

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Búsqueda de polimorfismos de ADN asociados a patologías hereditarias en equinos.

“por”

**Rosina LANFRANCO GARCIA PINTOS
Mateo PARDIE CARRIERI**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Medicina Veterinaria.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Rody Artigas

Segundo miembro (tutor):



Dra. Silvia Llambí

Tercer miembro:

Dra. María del Carmen Cuns

Fecha: 23 de setiembre del 2020

Autores:

Br. Rosina Lanfranco

Br. Mateo Pardié

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a la Facultad de Veterinaria de la UdelaR, a sus profesores y profesionales que fueron parte de nuestro proceso de aprendizaje y nos dieron la oportunidad de formarnos en esta carrera.

A nuestras familias, por el apoyo incondicional a lo largo de toda nuestra carrera.

A nuestros amigos, los que ya estaban y los que nos regaló la FVet.

A la Dra. Silvia Llambí y Lic. Nariné Balemián; por contagiarnos e incentivarnos las ganas de investigar. Estando siempre presentes a lo largo de este proyecto, sin importar el día ni la hora.

A los caballos que participaron del proyecto, sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

TABLA DE CONTENIDOS

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCION	8
Genómica	8
El genoma del caballo	9
Síndrome de domesticación	10
Sordera asociada a despigmentación de pelaje e iris celeste	11
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
General	13
Particulares	13
MATERIALES Y METODOS	13
Lugar y momento	13
Extracción de muestras	13
Extracción de ADN	14
Amplificación y secuenciación	14
Búsqueda de polimorfismos	15
RESULTADOS	22
Alineamiento de secuencias	24
Exón 6 de gen PAX3	24
Exón 2 del gen PAX3	27
Región 3'UTR del gen PAX3	27
DISCUSION	29
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	31

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: La yegua Twilight. (Foto: Doug Antczak)	9
Fig. 2 (A, B y C): Reseña equino n°1. Fenotipo equino n°1.	166
Fig. 3 (A, B y C): Reseña equino n°2. Fenotipo equino n°2.	17
Fig. 4 (A, B y C). Reseña equino n°3. Fenotipo equino n°3.	18
Fig. 5 (A, B y C). Reseña equino n°4. Fenotipo equino n°4.	19
Fig. 6 (A, B y C). Reseña equino n°5. Fenotipo equino n°5.	200
Fig. 7 (A, B): Reseña equino n°6. Fenotipo equino n°6.	211
Fig. 7(C): Madre e hijo: equino n°3 (izq) y n°6 (der).	211
Fig. 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.	22
Fig. 9: Gel de agarosa al 1,5% donde se observan amplificaciones. ¡Error! Marcador no definido.3	
Fig.10: Alineamiento del exón 6 del gen PAX3.	244
Fig. 11: Fragmento del cromatograma del individuo 4.	24
Fig. 12: Fragmento del cromatograma del individuo 1.	255
Fig. 13: Fragmento del cromatograma del individuo 1.	25
Fig. 14: Fragmento del cromatograma del individuo 1.	26
Fig. 15: Fragmentos de cromatograma del individuo 6 (madre).	26
Fig. 16: Secuencia traducida que corresponde a parte de la proteína codificada por el exón 6 del gen PAX3.	27
Fig. 17: Fragmento del alineamiento del exón 2 del gen PAX3.	27
Fig. 18: Fragmento del alineamiento de región 3'UTR del gen PAX3.	28
Fig. 19 y 20: Cromatograma de fragmentos de 3'UTR del individuo 3.	28

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Se describen las características fenotípicas.	14
Tabla 2: Secuencias, Tm y productos de amplificación (bp).	15

RESUMEN

Se entiende por síndrome de la domesticación a una serie de cambios que ocurren en las especies domésticas comparadas con las salvajes. Dentro de ellos, a nivel comportamental tenemos docilidad y capacidad de aprendizaje, cambios de coloración del pelaje, pigmentación del iris, etc. En este estudio se identificó una familia de equinos que presenta dicho síndrome y como manifestación fenotípica: despigmentación en cara, iris celeste, hipoacusia/sordera (fenómeno asociado a la coloración blanca). Esta asociación se debe al similar origen embrionario, así como la migración defectuosa de determinado tipo de células llamadas melanocitos.

Se sabe que este síndrome tiene una base genética importante y a la fecha ya hay un gran número de genes identificados en distintas especies domésticas.

En este estudio se profundizó en el conocimiento a nivel genético de equinos con fenotipo problema (FP) sordera, zonas despigmentadas en el pelaje y coloración celeste del iris; de las razas Cuarto de Milla y Paint Horse. Por técnicas moleculares se amplificaron distintas regiones del gen PAX3, para luego realizarse la búsqueda mediante programas bioinformáticos de mutaciones o cambios en la secuencia de ADN de los animales con estas características fenotípicas.

Se encontraron cuatro mutaciones del tipo polimorfismo de nucleótido simple (SNP), en dos de los seis individuos estudiados. En uno de ellos, el cual presenta FP, se pudo determinar que dichas mutaciones se heredan por vía paterna (padrillo con FP).

En el estudio bioinformático, se encontró que las cuatro mutaciones provocaron cambios aminoacídicos.

Si bien el FP todavía no ha sido caracterizado totalmente a nivel molecular, en este trabajo se describe el mismo en familias de caballos de la raza Cuarto de Milla en Uruguay y se aportan datos de nuevas mutaciones en regiones de uno de los genes involucrados (PAX3).

SUMMARY

Certain changes in domestic species compared with the wild are understood as domestication syndrome. Some of these are behavioural changes like docility and learning capacity, coat colouring and iris pigmentation. In this study a family with the described syndrome was identified, and as phenotypic manifestation: face depigmentation, light blue coloured iris and deafness (phenomenon associated with white colouring). This association must be because of their similar embryonic origin, as well as the faulty migration of some determined type of cells called melanocytes.

We know that this syndrome has a strong genetic basis, and there is a large number of genes identified in different domestic species related to it.

This study deepened in the genetic knowledge of this phenotype (FP) deafness, coat depigmented area, light blue iris colouration; in Quarter Horse and American Paint Horse breeds. Different regions of the PAX3 gene were amplified by molecular techniques and then mutations or DNA sequence changes were searched by bioinformatics programs in animals with the phenotype described.

Four single nucleotide polymorphisms (SNP) mutations were found in two of the six individuals studied. In one individual, which presented FP, mutations were determined to be inherited through the father (stallion with FP).

By bioinformatics studies, it was found that the four mutations made amino acid changes.

Although FP has not been totally understood at the molecular level yet, this study describes it in Uruguayan Quarter Horse families and new data is provided about new mutations in some regions of one of the genes involved (PAX3).

INTRODUCCIÓN

Genómica

La genómica es el análisis o estudio de los genomas, en este caso de animales domésticos. Se trata de conocer y analizar su contenido, lograr entender cómo se organiza y cuál es la función de sus componentes. La genómica también es importante para conocer cómo ha variado la información genética y las relaciones filogenéticas entre los distintos seres vivos.

Se denomina genómica comparativa a la comparación de genomas de especies relacionadas. Estudia la función, el contenido y la organización de genomas de diferentes especies u organismos y los compara con otros previamente secuenciados y a su vez con genomas ancestrales. Los estudios de genómica comparativa son valiosos en veterinaria ya que frente a una enfermedad hereditaria estudiada en una especie, se puede extrapolar información a otra especie donde hay una sintomatología similar (Llambí y Arruga, 2018).

Una de las técnicas de aporte fundamental para posibilitar estos avances fue la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) diseñada por Mullis en el año 1983. La PCR permitió acelerar el desarrollo de la secuenciación debido a que ya no se tenía la limitante de cantidad de ADN y los fragmentos a analizar se podían amplificar miles de veces. La etapa de secuenciación automática comienza en 1987 por el método Sanger, pero con marcación fluorescente (Llambí y Arruga, 2018).

La fiebre de la secuenciación automática va de la mano del desarrollo de la bioinformática para realizar el análisis de datos y ensamblaje de las secuencias. El ensamblaje se refiere a ordenar y alinear el puzzle de fragmentos de ADN obtenidos por distintos métodos de secuenciación para reconstruir la secuencia original de un genoma en forma ordenada. Se habla de un proceso de tres instancias o pasos: la filtración de secuencias, la selección de las mismas y la unión o ensamblaje final (Llambí y Arruga, 2018).

