

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Utilización de técnicas moleculares para
el diagnóstico de enfermedades
hereditarias en equinos**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Santiago Souza Nava - 208012

Tutor: Ana López

2023

Declaración de autoría

Yo, Santiago Souza Nava, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto de grado para Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in black ink that reads "Santiago SN." The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Santiago Souza Nava

Montevideo, 13 de marzo de 2023

Agradecimientos

En primera instancia me gustaría agradecerle a Genexa por abrirme las puertas del mercado laboral relacionado a la Biotecnología y a las personas que estuvieron involucradas en el proyecto por su paciencia, disponibilidad y consejos. A mi tutora Ana López y a todo el equipo de Genexa: Rosina Fossati, Andrés Pereira, Florencia Arezo, Rodrigo Duran, Rodolfo Presno, Mariana Pejo, Mariana García y Carolina Roure.

También me gustaría agradecerle a Nicola De Angelis dueño de la cabaña Haras Don Carmine por su disponibilidad en todo momento y por mostrarme todo el proceso de criar a los caballos, su cuidado y trabajo que realizan día a día para mantenerlos en buen estado. Igualmente, para Sebastián Pimiento por su paciencia para responder las preguntas que le fui haciendo durante el proyecto.

Me gustaría agradecerle a la Universidad ORT desde un lado académico a todos los docentes por su amabilidad y aprendizaje que me transmitieron, y por otro lado a sus funcionarios ya que tuve mi primera experiencia laboral la cual fue única.

A mis compañeros de generación por compartir desde el día uno clases, laboratorios y charlas.

Y finalmente a toda mi familia principalmente a mis dos pilares, mi hermano y a mi madre que estuvieron en todo, ya sean momentos buenos o malos y que sin ellos todo lo que he logrado hoy no pudiera haber ocurrido.

¡Gracias!

Resumen

En la actualidad los caballos son utilizados principalmente como herramienta de trabajo en el campo, pero también para deportes como carreras, polo, equitación, exposiciones y en menor medida para usos terapéuticos. Estos presentan diferencias genéticas que afectan sus aptitudes en determinadas actividades por lo que el valor de los individuos en el mercado se verá influenciado por la trayectoria de ascendencia.

Por tal motivo los ensayos genéticos son un sello de calidad que presentan las asociaciones en cuanto a la certificación de la ascendencia de los productos y sus logros. Las exigencias de los mercados han llevado a las asociaciones a aumentar sus controles para la aceptación del equino las cuales van desde las reseñas para la inscripción, el chipeado para la identificación inmediata del equino, la realización del estudio de perfil de ADN para certificar la ascendencia y en algunas razas la detección de ciertas enfermedades características de la propia raza.

Con el objetivo de brindar diagnósticos genéticos para enfermedades que afectan a las razas Appaloosa y Paint Horse, se desarrollaron dos ensayos para detectar mutaciones responsables de estas patologías. Dichos ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones de Genexa, un laboratorio especializado en biología molecular. Una de ellas es la detección del complejo leopardo causante de la ceguera nocturna estacionaria congénita en los Appaloosa, causado por una inserción en el gen “miembro 1 de la subfamilia M de canales catiónicos de potencial receptor transitorio” (TRPM1). La otra es la detección del overo letal causante de anomalías en el tracto digestivo debido a una mutación missense en el gen “receptor de endotelina tipo B” (EDNRB) en la raza Paint Horse.

Se evaluaron dos formas de extraer ADN, un método propio de Genexa y un kit comercial con el fin de determinar cuál es el más adecuado para realizar el test genético evaluando concentración del ADN obtenido y pureza de este. También, se evaluó cual técnica era mejor económicamente.

Además, por tratarse de enfermedades hereditarias que se transmiten a la descendencia se realizó el análisis de parentesco mediante tipificación por microsatélites para la confirmación de parentesco. Se utilizaron marcadores recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG).

Los resultados obtenidos para la raza Appaloosa fueron que el 50% de los animales analizados dieron resultado homocigotas mutados (LP/LP) presentando la ceguera nocturna congénita estacionaria. Para la raza Paint Horse se obtuvo que el 13% dieron resultado heterocigota (LO/lo) tratándose de portadores para la enfermedad overo letal.

Palabras clave

herencia, equinos, complejo leopardo, inserción, appaloosa, overo letal, missense, paint horse, electroforesis capilar, secuenciación, tipificación, fragmentos.

