

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**PRIMEROS ESTUDIOS MOLECULARES DE ABIOTROFIA CEREBELAR EN
EQUINOS ÁRABES EN URUGUAY**

por

CATANIA BASCARDAL, Cinthya Daniela
GHIRINGHELLI ALGORTA, Cecilia

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

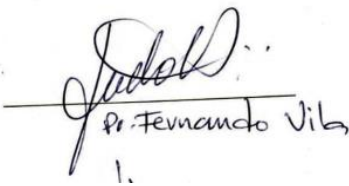
MODALIDAD: Caso Clínico

MONTEVIDEO
URUGUAY
2024

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa



Pr. Fernando Vil

Segundo miembro (Tutor):



Dra Silvia Llambí

Tercer miembro:



Rodolfo Arce

Cuarto Miembro :

Fecha:

Autoras:

Br. CATANIA BASCARDAL,
Cinthya Daniela

Br. GHIRINGHELLI ALGORTA,
Cecilia

DEDICATORIA (*In memoriam*)

Queremos dedicar este trabajo en memoria de nuestra primera tutora, la Dra. Rosa Gagliardi Berenguer.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Genética y Mejora Animal, donde se desarrolló el trabajo.

A la Dras. Eileen Armstrong y María del Carmen Montenegro de la Unidad Genética y Mejora animal.

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC), quien financió parte de este proyecto a través del programa de becas para ayudantes de investigación CIDEC-FVET.

Se agradece a la Dra. Laura de León, (Veterinario de Libre Ejercicio) por el caso clínico proporcionado.

Al Dr. Fernando Vila por su colaboración al facilitarnos las muestras complementarias al estudio del caso clínico.

A la sección de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por su dedicación y compromiso.

A nuestras familias, cuyo apoyo incondicional ha sido una fuente constante de fortaleza a lo largo de este proceso.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. El cerebelo	10
2.2. Patologías con base genética que afectan el cerebelo equino	11
2.3. Genoma equino y genética de la abiotrofia cerebelar	13
2.4. Importancia del estudio en equinos de raza árabe	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Descripción del caso clínico	19
5.2. Población de animales	19
5.3. Extracción de ADN genómico	19
5.4. Diseño de primers, amplificación por PCR y secuenciación de una región del exón 4 del gen <i>TOE1</i>	20
5.5. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y efecto de la mutación sobre el producto proteico	21
6. RESULTADOS	23
6.1. Estudios moleculares	23
6.1.2. Resultados de PCR	23
6.1.3. Resultados de la secuenciación y programas de alineamiento	24
6.1.4. Cromatogramas	24
6.1.5. Resultados del análisis de la sustitución de aminoácido en la proteína exonucleasa blanco de EGR1	27
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIONES	31
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

10. ANEXOS	
10.1. Código QR para descarga de artículo científico publicado en Revista Veterinaria de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay.	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Corte medial del encéfalo de un equino	11
Figura 2: Corte transversal de la corteza cerebelosa de un equino normal en comparación con un equino afectado de abiotrofia cerebelosa	13
Figura 3: Direcciones web relacionadas con el genoma del equino	14
Figura 4: Secuencia parcial del gen <i>TOE1</i>	15
Figura 5: Región del mapeo genético donde se localizan y se observa la estrecha relación entre los genes <i>TOE1</i> y <i>MUTYH</i>	16
Figura 6: Gel de agarosa al 1,5% donde se observan los productos de la amplificación por PCR	23
Figura 7: Alineamiento de la secuencia amplificada del gen <i>TOE1</i>	24
Figura 8: Cromatogramas del potrillo Forward	25
Figura 9: Cromatogramas del potrillo Reverse	25
Figura 10: Cromatogramas de la madre del potrillo Forward	26
Figura 11: Cromatogramas de la madre del potrillo Reverse	26
Figura 12: Cromatogramas de la muestra 17. Forward y Reverse	27
Figura 13: Resultado obtenido con el programa PolyPhen-2	28
Figura 14: Resultado obtenido con el programa I mutan 2.0	28

RESUMEN

El objetivo de esta tesis de grado fue analizar mediante estudios genéticos moleculares, un caso clínico de un potrillo de raza árabe que presentaba síntomas compatibles con Abiotrofia Cerebelar (AC).

La AC es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las células de Purkinje del cerebelo, produciendo principalmente dificultad en el equilibrio y la coordinación de los animales.

Esta patología se trata de un problema hereditario autosómico recesivo, situado a nivel del ADN en el cromosoma 2 (ECA2). Es una mutación puntual clasificada como Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP), donde una guanina (G) cambia por una adenina (A) en el exón 4 del gen *TOE 1*.

En este estudio, se analizaron muestras de sangre del potrillo, de su madre y de siete caballos árabes, empleando un kit comercial para la extracción del ADN. El objetivo fue realizar un análisis molecular mediante PCR y secuenciación de la mutación, además de llevar a cabo estudios *in silico* para evaluar su impacto en la proteína utilizando programas bioinformáticos de distribución libre. Los hallazgos clínicos fueron validados mediante estudios moleculares. Estos resultados permitieron confirmar la presencia de la mutación responsable, tanto en el potrillo (homocigoto) como en la madre (portadora) así como en otro equino estudiado (portador). Aunque ya existían antecedentes sobre la existencia de AC en Uruguay, éste constituye el primer diagnóstico en el país que confirma oficialmente la presencia de la enfermedad mediante técnicas moleculares de ADN.

SUMMARY

The aim of this thesis was to analyse, through molecular genetic studies, a clinical case of an Arabian foal that presented symptoms compatible with Cerebellar Abiotrophy (CA).

CA is a neurodegenerative disease that affects the Purkinje cells of the cerebellum, mainly causing difficulty in balance and coordination in animals.

This pathology is an autosomal recessive hereditary problem, located at the DNA level on chromosome 2 (ECA2). It is a point mutation classified as a Single Nucleotide Polymorphism (SNP), where a guanine (G) is changed to an adenine (A) in exon 4 of the TOE 1 gene.

In this study, blood samples from the foal, its mother and seven Arabian horses were analysed, using a commercial kit for DNA extraction. The objective was to perform a molecular analysis using PCR and sequencing of the mutation, in addition to carrying out in silico studies to evaluate its impact on the protein using freely distributed bioinformatics programs. The clinical findings were validated by molecular studies. These results confirmed the presence of the responsible mutation, both in the foal (homozygous) and in the mother (carrier) as well as in another equine studied (carrier). Although there were already antecedents about the existence of AC in Uruguay, this is the first diagnosis in the country that officially confirms the presence of the disease using molecular DNA techniques.

1. INTRODUCCIÓN

La abiotrofia cerebelar (AC) se ha descrito en diferentes especies, incluyendo caninos, ovinos, bovinos y equinos (Brault et al., 2011a). También se ha observado en felinos y suinos (Green & Mayhew, 1990). En Uruguay, en 2024 se publicó una tesis sobre AC en caninos pit bull terriers (Menchaca, 2024).

En equinos la AC se presenta principalmente en caballos árabes y sus razas derivadas. Esta afección generalmente afecta a potros menores de un año, siendo más frecuente entre el nacimiento y los seis meses de edad (Scott et al., 2016). Sin embargo, lo más común es que se manifieste entre las seis semanas y los cuatro meses de vida (Sadaba et al., 2016).

Se trata de una enfermedad neurodegenerativa causada por una mutación en el ADN que afecta a las células de Purkinje del cerebelo, produciendo principalmente problemas en el balance y la coordinación de los animales afectados (Scott et al., 2017).

Los signos clínicos observados incluyen ataxia, movimientos exagerados en los miembros anteriores, temblores de la cabeza, falta de respuesta a la amenaza, búsqueda de mayor base de sustentación, caídas frecuentes, y dificultad para incorporarse desde posiciones de decúbito (Mc Auliffe & Slovis, 2011).