A nivel mundial hay bases interconectados “on line” donde se depositan las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de diferentes especies existiendo una estrecha colaboración entre ellas:

- 1) National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- 2) European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/>).
- 3) DNA Data Bank of Japón (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>).

A comienzos del siglo XXI se produjo una gran expansión del conocimiento de los genomas de animales domésticos debido al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva. La especie equina (*Equus ferus caballus*) no ha escapado a este conocimiento y en el año 2009 se publica el borrador de su genoma en la revista científica Science (Wade y col., 2009).

El Genoma del caballo

Para la secuenciación de este genoma se tomó como referencia una hembra de raza Pura Sangre llamada Twilight procedente de la Universidad de Cornell. Su tamaño es de 2.428.790.173 pares de bases y se han identificado 20.449 genes codificantes. El equino tiene una dotación de $2n=64$ cromosomas, con XY los machos y XX las hembras los como los demás mamíferos domésticos. De esta publicación de la revista Science, se generó información sobre la historia de la domesticación de esta especie que sería diferente al camino de domesticación del perro y más similar al bovino. Los equinos no parecen haber sufrido una domesticación estricta con cuello de botella sino que habría varias líneas matrilineales y pocas líneas patrilineales existiendo un fuerte sesgo sexual durante el proceso de domesticación (Llambí y Arruga, 2018).



Fig. 1: La yegua Twilight. (Foto: Doug Antczak) tomada de <https://www.solociencia.com>. Fecha de consulta: 26/08/2020.

Estos avances en el conocimiento del genoma permitieron identificar distintos mecanismos intrínsecos implicados en patologías y rasgos fenotípicos asociados a mutaciones en genes específicos (Nicholas y Hobbs, 2014). Estos autores observaron que muchas de las patologías y rasgos fenotípicos hereditarios se deben a mutaciones puntuales tipo SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), inserciones o deleciones de bases nucleotídicas (InDels).

Síndrome de domesticación

En mamíferos domésticos se observan varios rasgos de carácter hereditario que no se ven en las especies salvajes de las que descienden, a esto se le llama “síndrome de la domesticación” (SD). Actualmente hay una corriente de científicos que trata de explicar y asociar directa e indirectamente al SD con un déficit leve de células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario que implican modificaciones en caracteres de tipo morfológicos, fisiológicos y comportamentales (Wilkins y col., 2014).

Este déficit podría explicarse a nivel hereditario y en la actualidad se está explorando en el conocimiento de evidencia genética a través del estudio de polimorfismos en genes asociados al mismo. Por domesticación animal se entiende como un proceso en donde con el paso del tiempo hay una adaptación de una población animal al hombre y esa población se adaptará a una vida en cautiverio donde se podrá reproducir y dejar descendencia, esto implica una serie de cambios a nivel genético con adaptación al medio ambiente donde vive el ser humano (Price, 1984). La domesticación consiste en el control de especies salvajes y es considerada como un proceso complejo confinado a un área y restringida a una cultura particular.

Estudios basados en el análisis de secuencias de ADN realizados en varias especies domésticas sugieren que ha ocurrido un número limitado de eventos de domesticación, mientras que los equinos y los caninos constituyen una excepción, ya que se supone que surgieron de numerosos eventos independientes (Giovambattista y Peral, 2010). A diferencia de sus ancestros salvajes, las especies domesticadas se caracterizan por una gran variabilidad alélica en genes asociados al color del pelaje. Esta variabilidad resulta de la selección artificial, que acarrea efectos pleiotrópicos negativos vinculados a ciertas variantes de color de pelaje (Cieslak y col., 2011).

Algunos de los caracteres que están relacionados con el SD son cambios en la morfología craneofacial, reducción de zonas del cerebro, cambios en las concentraciones de neurotransmisores, reducción del tamaño de las piezas dentales, mayor docilidad, alteraciones en la forma de las orejas, cambios en el tamaño de glándulas adrenales, ciclos estrales más frecuentes y cambios en el color de la capa (Wilkins y col., 2014; Wright, 2015). Belyaev (1979) propone que la reducción del nivel de estrés en los animales domésticos viviendo en un ambiente antropogénico con mayor protección llevó a cambios sustanciales en las respuestas hormonales basados en cambios de expresión génica.

En la historia de la domesticación, los caballos inicialmente se domesticaron para producir carne y leche, fueron indispensables para la guerra y fueron la forma más rápida y confiable de transportarse hasta la invención de los motores (Giovambattista y Peral, 2010; Cieslak y col., 2011). También, la domesticación de los equinos jugó un papel muy importante en la vida de las poblaciones pastoriles nómadas de las estepas

euroasiáticas, tanto en la exploración como en la dispersión de las lenguas indoeuropeas; por lo tanto se puede afirmar que tuvo un rol fundamental en las sociedades humanas. El momento exacto de las primeras domesticaciones de caballos es aún incierto, se han propuesto diferentes momentos y lugares, pero la evidencia más temprana e indiscutible de domesticación son los procesos acaecidos hace 2000 años en las estepas de los Urales (Giovambattista y Peral, 2010).

Al comparar la especie equina de la actualidad con la antigua, esta última resultó ser relativamente más homogénea, comprobando que este tipo de uniformidad es típico de las especies salvajes (Vilà y col., 2001). Estos cambios en la selección fenotípica, paralelamente causaron cambios genéticos mediados por la selección (Cieslak y col., 2011).

Sordera asociada a despigmentación del pelaje e iris celeste en equinos.

La función auditiva juega un papel importante en los animales domesticados, ya que estos interactúan con animales de su misma especie y de otras especies incluyendo al ser humano (Strain, 2015). Durante el desarrollo embrionario, los melanoblastos migran desde la cresta neural hacia sus sitios destino (piel, pelo, ojos, *stria vascularis*), se diferencian en melanocitos y luego producen melaninas (eumelanina y feomelanina) (Strain, 2015). Una pequeña población de melanocitos dentro del oído interno es esencial para la audición (Magdesian y col., 2009).

Se ha reconocido sordera en caballos con grandes áreas despigmentadas y ojos azules (Strain, 2015). La falta de melanocitos funcionales es el vínculo entre sordera y alteraciones de pigmento ya que la sordera congénita se asocia con una migración anormal de estos melanocitos desde la cresta neural, y una pobre supervivencia o desarrollo dentro del oído interno de algunos animales con alteraciones en la pigmentación del pelaje y del iris (Magdesian y col., 2009). Se han encontrado variantes genéticas asociadas con diferentes fenotipos de manchas blancas en caballos en varios genes, incluidos PAX3 y MITF (Negro y col., 2017).

El gen MITF es un regulador clave en la pigmentación. Desempeña un papel fundamental en la diferenciación de los melanocitos, a través de la regulación de la expresión de ciertas proteínas del melanosoma. Las mutaciones en el gen MITF son responsables de una gran variedad de fenotipos diluidos, con manchas blancas y completamente blancos. Algunas de estas mutaciones tienen un efecto pleiotrópico como la microftalmia severa (trastorno del desarrollo del ojo), falta de pigmentación

ocular, sordera, osteopetrosis y otras anomalías (Cieslak y col., 2011). MITF es necesario para la proliferación y desarrollo de los melanocitos. El promotor MITF se ve afectado por los factores de transcripción PAX3, SOX10, TCF, LEF-1 y CREB (Strain, 2015). Henkel y col., 2019, realizaron un estudio de una familia de equinos American Paint Horse con fenotipo de manchas blancas y ojos celestes, algunos de los cuales eran sordos. Encontraron una delección heterocigota de ~ 63 kb que abarca los exones 6-9 del gen MITF en los 8 caballos afectados de la familia.

Las variantes en PAX3 no explican el fenotipo en las familias de Cuarto de Milla, se secuenciaron todos los exones y los elementos promotores conocidos del gen MITF en dos animales “splashed white” que no tenían el alelo PAX3 y en dos controles (Hauswirth y col., 2012). Hauswirth y col. (2012), analizaron cuantitativamente la proporción de piel despigmentada en el área de la cara de Cuarto de Milla “splashed white” en relación a su genotipo MITF y PAX3 subyacente y también comparado a su color de manto. Este análisis indicó que una copia tanto de MITF como de PAX3 tienen un efecto similar en la pigmentación de la cara. La presencia de los dos alelos (MITF_{prom1} y PAX3_{C70Y}) conllevan a una despigmentación levemente más pronunciada en la cara comparado a casos donde hay solo un alelo presente.