Abreviaturas

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido

CSNB: ceguera nocturna estacionaria congénita

ERG: electroretinografía

TRPM1: miembro 1 de la subfamilia M de canales catiónicos de potencial receptor transitorio

ECA1: cromosoma 1 de caballo

LTR: repetición terminal larga

ERV: retrovirus endógeno

LP: leopard complex

ERU: uveitis recurrente equina

LO: lethal overo

LWO: síndrome de overo letal

EDNRB: receptor de endotelina tipo B

ECA17: cromosoma 17 de caballo

“I”: aminoácido isoleucina

“K”: aminoácido lisina

STR: microsatélite o repetidos en tandem cortos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ISAG: International Society for Animal Genetics

diSTR: microsatélites dinucleótidos

tetraSTR: microsatélites tetranucleótidos

EC: electroforesis capilar

dNTPs: desoxirribonucleico

ddNTPs: di-desoxirribonucleico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

T_m: temperatura de melting

TRPM1-N-F: primer forward normal para TRPM1

TRPM1-M-F: primer forward mutado para TRPM1

TRPM1-R: primer reverse para TRPM1

LWO-F: primer forward EDNRB

LWO-R: primer reverse EDNRB

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

nm: longitud de onda

AB: Applied Biosystems

3500 xL: equipo analizador genético de AB

LIZ500: control interno de tamaño de AB para el equipo 3500 xL

“APP”: denominación interna a la raza Appaloosa

“PH”: denominación interna a la raza Paint Horse

“P”: denominación interna a la extracción propia de ADN

“W”: denominación interna a la extracción comercial de ADN

pb: pares de bases

Índice

1. Introducción	11
1.1 Mutaciones y herencia	11
1.2 Enfermedades genéticas en caballos	12
1.2.1 Ceguera nocturna estacionaria congénita	13
1.2.2 Overo letal	17
1.3 Tipificación de animales mediante microsatélites	19
1.4 Electroforesis capilar	22
1.5 Generalidades del laboratorio Genexa ADN evolutivo	25
1.5.1 Antecedentes	25
1.4.2 Visión	25
1.4.3 Misión	26
1.4.4 Política de Calidad	26
1.4.5 Actualidad de Genexa	27
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo general	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Materiales y métodos	29
3.1 Diseño de primers	29
3.1.1 Complejo leopardo	29
3.1.2 Overo letal	30
3.1.3 Tipificación equina	31
3.2 Muestras	31
3.3 Extracción de ADN	32
3.3.1 Método propio	32
3.3.2 Método comercial	32
3.4 Cuantificación de ADN	32
3.5 Amplificación	33
3.5.1 Complejo leopardo	33
3.5.2 Overo letal	34
3.5.3 Tipificación equina	34
3.6 Detección	34

4. Resultados y discusión	36
4.1 Muestras	36
4.2 Extracción de ADN	37
4.3 Amplificación y detección	40
4.3.1 Complejo leopardo	41
4.3.2 Overo letal	45
4.3.3 Tipificación equina	50
4.3.3.1 Complejo leopardo	53
4.3.3.2 Overo letal	56
5. Análisis económico	58
5.1 Análisis de mercado	58
5.1.1 Nivel nacional	58
5.1.2 Nivel regional	59
5.2 Factibilidad económica	61
6. Conclusiones y perspectivas a futuro	63
6.1 Conclusiones	63
6.2 Perspectivas a futuro	63
7. Referencias bibliográficas	65
8. Anexos	70

1. Introducción

1.1 Mutaciones y herencia

El caballo tiene un total de 64 cromosomas o 32 pares de los cuales uno es materno y el otro paterno. De los 64 cromosomas, dos se llaman cromosomas sexuales porque contienen genes que determinan el sexo del individuo. Una hembra normal tiene dos cromosomas X, en cambio los machos normales tienen un cromosoma X y uno Y (Figura 1).(1, 2)

