnosis of severe congenital malformations by ultrasonography. *J. Perinat. Med.* 10: 233-241.
- Schuppler U., Weisner D., Schollmeyer T., Grillo M., Franz W. (1994) Combination of Cantrell pentalogy and amniotic band syndrome: a case report. *Zentralbl Gynakol* 116: 115-119.
- Seller M.J. (1995) Neural tube defects, chromosome abnormalities and multiple closure sites for the human neural tube. *Clin. Dysmorphol.* 4: 202-207.
- Seller M.J. (2004) A trisomy 2 fetus with severe neural tube defects and other abnormalities. *Clin. Dysmorphol.* 13(1):25-7
- Sepulveda W., Corral E., Ayala C., Be C., Gutierrez J., Vasquez P. (2004) Chromosomal abnormalities in fetuses with open neural tube defects: prenatal identification with ultrasound. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 23: 352-356.
- Sherod C., Sebire N.J., Soares W., Snijders R.J., Nicolaides K.H. (1997) Prenatal diagnosis of trisomy 18 at the 10-14 week ultrasound scan. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 10: 387-390.
- Shields L.E., Carpenter L.A., Smith K.M., Nghiem H.V. (1998) Ultrasonographic diagnosis of trisomy 18: is it practical in the early second trimester? *J. Ultrasound Med.* 17: 327-331.

- Snijders R.J.M., Holzgreve W., Cucklie H., Nicolaides K.H. (1994) Maternal-age specific risks for trisomies at 9-14 weeks gestation. *Prenat. Diagn.* 14: 543-552.
- Snijders R.J., Brizot M.L., Faria M., Nicolaides K.H. (1995) Fetal exomphalos at 11 to 14 weeks of gestation. *J. Ultrasound Med.* 14: 569-574.
- Stoll C., Alembik Y., Dott B. (2007) Associated malformations in cases with neural tube defects. *Genet. Couns.* 18: 209-215.
- Tairou F., De Wals P., Bastide A. (2006) Validity of death and stillbirth certificates and hospital discharge summaries for the identification of neural tube defects in Quebec City. *Chronic. Dis. Can.* 27: 120-124.
- Verpyck E., Degree S., Hellot M.F., Descargues G., Philippe C., Labadie G. (1999) Amniotic fluid alpha-fetoprotein is not a useful biological marker of pregnancy outcome. *Prenat. Diag.* 19: 1031-1034.
- Wathen N.C. (1993) Alphafetoprotein levels in amniotic fluid from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 100: 380-382.

DYNAMICS OF DNA DAMAGE IN LEUKOCYTES OF THOROUGHbred EQUINES SUBJECTED TO A STANDARDIZED EXERCISE TEST

DINÁMICA DEL DAÑO EN EL ADN EN LEUCOCITOS DE EQUINOS SANGRE PURA DE CARRERA SOMETIDOS A UN TEST DE EJERCICIO ESTANDARIZADO

Muriel M.¹, Seoane A.², Savignone C.³, Palacios A.³, Ferreira V.¹, Boffi F.M.⁴, Picco S.J.^{2*}

¹Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Hospital Escuela, FCV UNLP. Centro de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata/CONICET, Argentina.

³Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

⁴Profesional independiente.

*Corresponding author: spicco@fcv.unlp.edu.ar

ABSTRACT

It is well established that during exercising, an increase in the production of free radicals occurs, which can break the oxide-reducing balance of the cell causing DNA damage. The aim of this study was to establish the existence of DNA damage in circulating leukocytes of horses undergoing sub-maximal exercise by using the comet assay. Five horses subjected to a standardized exercise test were used. Samples were extracted before starting the exercise and, then, at 8.5 m/s, at 15 m/s, and 1 and 30 min post-exercise. Simultaneously, oxygen consumption during the exercise test was measured. The frequency of cells with DNA damage was 0.448, 0.537, 0.617, 0.556 and 0.592 respectively, being significant the differences from the baseline values over time ($p < 0.05$). Then, the cells were classified by levels of damage, with significant increases ($p < 0.05$), especially at 15 m/s and 30 min after exercise. A significant association between the frequency of cells with DNA damage and oxygen consumption during standardized exercise test is observed. These results suggest that genotoxic damage inducing factors occur mainly during physical exertion.

Key words: equine thoroughbred, exercise, DNA damage.

RESUMEN

Está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres que pueden romper el equilibrio óxido-reductor y causar daño en el ADN. El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a ejercicio sub-máximo mediante el empleo del ensayo cometa. Se usaron cinco equinos sometidos a un test estandarizado de ejercicio, a los que se les extrajeron muestras antes de comenzar el ejercicio, a los 8,5 m/s, a los 15 m/s, y 1 y 30 min post-ejercicio. Simultáneamente se realizó una ergoespirometría continua para determinar el consumo de oxígeno durante el test de ejercicio. La frecuencia de células con daño en el ADN fue 0,448, 0,537, 0,617, 0,556 y 0,592 respectivamente, observándose diferencias significativas con respecto a los valores del tiempo basal ($p < 0,05$). Luego las células se clasificaron por niveles de daño, observándose incrementos significativos ($p < 0,05$) especialmente a los 15 m/s y 30 min post-ejercicio. Se observó una asociación significativa entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el test estandarizado de ejercicio. Estos resultados sugieren que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico.

Palabras clave: equinos Sangre Pura de Carrera, ejercicio, daño en el ADN.

Fecha de recepción: 24/12/2015
Fecha de aceptación de versión final: 21/03/2016

INTRODUCCIÓN

Si bien las primeras evidencias que relacionan al ejercicio con el daño oxidativo datan del año 1978; es en las últimas tres décadas que se han acumulado abundantes conocimientos que vinculan estos dos hechos. En la actualidad, está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres (RL) del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) y que dicho aumento tiene su base en el incremento de ROS y RNS producidos especialmente en el propio músculo en ejercicio (Powers y Jacson, 2008). La producción de RL puede alcanzar niveles alarmantes durante el ejercicio extremo, rompiendo el equilibrio oxidante/antioxidante y causando daño en moléculas orgánicas tales como componentes de membrana, proteínas, ADN, etc. En años recientes numerosos trabajos han reportado la aparición de daño en el ADN asociado a estrés oxidativo y ejercicio en diferentes modelos y tipos de animales (Wierzba *et al.*, 2006; Gandhi y Gunjan, 2009).

La versión alcalina de la electroforesis en gel de células aisladas, más conocida como “*Ensayo Cometa*”, es un método sensible, confiable y rápido para detectar rupturas de simple y doble cadena en la molécula de ADN así como sitios lábiles al álcali. Con esta técnica, la cantidad de daño en el ADN está dada por la cantidad de ADN que migra en el campo electroforético, en forma proporcional a la cantidad de daño presente (Picco *et al.*, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio sub-máximo mediante la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas (“*Ensayo Cometa*”).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cinco equinos Sangre Pura de Carrera (SPC) con un peso promedio de 440 kg, habituados a realizar entrenamiento en forma continua en cinta ergométrica.