Mutaciones en el PAX3, gen que codifica para una familia de proteínas de tipo factores de transcripción, causan similar fenotipo en ratones y humanos y la mutación afecta a un residuo altamente conservado de cisteína que se predice que participa en la unión del ADN. El alelo PAX3_{C70Y} se comenzó a estudiar hace 24 años y se sabe que ocurre exclusivamente en Cuarto de Milla y Paint Horse. No se encontraron animales homocigotos para esta mutación, y basados en estudios en ratones es improbable que un equino homocigota para PAX3_{C70Y} sea viable. Como PAX3 es requerido en varios pasos clave del desarrollo neural, la homocigosis en este alelo resultaría en letalidad embrionaria o fetal. Por lo tanto el cruzamiento de dos equinos heterocigotas PAX3_{C70Y} no es recomendado, ya que se debe prevenir la producción accidental de un embrión homocigota para este alelo (Hauswirth y col., 2012).

En equinos los patrones de presencia de manchas blancas presentan una gran varianza fenotípica desde el “blanco sólido” pasando por el “salpicado blanco” hasta la sola presencia de pequeñas manchas o marcas despigmentadas. Existe una estrecha asociación entre determinadas zonas de pelaje blanco (máscara blanca abarcando la zona de los ojos), iris de color azul y sordera en la raza de caballos American Paint Horse (Pardie y col., 2017).

En el presente trabajo, pretendemos profundizar en el estudio y búsqueda de polimorfismos de ADN presentes en equinos con el fenotipo problema (FP): presencia de sordera, despigmentación de pelaje e iris celeste.

HIPÓTESIS

Los equinos con fenotipo sordera, despigmentación del pelaje e iris celeste, presentan polimorfismos en regiones de los genes MITF y PAX3.

OBJETIVOS

General

Estudiar polimorfismos en regiones de los genes MITF y PAX3 asociadas al fenotipo sordera, despigmentación de pelaje e iris celeste en equinos de la raza Cuarto de Milla y American Paint Horse.

Particulares

- 1- Extraer ADN de muestras de sangre periférica de caballos de las razas Cuarto de Milla y American Paint Horse con y sin el FP.
- 2- Buscar en las bases de datos (GenBank, Ensembl) los polimorfismos ya descritos en los genes MITF y PAX3.
- 3- Amplificar secuencias en los genes MITF y PAX3.
- 4- Realizar un análisis bioinformático (comparativo) de las secuencias amplificadas con las presentes en las bases de datos (GenBank, Ensembl) mediante programas bioinformáticos para detectar posibles polimorfismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de investigación fue previamente aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) (Protocolo N°528), de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de la República.

Lugar y momento

Se visitó un establecimiento criador de las razas Cuarto de Milla y American Paint Horse en el departamento de Florida-Uruguay en Abril de 2018 donde hay registros de casos de equinos que presentan el FP (sordera, despigmentación de pelaje e iris celeste).

Extracción de muestras

Para el análisis de genética molecular se extrajeron muestras sanguíneas de animales que presentan el FP así como de animales emparentados normales y no

emparentados normales. Se extrajeron muestras de seis animales; cuatro de ellos hermanos por parte de padre (individuos 1, 2, 3 y 4 – ver tabla 1 y figs. 2, 3, 4 y 5), de los cuales dos son también hermanos por parte de madre (individuos 1 y 3). Una muestra de la madre (individuo 6 – ver tabla 1 y fig. 7) y un control de la misma raza no emparentados (individuo 5 – ver tabla 1 y fig. 6). Se tomaron muestras de sangre (5 ml) con tubos vacutainer con EDTA.

Tabla 1: Se describen las características fenotípicas relevantes de los individuos muestreados:

Individuo	Raza	Sexo	Audicion	Despigment	Ojos (Iris)	Padre	Madre
1	CdM	Macho	Sordo	Si	Celestes	SSG	6*
2	PH	Macho	S/P	Si	Celestes	SSG	2
3	CdM	Macho	Sordo	Si	Celestes	SSG	6*
4	CdM	Hembra	S/P	No	Marrones	SSG	7
5	CdM	Macho	S/P	No	Marrones	otro	otro
6*	CdM	Hembra	S/P	Si	Celestes	otro	otro

En amarillo se destacan los individuos que presentan fenotipo problema. Con asteriscos se marca a la madre de los individuos con fenotipo problema; también muestreada con el número 6. Al padre de los individuos 1, 2, 3 y 4 lo denominamos “SSG” para proteger su identidad ya que se encuentra en el exterior del país. Por este motivo es que no contamos con una muestra del mismo; aunque sabemos que presenta nuestro FP.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de las muestras sanguíneas se utilizó el kit ZR Genomic DNA tissue (Zimo Research, Innis y col., 1990). Se midió la concentración del ADN en equipo nanodrop (absorbancias A260/A280, A260/230) y se evaluó la pureza y concentración del mismo.

Amplificación y secuenciación

Se obtuvieron *primers* de la bibliografía (Hauswirth y col., 2012) para la amplificación de las secuencias específicas correspondientes a los dos genes de estudio (MITF y PAX3). Se amplificó mediante PCR convencional (a tiempo final) y los productos obtenidos se enviaron al servicio de secuenciación MACROGEN.

Tabla 2: se observa la secuencia de los primers utilizados para amplificar los exones 2, 6 y 10 del gen PAX3, y los exones 1, 5 y 6 del gen MITF:

Chromosome	Start	Stop	Gene	Exon	Forward primer	Sequence 5'-3'	Reverse Primer	Sequence 5'-3'	Tm (°C)	Product (bp)
	Build EcuCab 2.1	Build EcuCab 2.1								
6	11,429,573	11,429,916	PAX3	2	Pax3_Ex2_F	TGACTTTCCTCGCTCTC	Pax3_Ex2_R	CTGCCCCATGTCCTAAC	60	344
6	11,359,762	11,360,045	PAX3	6	Pax3_Ex6_F	GGGGCCTTAATCTGTTTAGC	Pax3_Ex6_R	AACTCCTTGACTCCCTCCTTC	60	284
6	11,340,225	11,340,521	PAX3	10	PAX3_EX10_F2	TGACAGGAGACAAAGGAGAGTG	PAX3_EX10_R2	CATTCTGCTGCACAAACCA	60	297
16	20,116,949	20,117,808	MITF	1M	MITF_Ex1M_F	GGTATCAAACAACAACAGCATT	MITF_Ex1M_R	GCTAACTCCCTCTTCTCTGA	58	860
16	20,105,065	20,105,533	MITF	5	MITF_Ex5F2	GGAGTAATGGTCTGTGGAG	MITF_Ex5R2	TCCCAGAACCAACCAAGTA	58	469
16	20,103,027	20,103,521	MITF	6	MITF_Ex6F2	GTCGGTGTGATCACGAGGT	MITF_Ex6R2	GCGAATCACTCAACAT	58	495

Secuencias, Tm y productos de amplificación (bp).

Para realizar la PCR utilizó el equipo Multigene II (Labnet International, Inc).

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25ul. Para esto se utilizó:

1 ul de ADN genómico (~20 ng/ul)

1 ul de cada primer (100 pg/ul)

12,5 ul de ImmoMix (Bioline, Australia)

5,5 ul de agua Miliq.