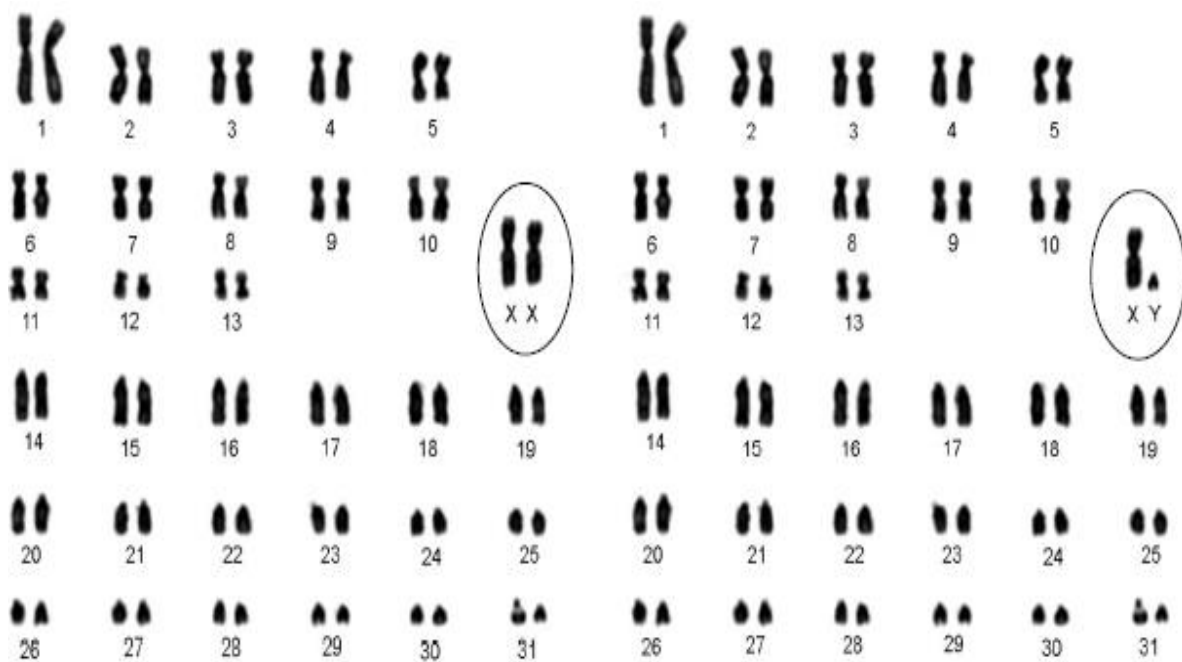


Figura 1. Se representan los cariotipos femenino y masculino donde la única diferencia es la composición de los cromosomas sexuales es que las hembras son XX y los machos son XY.(1)

Los científicos han estudiado los genes animales para aprender cómo funcionan y cómo los cambios en estos pueden alterar su funcionamiento. Algunos cambios son muy pequeños y se denominan polimorfismo de nucleótido único (SNPs, por su sigla en inglés *single-nucleotides polymorphisms*). Otros cambios, afectan el funcionamiento de un gen y pueden provocar enfermedades.(3)

Existen algunos modelos básicos de herencia para enfermedades causadas por mutaciones en un solo gen: autosómico dominante, autosómico recesivo, dominante ligado al cromosoma X y recesivo ligado al cromosoma X. (3, 4)

La genómica comparativa es una técnica utilizada en la investigación genética que se basa en comparar el genoma de diferentes especies para identificar similitudes y diferencias en los genes y su función. En el caso de los caballos, la genómica comparativa se ha utilizado para identificar mutaciones genéticas que pueden estar asociadas con enfermedades específicas. Para ello, se han tomado como base los genes candidatos que se han identificado en otras especies, especialmente en humanos, ya que muchos genes son compartidos entre distintas especies animales. Por ejemplo, si se ha descubierto una mutación genética en humanos que está relacionada con una enfermedad oftalmológica, se puede investigar si existe una mutación similar en el genoma del caballo que también pueda estar relacionada con problemas de visión en estos animales. Una vez identificada la mutación, se puede diseñar una prueba genética para detectar la presencia de esa mutación en caballos y así prevenir la aparición de la enfermedad o tomar medidas adecuadas para tratarla. (5)

1.2 Enfermedades genéticas en caballos

Las enfermedades genéticas en equinos *Equus caballus* son de gran interés cuando una raza en específico es afectada, varios descendientes son afectados, o cuando ciertos rasgos del desarrollo se alteran ya sea por defectos congénitos o enfermedades letales. La identificación de estas enfermedades genéticas en caballos ha sido de gran dificultad debido a sus largas gestaciones, nacimientos únicos, dispensaciones de los caballos luego del destete, y además que varias de estas enfermedades tienen un retraso en el inicio de la expresión o una penetrancia variable.(6)

Estas dificultades desaparecieron luego que los líderes del “*Horse Genome Sequencing Project*” proyecto llevado a cabo en el Broad Institute en el año 2007 pudieron obtener el genoma completo de los caballos con buena calidad, esfuerzo que llevó más de 10 años por un grupo de científicos internacionales. Además, obtuvieron una larga colección de SNPs que permiten identificar rasgos genéticos en poblaciones de caballos los cuales dieron a conocer más de 80 condiciones genéticas que son similares a trastornos presentes en humanos. A raíz de esto, se fueron descubriendo muchas enfermedades genéticas hereditarias en caballos para algunas de las cuales se conoce la mutación que la causa mientras que para otras aún se desconoce cuál es la causa de la enfermedad.(7–9)

En medicina veterinaria es posible que el patrón de pelaje esté ligado a una manifestación de enfermedad neurológica y oftalmológica. Entre ellas podemos encontrar la sordera neurosensorial hereditaria, el síndrome letal overo blanco, el síndrome de potro lavanda, la ceguera nocturna estacionaria congénita, estrabismo y nistagmo hereditarios en gatos, y la anomalía ocular congénita múltiple en caballos. Debido a que el pelaje de un animal está determinado por una gran cantidad de genes muchas veces la manifestación de la enfermedad no resulta visible a partir de los rasgos fenotípicos. Para poder detectar algunas de ellas se han desarrollado análisis genéticos mediante el uso de herramientas moleculares.(10, 11)