Protocolo de ejercicio

Los animales fueron sometidos a un test de ejercicio estandarizado sobre una cinta ergométrica marca Kagra modelo 2200. El test constó de las siguientes etapas: 1 min a

1,7 m/s, 4 min a 4 m/s, 1 min a 6,5 m/s, 1 min a 8,5 m/s, 1 min a 10,5 m/s, 1 min a 12,5 m/s, 2 min a 15 m/s, 4 min a 4 m/s, y 1 min a 1,7 m/s, respectivamente. Todo el test se desarrolló con una inclinación del 3%.

Toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción de la vena yugular derecha. Para ello se utilizaron Abbocat N° 14 y una guía de 1,20 m de longitud recubierta con papel de aluminio para evitar el contacto de la sangre con la luz. Dichos elementos permanecieron colocados y permeables durante todo el test de ejercicio. Las muestras se tomaron con el animal en reposo previo al ejercicio (T0), durante el test de ejercicio a los 8,5 m/s (T1) y 15 m/s (T2), y a 1 minuto (T3) y 30 (T4) minutos pos ejercicio. En cada toma de muestras se extrajeron 2,5 ml de sangre que fueron almacenadas en tubos éppendorf heparinizados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el posterior análisis.

Ensayo Cometa (versión alcalina)

Para la realización del ensayo cometa las muestras fueron almacenadas en ambiente oscuro y a 4° C por no más de 30 minutos. El ensayo se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con pequeñas modificaciones. Se mezclaron 15 ml de sangre con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 % (Gibco BRL, NY, USA). Dicha mezcla se colocó sobre un portaobjetos cubierto previamente con agarosa de punto de fusión normal al 0,5 % (Promega, USA) previamente solidificada. Se prepararon dos portaobjetos por animal. Luego de esto, las células fueron lisadas en una solución detergente (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 y 10 % DMSO) por al menos una hora antes de la electroforesis. Para la electroforesis los portaobjetos fueron colocados en cubeta horizontal y cubiertos con una solución alcalina de electroforesis (1mM EDTA, 300mM NaOH, pH > 13) durante 20 minutos. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la electroforesis los portaobjetos fueron enjuagados 3 veces con una solución *buffer* de Tris (pH 7,5) durante 5 minutos y finalmente con agua destilada. Una vez secos, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de SYBR Green I 1/1000 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Ward y Marples, 2000). El análisis se realizó utilizando un microscopio Olympus BX 40 provisto de una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W USHIO USH 102 D. El registro de las imágenes se realizó con una cámara Sony

CCD y las imágenes se grabaron utilizando el software Image Pro Plus^á. Se analizaron un total de 200 células por punto experimental. Los leucocitos fueron clasificados primariamente en normales (núcleos sin migración del ADN) y anormales (núcleos con migración del ADN). Posteriormente se realizó la clasificación por niveles de daño tomando como criterio a Kobayashi *et al.* (1995), donde 1 significó ausencia de migración visible del ADN y 5 represento el máximo nivel de migración de daño en el ADN.

Ergoespirometría

Los registros ergoespirométricos fueron obtenidos a través del sistema Cortex Biofísic MetaVet. El equipo se calibra con cada caballo en particular en función de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiental, presión atmosférica, humedad relativa ambiente, presión de oxígeno ambiental y presión de dióxido de carbono ambiental) donde se va a realizar el test de ejercicio. Una vez calibrado el equipo, se le coloca al equino la máscara provista de sensor de flujo/volumen, y luego se lo sube a la cinta ergométrica para dar inicio al ejercicio. Este equipo permite medir el consumo de oxígeno (VO₂) en ambas condiciones “*Body temperature pressure saturated*” (BTPS) donde el análisis se realiza en presencia de vapor de agua ó en “*Standar temperature pressure and dry*” (STPD) esto corresponde a una situación de 0° C de temperatura, presión de 760 mmHg al nivel del mar en condiciones de ausencia de vapor de agua (seco). La información fue procesada con el Programa MetaSoft Vet Metabolic Stress®.

Análisis de los datos

Las frecuencias de células normales y anormales en cada tiempo de muestreo fueron comparadas utilizando el test de Chi cuadrado con corrección de Yates. Los diferentes niveles de daño fueron comparados utilizando el test *t* de Student's (SPSS® Versión 11). Los resultados se expresaron como la media ± DS. La asociación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno se estimó mediante el coeficiente de correlación y valor de R ajustado.

RESULTADOS

La frecuencia de células consideradas anormales fue de 0,448; 0,537; 0,617; 0,556 y 0,592 para el T0, T1, T2, T3 y T4,

respectivamente. Una vez iniciado el ejercicio los niveles de células con daño en el ADN con respecto al T0 aumentaron significativamente en todos los tiempos estudiados (Tabla 1). También fueron significativos los incrementos observados entre T1 y T2 ($X^2= 12,79$; $p<0,005$), entre T1 y T4 ($X^2= 5,93$; $p<0,05$) y la reducción observada entre T2 y T3 ($X^2= 7,42$; $p<0,05$).

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos con el ensayo cometa. El nivel de células sin migración aparente del ADN (Grado 1) fue significativamente menor con respecto al control cuando los animales alcanzaron los 15 m/s ($p=0,0035$) y los 30 minutos pos ejercicio ($p=0,0175$). El nivel de células con daño leve (Grado 2) se incrementó paulatinamente hasta alcanzar los caballos los 15 m/s (T2), momento en el cual el incremento con respecto al T0 fue significativo ($p=0,00609$). Un segundo incremento significativo de células Grado 2 se observó 30 minutos pos ejercicio (T4) ($p=0,025$). También se observó un incremento significativo entre T3 y T4 ($p=0,0466$) y una reducción significativa entre T2 y T3 ($p=0,014$). Las células con daño moderado (Grado 3) alcanzaron sus máximos valores al término del ejercicio pero estos valores no se diferenciaron significativamente de los obtenidos para el control ni para los otros tiempos. Algo similar ocurrió con las células con daño intenso (Grado 4), que alcanzaron sus máximos valores 1 minuto pos ejercicio (T3), aunque dicho valor no fue significativamente diferente. El porcentaje de células con máximo nivel de daño (Grado 5) creció constantemente desde que los equinos iniciaron el ejercicio, alcanzando los máximos valores a los 15 m/s ($p=0,0267$) y 1 minuto pos ejercicio ($p=0,00025$). También se observaron diferencias por incrementos entre los valores obtenidos entre T1 y T2 ($p=0,0457$) y entre T1 y T3 ($p=0,0006$) y por reducción de los valores entre T3 y T4 ($p=0,0017$).

El consumo de O₂ experimentó un crecimiento sostenido desde el reposo hasta que los animales alcanzaron la velocidad de 15 m/s, momento en el cual el consumo de O₂ fue unas 10 veces superior a los iniciales. Luego de esto, se produjo un marcado descenso, alcanzando valores similares al basal luego del ejercicio (Tabla 3). La Figura 1 muestra el comportamiento del consumo de oxígeno durante el test de ejercicio y el porcentaje de células con daño en el ADN. La asociación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el set de ejercicio fue de 0,88 ($R^2=0,77$), mientras que cuando se agregó la determinación 30 minutos pos ejercicio la correlación se redujo a 0,58 ($R^2=0,342$).