Las condiciones de amplificación para los tres exones del gen PAX3 y los tres exones del gen MITF fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	95°C durante 5 min.
35 ciclos	
Desnaturalización	95°C durante 30 segundos
Annealing	53° durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 1minuto
Extensión final	72°C durante 5 minutos

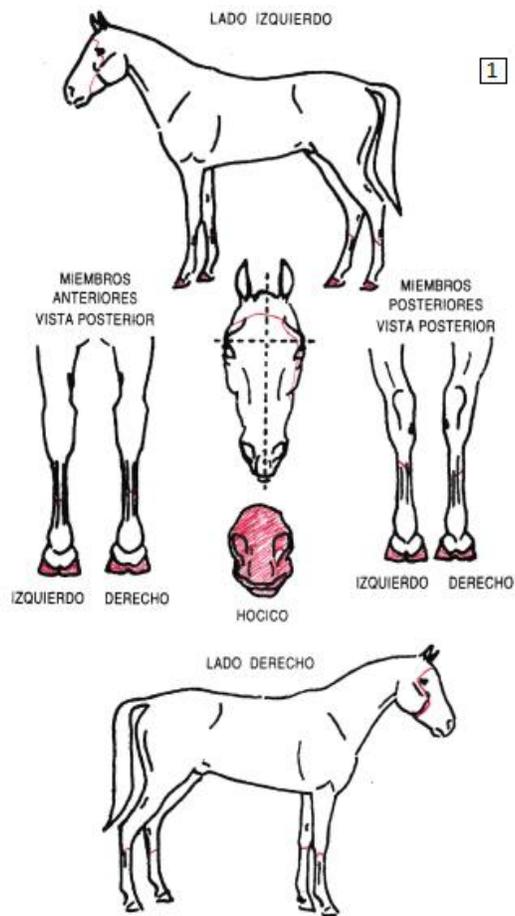
Los productos de la PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1,5 % marcado con Good View Nucleid Acid Stain en buffer TBE 1x y se visualizaron mediante luz UV en el equipo BIOSENS SC- 805.

Los 36 amplicones de los genes MITF (n=3) y PAX3 (n=3) se enviaron a MACROGEN (Korea) para realizar la secuenciación de los seis animales.

Búsqueda de polimorfismos

Para el análisis de las secuencias y búsqueda de polimorfismos se utilizaron herramientas bioinformáticas de la base https://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index y el programa de dominio público Bioedit, (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación se realizó un análisis de los polimorfismos encontrados.



A



B



C

Fig. 2: Equino 1. A: reseña del animal. B: fotografía de región de la cabeza. C: fotografía de cuerpo entero.

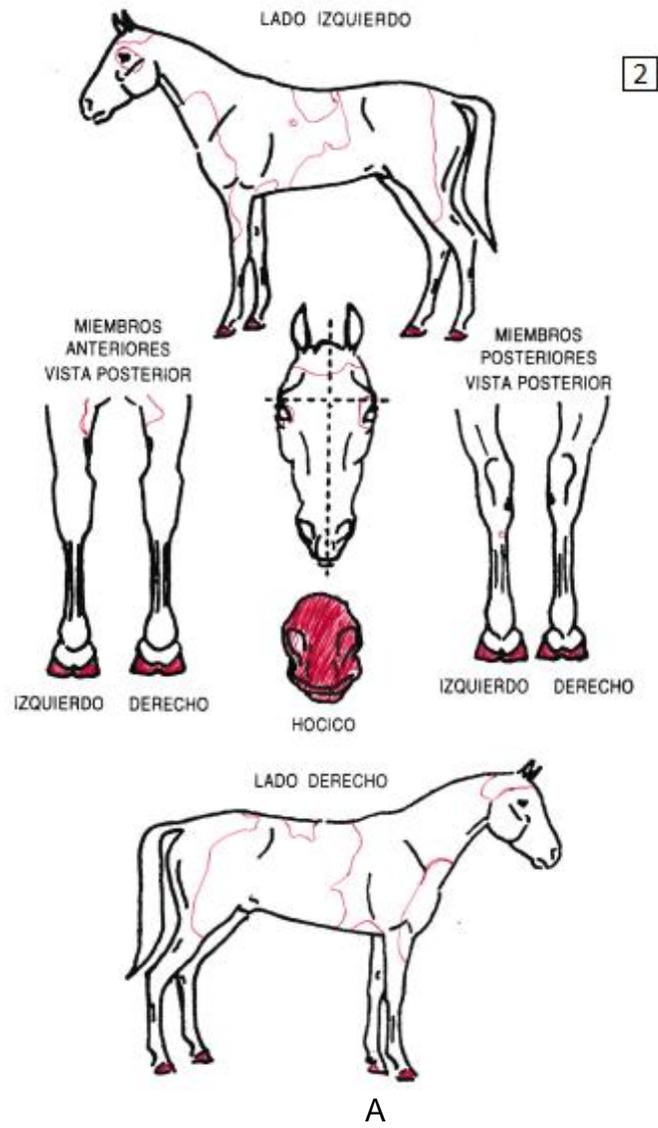
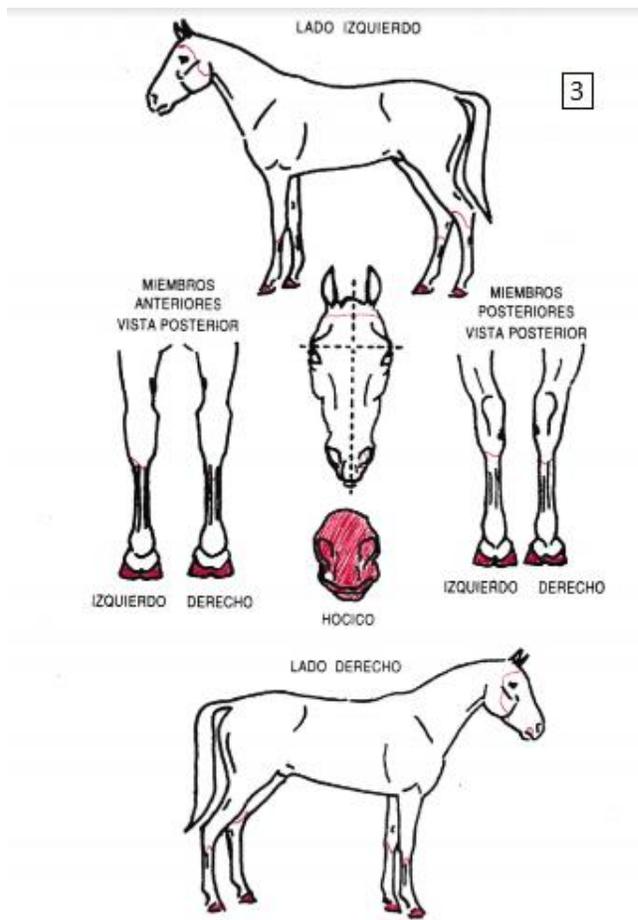


Fig. 3: Equino 2. A: Reseña del animal. B: Fotografía de la región de la cabeza. C: Fotografía del cuerpo entero.



A



B



C

Fig. 4: Equino 3. A: Reseña del animal. B: Fotografía de la región de la cabeza. C: Fotografía del cuerpo entero.