Tanto el conocimiento de las variantes genéticas de un caballo para determinadas enfermedades como las pruebas genéticas para identificar características de desempeño pueden ser muy útiles para tomar decisiones informadas sobre su cría y manejo. Los veterinarios tienen un papel importante en la aplicación de estas herramientas genéticas para mejorar la salud, el bienestar y el rendimiento de los caballos, incluyendo la toma de decisiones de cruzamientos. El conocimiento de las variantes genéticas puede permitir seleccionar parejas de cría que reduzcan el riesgo de transmitir enfermedades hereditarias o mejoren características de desempeño deseadas en la descendencia. Las pruebas genéticas también pueden ayudar a seleccionar ejemplares para ciertas actividades o disciplinas y reducir el riesgo de lesiones o enfermedades relacionadas con el desempeño. Además, es importante recordar que los factores no genéticos, como el ambiente, la capacitación y la alimentación, también influyen en el desempeño de los caballos y deben ser considerados en su manejo y cuidado.(12)

1.2.1 Ceguera nocturna estacionaria congénita

La ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB, por su sigla en inglés *Congenital stationary night blindness*) es una afección hereditaria presente al nacer y no progresiva, que se caracteriza por problemas de visión en condiciones de oscuridad (Figura 2) asociada con la raza Appaloosa con una incidencia del 30% para esta población. A su vez, no hay evidencia de anomalías oftálmicas en exámenes clínicos de caballos afectados, por lo que el diagnóstico se confirma mediante electroretinografía (ERG). La ERG es una prueba electrofisiológica que se utiliza para medir la respuesta eléctrica de las células de la retina ante la estimulación lumínica. En el caso de los caballos, esta prueba debe ser realizada por un veterinario especializado, en una clínica equipada con el equipo adecuado, lo que puede implicar un costo elevado tanto por la prueba en sí como por el traslado del animal. (13, 14)

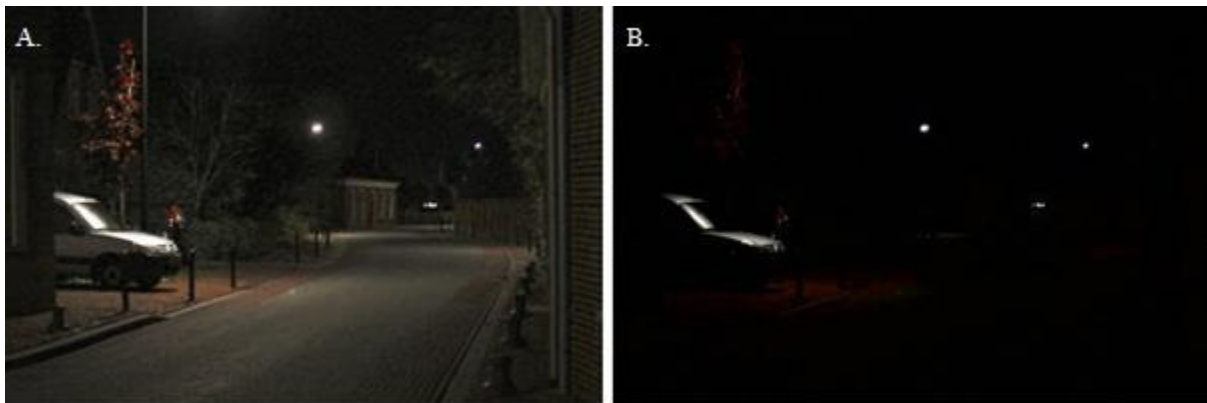


Figura 2. Representación visual de cómo afecta la ceguera nocturna a la visión normal en baja condiciones de luz. (A) Se observa una visión normal en baja condiciones de luz. (B) Se observa una visión afectada con ceguera nocturna congénita donde se ve una imagen mucho más oscura y borrosa debido a esta afección.(15)

La CSNB es causada por una inserción de 1378 pb en el gen miembro 1 del canal catiónico potencial del receptor transitorio subfamilia M (TRPM1, por su sigla en inglés *Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 1*) ubicado en el cromosoma 1 (ECA1). La inserción es una repetición terminal larga (LTR, por su sigla en inglés *long terminal repeat*) de un retrovirus endógeno (ERV, por su sigla en inglés *endogenous retrovirus*) que interrumpe la transcripción de TRPM1 por poliadenilación prematura que impide la traducción del último aminoácido. Si bien la CSNB es completamente recesiva, si el animal es heterocigota para el complejo de leopardo (LP, por su sigla en inglés *leopard complex*) va a ser portador de la enfermedad y tiene posibilidades de contraer uveítis recurrente equina (ERU, por su sigla en inglés *equine recurrent uveitis*). En cambio, sí es homocigota para LP va a tener CSNB y tendrá chances más altas de contraer ERU.(13, 16)