Tabla 1. Comparación de las células anormales (con daño en el ADN) observadas en T₀ y en los tiempos T₁, T₂, T₃ y T₄ mediante la prueba de Chi cuadrado

Grupo Comparado	Valor de <i>Chi cuadrado</i>	Valor de <i>p</i>
T1 (8,5 m/s)	15,49	< 0,001
T2 (15 m/s)	56,69	< 0,001
T3 (1 min post ejercicio)	23,33	< 0,001
T4 (30 min post ejercicio)	40,96	< 0,001

Tabla 2. Clasificación de las células en niveles de daño en el ADN (ensayo cometa), según Kobayashi *et al.* (1995). Valores medios expresados en porcentaje (\pm DS).

Tratamiento	Grados de daño en el ADN (%)				
	1	2	3	4	5
Reposo	55,19	38,59	4,68	0,95	0,68
(T ₀)	(\pm 16,06)	(\pm 16,69)	(\pm 6,61)	(\pm 0,96)	(\pm 1,18)
8,5 m/s	46,25	45,05	5,65	2,35	0,85
(T ₁)	(\pm 22,97)	(\pm 20,59)	(\pm 5,24)	(\pm 3,23)	(\pm 1,2)
15 m/s	38,25	53,62	4,83	1,42	2,46
(T ₂)	(\pm 10,85)	(\pm 9,56)	(\pm 3,29)	(\pm 1,92)	(\pm 2,64)
Pos 1	44,84	41,06	7,37	3,62	3,50
(T ₃)	(\pm 17,20)	(\pm 14,07)	(\pm 8,83)	(\pm 5,5)	(\pm 1,69)
Pos 2	40,83	51,61	5,28	1,11	1,17
(T ₄)	(\pm 10,92)	(\pm 10,08)	(\pm 4,24)	(\pm 1,61)	(\pm 1,06)

Tabla 3. Valor medio de consumo de O₂ (± DS) en los equinos SPC sometidos al test de ejercicio.

Tratamiento	Consumo de O ₂ (l/min)
Reposo (T0)	9,40 (±10,9) ^a
8,5 m/s (T1)	38,60 (±44,9) ^b
15 m/s (T2)	82,60 (±96,1) ^c
Post 1 (T3)	24,00 (±27,9) ^d
Post 2 (T4)	11,20 (±10,4) ^a

Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

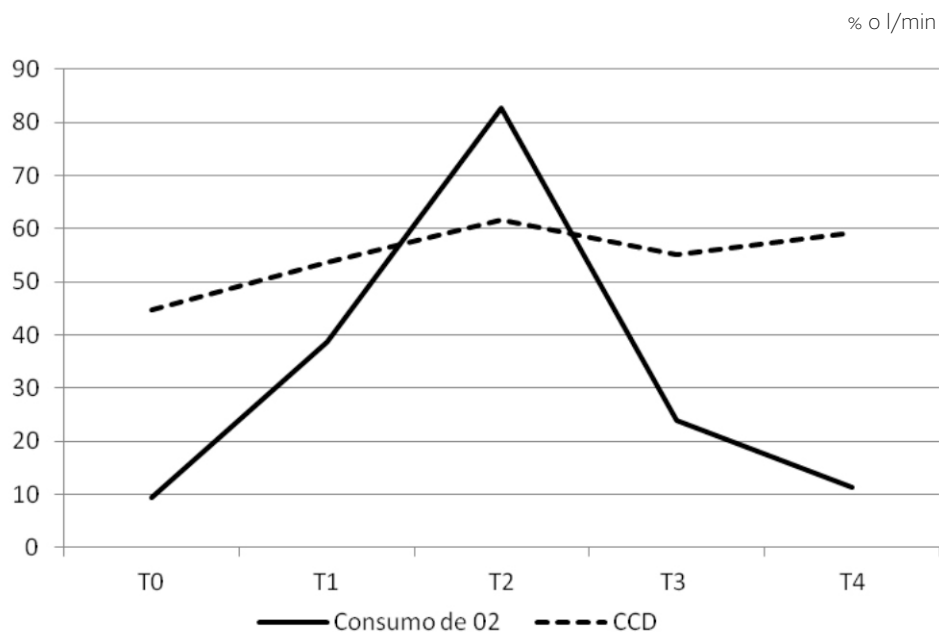


Figura 1. Valor medio de consumo de O₂ (l/min) y porcentaje de células con daño (CCD) en el ADN durante las cinco etapas del test de ejercicio.

T0: reposo, T1: 8,5 m/s, T2: 15 m/s, T3: 1 min post-ejercicio, T4: 30 min post-ejercicio.

DISCUSIÓN

La producción de daño en el ADN asociado a ejercicio no es en sí un hecho inédito. Existen numerosas publicaciones previas en las cuales animales o humanos sometidos a diferentes niveles de ejercicio expresaron daño en el ADN, muchos de ellos incluso, utilizando la misma metodología que la empleada en el presente trabajo (ensayo cometa). Sin embargo, el denominador común de estos trabajos fue la estimación del daño posterior al ejercicio y no durante el ejercicio (Hartmann *et al.*, 1995; Niess *et al.*, 1996; 1998). Con la excepción de los resultados obtenidos por Mastaloudis *et al.* (2004) quienes trabajando en humanos sometidos a ejercicio de resistencia registraron un incremento de los niveles de daño en el ADN a mitad del test (carrera de 50 km), y su posterior retorno a niveles basales 2 hs pos ejercicio, este es el primer trabajo que presenta una cinética de daño en el ADN producto de un modelo particular de ejercicio estandarizado sub-máximo.

Los resultados obtenidos permiten observar que el ejercicio, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produce un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión al momento de llegar los equinos a la máxima velocidad (15 m/s) y luego, al finalizar la prueba, 30 minutos pos ejercicio.

El hecho de que en el momento en que se produce el ejercicio se haya observado la mayor frecuencia de células con migración del ADN demuestra que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico. Dado que al momento de terminar el ejercicio los valores de daño son significativamente menores a los observados a 15 m/s, puede sugerirse que en ese lapso hay una intensa reparación del daño que tiene como consecuencia una marcada reducción del daño en el material genético. Estudios realizados en 1984 por Van Zeeland en células de mamíferos demostraron que, tras inducir daño con rayos x e g, la eficacia de la reparación permite a las células recomponer el 80 % de las lesiones en la molécula de ADN entre 5 y 10 minutos post exposición, mientras que el 20 % restante se repara pocas horas después. Estos hallazgos son concordantes con lo observado en el presente trabajo ya que entre la aparición del máximo nivel de daño y la reducción significativa del mismo transcurrieron 6

minutos. Si este razonamiento es correcto, debemos asumir entonces que una segunda fuente de daño genotóxico genera el posterior aumento significativo del daño en el ADN observado 30 minutos pos ejercicio.

Los mecanismos propuestos para explicar la aparición de daño en el ADN tras el ejercicio extremo incluyen la producción de ROS a partir de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, el proceso de isquemia-reperusión, reacciones catalizadas por la Xantina Oxidasa, mecanismos inflamatorios y producción de catecolaminas (Hartmann y Niess, 1999). La cadena transportadora de electrones mitocondrial es posiblemente la principal responsable del pico de daño observado durante el ejercicio máximo. Esto se debe a que durante el mismo, el consumo de oxígeno (O_2) se incrementa más de 10 veces, pero a nivel de la fibra muscular lo hace unas 100 veces, con el consiguiente aumento proporcional de la actividad de la cadena respiratoria y de la producción de anión superóxido (O_2^-) (Gandhi y Gunjan, 2009), el cual tiene amplia capacidad de difusión a través de las membranas plasmáticas (Picco, 2004).