Estos signos son consistentes con la pérdida de las neuronas de Purkinje, y una desorganización de la estructura de las tres capas del córtex cerebeloso (Cavalleri et al., 2013; Sadaba et al., 2016; Scott et al., 2017).

En cuanto al momento de la manifestación clínica, los potrillos neonatos pueden no presentar síntomas. A medida que avanza la degeneración de las células de Purkinje, los signos clínicos asociados comenzarán a ser más evidentes.

En estos animales se ha identificado, a nivel del ADN, una mutación puntual en el cromosoma 2 (ECA 2) específicamente un Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) en el gen *TOE 1*, donde una guanina se reemplaza por una adenina (ECA2:13074277G>A). Esta mutación afecta la expresión del gen *MUTYH*, lo que indica que se trata de un problema hereditario donde hay solapamiento de los dos genes mencionados (Brault et al., 2011a; b).

Un animal normal presenta dos copias del alelo normal N con un genotipo N/N (homocigota). En un animal portador las copias son diferentes, una es normal y la otra presenta la mutación mencionada, lo que da como resultado el genotipo N/AC (heterocigota). Cuando la patología está presente, ese animal va a presentar genotipo AC/AC. Al tratarse de una enfermedad autosómica recesiva (en brazo corto del cromosoma ECA2) ambas copias alélicas deben ser iguales para que se presente la patología. Al cruzar dos animales portadores de la mutación (heterocigotas N/AC) hay un 25% de probabilidad de que el potrillo nacido sea AC/AC (homocigota para el alelo mutado), y desarrolle la patología (Brault et al., 2011a; b). En la base de datos Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA la patología figura con el número OMIA:000175-9796 donde los seis primeros números identifican a la patología y los cuatro últimos a la especie (Durward et al., 2024).

A nivel internacional, hay laboratorios de Universidades como la de Davis California, USA que ofrecen servicios de diagnóstico molecular de animales portadores de la mutación (<https://vgl.ucdavis.edu/cerebellar-abiotrophy>; Sadaba et al., 2016). Conocer el genotipo del animal, es fundamental, ya que permite prevenir el nacimiento de equinos afectados por esta enfermedad. En esta tesis de grado se llevaron a cabo los primeros estudios moleculares sobre esta patología en equinos árabes en Uruguay.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cerebelo

El cerebelo, se localiza en el cuarto ventrículo. Su anatomía está compuesta por circunvoluciones y se divide en una protuberancia central conocida como vermis y en dos hemisferios cerebelosos. El vermis se localiza en la región caudoventral (Koing et al., 2011), y alberga la mayoría de las funciones cerebelosas relacionadas con el control de los movimientos musculares del eje corporal que incluye el cuello, el dorso, y la cadera.

A cada lado del vermis se extiende un hemisferio cerebeloso que se divide en una zona intermedia o paravermal y una zona lateral. La zona paravermal está asociada al control de las contracciones musculares de las extremidades (patas y manos) del lado contrario del cuerpo. Sin embargo, las zonas laterales, se vinculan con la preparación de los movimientos que el animal está a punto de realizar (Carmona, 2018).

En su extremo rostral, el cerebelo se conecta con el tegumento del mesencéfalo a través de los pedúnculos cerebelosos. En la región ventrolateral, se une al puente mediante los pedúnculos cerebelosos medios, mientras que en el sector caudal se comunica con la médula oblonga a través de pedúnculos cerebelosos caudales.

La función principal del cerebelo es mantener el equilibrio y coordinar los impulsos que se dirigen hacia la musculatura esquelética, regulando así la motricidad en su totalidad. (Koing et al., 2011).

En los animales domésticos, el cerebelo se divide en 3 lóbulos: rostral (neocerebelo), caudal (paleocerebelo), y floclonodular (arquicerebelo). Este último es el más primitivo de todo el cerebelo y funciona en colaboración con el aparato vestibular del oído interno, en el control del equilibrio (Carmona, 2018).

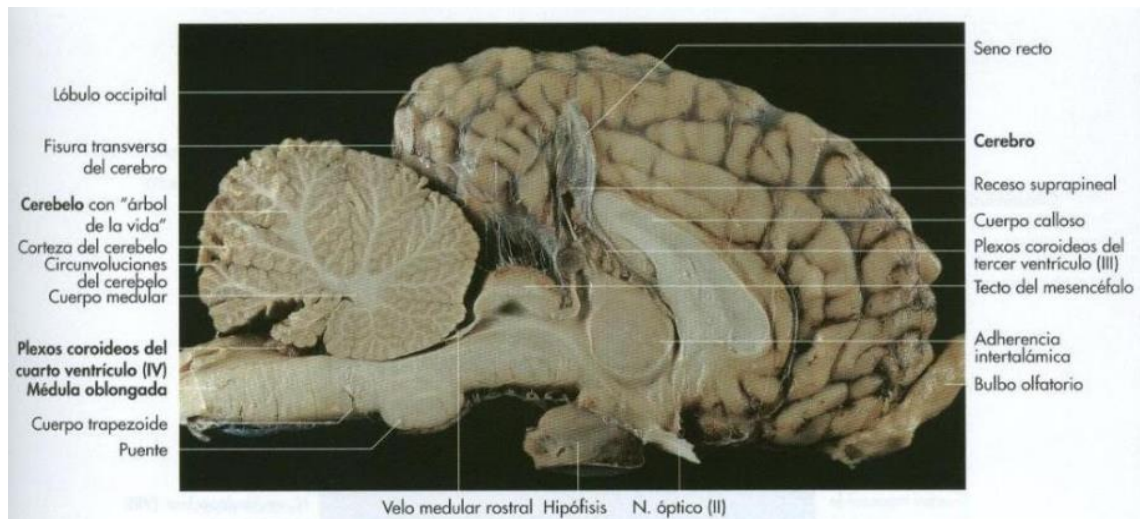


Figura 1. Corte medial del encéfalo de un equino. (Imágen extraída de Koing HE et al., 2011).

2.2 Patologías con base genética que afectan al cerebelo equino

En animales domésticos tenemos patologías congénitas y adquiridas, y por otro lado enfermedades neurodegenerativas hereditarias que afectan al cerebelo (Lahunta & Glass, 2009). Sobre las patologías del cerebelo de origen congénito y/o hereditario en equinos se encuentran la hipoplasia cerebelosa y la abiotrofia cerebelar. En las hipoplasias cerebelosas de tipo congénito con base genética, el cerebelo no presenta un desarrollo completo y los animales afectados presentan sintomatología clínica como falta de coordinación en la marcha, trastornos del equilibrio y dificultad para la movilidad (Willis et al., 2024).

La abiotrofia cerebelar es una alteración neurodegenerativa hereditaria, que fue descrita por primera vez en el ámbito de la medicina veterinaria a finales de los años 60 (Brault et al., 2011). Dentro de las enfermedades hereditarias que afectan a los animales domésticos, se encuentra la abiotrofia cerebelar (*cerebellar abiotrophy*, AC), conocida como “ataxia o abiotrofia cerebelosa”. El término “abiotrofia” proviene del griego, donde “a” significa ausencia, “bios” se traduce como vida y “trofia” se refiere a la sustancia del cerebelo, en particular neuronas cerebelares. Esta condición es el resultado de la degeneración y agotamiento de las células de Purkinje, y de las células de la capa granular. En distintas especies domésticas (perro, equino) se ha observado disminución de

células de la capa granulosa, astrogliosis y pérdida de células de Purkinje (Verdes y Yamasaki; 2022).

En equinos se presenta en caballos árabes puros y sus cruza, así como en diversas razas de ponies, incluyendo el Gotland ponie, Oldenburg Light horse, Eriskay pony y Americans Miniature horse, entre otras razas (Green S & Mayhew I, 1990). Se manifiesta clínicamente a través de síntomas como ataxia, temblor de cabeza, incoordinación, dismetría, hipermetría, pérdida de percepción del espacio, pérdida del balance: afectando el equilibrio y la postura. También se observan pedaleos exagerados de los miembros anteriores, y una respuesta desmesurada ante situaciones de amenaza. (McAuliffe & Slovis, 2011; Scott et al., 2017).