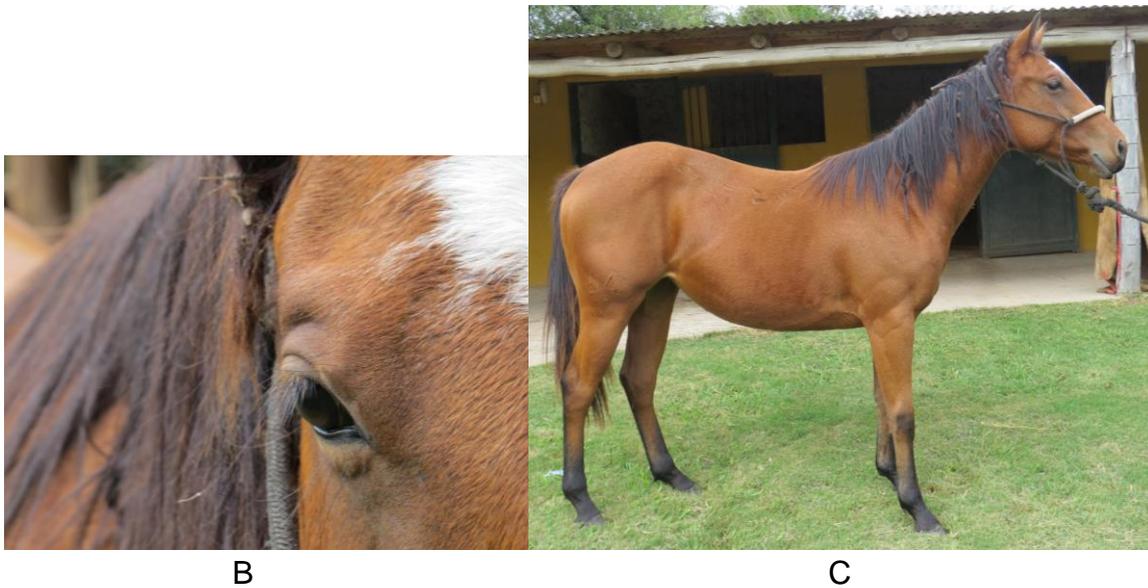
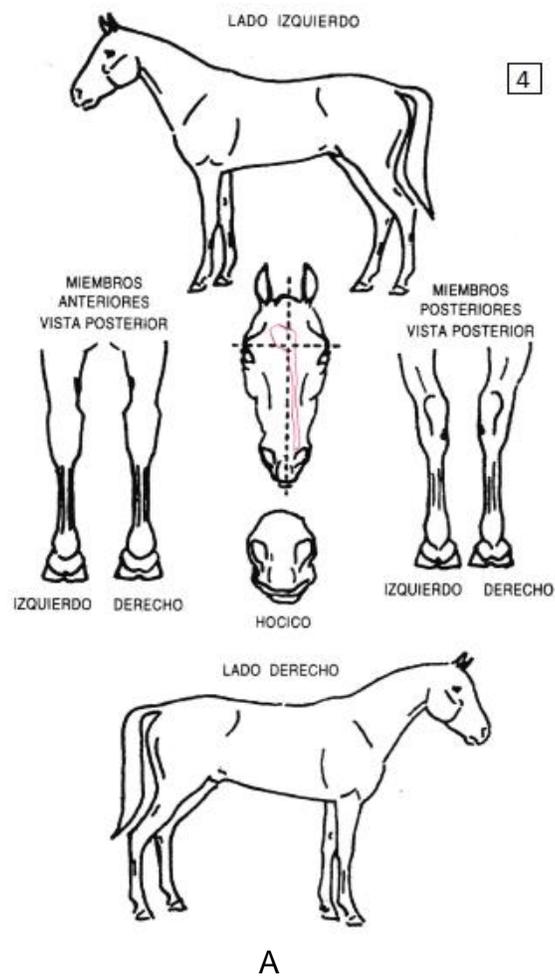
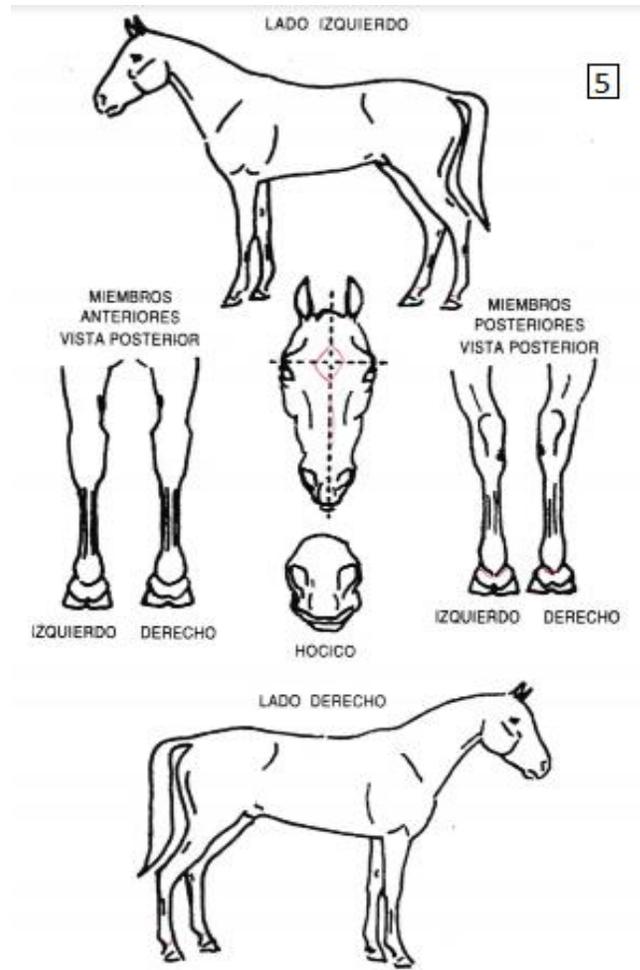


Fig. 5: Equino 4. A: Reseña del animal. B: Fotografía de la región de la cabeza. C: Fotografía del cuerpo entero.



A.

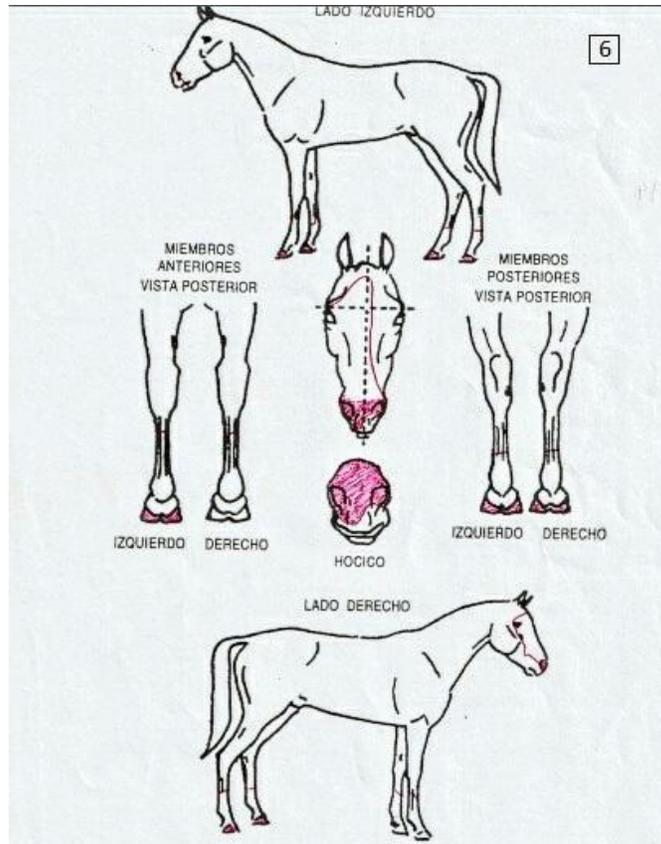


B



C

Fig. 6: Equino 5. A: Reseña del animal. B: Fotografía de la región de la cabeza. C: Fotografía del cuerpo entero.



A



B



C

Fig. 7: Equino 6. A: Reseña del animal. B: Fotografía de la región de la cabeza. C: Fotografía de cuerpo entero de equino 6 a la derecha y equino 3 (hijo) a la izquierda.

RESULTADOS

Las muestras de ADN obtenidas para el análisis fueron cuantificadas mediante Nanodrop, presentando concentraciones de entre 10 y 20 ng/ μ L.

Los productos de PCR obtenidos para ambos genes fueron cargados en geles de agarosa al 1,5% (ver fig. 8), se analizaron y fotografiaron en transiluminador (ver fig. 9).