Tras el ejercicio, la producción de O_2^- por acción de la cadena respiratoria disminuye pero se activan otros mecanismos capaces de generar estrés oxidativo, como la isquemia-reperusión, la cual es proporcional al esfuerzo realizado y que culmina con la reoxigenación de las áreas isquémicas y la consiguiente producción de ROS (Adams y Best, 2002). En tal sentido, los resultados obtenidos al comparar el consumo de O_2 con la frecuencia de células con daño parecen abonar la teoría de la generación de daño a partir de diferentes estímulos según sea ejercicio extremo o pos ejercicio ya que el pico de daño 30 minutos pos ejercicio se produce en presencia de bajos valores de consumo de O_2 . Es probable que tras el ejercicio adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de RL por leucocitos y el fenómeno de isquemia-reperusión. Este último probablemente también genere daño en el ADN por la vía de la producción de ROS, aunque el origen de estos últimos sea diferente. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio en equinos SPC bajo modelos de ejercicio como el planteado en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams A.K., Best T.M. (2002) The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *Phys Sportsmed* 30: 37-44.
- Gandhi G., Gunjan C. (2009) Exercise-Induced Genetic Damage: A Review. *Int. J. Hum. Genet.* 9 (2): 69-96.
- Hartmann A., Niess A.M., Grunert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1995) Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 346 (4): 195-202.
- Hartmann A., Niess A.M. (1999) Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen C.K., Packer L., Hänninen O. (Eds.) *Exercise and Oxygen Toxicity: A Handbook*. Elsevier Science: B.V. North Holland/New York, pp.195-217.
- Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T. (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3: 103-115.
- Mastaloudis A., Yu T.W., O'Donnell R.P., Frei B., Dashwood R.H., Traber M.G. (2004) Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 966-975.
- Niess A.M., Baumann M., Roecker K., Hartmann T., Mayer F., Dickhuth H.H. (1998) Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 38: 111-115.
- Niess A.M., Hartmann A., Gurnert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17: 397-403.
- Picco S.J., De Luca J.C., Mattioli G.A., Dulout F.N. (2001) DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the Comet assay. *Mutat. Res.* 498: 1-6.
- Picco S.J. (2004) Consecuencias genotóxicas y clastogénicas de la hipocuprosis bovina. Tesis Doctoral, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Powers S.K., Jackson M.J. (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* 88 (4): 1243-1276.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Van Zeeland A.A. (1984) DNA repair. In: Obe G. (Ed.) *Mutations in man*. Springer, Berlin, pp. 35-57.
- Ward T.H., Marples B. (2000) Technical report SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int. J. Radiat.* 76: 61-65.
- Wierzba T.H., Olek R.A., Fedeli D., Falcioni G. (2006) Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (Suppl 10): 115-31.

REGISTRATION OF CULTIVAR YAVÚ-UNRC

REGISTRO DE CULTIVAR YAVÚ-UNRC

Ferreira V.¹, Grassi E.^{1*}, di Santo H.¹, Ferreira A.¹, Castillo E.¹, Paccapelo H.²

¹ Facultad de Agronomía y Veterinaria, UN Río Cuarto.

² Facultad de Agronomía, UN La Pampa.

*Corresponding author: egrassi@ayv.unrc.edu.ar

Yavú-UNRC es un cultivar de Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) $2n=6x=42$, inscripto en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas. Expte. INASE N° 15.191, Resolución INASE N° 135/2014 del 04/06/2014. Fue obtenido en el Criadero A/1739 UNINARC, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Fecha de recepción: 21/03/2016
Fecha de aceptación de versión final: 31/03/2016

Origen y proceso de selección

Deriva del cruzamiento original CIMMYT SVHT 02 / BORA / 3 / YOGUI_1 / TARASCA 87_3 // HARE_212. Fue seleccionado para uso forrajero de doble propósito (pasto y grano) a partir de una introducción recibida en F4 formando parte del FWTCL 1995 (Ensayo Internacional de Triticales Forrajeros de Invierno) del CIMMYT.

Se efectuó elección individual en F₇ en Río Cuarto, Córdoba. El comportamiento forrajero para doble propósito de varias líneas se probó durante 5 años en Río Cuarto y Santa Rosa, La Pampa. La entrada original C95/88 se eligió por su muy buena producción de forraje invernal y grano frente a los testigos Genú y Tizné-UNRC, Antonio-UNLPam y Yagán-INTA empleados en los ECR. Yavú-UNRC se fundó a partir de una planta individual de C95/88. Fue incluido en ensayos de experimentación adaptativa en las EEAs del INTA Gral. Villegas (2012-2013), Marcos Juárez (2011-2012) y Manfredi (2011-2012).

De acuerdo a su historial de selección y pruebas de producción de forraje (pasto y grano) se considera apto para emplear en la región pampeana subhúmeda-semiárida.

Ciclo vegetativo

Yavú-UNRC tiene hábito de crecimiento intermedio-largo con porte juvenil semierecto, macollaje abundante y vigoroso crecimiento durante todo el ciclo vegetativo. Ciclo emergencia a floración plena 128 ± 6 días y 165 ± 5 días a madurez de cosecha en siembras para grano. Ciclo vegetativo similar a Genú-UNRC, más largo que Tizné-UNRC y algo más corto que Quiñé-UNRC. Sensible al fotoperiodo, con moderados requerimientos de frío. La altura de planta a la madurez = 94 ± 17 cm según año y disponibilidad de agua durante el ciclo. Es significativamente más bajo que los testigos Genú y Tizné-UNRC. Cuello ondulado poco piloso; espiga inclinada como Tizné-UNRC y de forma oblonga como Cayú-UNRC.

La fecha de siembra para producción de forraje es en la primera quincena de marzo. La densidad de siembra se debe ajustar según calidad de la semilla para obtener 200 plantas m⁻² a la emergencia. Siembras para grano: primera quincena de junio.



Producción de materia seca y grano

Presenta mayor producción de materia seca acumulada y distribución de forraje estable a lo largo del ciclo de producción que los testigos. Permite aprovechamiento continuo y prolongado del cultivo y la cosecha de grano si las condiciones ambientales son favorables y se retira el pastoreo. También en rendimiento de grano aventajó a los testigos (Tabla 1).

Calidad comercial

El cultivar Yavú-UNRC presenta grano de muy buena calidad comercial, con 39,3 g de Peso de 1.000 granos y Peso Hectolítrico 71,7 kg/hL, promedios de 4 años (2009-2012). Los valores máximos fueron 45,3 g para P1000 y 79,2 kg/hL de Peso Hectolítrico en 2009. El grano es ovoide, levemente arrugado, con el relieve dorsal convexo. Resultó el material de mayor estabilidad interanual según método de Eberhart y Russell (Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci.6: 36-40, 1966). Además de apto para consumo animal, es potencialmente utilizable en la elaboración de productos para consumo humano que no requieran harinas leudantes.

Comportamiento frente a factores adversos

Tolera la sequía invernal, es resistente a heladas durante el período juvenil y moderadamente resistente en floración.