Se documentó el caso de una yegua de 19 años que, a pesar de ser homocigota para la AC, se consideró asintomática durante toda su vida. La yegua no presentó signos típicos como ataxia ni otros característicos de la enfermedad. (Scott et al., 2017).

La AC, está asociada con diferentes isoformas del gen MUTYH en diversas especies, incluido el ser humano. Se han identificado múltiples isoformas de MUTYH en ratones, ratas y humanos, las cuales se localizan de manera diferencial en el núcleo o en las mitocondrias. Esta diversidad de isoformas contribuye a que la abiotrofia se exprese a través de diversos cuadros clínicos, que varían en su gravedad y que, en algunos casos, son compatibles o no con la vida. (Jimenez et al.,2020).

La degeneración de las células de Purkinje da lugar a la aparición de signos clínicos, lo cual puede ocurrir desde los pocos días después del nacimiento hasta aproximadamente los seis meses de edad, siendo lo más común que se presente entre las seis semanas y los cuatro meses de vida (Sadaba et al., 2016).

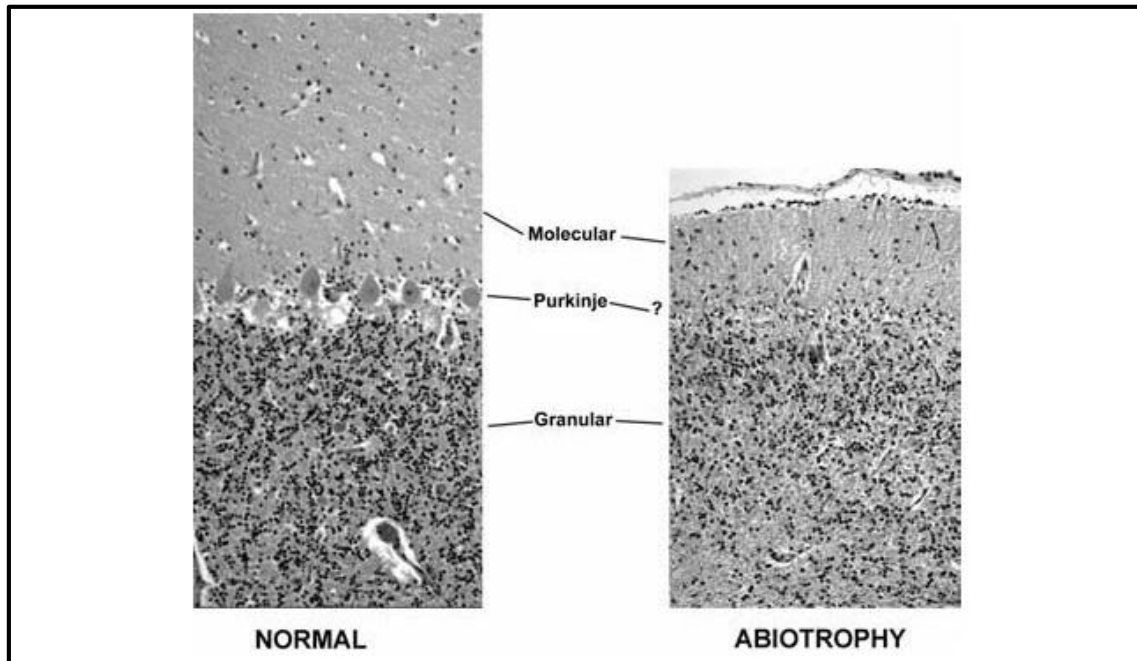


Figura 2. Corte transversal de la corteza cerebelosa de un equino normal en comparación con un equino afectado de abiotrofia cerebelosa. En el equino con AC se observa un adelgazamiento de la capa molecular, ausencia de células de Purkinje y disminución de las células de la capa granular (Imagen extraída de MacKay, 2008).

2.3. Genoma equino y Genética de la Abiotrofia Cerebelar

El primer borrador completo del genoma equino se publicó en la revista Science en el año 2009, siendo el genoma de referencia el de una hembra de la raza Pura Sangre que se encontraba en la Universidad de Cornell y se llamaba “Crepúsculo”. Este genoma tiene un tamaño aproximado de 2.4 Gb y contiene 20.449 genes codificantes distribuidos en una dotación de $2n=64$ cromosomas, con un par sexual XY como en los mamíferos domésticos (Llambí & Arruga, 2018).

En la siguiente figura se brindan una fuente de direcciones web vinculadas al desarrollo y evolución del genoma equino siendo de interés para aportar una mayor profundización al conocimiento del mismo.

Páginas Web sugeridas

http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index

<https://www.uky.edu/Ag/Horsemap/>

<https://www.broadinstitute.org/horse/horse-genome-project>

<https://www.genome.gov/20519480/2007-release-horse-genome-assembled/>

Figura 3. Direcciones web relacionadas con el genoma del equino. (Imagen extraída de Llambí & Arruga, 2018).

En el año 2011 se identifica y asocia a una mutación puntual con la AC en equinos árabes observándose una alteración en la expresión del gen *MUTYH* (Brault et al., 2011).

La AC se hereda de manera autosómica recesiva y se ha asociado con una mutación G/A en el exón 4 del gen *TOE 1* (figura 4), en proximidad al inicio de la secuencia del gen *MUTYH*. Esta mutación produce un cambio aminoacídico arginina/histidina que podría tener un impacto funcional sobre el producto proteico *TOE 1*. Sugiriendo también que esta mutación podría afectar la regulación transcripcional del gen *MUTYH* (Scott et al., 2016). El gen *TOE 1* codifica para una proteína con función de exonucleasa blanco de EGR1 (tamaño de 509 aminoácidos) de acuerdo a la base de datos <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F6UV52/entry>. Actúa en la catálisis de moléculas de ARN, procesamientos de ARN pequeños localizados en el núcleo celular (precursores de ARN mensajeros) (Scott et al., 2016).