La ERU es una dolorosa condición del ojo que resulta en una pérdida total de la visión, afectando la función y valor del caballo. Es una enfermedad autoinmune espontánea caracterizada por episodios recurrentes de inflamación intraocular (Figura 3), que puede afectar gravemente la salud ocular del caballo, y si no se controla adecuadamente, puede provocar una inflamación que dañe el tejido ocular y cause una pérdida de la visión. Los caballos Appaloosas en particular tienen entre 8,3 y 12 veces más riesgo de contraer ERU frente a otras razas de caballos. Se ha observado que los caballos que sufren de CSNB tienen un mayor riesgo de desarrollar uveítis recurrente. Esto se debe a que los ojos afectados por la ceguera nocturna pueden ser más susceptibles a la inflamación y a otros problemas oculares, como la irritación

y las infecciones. Además, la uveítis recurrente puede ser causada por una respuesta inmunológica anormal del cuerpo a la inflamación crónica, lo que también puede ser un factor de riesgo en estos caballos. (17, 18)

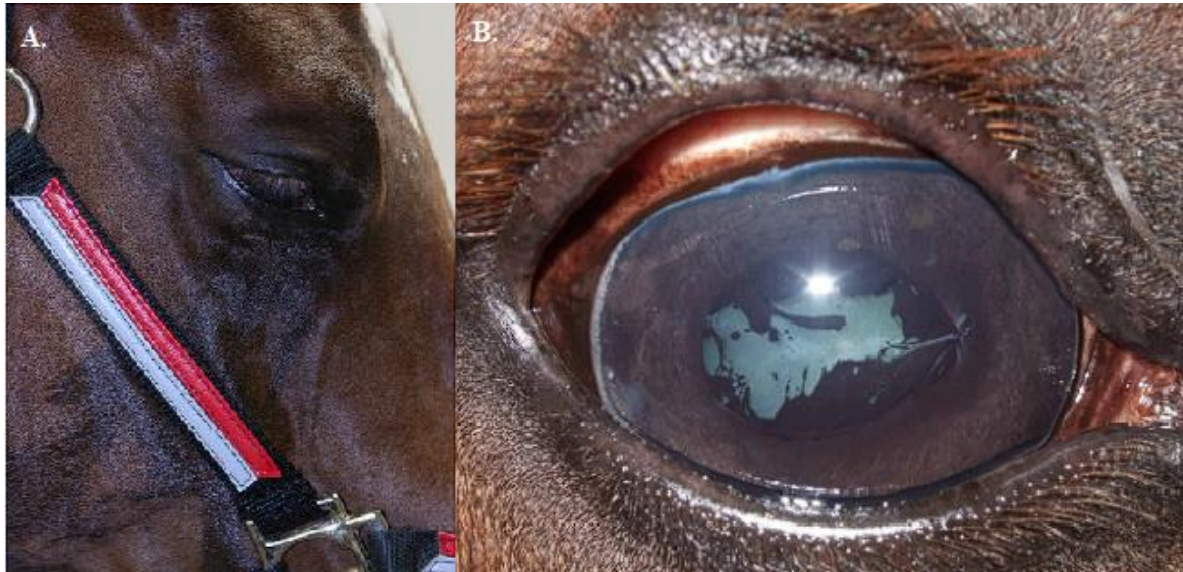


Figura 3. Expresión de la ERU en un caballo. (A) Señales típicas de un caballo con ERU, mucho lagrimeo y parpadeo constante. (B) ERU interna.(17)

Los bastones o células fotorreceptoras ROD son los encargados de participar en la visión en la oscuridad o baja condición de luz (conocido como *scotopic vision*) estas no están relacionadas a la visión a color. Por otro lado, están los conos que están relacionados con la visión a color y en altas condiciones de luz (conocido como *photopic vision*). La CSNB por lo tanto va a involucrar a los bastones y no a los conos. (19)

En una condición normal de oscuridad se libera glutamato por los bastones el cual se une al receptor de proteína G (MGlur6) en la célula bipolar. La activación de la proteína G ($G_{\alpha o}$) mantiene el receptor TRPM1 cerrado lo que resulta en la hiperpolarización de la célula bipolar (se observa una línea plana en la ERG) (Figura 4 - A1). La foto absorción cierra el canal de cationes que se hiperpolarice por los bastones interrumpiendo la liberación de glutamato. La pérdida del efecto inhibitorio del glutamato abre el canal TRPM1 resultando en la despolarización de la célula bipolar (se observa un pico en el ERG) (Figura 4 - A2). Esta respuesta se da cuando el animal es y se refiere a un ERG normal (Figura 4B). (16)