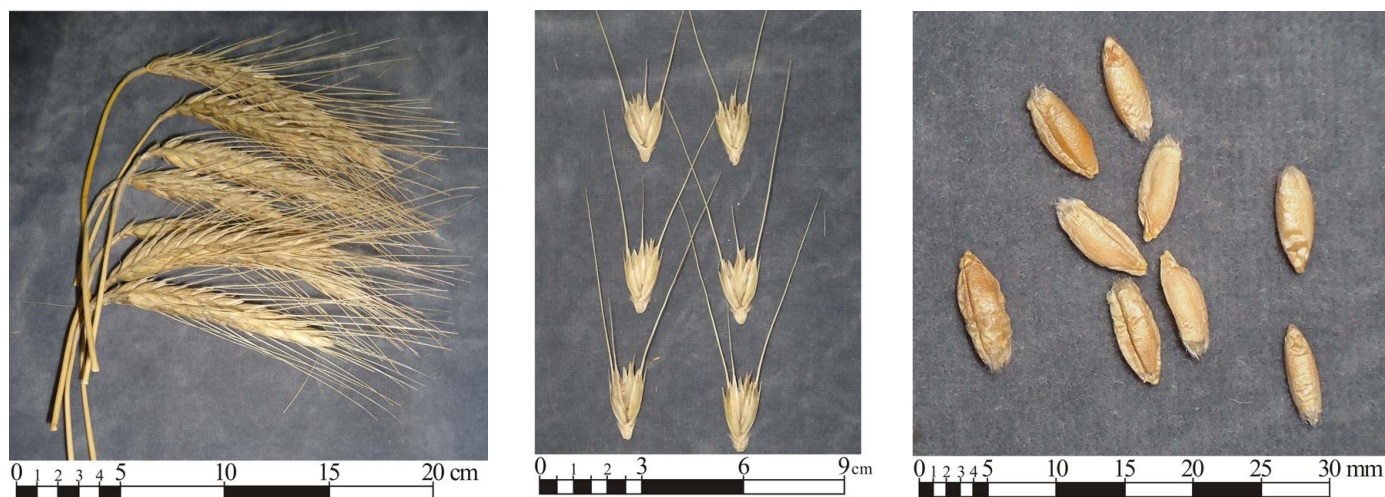


Tabla 1. Triticale Yavú-UNRC y testigos. Valores medios y significación de la producción de materia seca por corte y acumulado en kg/ha, 2008-2012, y del rendimiento de grano 2009-2012 en Río Cuarto, Córdoba y Santa Rosa, La Pampa.

Genotipo	Producción de materia seca (kg/ha)						Rendimiento (kg/ha)			
	1 ^{er} corte	2 ^{do} corte	3 ^{er} corte	Acumulado						
Yavú-UNRC	1.659	a	997	ab	687	bc	3.343	a	3.086	a
Antonio-UNLPam	1.338	c	1.106	a	887	a	3.331	a	2.923	b
Genú-UNRC	1.509	bc	898	bc	719	b	3.126	b	2.600	bc
Tizné-UNRC	1.667	a	862	c	566	c	3.095	b	2.253	c

Letras iguales en la misma columna indican diferencias no significativas.

No se desgrana y el vuelco por tormentas primaverales con fuertes vientos no sobrepasa el 10 %. No se ha constatado arrebataamiento. Resistente a roya de la hoja y con muy baja incidencia de “manchas foliares”. En ningún caso los ataques comprometen la cantidad y calidad del forraje producido hasta hoja bandera. No se han registrado ataques de otros fitoparásitos ni de pulgón verde.

Pureza varietal

La pureza varietal se mantiene en el Criadero A/1739 UNINARC. Anualmente se realiza selección individual de una planta en jaula fitotécnica, siembra de planta a surco

en jaula fitotécnica y surco a parcela prebásica a campo. Posterior selección masal en lotes de semilla fundación en el Criadero UNINARC, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UN de Río Cuarto, mediante revisiones periódicas desde el estado fenológico 61 (comienzos de floración) hasta el 92 (grano duro) (según Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. CIMMYT, México).

DIFFERENTIAL ESTERASE ACTIVITY IN AERIAL AND ROOT TISSUES FROM 6AS DHR WHEAT LINES AFTER PHYTOHORMONAL TREATMENTS

ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE ESTEARASAS EN TEJIDOS AÉREOS Y RAÍCES DE LÍNEAS DE TRIGO 6AS DHR LUEGO DE TRATAMIENTOS FITORHORMONALES

Tacaliti M.S.¹, Tocho E.^{1,2}, Castro A.M.^{1,2}

¹ CISAy, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata

² INFIVE- CONICET, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

msilviatacaliti@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Activity of aerial and root esterases in wheat DHR lines of chromosome 6AS was tested. Different patterns were found after applying phytohormone treatments that mimic stress conditions. Ethylene treated plants showed the lowest aerial and root weights; also, the smallest foliar area, in conjunction with absence of esterase activity in more than half of the lines, was observed. Additional studies will contribute to clarify the key role of ET in the expression of defense related genes.

Key words: ethylene, esterase activity, defense related genes

RESUMEN

Se probó la actividad de estearasas en parte aérea y raíces de líneas de trigo DHR para el cromosoma 6AS. Se encontraron diferentes patrones luego de la aplicación de tratamientos fitohormonales que simulaban condiciones de estrés. Las plantas tratadas con etileno mostraron los pesos más bajos de parte aérea y de raíces, así como también la menor área foliar, junto con ausencia de actividad estearasa en más de la mitad de las líneas de trigo. Estudios adicionales contribuirán a clarificar el rol clave del ET en la expresión de genes relacionados con la defensa.

Palabras clave: etileno, actividad de estearasas, genes relacionados con defensa

Fecha de recepción: 17/09/2015

Fecha de aceptación de versión final: 29/04/2016

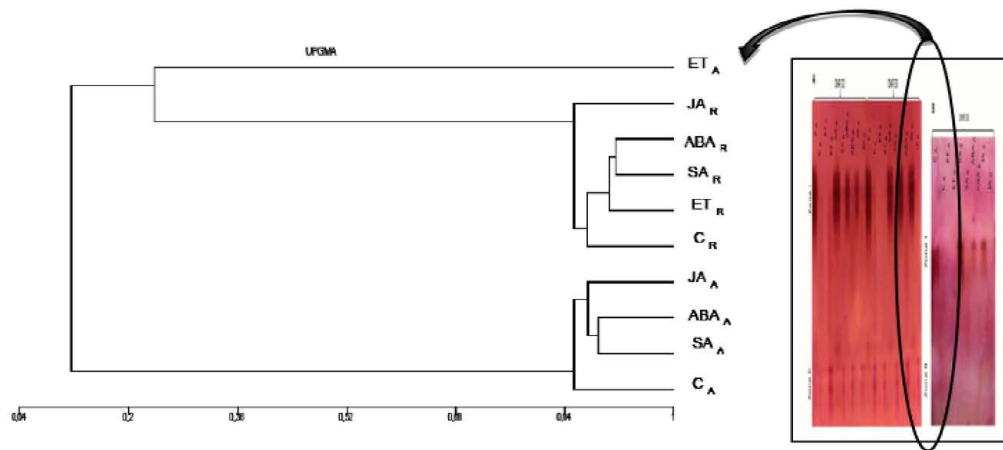


Figure 1. Dendrogram of wheat DHR lines based on esterase activity from each treatment and part of the plant (_A or _R, aerial or roots). Right side: esterase gel with absence of band in the aerial part treated with ET (ET_A).