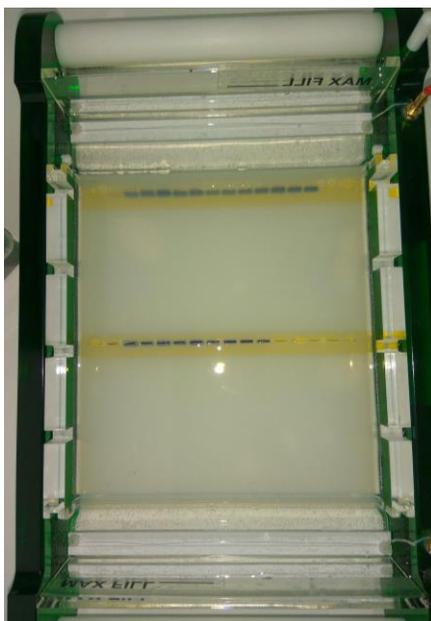


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

A) GEN MITF

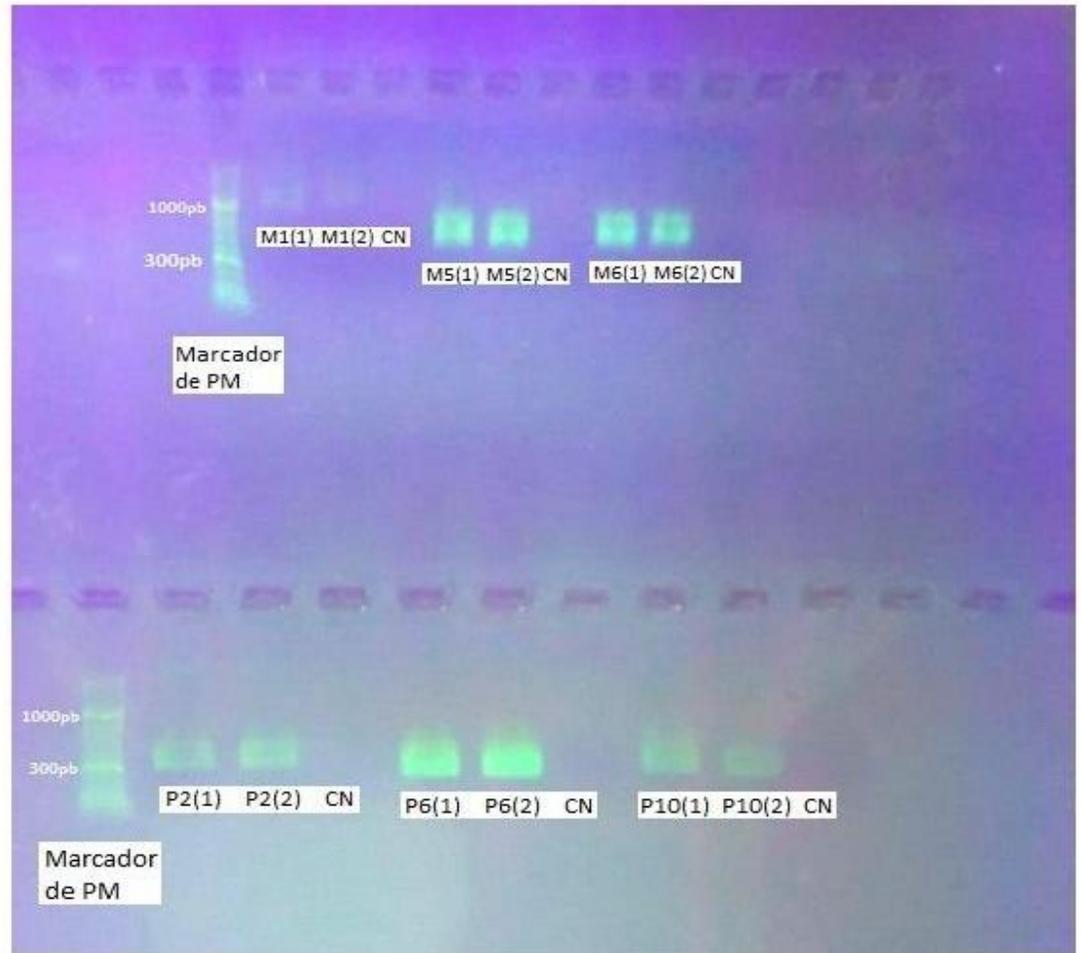


Fig. 9: Gel de agarosa al 1,5% donde se observan los amplicones de parte de los exones de los genes MITF y PAX3 y los marcadores de peso molecular.

En el gel A se amplificaron los exones 1, 5 y 6 del gen MITF con muestras de los individuos 1 y 2. En el gel B se amplificaron los exones 2, 6 y 10 del gen PAX3 con muestras de los individuos 1 y 2. CN=control negativo.

Para el gen MITF se observaron bandas de 860 pares de bases (pb) correspondientes a la secuencia del exón 1 (M1(1) y M1(2)), bandas de 469 pb correspondientes a la secuencia del exón 5 (M5(1) y M5(2)), y bandas de 496 pb correspondientes a la secuencia del exón 6 (M6(1) y M6(2)).

En el caso del gen PAX3, se obtuvieron bandas de 344 pb correspondientes a la secuencia del exón 2 (P2(1) y P2(2)), bandas de 284 pb correspondientes a la secuencia del exón 6 (P6(1) y P6(2)), y bandas de 297 pb correspondientes a la secuencia del exón 10 (P10(1) y P10(2)).

Los amplicones obtenidos fueron enviados a MacroGen (Korea) para su secuenciación. Del gen MITF, no se obtuvo un buen resultado de secuenciación de ninguno de los exones amplificados (1, 5 y 6), por lo que no pudimos continuar el estudio del mismo. Sin embargo del gen PAX3, sí se pudieron secuenciar los exones 3, 6 y 10.

Alineamiento de secuencias

Las fragmentos secuenciados fueron alineadas y analizadas mediante el programa Bioedit (Hall T.A., 1999), obteniéndose los siguientes resultados:

Exón 6 del gen PAX3

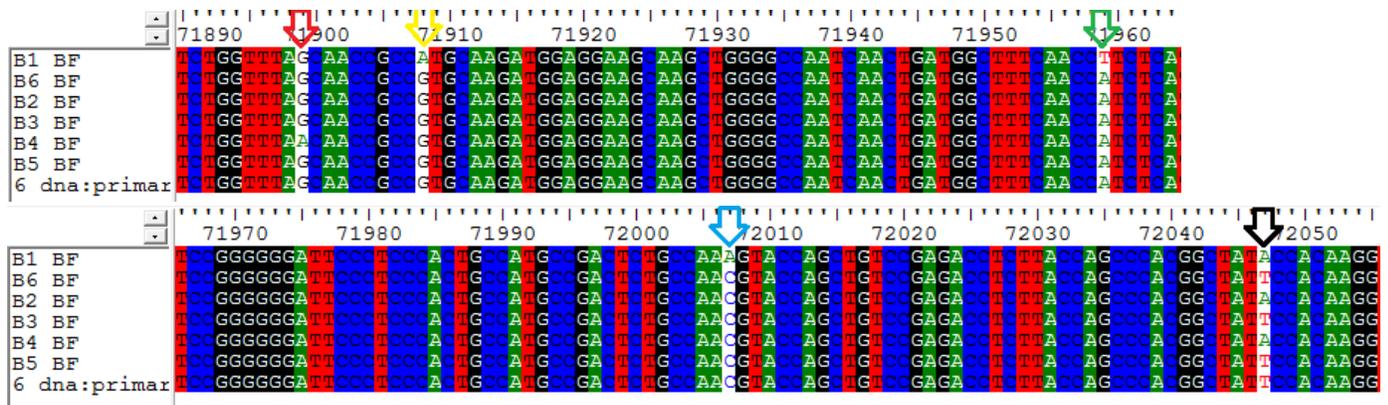


Fig.10. Alineamiento del exón 6 del gen PAX3. B1 corresponde al individuo 1; B6 al individuo 6; B2 al individuo 2; B3 al individuo 3; B4 al individuo 4; B5 al individuo 5; 6 dna:primar corresponde al ADN referencia.

En la región 71899 (flecha roja; ver fig. 10) del individuo 4, se observa una mutación donde cambia una Guanina por una Adenina. Se verificó dicha mutación en el cromatograma donde se observa que el individuo es heterocigota A/G (ver fig. 11).

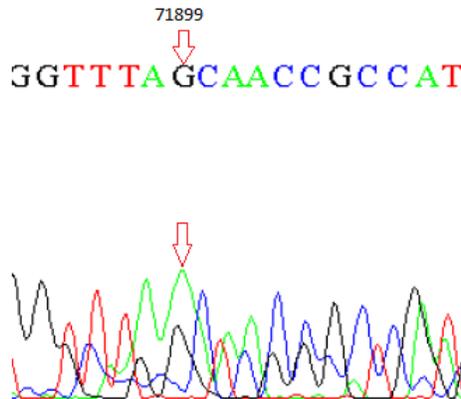


Fig. 11. Fragmento del cromatograma del individuo 4.

En el individuo 1 se observan 3 mutaciones en el exón 6 del gen PAX3, en las regiones 71908 (flecha amarilla), 71959 (flecha verde) y 72007 (flecha celeste) (ver fig. 10) las cuales también pudieron ser verificadas en el cromatograma.

En la posición 71908 cambia una Guanina por una Adenina. El individuo es heterocigota A/G (ver fig. 12).

71908
↓
CAACCGCCATGCAAGAT

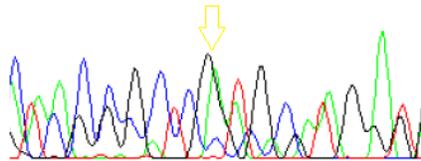


Fig. 12. Fragmento del cromatograma del individuo 1.