En caballos que presentan CSNB el receptor TRPM1 no está presente y la respuesta a la pérdida de glutamato seguida de la foto absorción es inviable (Figura 4 - A3 y A4). Los bastones quedan hiperpolarizados en respuesta a la luz (Figura 4 - A3), pero las células bipolares no pueden despolarizarse y no aparece la onda “B” (Figura 4A - A4), con esto nos referimos a un ERG negativo.(16, 20)

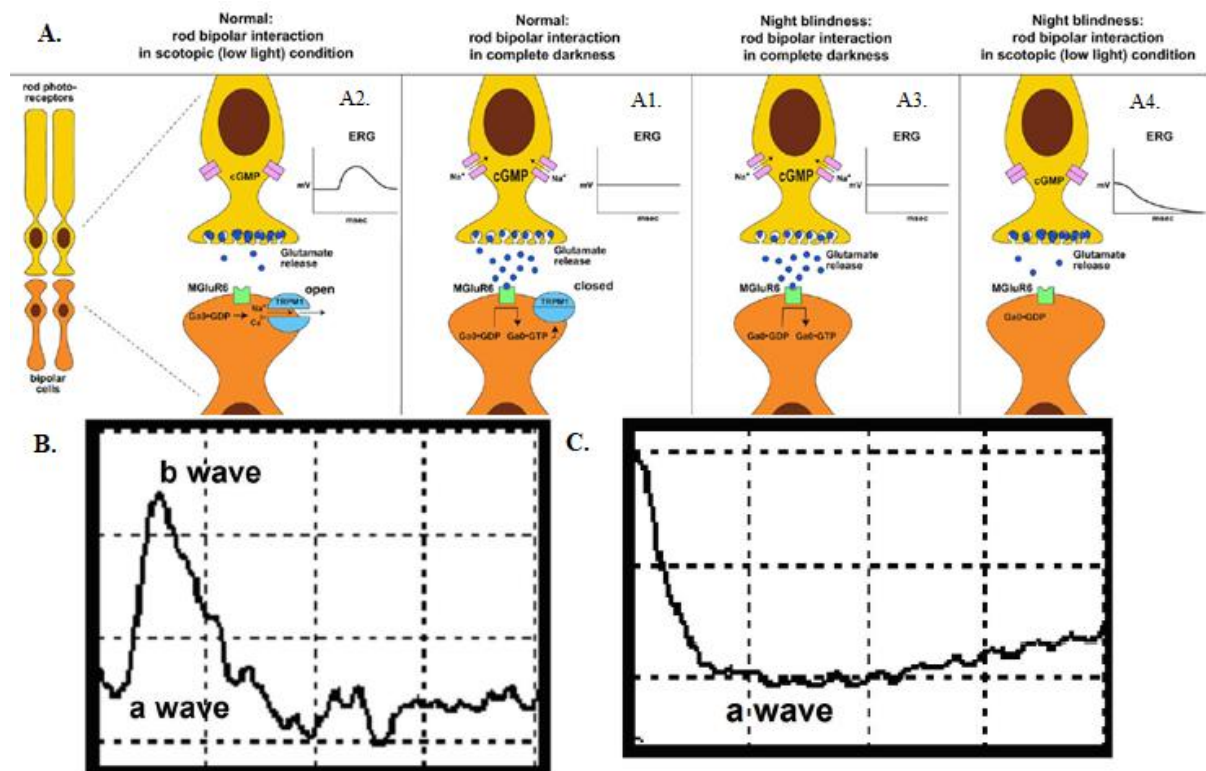


Figura 4. Función del TRPM1 en la CSNB y ERG. (A) TRPM1 y su rol en la visión nocturna. En color amarillo se puede observar los bastones, en naranja las células bipolares, y en celeste el TRPM1. (A1) Condición normal en oscuridad. (A2) Condición normal en baja condición de luz. (A3) CSNB en oscuridad. (A4) CSNB en baja condición de luz. (B) ERG normal con su onda “A” y su onda “B” o también denominado “pico”. (C) ERG negativo se observa únicamente una onda “A”, esto se debe a que al no estar presente el TRPM1 no puede despolarizarse la célula.(13)

Es importante destacar que el tratamiento de la ERU puede ser costoso, ya que suele requerir el uso de corticoides para evitar la inflamación. Además, si la ERU se presenta repetidamente, puede provocar ceguera completa en el animal, o causar complicaciones como cataratas, desprendimiento de retina y glaucoma, lo que puede tener un impacto negativo en la calidad de vida del caballo. Por lo tanto, la prevención de la propagación de enfermedades hereditarias como la CSNB puede ayudar a prevenir estas complicaciones oculares y promover la salud ocular de los equinos. (21)