Plants have developed sophisticated mechanisms to sense and adapt to stress conditions. It is well known that phytohormones activate defense related genes in biotic and abiotic stress conditions (Bari and Jones, 2009). Furthermore, esterase activity measured in different plant portions was considered a biomarker of saline stress (Radic and Pevalek-Kozlina, 2010).

Some QTLs for growth responses have been localized, suggesting that wheat chromosome 6AS would carry genes related to a better plant behaviour in a biotic stress circumstance (Castro *et al.*, 2008). The aim of this study was to relate some physiological measures from aerial and root tissues with esterase patterns revealed in both parts, after phytohormone treatments which could mimic stress.

Seventy-eight wheat doubled haploid recombinant (DHR) lines of chromosome 6AS were tested. At the third leaf stage, the plants were subjected to exogenous application of 50 mM ethylene (ET) (Ethrel®), 10^{-5} M jasmonic acid (JA), 50 mM salicylic acid (SA) and 10^{-5} M abscisic acid (ABA) or water (controls). Esterases (EST 3.1.1.1) were screened by gel electrophoresis.

According to the high significant differences found between genotypes and hormonal treatments for ADW, RDW and FA (Castro *et al.*, 2008), the main point to highlight is that ET treated plants showed the lowest mean values, in conjunction with the absence of esterase activity in more than half (58%) of the lines. Additional studies will contribute to clarify the key role of ET in the expression of defense related genes.

Jaccard's similarity coefficient showed a grouped esterase presence/ absence coming from roots of all treatments and their controls, which is observed by the only one cluster that groups all of them. In contrast, aerial tissues showed two separate clusters: one of them with esterase activity coming from ET treated plants and the other with the remaining treatments (Figure 1).

In conclusion, root and aerial esterases exhibited their tissue specificity through their own pattern. Future identification and sequencing of tolerance genes is desirable to improve elite lines carrying defense related genes.

REFERENCES

- Bari R., Jones J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Mol. Biol.* 69: 473-488.
- Castro A.M., Tacaliti M.S., Giménez D., Tocho E., Dobrovolskaya O., Vasicek A., Collado M., Snape J.W., Börner A. (2008) Mapping Quantitative Trait Loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat. *Euphytica* 164: 719-727.
- Radic S., Pevalek-Kozlina B. (2010) Differential esterase activity in leaves and roots of *Centaurea ragusina* L. as a consequence of salinity. *Period. Biol.* 112 (3): 253-258.

OBITUARIES

Ing. Agr. (Dr.) ANTONIO KRAPOVICKAS

1920 - 2015



El 17 de agosto de 2015, a los 93 años de edad, falleció en la ciudad de Corrientes el Ing. Agr. Antonio Krapovickas. Nació en Buenos Aires y se graduó de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Allí se formó con el Ing. Lorenzo Parodi, junto a otros reconocidos investigadores, entre los que se destacan Juan Hunziker, Primer Presidente de la Sociedad de Genética, y Ewald Favret, quien fuera Director del Instituto de Genética y del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias del INTA.

Krapovickas tuvo una destacada actuación en la Sociedad Argentina de Genética. Fue uno de sus Socios Fundadores, Socio Honorario, Presidente en el periodo 1983 - 1985 e integrante del Consejo Asesor (1970 -2008). En ocasión del XL Congreso realizado en la ciudad Corrientes, la SAG le rindió un Homenaje designándolo Presidente Honorario del Congreso.

Durante más de 30 años, formó parte del CONICET, retirándose en 1994 como Investigador Superior. Su excelente e intensa labor académica le valió el reconocimiento de la comunidad científica nacional y extranjera. Recibió los Premios Konex, CADIA, Bunge y Born y “Arturo Burkart” de la Academia Nacional de Ciencias. Además, fue incorporado como Académico Correspondiente a las Academias Nacional de Agronomía y Veterinaria y a Nacional de Ciencias. La Universidad Nacional de Rosario lo distinguió con el título de Doctor Honoris Causa. Además, fue Socio Honorario del Centro Argentino de Ingenieros Agrónomos y de la Asociación de Biología de Tucumán y Miembro Correspondiente de la Botanical Society of America . Krapovickas fue también Socio Honorario y Presidente la Sociedad Argentina de Botánica durante dos períodos (1967-1969 y 1972- 1974).

Su labor científica se vio plasmada en más de 160 publicaciones. Se inició en la investigación siendo aún estudiante. En 1945, publicó su primer trabajo, en la Revista Argentina de Agronomía, sobre taxonomía de Malváceas. A partir de este trabajo, realizó una labor ininterrumpida en el campo de la Genética y la Botánica. En este contexto, se destaca la

importante influencia que Krapovickas tuvo en los inicios de la Citogenética Vegetal en Argentina ya que, hacia finales de los '40, fue uno de los primeros en incorporar a sus investigaciones taxonómicas el estudio de los cromosomas.

En el año 1949, cuando trabajaba en el Instituto de Botánica del Ministerio Nacional de Agricultura, fue trasladado a la Estación Agropecuaria de Manfredi, en la provincia de Córdoba. Allí, inició sus investigaciones acerca del maní (*Arachis hypogea* L.). En 1954, recibió la beca de la John Simon Guggenheim Foundation para viajar a los Estados Unidos. Durante su estadía revisó el material de los grandes herbarios y reunió información para planificar las campañas (más de 30) que realizaría al noroeste de Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay, para coleccionar material silvestre de *Arachis* y cerca de 3600 muestras de maní cultivado. Dicha colección, que aún se conserva en los Bancos de Germoplasma de Manfredi (Argentina), USDA (Estados Unidos), EMBRAPA (Brasil) y del ICRISAT (India), es la única de maníes cultivados americanos y constituyó el material a partir del cual se realizaron la mayoría de las investigaciones genéticas acerca de este cultivo en el mundo. Fue el primero en investigar el origen genético del maní, propuso su origen genético y geográfico, así como los 6 genocentros de los maníes cultivados. Su monografía de *Arachis* fue una contribución trascendental a la taxonomía del género. Krapovickas también fue autor y coautor de numerosos trabajos en citogenética, genética molecular, domesticación y mejoramiento del maní.

Krapovickas se destacó, además, por su actividad docente. En el año 1949, fue designado Profesor de Genética en la Universidad Nacional de Córdoba y en 1964, se trasladó a la ciudad de Corrientes donde, se hizo cargo de las cátedras de Genética de las Facultades de Agronomía y Veterinaria y de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional del Nordeste, desempeñándose como Profesor Titular en la Facultad de Agronomía hasta su jubilación. El equipo de trabajo que formó junto a sus colecciones personales y su biblioteca constituyeron la base para la fundación en 1977 del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), institución que fuera distinguida con la medalla de honor de la Fundación Rómulo Raggio por ser una de las Instituciones botánicas más destacadas del país. Allí trabajó hasta sus últimos días.

Además de sus contribuciones a la ciencia, Krapovickas se destacó por ser una persona humilde, generosa, con una profunda cultura general y con un particular sentido del humor. Tras su partida, Krapovickas dejó un recuerdo imborrable en todos aquellos que hemos tenido el privilegio de formarnos a su lado.