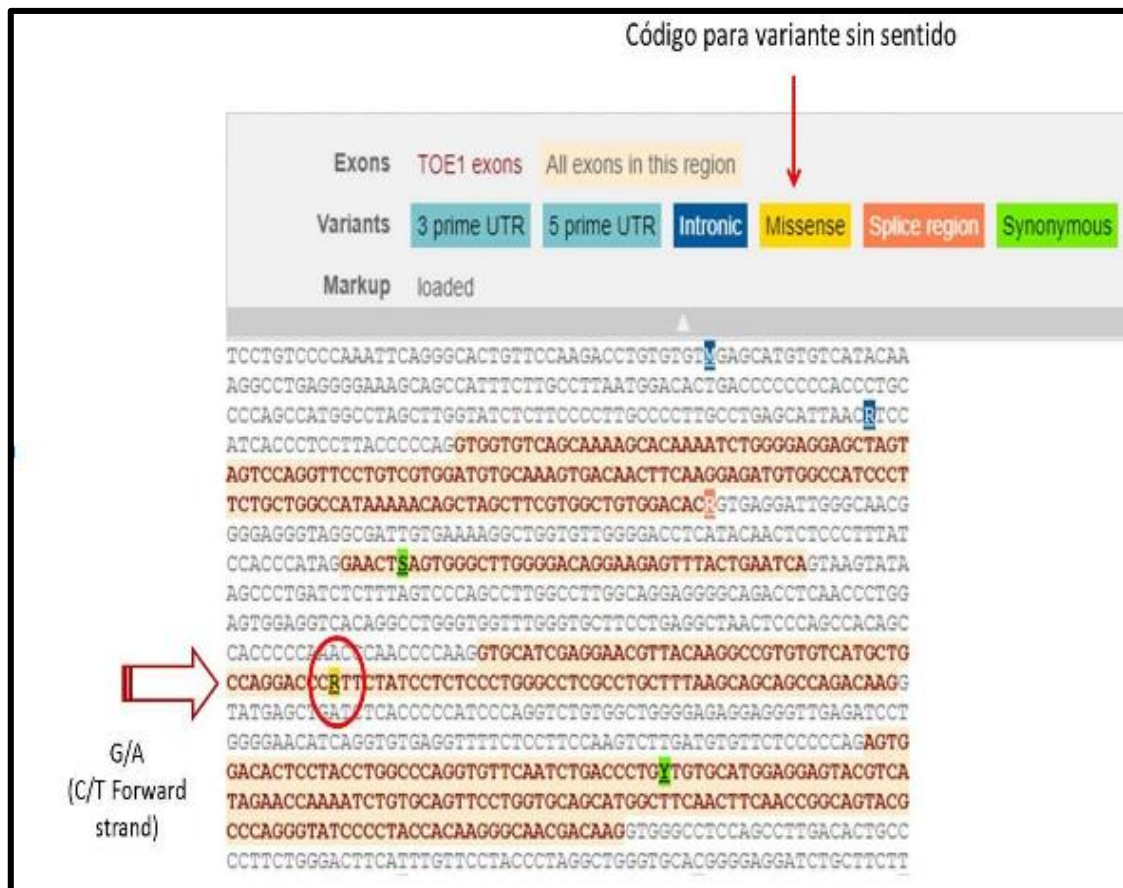


Figura 4. Secuencia parcial del gen *TOE 1*. La flecha nos indica la secuencia del exón 4 y el círculo rojo el lugar de la mutación puntual (R=G/A). (Imagen extraída y modificada de la base https://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index).

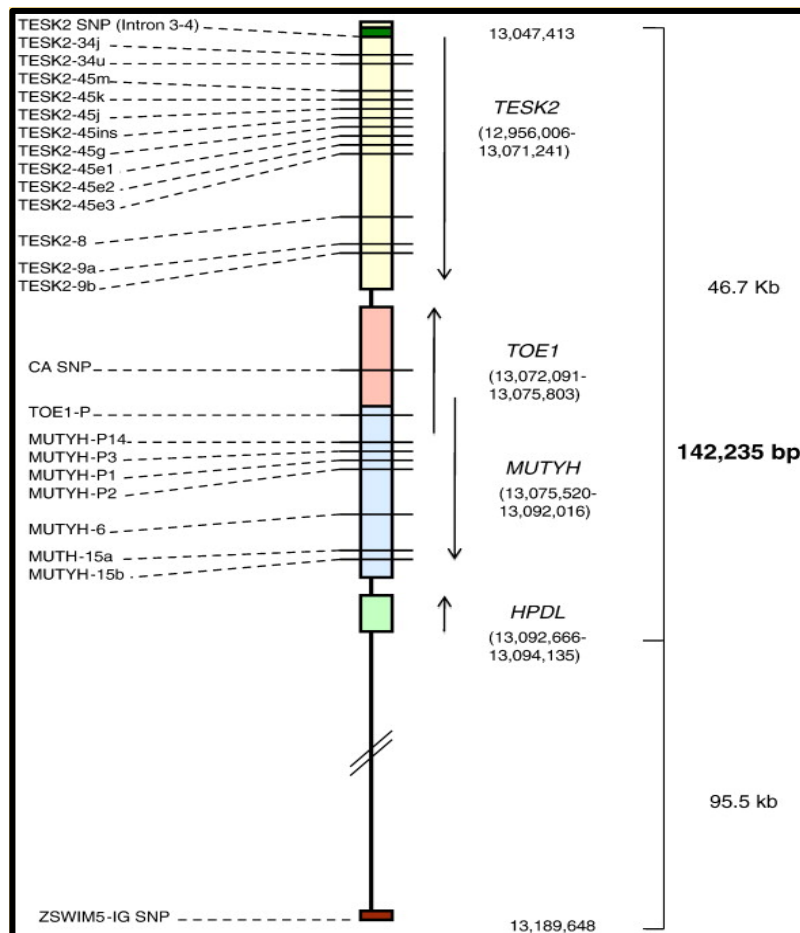


Figura 5. Región del mapeo genético donde se localizan los genes *TOE1* y *MUTYH* relacionados a la abiotrofia cerebelosa equina en el cromosoma ECA2, y se observa su estrecha relación (Imagen extraída de Brault L et al., 2011a).

2.4 Importancia del Estudio en Equinos de Raza árabe

Los síntomas de la enfermedad tienden a ser progresivos, agravando la situación con el tiempo. Los potros afectados pueden lesionarse a sí mismos o a sus cuidadores; por lo que se recomienda la eutanasia y la posterior necropsia como método de diagnóstico.

El diagnóstico definitivo se realiza mediante estudios anatomopatológicos, histopatológicos, así como mediante técnicas de diagnóstico molecular con ADN (Brault et al., 2011 a, b; Green S & Mayhew, 1990).

Los hallazgos patológicos incluyen la degeneración de las neuronas de Purkinje y de las células asociadas en el cerebelo, lo que resulta en una desorganización de las capas

granulares y moleculares del cerebelo. También se observa una reducción en el tamaño y alteración en la morfología celular (Sadaba et al., 2016). Una de las principales formas de poder prevenir la AC es conociendo el genotipo de los animales y por ende si son portadores de la mutación. De esta manera, podemos realizar cruzamientos dirigidos para prevenir la cruce de heterocigotas, y así evitar tener un 25% de probabilidad de que la descendencia sea homocigota y manifieste la AC. Por otra parte, el 50% de la descendencia de este tipo de cruzamiento sería probabilísticamente heterocigota (portadores de AC), transmitiendo la mutación a futuras generaciones, aunque permanezcan asintomáticos. Por otro lado, si cruzamos homocigotas normales con heterocigotas portadores generarían un 50% de portadores de AC. La Arabian Horse Association dentro de sus reglamentos no admite que si sus miembros conocen el genotipo de sus animales, los ofrezcan conociendo que son portadores de AC y de otras patologías hereditarias (inmunodeficiencia combinada grave, síndrome del potro lavanda, malformación occipitoatlantoaxial, parálisis periódica hipercalémica) sin poner en conocimiento a todas las partes de la transacción.

De esto se desprende la importancia de conocer el genotipo para AC como medida de monitoreo de la patología.

3. HIPÓTESIS

La mutación en el gen *TOE 1*, asociada con la abiotrofia cerebelar, ha sido identificada en caballos de raza árabe en Uruguay.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar la secuencia del gen *TOE 1* (exón 4) que contiene la mutación responsable y los efectos in silico de la exonucleasa codificada por el gen en caballos de la raza árabe en Uruguay.

4.2 Objetivos específicos

Realizar el diseño de primers, amplificación por PCR en tiempo final y secuenciación del fragmento del gen que contiene la mutación.

Analizar la región del polimorfismo en las secuencias amplificadas utilizando programas bioinformáticos.

Evaluar in silico la estabilidad estructural y funcional de la proteína codificada por el gen *TOE 1*.

Validar el diagnóstico del caso clínico mediante el servicio de genotipado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción del caso clínico

El caso en estudio corresponde a un potrillo macho de raza árabe, que presentó síntomas neurológicos a los 40 días de edad. El animal se ubicaba en un establecimiento en el Departamento de Colonia, Uruguay.

La Dra.MV Laura de León, quien presentó el caso clínico y remitió las muestras a la Facultad de Veterinaria, informó que el examen objetivo general reveló parámetros dentro de los rangos fisiológicos, con un desarrollo óseo y una conformación esquelética adecuada, y presencia de funciones vitales.