1.2.2 Overo letal

El overo letal (LO, por su sigla en inglés *lethal overo*) u overo letal blanco (LWO, por su sigla en inglés *overo lethal white*) es una afección hereditaria común en la raza Paint Horse. Los potros afectados por LO tienen aganglionosis, falta de células ganglionares parasimpáticas en el intestino delgado distal y el intestino grueso que resulta en un megacolon, una dilatación anormal del colon debido a la parálisis de los movimientos peristálticos del intestino haciendo que las heces permanezcan dentro del intestino lo que resulta en una enfermedad fatal. La afección es similar a la enfermedad hereditaria humana de Hirschsprung, causada por mutaciones en el gen humano ortólogo. Los animales afectados presentan un pelaje completamente blanco y mueren poco después de su nacimiento debido a esta obstrucción intestinal (Figura 5). Hoy en día no hay tratamiento efectivo para esta enfermedad, la cual tiene una incidencia del 8% en esta raza. (22–24)



Figura 5. Hembra y su potro afectado por el síndrome de overo letal.(25)

El LO es causado por una mutación con cambio de sentido o también denominada *missense* de dos nucleótidos pasando de un alelo normal “TC” a uno mutado “AG” en el gen del receptor de endotelina-B (EDNRB, por su sigla en inglés *endothelin receptor B*) ubicado en el cromosoma 17 (ECA 17) que provoca el reemplazo de un aminoácido de isoleucina “I” por uno de lisina “K” en la posición 118 de la proteína (Figura 6).(22, 23, 26)

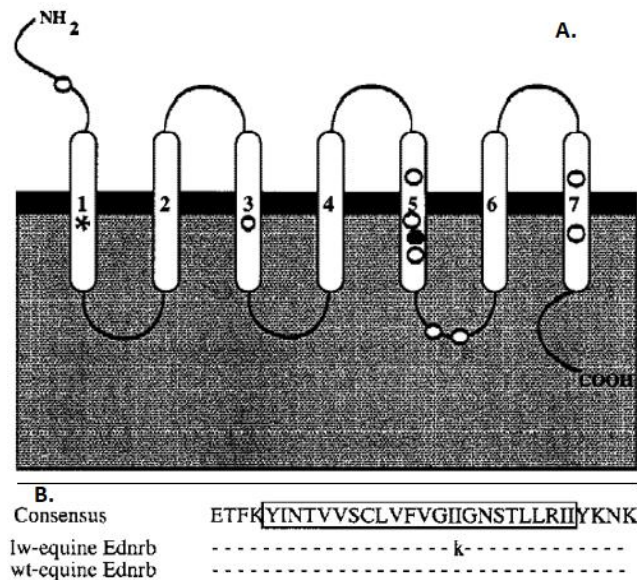


Figura 6. EDNRB y su mutación. (A) Se observa en negro la membrana plasmática, en gris el citosol y en blanco numerado los dominios transmembrana. En asterisco se representa la mutación causada en los caballos, en círculos blancos las conocidas en los humanos y en el círculo negro una reconocida en ratones. (B) Se visualiza la secuencia de aminoácidos de la posición 99 a la 132, encerrado está el primer dominio transmembrana donde ocurre la mutación missense. (22, 27)

Se cree que este cambio de la isoleucina el cual es un aminoácido hidrofóbico por uno cargado como es la leucina podría tener un efecto negativo en el primer dominio transmembrana, disruptiendo la localización del receptor en la membrana, la capacidad de señalización y de unión generando la enfermedad en cuestión.(22)

Las endotelinas son una familia de péptidos que funcionan como receptores acoplados a una proteína G. Se han descubierto tres endotelinas que residen en los mamíferos, EDN1, EDN2 y EDN3. Además, se han identificado dos subclases de receptores, endotelina-A y endotelina-B. (28) El receptor de la endotelina tipo B (EDNRB) es un receptor de endotelina, una proteína que regula diversos procesos fisiológicos en el cuerpo, desde la activación de la óxido nítrico sintetasa que participa en la vasoconstricción hasta la participación en el desarrollo y la migración de las células de la cresta neural durante la embriogénesis. Estas células son importantes porque tienen la capacidad de migrar a diferentes partes del cuerpo y diferenciarse en diversos tipos de células, como células del sistema nervioso, musculares, del corazón y de la piel. En los caballos, una mutación en este gen puede interrumpir el desarrollo y la migración normal de las células de la cresta neural, lo que resulta en la ausencia de células nerviosas en el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso simpático. La falta de estas células nerviosas son los responsables de los síntomas de la enfermedad overo letal en los caballos homocigotos,

como la acumulación de gas y materia fecal en el colon. También existe la falta de células de melanocitos que da origen a la falta de pigmentación en algunas áreas del cuerpo.(28)