En la posición 71959, cambia una Adenina por una Timina. El individuo es heterocigota A/T (ver fig. 13).

71959
↓
TCAACCTTCTCATTCCG

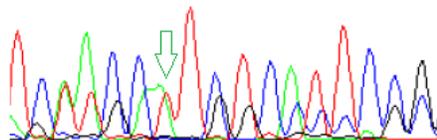


Fig. 13. Fragmento del cromatograma del individuo 1.

En la posición 72007 cambia una Citosina por una Adenina. El individuo es heterocigota A/T (ver fig. 14).

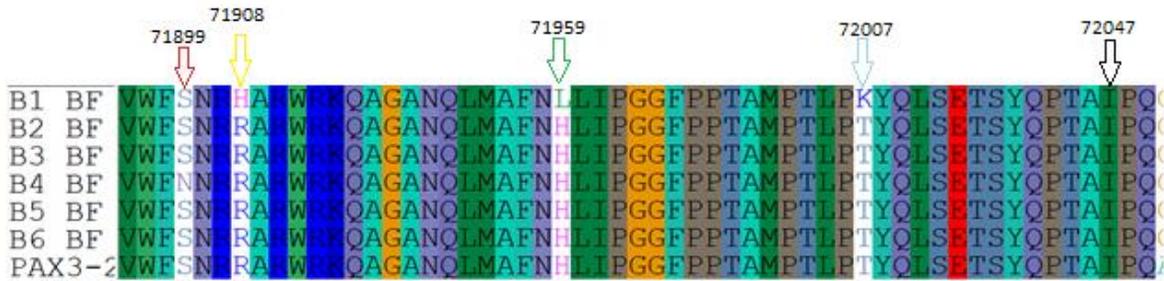


Fig. 16: Secuencia traducida que corresponde a parte de la proteína codificada por el exón 6 del gen PAX3.

En esta secuencia traducida a proteínas, podemos observar que 4 de las 5 mutaciones observadas en el alineamiento de secuencia del exón 6 del PAX3, provocaron un cambio en la proteína, mientras que una de ellas no tuvo efecto en la proteína formada. Esto se debe a la ubicación de la mutación dentro del triplete de bases, lo cual puede o no influir en la proteína final. Entonces en la posición 72047 (flecha negra, ver fig. 10), donde una T cambia por una A, no se observan cambios a nivel de la proteína (flecha negra, ver fig. 16) ya que el aminoácido codificado es el mismo (ATA=ATT= Isoleucina); esto se denomina “mutación sinónima”.

En la posición 71899 (flecha roja, ver fig. 16), en el individuo 4 se observa una Aspargina (N) mientras que en la secuencia referencia hay una Serina (S).

En el individuo 1 se observan 3 cambios aminoacídicos: en la posición 71908 (flecha amarilla, ver fig. 16) cambia una Histidina (H) por Arginina (R). En la posición 71959 (flecha verde, ver fig. 16) cambia una Leucina (L) por una Histidina (H). Y en la posición 72007 (flecha celeste, ver fig. 16) cambia una Lisina (K) por una Treonina (T).

Exón 2 del gen PAX3

En la siguiente figura (fig. 17) podemos observar un fragmento del alineamiento del exón 2 del gen PAX3, el cual no presentó ninguna mutación en toda su extensión.



Fig. 17: Fragmento del alineamiento del exón 2 del gen PAX3.

Región 3'UTR del gen PAX3

En la siguiente figura (fig. 18), podemos observar un fragmento del alineamiento de 3'UTR (previamente referido como exón 10), donde se observan dos mutaciones en el

individuo 3, en las posiciones 91363 y 91404 (flechas), las cuales no pudieron ser corroboradas en el cromatograma (figs. 19 y 20).

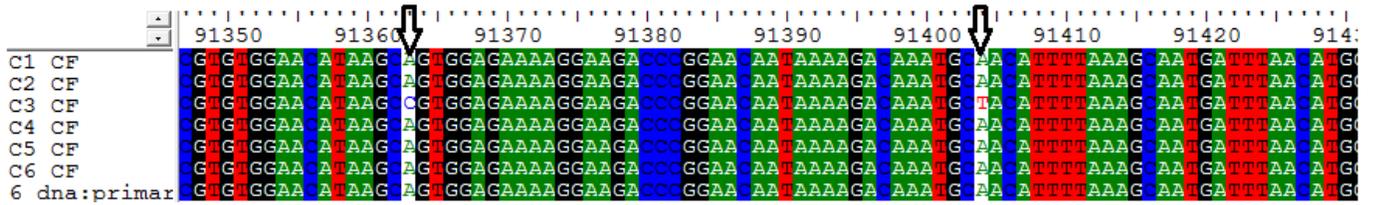


Fig. 18: Fragmento del alineamiento de región 3'UTR del gen PAX3.

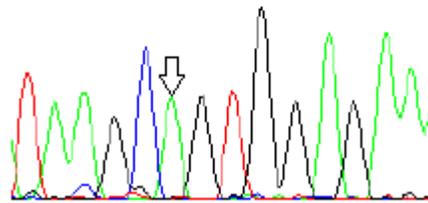
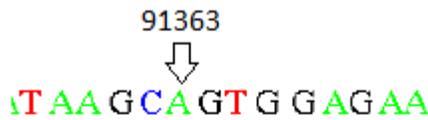


Fig. 19.

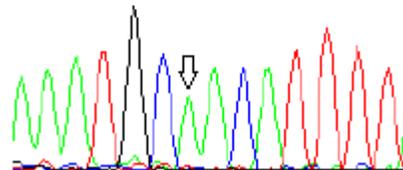
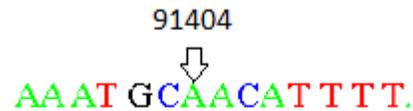


Fig. 20.

Fig. 19 y 20: Cromatograma de fragmentos de 3'UTR del individuo 3.

DISCUSIÓN

La variación del color del pelaje durante los eventos de domesticación de los animales resulta en patrones diversos donde existen patrones de manchas blancas.

Varios genes con variantes alélicas (entre ellos el gen PAX3), se encuentran asociados a estos patrones de manchas en el pelaje de los equinos (Holl y col., 2017). La variación del color debido a efectos de pleiotropía se asocia con otros rasgos conductuales o de salud (sordera, cáncer de piel, esterilidad, anemia, etc) (Reissmann y Ludwig, 2013; Holl y col., 2017).

En este trabajo se identificaron mutaciones de sustitución de nucleótidos (del tipo SNP) en una de las regiones secuenciadas del gen PAX3 (exón 6), en dos de los animales (N°1 y N°4) estudiados cuando se comparan con el genoma de referencia. El animal N°1 presenta 3 sitios de mutación en el exón 6 y se observa el FP, donde se observa el fenómeno de pleiotropía (despigmentación en cara y miembros, iris celeste y sordera) de acuerdo a lo planteado por Bellone (2010). Sin embargo el animal N°4 no presenta el FP y en el análisis de secuencias se observa un solo sitio de mutación en el exón 6.

Con respecto a la proteína codificada por el exón 6 del gen PAX3, al haber cambios en su secuencia, su función podría estar alterada. Se deberían realizar análisis bioinformáticos más profundos sobre la proteína, pero esto escapa a los objetivos del presente trabajo.

Por otra parte, en el animal N°3, que presenta FP, no se identificaron mutaciones en las secuencias analizadas. Siendo estos tres animales descendientes del mismo padre (“SSG”, con FP).

Hauswirth et al; 2012 identifican mutaciones en el gen PAX3 asociadas al fenotipo despigmentación extensa en cabeza, miembros, iris celeste y sordera aunque dada la complejidad de genes involucrados, este fenotipo todavía no se encuentra caracterizado totalmente a nivel molecular.

Estos autores, identificaron tres mutaciones causantes de este determinado patrón de despigmentación (cara y miembros) descrito como “splashed white”, y asegura que determinado alelo (PAX3C70Y) ocurre “de novo” en una hembra que la transmitió a sus descendientes, que tenían el fenotipo mencionado.

En nuestro trabajo, haciendo el análisis del cromatograma de la secuencia del exón 6 de la madre (N°6) de uno de los caballos con mutaciones y fenotipo problema (N°1) pudimos determinar que las mutaciones eran heredadas por vía paterna (padre “SSG”

con fenotipo problema), ya que la hembra era homocigota coincidiendo con el genotipo de referencia.