Dra. Viviana Solís Neffa

OBITUARIES

Ing. Agr. SAÚL OLIVIO FEHLEISEN

1920 - 2016



El día 24 de febrero de 2016, a la edad de 96 años dejó de existir el Ing. Agr. Saúl O. Fehleisen un eximio docente e investigador en el campo de la genética vegetal.

Nació el 26 de junio de 1920 en Villaguay Entre Ríos, donde cursó sus estudios primarios y secundarios.

Obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo en la Universidad Nacional de La Plata el 23 de Agosto de 1947.

Inició su extensa y destacada trayectoria académica en la Facultad de Agronomía de la UNLP como ayudante alumno en la Cátedra de Fitopatología.

En virtud de sus méritos profesionales ocupó el cargo de Subdirector del prestigioso Instituto Fitotécnico de Santa Catalina de la UNLP pionero en estudios de genética y fitotecnia donde se formaron jóvenes profesionales.

Fue docente por concurso en la Cátedra de Genética y Mejoramiento Vegetal de la Facultad de Agronomía UNLP, ocupando el cargo de Jefe de Trabajos Prácticos.

Su actividad docente en la Facultad de Agronomía de La Plata se desarrolló desde el 2 de julio de 1947 al 1 de agosto de 1974.

Continuó su carrera docente en la Universidad Nacional de Jujuy (UNJu), donde fue Profesor Titular dedicación exclusiva en la Facultad de Ciencias Agrarias. Allí trabajó en genética de tomate tipo platense, haciendo contribuciones destacadas y siendo muy reconocido por su tarea en el área hortícola del norte.

Fue designado Vicedecano en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu en el año 1980.

En 1986 se acogió a los beneficios de la jubilación y fue nombrado Profesor Consulto

Como investigador fue un pionero en la producción y creación del tomate híbrido

Además trabajo en la producción de alelíes dobles. Usando el gen marcador de plantas en el almácigo.

Trabajo en otras plantas ornamentales y en Verbenáceas.

Publico más de treinta trabajos en Revistas Científicas.

Fue un ejemplo y un maestro para varias generaciones de investigadores y formó profesionales en la especialidad.

Tuvo una personalidad afable sencilla y cordial.

Con estos breves párrafos queremos recordar a un excelente docente e investigador, haciendo un brevísimo resumen de su amplia trayectoria profesional y académica.

Un recuerdo para toda su familia.

Ing. Agr. Guillermo Pantaleón

OBITUARIES

DR. TETSUJI MATAYOSHI

1937 - 2016



Adiós a un Amigo

Debía ser el Imperio del Sol Naciente que permitiera el nacimiento de uno de los Citogenetistas más plásticos de nuestro medio, **Tetsuji Matayoshi**. Nació con la Citogenética clásica, y sin embargo no tuvo dificultades para transitar por la Citogenómica con la sencillez y humildad que lo caracterizaba.

Era yo muy joven y me fascinó conocer una persona de otra cultura, y a su vez, era mi primer jefe de laboratorio. Se estableció rápidamente una relación como si fuera de padre a hijo, de maestro a discípulo, de jefe a aprendiz de brujo, de compinche y amigo.

Fue justo el momento de conocerlo, era el típico japonés, pequeño físicamente, de pocas palabras y de sabios e interminables silencios, pero ahí estaba yo, esperando la ruptura, para aprovechar el desborde de información que fluía de su mente, con palabras justas. Hicimos muchas cosas juntos, y algunas las continuó.

Quizá la templanza de su espíritu oriental, hizo lo impecable de su accionar, tanto en lo personal como en lo profesional. Para aquellos que no tuvieron la posibilidad de conocerlo, cuento solo algunas de las cosas hechas por el maestro “**Mata**”.

Se destacó en los lugares que actuó, dejando verdaderas Instituciones a su paso por el CGM (Centro de Genética Médica), CEMIC y su propio “**BOLICHE**”, como él llamaba a su laboratorio. Formó un sinnúmero de recursos humanos, perteneciente a distintas generaciones y desperdigados por distintos lugares del país y el extranjero.

Como histórico socio de la Sociedad Argentina de Genética, fue Vicepresidente e integró comisiones evaluadoras de especialidad; consultor en citogenética humana y jurado del Premio Francisco Sáez. Premio Konex 2003 en Genética y Citogenética.

Investigador visitante en el Laboratorio de Citogenética, Tokyo (Japón). Jefe de División Genética en el Hospital de Clínicas José de San Martín. Jefe de Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas CEMIC. Médica y Codirector de la Carrera de Especialista en Genética, Instituto Universitario CEMIC, aprobado por CONEAU, Ministerio de Educación, hicieron de él, un profesional digno de toda admiración.

Fue un gran Maestro, se alegraba con los logros de sus discípulos, alentándolos para que el conocimiento fluyera en forma natural.

“Las Doctrinas del Maestro No Son Artículos de Fe, Sino Reflexiones Que Obrán Sobre la Inteligencia del Discípulo”

¡AL MAESTRO, CON CARÍÑO !

Dr. Eliseo Isaac Aranda

ERRATA

The following tables are part of the research article: Souza Canada, E. D.I; Fettig, S.; Ziegler, P.; Beck, E. 2015. Transformation of an argentine spring wheat genotype: optimization of the protocols for particle bombardment of excised immature embryos and rapid isolation of transgenic plants. Vol. XXV (1): 21-40

Table 3. *In vitro* culture and transformation of immature *Klein Brujo* (KB) and *Bobwhite* (Bw) embryos co-bombarded with pGFPBAR and either pS40-IPT (KB) or pSG516 (Bw). The transgenic plants were obtained according to the scheme shown in Fig. 1 from embryos cultured on the MB3-1 medium. The embryos were subjected to 96 h of pre-bombardment culture and to pre- and post-bombardment osmotic treatment with 0.5 M mannitol. dist: distance, Acc. press.: acceleration pressure, Part.: gold particle

Bombardment		<i>In vitro</i> culture and transformation				Expression of transgenes							
Ballistic Parameters		Culture efficiency (%)		Transformation efficiency (%) (Best experiments [%])		Number of transgenic plants possessing the <i>ipt</i> -gene / number of investigated plants ¹		Group A		Group B		Group C	
Target dist. (cm)	Acc. press. (psi) / Part. size (µm)	KB	Bw	KB	Bw	KB	Bw	GFP-expression ²	PPT-resistance ³	PPT-resistance ³	PPT-resistance ³	KB	Bw.
6	900 / 0.6	23.5	17.4	4.2 (6.6)	0.5 (1.4)	7/7	1/1	3	0	0	0	4	1
9		27.7	6.8	8.4 (12.6)	0.0	10/10	0	4	0	0 (3)	0	0 (3)	0
12		10.8	12.1	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	900 / 1.0	24.5	20.1	1.3 (2.9)	0.0	2/2	0	0	0	1	0	0 (1)	0
9		28.4	16.1	1.1 (3.1)	0.0	1/1	0	0	0	0 (1)	0	0	0
12		19.8	13.2	2.9 (4.7)	0.0	4/4	0	0 (1)	0	0 (2)	0	1	0
6	1350 / 0.6	31.4	3.6	8.6 (11.4)	0.0	6/6	0	2	0	0	0	3 (1)	0
9		20.6	3.3	5.9 (8.3)	0.0	8/8	0	0 (1)	0	0 (1)	0	4 (2)	0
12		19.2	1.2	2.4 (5.2)	0.0	2/3 (1)	0	0	0	0	0	2 (1)	0
6	1350 / 1.0	39.9	15.6	2.4 (4.5)	0.9 (1.3)	11/11	2/2	7	1	2 (2)	1	0	0
9		69.8	45.0	10 (16.4)	4.1 (6.0)	22/24 (2)	4/4	7	2	10 (1)	1	5 (1)	1
12		32.0	30.3	0.2 (2.3)	2,3 (4.6)	1/1	1/1	0	1	0	0	1	0
Total						74/77 (3)	8/8	23 (2)	4	13 (10)	2	20 (9)	2