En el examen neurológico se observó hiperexcitabilidad, temblores musculares más exacerbados en la región del cuello, hiperextensión de los miembros anteriores durante el trote, ataxia leve en miembros posteriores e incoordinación de leve a moderada. Además se registraron movimientos de hiperreflexia al examen de mucosas, cabeza y cuello. Las fasciculaciones musculares se intensificaron en pocos días, agravando los síntomas en el correr de una semana donde la médico veterinaria tratante decidió proceder con la eutanasia del potrillo afectado, y la posterior necropsia; siguiendo las normas de bienestar animal correspondientes (anexo 1).

5.2. Población de animales

Se trabajó con 9 muestras sanguíneas de equinos árabes, remitidas del mismo establecimiento. Cada muestra tenía un volumen de 2 ml y se recolectaron con EDTA como anticoagulante. Estas muestras correspondían al potrillo afectado, su madre, y siete caballos árabes puros.

El padre del potrillo era portador de la mutación de AC, según el genotipado realizado con el catálogo de semen (comunicación personal del responsable del establecimiento).

También trabajamos con un control negativo, muestra de ADN de un animal sano perteneciente al banco de genética de la Facultad de Veterinaria.

5.3. Extracción de ADN genómico

En el Laboratorio de la Unidad de Genética y Mejoramiento Animal, realizamos la extracción del ADN genómico utilizando el kit comercial *Quick-gDNATM* MiniPrep, según las indicaciones del fabricante.

El ADN aislado fue cuantificado estudiando su concentración y pureza con el espectrofotómetro *NanodropTM* ND1000.

5.4. Diseño de primers, amplificación por PCR y secuenciación de una región del exón 4 del gen *TOE 1*

Se estudiaron las secuencias y variantes del gen *TOE1*, disponibles en un programa de libre acceso: www.ensembl.org.

A partir de la identificación del sitio de mutación, se diseñó un par de cebadores específicos (5'-3') para amplificar una región del gen *TOE1* de 460 pb mediante PCR. Este diseño se realizó utilizando el programa Primer3Plus disponible en: <https://primer3plus.com/> y Primer Blast, disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast.

Primers o cebadores que se diseñaron para la técnica de diagnóstico:

TOE1 Forward 5'TAGGAACTGAGTGGGCTTGG3'

TOE1 Reverse 5'CATGCACAACAGGGTCAGAT3'

Con esta herramienta de software, pudimos seleccionar un par de cebadores que se ajustaran de manera óptima a todos los parámetros establecidos, definiendo así la secuencia de interés, la ubicación de la mutación, el tamaño, y la temperatura.

La amplificación de la secuencia a analizar se llevó a cabo mediante la técnica de PCR a tiempo final, utilizando el juego de primers diseñado previamente. Para este proceso, se utilizó el termociclador Multigene II. Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron los siguientes componentes: 12.4 µl de agua destilada, 2 µl de ADN, 0.6 µl del juego de primers *TOE 1* (forward y reverse), y 15 µl ImmoMix TM, obteniendo un volumen total de 30 µl.

Se utilizó un programa de amplificación clásico que consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, annealing a 56°C durante 30 segundos, y una extensión (elongación) a 72 °C durante un minuto. La temperatura empleada para la extensión se mantuvo a 71°C por 5 minutos.

El siguiente paso consistió en verificar si el PCR había generado el fragmento de ADN esperado, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando la tinción GoodView™.

Se reservó un pocillo del gel para el marcador de peso molecular, un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. Tras la separación de los fragmentos, se examinó el gel en un transiluminador para detectar el tamaño de las bandas. El tamaño de los amplicones se comparó con un estándar de referencia que es una escalera de fragmentos de ADN de longitudes conocidas (NZYDNA Hyperladder V, 100-1000 bp, <https://www.nzytech.com/>).

Los productos de amplificación se enviaron a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación en las direcciones forward y reverse.

5.5. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y efecto de la mutación sobre el producto proteico

Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon utilizando el programa informático de distribución libre BioEdit, disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Se recortaron las regiones flanqueantes del ADN secuenciado y a continuación se llevó a cabo el alineamiento, en el cual incluyó la secuencia de referencia del genoma equino disponible en (https://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index).

Para el estudio del efecto que produce la mutación del gen *TOE1*, (ECA2:13074277G>A) a nivel de la proteína codificante (exonucleasa blanco de EGR1), donde se produce un cambio de aminoácido Arginina por Histidina en posición 95, se utilizaron los siguientes programas bioinformáticos on line de

distribución libre. Para estudiar la proteína se utilizó la base de datos on line, UniProt SWISS-Prot 2010-09 (<https://www.uniprot.org/>).

1.- Programa SIFT Sorting Intolerant From Tolerant, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>

2.-Programa PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

3.- Programa i mutan 2.0 <https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>.

6. RESULTADOS

6.1. Estudios moleculares

Se logró extraer ADN, obteniendo valores de pureza y concentración aceptables.

A continuación, se presentan la cuantificación y mediciones realizadas para la muestra P (potrillo), M (madre).

MUESTRAS	260/280, (relación ADN-proteína)	260/230, (relación ADN- ARN)	ng/ μ l
Potrillo(P)	1,82	0,58	24,9
Madre (M)	2, 09	1,70	29,6

Los valores obtenidos de las 7 muestras restantes estuvieron dentro de los rangos: 260/280: 1.6-1.9; 260/230: 0.6-1.5.

6.2.1. Resultados de PCR

Mediante la técnica de PCR se logró amplificar el tamaño esperado de acuerdo al diseño de primers de 460 pb en las muestras de ADN (figura 6).

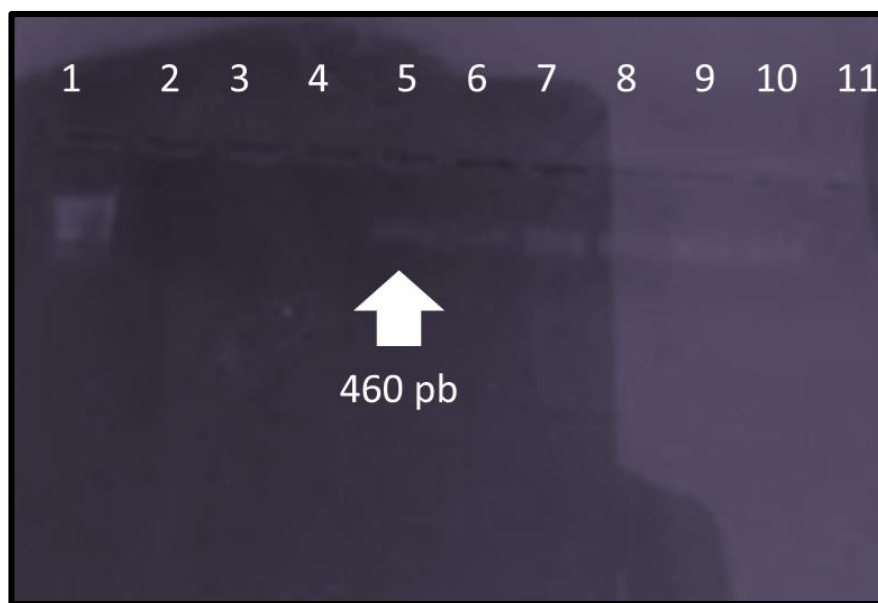


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5 % donde se observan los productos de la amplificación por PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular

(Hyperladder). Carriles 2 al 10 son muestras de ADN de caballos árabes amplificadas por PCR (460 pb). Carril 11, corresponde al control negativo de PCR (mezcla de mix sin ADN).

6.2.2. Resultados de la secuenciación y programas de alineamiento

Alineamiento en BioEdit de las secuencias (M: madre, P: potrillo y 7 muestras de equinos árabes). Se realizó un análisis de las variantes obtenidas en la secuenciación, las cuales fueron alineadas, incluyendo la secuencia descrita en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), permitiéndonos comparar dichas variantes con esta secuencia de referencia (Figura 7).