Sin embargo recientemente, Hauswirth et al; 2019, publican una enmienda sobre un error en el genotipado de la hembra “splashed White”, asumiendo que dicha mutación PAX3C7OY pudo haber surgido en un antepasado de ésta, no pudiendo establecer el origen ni fecha estimada en años.

Debido a esto es que resaltamos la importancia de hacer un buen análisis del cromatograma. Esta herramienta es fundamental para corroborar o, por lo contrario, descartar mutaciones observadas en la secuencia de ADN. Como lo que nos ocurrió al observar 2 mutaciones en las posiciones 91363 y 91405 del alineamiento de la región 3'UTR, las cuales no se corroboraron en el cromatograma por lo que no se consideran como tales. También, fue útil para conocer el genotipo del animal (homocigosis o heterocigosis para determinado SNP).

Por otro lado, en la presente tesis se utilizaron los primers diseñados por Hauswirth y col., 2012, para amplificar las distintas regiones del gen PAX3 (regiones de los exones 2, 6 y 10). Pero al realizar la secuenciación y análisis bioinformático, encontramos que no hay exón 10 del gen PAX3, sino que esa región corresponde a intron y región 3'UTR. Esto podría deberse a problemas y modificaciones posteriores de los ensamblajes de los genomas. El ensamblaje es fundamental ya que alinea y ordena el puzzle de fragmentos de ADN obtenidos a partir de diferentes métodos de secuenciación con el fin de reconstruir la secuencia original de un genoma. En la actualidad se están reconsiderando y resolviendo varios errores producidos por ensamblajes defectuosos en genomas de diferentes especies. Gracias a los avances en análisis bioinformático, dentro de la llamada biología “*in silico*” contamos con la utilización de recursos de programas informáticos y bases de información de secuencias para ensamblar y alinear las mismas pudiendo identificar exones, intrones, regiones reguladoras (5'UTR, 3'UTR), regiones conservadas, etc (Llambí y Arruga., 2018). Por ejemplo en la especie bovina, el problema radica en que al comparar los ensamblajes de los dos genomas bovinos aparecen discordancias, las cuales pueden generar errores al momento de realizar estudios de selección genómica en el ganado (Zhou y col., 2015). Por otra parte, la reciente publicación de Hauswirth y col. (2019), asume y rectifica errores en la identificación de una variante alélica de PAX3 en relación al trabajo de los mismos autores del año 2012; trabajo en el cual nos basamos para enviar a diseñar los primers de PAX3.

Negro y col. (2017) realizan un estudio estadístico de asociación analizando variantes alélicas de los genes KIT, PAX3 y MITF, en 70 caballos Pura Raza Menorca (pelaje uniforme oscuro) y en 70 caballos españoles de pura raza con patrones diferenciales de coloración de pelaje y extensión del color blanco.

Estos investigadores no encontraron asociaciones significativas para las variantes del gen PAX3 mientras que para los genes KIT y MITF pudieron identificar variantes alélicas involucradas en los patrones de extensión de las manchas blancas en el pelaje de estas razas. En nuestro trabajo, si bien pudimos amplificar regiones del gen MITF, no logramos obtener un buen patrón de secuenciación que permitiera realizar un análisis bioinformático.

Esto pone en evidencia la complejidad de las variantes alélicas en los genes como para poder realizar un asesoramiento genético a los criadores para reproducir animales con un nivel deseado de extensión del manchado en el pelaje (Negro y col., 2017). Muchos criadores prestan gran atención y seleccionan a sus reproductores según su coloración de pelaje; e incluso según su patrón de parches despigmentados. El FP trabajado en esta tesis resulta ser muy distintivo de una determinada familia de equinos Cuarto de Milla.

CONCLUSIONES

Se encontraron polimorfismos de nucleótido simple en el gen PAX3 en el exón 6 en dos animales de los 6 analizados. Uno de ellos con el fenotipo problema.

Haciendo un análisis de los cromatogramas se pudo determinar que el animal con FP recibió las mutaciones a través de la línea paterna (padrillo que presenta el FP).

Al analizar las cuatro mutaciones encontradas en la base Ensemble, se corroboró que estas no están descritas en el banco del ensamblaje del genoma equino (EquCab3.0).

BIBLIOGRAFÍA

1. Belyaev D. K. (1979). The Wilhelmine E. Key 1978 invitational lecture. Destabilizing selection as a factor in domestication. *The Journal of Heredity*; 70(5): 301–308.
2. Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M., Ludwig, A. (2011). Colours of domestication. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*; 86(4): 885–899.
3. Giovambattista, G., Peral García, P. (2010). *Genética de animales domésticos*. Buenos Aires, Intermédica, 261 p.

4. Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
5. Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., Gerber, V., Henke, D., Janda, J., Jude, R., Magdesian, K. G., Matthews, J. M., Poncet, P. A., Svansson, V., Tozaki, T., Wilkinson-White, L., Penedo, M. C., Rieder, S., Leeb, T. (2012). Mutations in MITF and PAX3 cause "splashed white" and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS genetics*, 8(4): e1002653.
6. Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., Gerber, V., Henke, D., Janda, J., Jude, R., Magdesian, K. G., Matthews, J. M., Poncet, P. A., Svansson, V., Tozaki, T., Wilkinson-White, L., Penedo, M., Rieder, S., Leeb, T. (2019). Correction: Mutations in MITF and PAX3 Cause "Splashed White" and Other White Spotting Phenotypes in Horses. *PLoS genetics*, 15(8): e1008321.
7. Henkel, J., Lafayette, C., Brooks, S. A., Martin, K., Patterson-Rosa, L., Cook, D., Jagannathan, V., Leeb, T. (2019). Whole-genome sequencing reveals a large deletion in the MITF gene in horses with white spotted coat colour and increased risk of deafness. *Animal genetics*, 50(2): 172–174.
8. Holl, H., Isaza, R., Mohamoud, Y., Ahmed, A., Almathen, F., Youcef, C., Gaouar, S., Antczak, D. F., Brooks, S. (2017). A Frameshift Mutation in KIT is Associated with White Spotting in the Arabian Camel. *Genes*, 8(3): 102.
9. Llambí S., Arruga M.V. (2018). *Selecciones de genética veterinaria*. Zaragoza, [s.n.], 137 p.
10. Magdesian, K. G., Williams, D. C., Aleman, M., Lecouteur, R. A., Madigan, J. E. (2009). Evaluation of deafness in American Paint Horses by phenotype, brainstem auditory-evoked responses, and endothelin receptor B genotype. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(10): 1204–1211.
11. Negro, S., Imsland, F., Valera, M., Molina, A., Solé, M., Andersson, L. (2017). Association analysis of KIT, MITF, and PAX3 variants with white markings in Spanish horses. *Animal genetics*, 48(3): 349–352.
12. Nicholas, F. W., Hobbs, M. (2014). Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Animal Genetics*, 45(2): 157–170.
13. Pardié M, Lanfranco R, Balemián N, Llambí S. (2017). Quién es quién en la genética de la domesticación de animales domésticos. *Revista Opción Veterinaria*. 7: 26-27.

14. Price, E. O. (1984). Behavioral Aspects of Animal Domestication. *The Quarterly Review of Biology*, 59(1): 1–32.
15. Reissmann, M., Ludwig, A. (2013). Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(6-7): 576–586.
16. Strain G. M. (2015). The Genetics of Deafness in Domestic Animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 2: 29.
17. Vilà, C., Leonard, J. A., Gotherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K., Wayne, R. K., Ellegren, H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*; 291(5503): 474–477.
18. Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., ... & Blöcker, H. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865-867.
19. Wilkins, A. S., Wrangham, R. W., Fitch, W. T. (2014). The "domestication syndrome" in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, 197(3): 795–808.
20. Wright D. (2015). The Genetic Architecture of Domestication in Animals. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9(Suppl 4): 11–20.
21. Zhou, S., Goldstein, S., Place, M., Bechner, M., Patino, D., Potamouisis, K., Ravindran, P., Pape, L., Rincon, G., Hernandez-Ortiz, J., Medrano, J. F., Schwartz, D. C. (2015). A clone-free, single molecule map of the domestic cow (*Bos taurus*) genome. *BMC genomics*, 16(1): 644.