¹ In parentheses: transgenic plants not possessing the *ipt*-gene

² In parentheses: calli or shoots having lost originally evident GFP fluorescence

³ In parentheses: GFP-expressing plantlets first evident at the end of the shoot regeneration or rooting phase

Table 4. Presence or expression, segregation and inheritance of the *gfp*- and *bar*-genes, and the *ipt*-gene in randomly selected T₁ progeny from the self-pollinated six *Klein Brujo* T₀ and two *Bobwhite* T₀ lines. The inheritance pattern was deduced by analyzing the T₂ progeny. Hom: homozygous, Hem: hemizygous, Az: azygous.

Lines	T ₀ plants			T ₁ progeny					Number of individuals <i>ipt</i> -positive but GFP-negative
	Presence of <i>ipt</i> -gene	GFP expression	PPT resistance	Segregation of <i>ipt</i> -gene + : -	Inheritance pattern of <i>ipt</i> -gene			Phenotypic segregation of GFP expression + : - ¹	
					Hom	Hem	Az		
Bw-1	+	+	+	18 : 23 ³	2	16	2	12 : 8 ³	6
Bw-2	+	+	+	12 : 8 ³	0	12	8	10 : 10	2
KB-1	+	+	+	13 : 7 ³	3	10	7	13 : 7 ³	0
KB-2	+	+	+	13 : 7 ³	3	5 ⁴	7	12 : 8 ³	1
KB-4	+	+	+	16 : 4 ³	4	12	4	16 : 4 ³	0
KB-5	+	+	+	17 : 3 ³	5	12	3	11 : 9	6

Lines	Presence of <i>ipt</i> -gene	GFP expression	PPT resistance	Segregation of <i>ipt</i> -gene + : -	Inheritance pattern of <i>ipt</i> -gene			Phenotypic segregation of PPT resistance + : - ²	Number of individuals <i>ipt</i> -positive but PPT-negative
					Hom	Hem	Az		
	KB-3	+	-	+	7 : 2 ³	0	7	2	
KB-6	+	-	+	18 : 2 ³	6	12	2	10 : 10	8

¹ GFP expression (+, -)

² PPT resistance (+, -)

³ The result of the χ^2 -test showed that the segregation ratio was not significantly different from the expected Mendelian ratio of 3:1 ($p \leq 0.05$)

⁴ Five of the T₁ plants were sterile, so that no progeny could be examined

Table 5. Loss of GFP expression and/or PPT resistance in T₃ progeny derived from selfing of homozygous T₂ plants (see Table 4). All three transgenes co-segregated as a single locus in these T₂ plants

Sibling plants ¹	T ₂ plant				Number of individuals possessing the <i>ipt</i> -gene	T ₃ progeny			
	Presence of <i>ipt</i> -gene	Phenotype		Phenotypes					
		GFP expression	PPT resistance	GFP expression : PPT resistance					
				+:+		+:-	-:+	-:-	
Bw-1-A	-1	+	+	+	26	14:14	0:0	1:1	11:11
	-2	+	+	+	12	9:9	0:0	0:0	3:3
	-3	+	+	+	20	14:14	0:0	0:0	6:6
	-4	+	+	+	20	13:13	0:0	0:0	7:7
	-5	+	+	+	19	11:11	0:0	1:1	7:7
KB-1-C	-1	+	+	+	13	12:12	0:0	1:1	0:0
	-2	+	+	+	27	26:26	0:0	1:1	0:0
	-3	+	+	+	8	8:8	0:0	0:0	0:0
KB-4-B	-1	+	+	+	20	20:20	0:0	0:0	0:0
	-2	+	+	+	20	18:18	0:0	2:2	0:0
	-3	+	+	+	18	18:18	0:0	0:0	0:0
KB-5-R	-2	+	+	+	20	0:0	0:0	20:20	0:0
	-3	+	+	+	20	19:19	0:0	0:0	1:1

¹ Bw-1 and KB-1, KB-4 and KB-5 designate independent T₀ lines. The letters -A, -B, -C and -R signify T₁ plants, and the numbers -1 to -5 sibling T₂ plants

The General Editor apologizes for the inconveniences that this omission could have caused to the authors.

ERRATA

El siguiente resumen corresponde al trabajo presentado en la sesión de Genética de Poblaciones y Evolución durante el transcurso del XLIV Congreso Argentino de Genética realizado en la ciudad de Mar del Plata del 13 al 16 de septiembre de 2015. Corresponde a GPE35, omitido involuntariamente en el Vol. XXVI (1) supl. 2015.

CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES NATURALES DE *Helianthus petiolaris* EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR FRÍO

Gutierrez A.¹, M. Poverene^{1,2}, M. Cantamutto^{1,2,3}.

¹ CERZOS- CONICET.

² Departamento de Agronomía, UNdelSur.

³ EE INTA Ascasubi.

aguti@criba.edu.ar

En los últimos 10 años el área de cultivo de girasol de Argentina se ha desplazado hacia el suroeste como resultado de la expansión del cultivo de soja. Siembras tempranas requieren una mayor tolerancia a las bajas temperaturas con el fin de optimizar el uso de los recursos de agua por el cultivo, especialmente en la etapa de plántula que es cuando el estrés por frío limita el crecimiento y la productividad. *Helianthus petiolaris* es un recurso genético silvestre que ha contribuido a la producción de cultivares modernos de girasol. Se analizaron ocho poblaciones de *H. petiolaris* que habían nacido y florecido tempranamente en la naturaleza y una población con ciclo de vida normal. Se evaluaron tres grupos de plantas: Control, Aclimatadas sometidas a estrés por frío y No aclimatadas sometidas a estrés por frío. Se caracterizaron por rasgos fisiológicos (fuga de electrolitos, contenido de glucosa, contenido de clorofila) y de crecimiento (altura de plántula, ancho y largo de hoja) en respuesta al frío. Todas las poblaciones aumentaron considerablemente su tolerancia al frío cuando las plantas fueron expuestas previamente a un proceso de aclimatación. Rasgos fisiológicos durante las etapas tempranas de crecimiento mostraron diferencias en la tolerancia al frío entre las accesiones, lo que sugiere la existencia de componentes hereditarios. Cuatro accesiones fueron las más tolerantes al frío entre las poblaciones estudiadas, esto sugiere que *H. petiolaris* es un recurso genético útil para contribuir a la mejora de girasol en la búsqueda de cultivares tolerantes al frío.



BAG
Journal of Basic & Applied Genetics