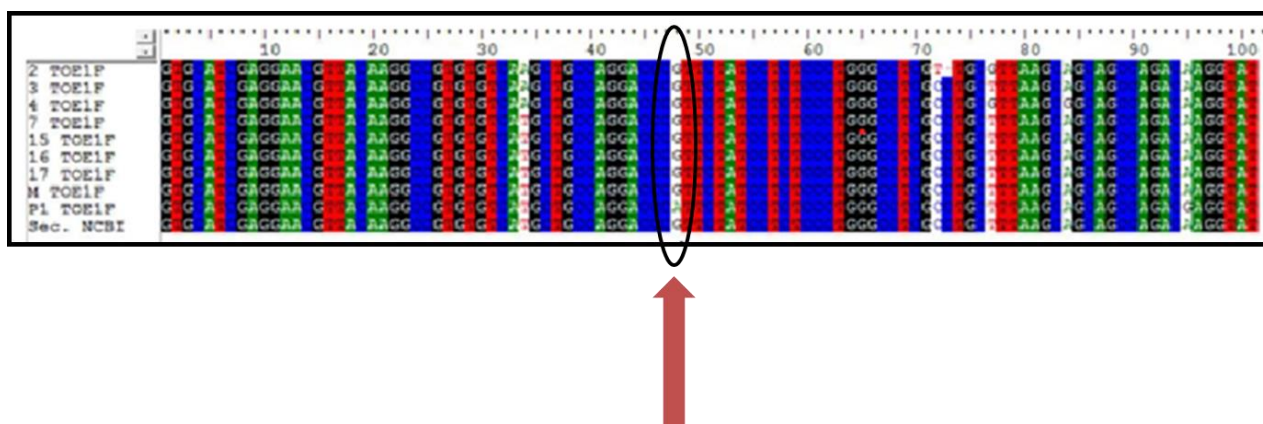


Figura 7. Alineamiento de la secuencia amplificada del gen *TOE 1*. Secuencia de caballos árabes numeradas como 2, 3, 4, 7, 15, 16, 17 (7 animales); M, madre del potrillo, P, potrillo (caso clínico), NCBI secuencia de referencia del genoma equino ([https://www.ensembl.org/Equus caballus/Info/Index](https://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index)). La flecha indica el sitio de mutación (SNP, ECA2:13074277G>A) donde se puede observar que en la muestra del caso clínico hay un cambio de G a A.

6.2.3. Cromatogramas

Al analizar los cromatogramas respectivos de las secuencias se identificó que el potrillo (caso clínico problema) era homocigota para la mutación (genotipo AA) mientras que la madre resultó ser heterocigota portadora (genotipo AG). De las 7 muestras restantes de caballos árabes, 6 de ellas presentaron genotipo normal homocigotas GG mientras que una muestra (animal 17) presentó genotipo heterocigota portador (AG).

A continuación se observa el genotipado de cada individuo, teniendo en cuenta el resultado de los cromatogramas.

Cromatogramas potrillo (primer forward)

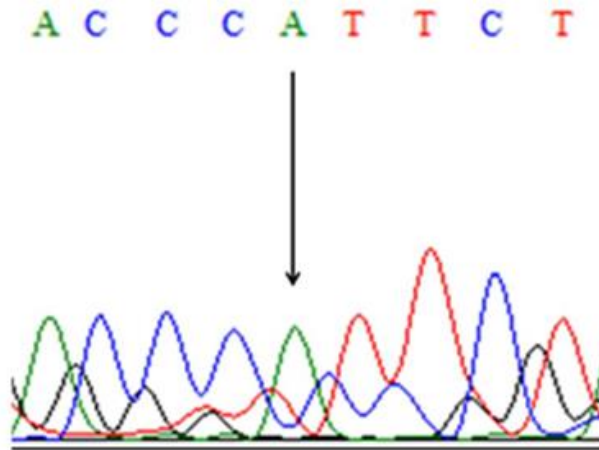


Figura 8. Se observa un único pico verde (A). Esto nos indicaría que el animal es homocigota para la mutación, ya que si fuese heterocigota se observarían dos picos superpuestos, uno de color negro (G) y otro verde (A). Sin embargo, aparecen dos líneas azul y roja que parecen superponerse, pero no forman picos definidos. Por esto es necesario observar el cromatograma de las dos secuencias del potrillo.

Cromatogramas potrillo (primer reverse)

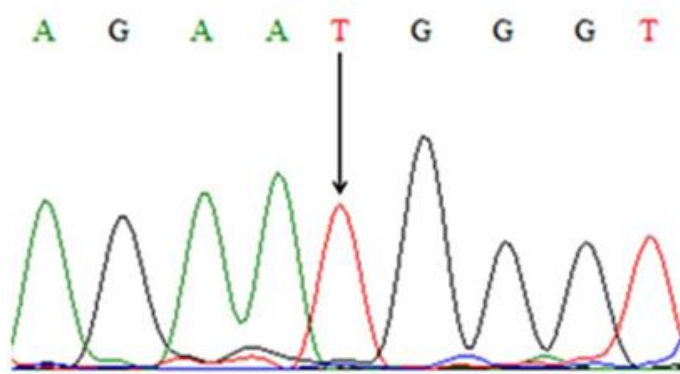


Figura 9. Para el primer reverse la calidad de secuenciación para esta muestra es mejor. En el lugar de la mutación se observa un único pico rojo, correspondiente a timina, confirmándose que el potrillo es homocigota para la mutación. Si el animal fuese heterocigota, se observarían dos picos superpuestos, uno de color azul (C) y otro rojo (T).

De esta forma, se logra el objetivo del desarrollo de una técnica diagnóstica (confirmada también a través del genotipado realizado por la Dra. Cecilia Penedo).

Cromatogramas de la madre del potrillo (primer forward)

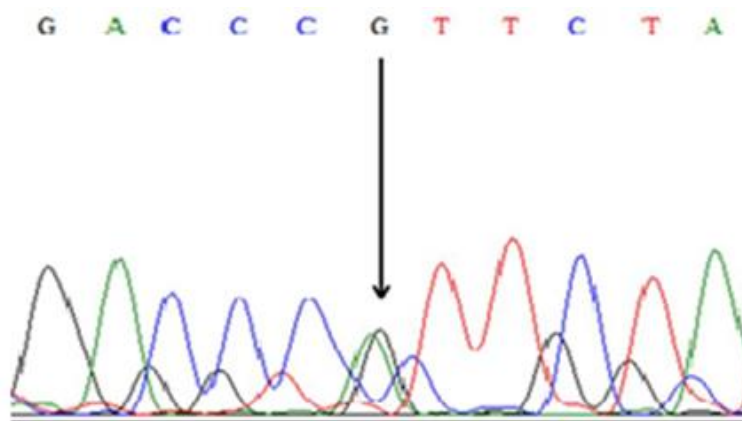


Figura 10. En el sitio estudiado se observan dos picos superpuestos, uno de color negro, correspondiente a guanina, y otro verde que corresponde a adenina. Este resultado indica que la madre del potrillo es heterocigota (GA). Esto se confirma al analizar la segunda secuencia de la madre:

Cromatograma de la madre del potrillo (primer reverse)

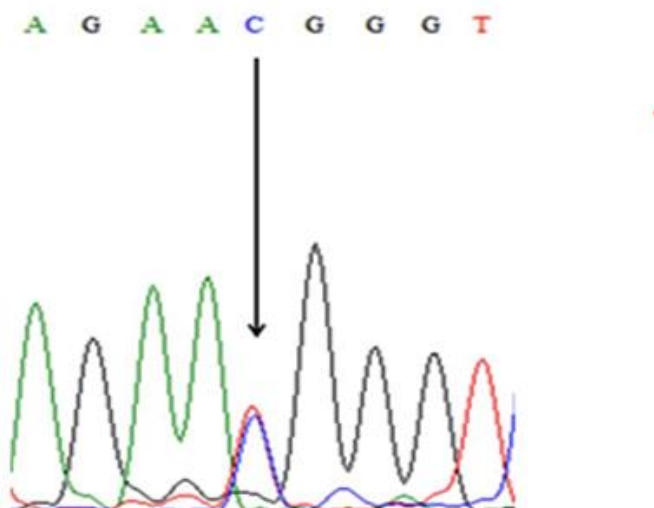


Figura 11. Se observa dos picos superpuestos, uno de color azul, correspondiente a citosina, y otro rojo que corresponde a timina. Este resultado confirma que la madre del potrillo es heterocigota (CT para esta hebra).

Muestra 17 (para primer forward en A y reverse en B)

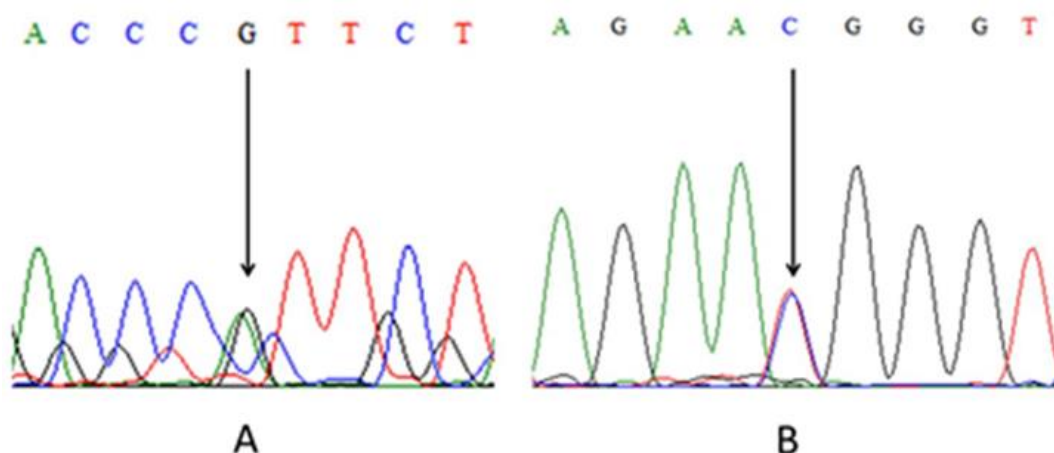
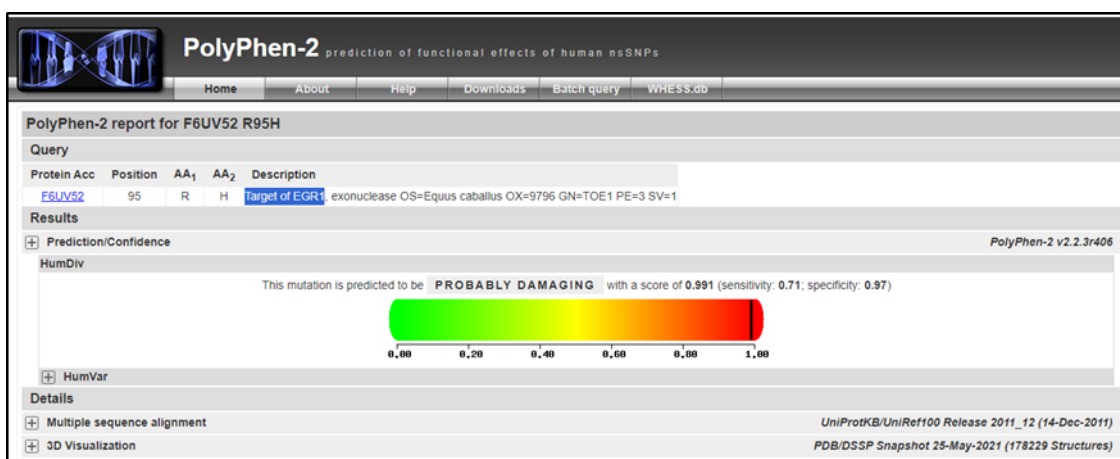


Figura 12. En ambos cromatogramas se observan dos picos superpuestos en el sitio analizado, indicando que el animal 17 es heterocigota (GA o CT).

6.2.4. Resultados del análisis de la sustitución del aminoácido en la proteína exonucleasa blanco de EGR1.

Con respecto al efecto del cambio de aminoácido producido por la mutación (G/A) al cambiar el codón (cGt cambia a codón cAt), en la proteína exonucleasa blanco de EGR1 se produjo un cambio de Arginina por Histidina en la posición 95. Con el programa SIFT se obtuvo una puntuación de 0.13 que significa que el cambio de aminoácido es “tolerado”, mientras que sustituciones con puntuaciones < 0.05 se consideran “perjudiciales” (se alteraría la función de la proteína). Con el programa PolyPhen-2 se obtuvo un resultado de 0.991 que indicaría un cambio que produciría “daño” (Figura 13).



7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la muestra M, correspondiente a la madre del potro sintomático con AC, indican que el animal es portador de la mutación. La madre fue cruzada con un semental que también había sido reportado como portador de AC (datos del catálogo), lo que dió como resultado el nacimiento de un potrillo con AC (diagnóstico clínico y genético) que presentó genotipo homocigoto recesivo (dos copias del alelo mutante). Esto estaría de acuerdo con los resultados del estudio de segregación, consistente con un modo de herencia autosómica recesiva de característica mendeliana donde al cruzar animales portadores tenemos una probabilidad de obtener un 25% de progenie afectada (Brault et al., 2011). El análisis del genotipo del potrillo árabe problema (homocigota AC/AC) se correlaciona con la sintomatología clínica presentada por el animal, según el informe de la veterinaria responsable del establecimiento. Por otra parte, la AC fue descrita por primera vez en una yegua mestiza árabe de Reino Unido por Fraser en 1966. La raza árabe es donde se reporta una alta frecuencia de la mutación para AC (10,5%) según los últimos estudios realizados (Durward-Akhurst et al., 2024). En los 9 equinos árabes analizados por nosotros, dos resultaron portadores (la madre y el equino identificado con el número 17), lo que nos indicaría dado la pequeña muestra estudiada, la importancia de la circulación de la mutación en esta raza en nuestro País.

Para el diagnóstico molecular, Brault y Penedo., 2011 desarrollan una técnica de genotipado para la mutación de AC utilizando la amplificación alelo-específica y posterior análisis de las amplificaciones con secuenciador automatizado de ADN. En este estudio se pudo optimizar y desarrollar la técnica de diagnóstico por PCR a tiempo final y secuenciación para genotipar a los animales, si bien partimos de extracciones de ADN donde había cierto grado de contaminación con proteínas, <https://www.bancoadn.org/>. la misma fue exitosa. El resultado del genotipado por esta técnica fue validado en el Laboratorio VGL, Universidad de Davis, Estados Unidos (Gagliardi et al., 2018). Jiménez Heredia et al. (2020) desarrollan otras técnicas de diagnóstico molecular de AC utilizando variantes de la PCR como es el análisis de la curva de fusión de alta resolución por qPCR.

A nivel del estudio del efecto de la mutación ECA2:13074277G>A sobre la estabilidad funcional de la proteína exonucleasa blanco de EGR1, pudimos observar que de acuerdo a los resultados obtenidos con el programa SIFT, no se vería alterada la funcionalidad de la misma, la mutación no afectaría una función evolutiva conservada. Sin embargo el resultado obtenido con el programa PolyPhen-2, indicaría un cambio que produciría “daño funcional”, por lo que podría alterar propiedades biofísicas importantes.

En el estudio de la estructura de la proteína, el programa I Mutan 2.0, detecta un pequeño efecto estabilizador en la misma.

Para poder evaluar de manera más precisa, como un cambio aminoácido afecta la funcionalidad proteica, se podría abordar mediante valoración bioquímica experimental. Esto implicaría el análisis comparativo de la actividad enzimática entre la proteína salvaje y la mutada, proporcionando datos más confiables y precisos.

Dado que este diagnóstico confirma la presencia de la abiotrofia cerebelar (AC), resulta esencial llevar a cabo un estudio poblacional para identificar animales portadores y determinar la incidencia de esta enfermedad en caballos de raza árabe. Un análisis de este tipo permitiría obtener información de interés al momento de planificar cruzamientos.

Además, es importante tener en cuenta que la AC también se ha descrito en animales cruza con árabes y en razas relacionadas. Sería igualmente relevante realizar estudios moleculares en estos casos para evaluar la situación actual en Uruguay.

8. CONCLUSIONES

En la presente tesis se logra diagnosticar por PCR y secuenciación el genotipo asociado a la Abiotrofia cerebelar (homocigota AC/AC) en un potrillo árabe con sintomatología clínica compatible con dicha enfermedad hereditaria.

Tanto la madre (mediante el diagnóstico molecular realizado en este trabajo) como el padre del potrillo, eran portadores de AC.

En la muestra analizada se identificó por genotipado otro animal portador de AC.

Se optimizó una técnica rápida de genotipado mediante PCR a tiempo final y secuenciación para esta enfermedad hereditaria.

A nivel de los estudios in silico, sobre el efecto del cambio aminoácido que se produce en la proteína cuando está presente un alelo mutado, los resultados fueron inconsistentes. Se debería profundizar utilizando más herramientas de programas bioinformáticos, así como estudios bioquímicos experimentales de funcionalidad proteica.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., & Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Banco de AND. (sf). Inicio: <https://www.bancoadn.org/>
- Brault, L.S., Cooper, C.A., Famula, T.R., Murray, J.D., & Torres-Penedo, M.C. (2011a). Mapping of equine cerebellar abiotrophy to ECA2 and identification of a potential causative mutation affecting expression of MUTYH. *Genomics* 97, 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.11.006>
- Brault, L.S., Famula, T.R., & Torres-Penedo, M.C. (2011b). *Inheritance of cerebellar abiotrophy in Arabians*. *American Journal of Veterinary Research*, 72(7) 940-944. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.7.940>
- Brault, L.S., & Penedo, M.C.T. (2011). *The frequency of the equine cerebellar abiotrophy mutation in non-Arabian horse breeds*. *Equine Veterinary Journal*, 43(6), 727-731. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00349.x>
- Carmona, S.A. (2018). Sistema nervioso. Ganglios basales y cerebelo. En A.G. Sacristán, *Fisiología Veterinaria* (pp. 214-216). Editorial Tébar Flores.
- Cavalleri, J.M.V., Metzger, J., Hellige, M., Lampe, V., Stucken-Schneider, K., Tipold, A., Beineke, A., Becker, K., Distl, O., & Feige, K. (2013). Morphometric magnetic resonance imaging and genetic testing in cerebellar abiotrophy in Arabian horses. *BMC Veterinary Research* 9(105). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-105>
- Durward Akhurst, S.A., Marlowe, J.L., Schaefer, R.J., Springer, K., Grantham, B., Carey, W.K., Bellone, R.R., Mickelson, J.R., & McCue, M.E. (2024). Predicted genetic burden and frequency of phenotype- associated variants in the horse. *Scientific Reports*, 14(8396) 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57872-8>
- Ensembl (sf). *Equus caballus*. Información: https://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index
- Gagliardi, R., De León, L., Catania, C., Ghiringhelli, C., & Llambí, S. (2019). Primer diagnóstico molecular de abiotrofia cerebelar en un equino Árabe en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 54(210), 43-45.

- Green, S.L., & Mayhew, I.G. (1990). Neurologic Disorders. En A.M. Koterba, W.H. Drummond, & P.C. Kosch, *Equine Clinical Neonatology* (pp.496-530). Interamericana.
- Jiménez Heredia, I., Quiñones Pérez, C., Ojeda Durán, F.J., Matínez-Pinna Vallejo, E., Gaudó Hernández, M., & Vega-Pla, J.L. (2020). Análisis de curvas de fusión de alta resolución para la tipificación de la mutación de la abiotrofia cerebelar equina. *Sanidad Animal*, 76(1), 8-12, <https://dx.doi.org/10.4321/s1887-85712020000100002>
- Konig, H.E., Liebich, H.G., & Cervený, C. (2011). Sistema nervioso. Cerebelo. En H.E. König & H.G. Liebich, *Anatomía de los animales domésticos* (2ª ed., pp. 213-215). Editorial Médica Panamericana.
- Laboratorio de Genética Veterinaria de la UC Davis (sf). *Abiotrofia cerebelosa*. UC Davis: <https://vql.ucdavis.edu/cerebellar-abiotrophy>
- Lahunta, A., Glass, E., & Kent, M. (2015). Cerebellum. En *Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Elsevier.
- Llambí, S., & Arruga, M.V. (2018). El puzzle de los genomas de animales domésticos. En *Selecciones de genética veterinaria* (Vol.1, pp. 26-27). M.V. Arruga.
- MacKay, R. (2008). Neurodegenerative disorders. En *Equine Neurology*. Blackwell Publishing.
- McAuliffe, S., & Slovis, N. (2011). *Nervous System*. En G.A. Munroe, & J.S. Weese, *Equine Clinical Medicine, Surgery and Reproduction* (pp.745-808). CRC.
- Menchaca (2024). *Análisis de polimorfismos en el gen ARSG asociado a la abiotrofia cerebelar en caninos pit bull terrier de Uruguay* (Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UDELAR).
- Sadaba, S.A., Madariaga, G.J., Corbi Botto, C.M., Carino, M.H., Zappa, M.E., Peral García, P., Olguín, S.A., Massone, A., & Díaz, S. (2016). First report of cerebellar abiotrophy in an Arabian foal from Argentina. *Open Veterinary Journal*, 6(3), 259-262. <https://doi.org/10.4314/ovj.v6i3.17>
- Scott, E.Y., Penedo, M.C., Murray, J.D., & Finno, C.J. (2016). Defining Trends in Global Expression in Arabian Horses with Cerebellar Abiotrophy. *Cerebellum*, 16, 462-472. <https://doi.org/10.1007/s12311-016-0823-8>

- Scott, E.Y., Woolard, K.D., Finno, C.J., & Murray, J.D. (2018). Cerebellar abiotrophy across domestic species. *The Cerebellum*, 17, 372-379.
- Scott, E.Y., Woolard, K.D., Finno, C.J., Penedo, M.C.T., & Murray, J.D. (2017). Variation in MUTYH expression in Arabian horses with cerebellar abiotrophy. *Brain Research*, 1678, 330-336.
- Verdes, J.M & Yamasaki, K. (2022). Estudio histológico comparado de abiotrofia cerebelosa en un perro y un potrillo. *Veterinaria (Montevideo)* Volumen 58 N° 218 (2022 Jul – Dic). <https://doi.org/10.29155/VET.58.218.6>
- Willis, A.T., Dahlgren, A.R., Woolard, K.D., Ghosh, S., Donnelly, C.G., de la Concha-Bermejillo, A., Pacheco, A., Watson, K.D., Berryhill, E., Aleman, M., Wensley, F., Humphreys, S., Whitehead, A.E., Goldsmith, D., Chesen, B., Ragsdale, J., Tompkins, J.E., Nash, R., Plunkett, A.H., ... Finno, C.J. (2024). Clinico pathological and pedigree investigation of a novel spinocerebellar neurological disease in juvenile Quarter Horses in North America. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 38, 1808-1814. <https://doi.org/10.1111/jvim.17049>

10. ANEXOS 1

10.1. Publicación del caso clínico en la Revista Veterinaria de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. Gagliardi R, De León L, Catania C, Ghiringhelli C, Llambí S. (2018). Primer diagnóstico molecular de abiotrofia cerebelar en un equino Árabe en Uruguay. SMVU, N°211.