Es por esto que el test genético para detectar preventivamente el overo letal en caballos es crucial para prevenir pérdidas económicas y de tiempo para los criadores, ya que esta mutación es letal para los homocigotos y puede generar problemas graves como la pérdida de tiempo, recursos en el proceso de embarazo y el nacimiento de un potro que no sobrevivirá. La realización de la prueba genética puede ayudar a evitar la cría de animales homocigotos para esta enfermedad y a preservar la salud y el bienestar de los caballos.(29)

1.3 Tipificación de animales mediante microsatélites

Los microsatélites o repetidos en tándem cortos (STRs, por su sigla en inglés *short tandem repeats*), son una clase de repetidos en tándem que involucran secuencias de 1 a 10 pares de bases y se pueden encontrar concatenados hasta 100 veces, y dispersos en varios puntos del genoma. Se ha demostrado que el número de repeticiones varía ampliamente entre individuos, y se cree que esto se debe a un deslizamiento o “*slippage*” de la ADN polimerasa durante la síntesis y reparación del ADN. Además de ser polimórficos y muy variables en la población, algunas características interesantes de los microsatélites son su herencia mendeliana, su naturaleza codominante, y su alta tasa de mutación.(30, 31)

Desde que fueron descubiertos en 1974 por Skinner, Beattie and Blattner se han utilizado ampliamente en ensayos de identificación genética, mapeo genómico, estructura genética de poblaciones, y análisis de parentesco, principalmente en animales y plantas.(30, 31)

Al igual que con el ADN humano, el material genético obtenido de los caballos contiene microsatélites que son muy variables entre los individuos y, por lo tanto, son útiles para diferenciar entre animales. A continuación, se muestra una lista de algunos de los marcadores de caballos descritos en la literatura y utilizados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, por su sigla en inglés *Internacional Society of Animal Genetics*) (Tabla 1) en la cual se puede observar el locus o lugar específico en el cromosoma donde se ubica, la ubicación dentro del cromosoma, el tipo de estructura del STR la cual puede ser simple, compleja o ambos, la secuencia repetida, referencia de quien lo descubrió, la secuencia de los primers y el tamaño de amplicón obtenido.(32, 33)

Tabla 1. Microsatélites recomendados para las tipificaciones equinas según la ISAG.(33)

Locus	Chrom. Location	Repeat structure	Repeat sequence	Original reference	Primer sequences (Forward and Reverse)	Amplicon length (bp)
AHT4	24q14	Compound	(AC) _n AT(AC) _n	Binns <i>et al.</i> 1995	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT	144-164
AHT5	8	Simple	(GT) _n	Binns <i>et al.</i> 1995	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	126-144
ASB2	15q21.3-q23	Simple	(GT) _n	Breen <i>et al.</i> 1997	F: CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG R: CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	216-250
ASB17	2p14-p15	Simple	(AC) _n	Breen <i>et al.</i> 1997	F: ACCATTGAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC	87-129
ASB23	3q22.1-q22.3	Simple and compound	(TG) _n and (TG) _n TT(TG) ₄	Irvin <i>et al.</i> 1998	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC	175-211
CA425 UCDEQ425	28q18	Simple	(GT) _n	Eggleston-Stott <i>et al.</i> 1997	F: AGCTGCCTCGTTAATTCA R: CTCATGTCCGCTTGTCTC	226-246
HMS1	15	Simple	(TG) _n	Guérin <i>et al.</i> 1994	F: CATCACTCTTATGTCGCTTGG R: TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	170-186
HMS2	10	Compound	(CA) _n (TC) ₂	Guérin <i>et al.</i> 1994	F: CTTGCAGTCGAATGTGTATTAATG R: ACGGTGGCACTGCCAAGGAAG	222-248
HMS3	9	Compound	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n and (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n GA(CA) ₅	Guérin <i>et al.</i> 1994	F: CCATCCTCACTTTTCACTTTGTT R: CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA	148-170
HMS6	4	Simple	(GT) _n	Guérin <i>et al.</i> 1994	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA	151-169
HMS7	1q25	Compound	(AC) ₂ (CA) _n	Guérin <i>et al.</i> 1994	F: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT R: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC	165-185
HTG4	9	Complex	(TG) _n AT(AG) ₂ AAG(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃	Ellegren <i>et al.</i> 1992	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCCTCCTCTGTCTC	127-139
HTG6	15q26-q27	Simple	(TG) _n	Ellegren <i>et al.</i> 1992	F: GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT R: CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT	84-102
HTG7	4	Simple	(GT) _n	Marklund <i>et al.</i> 1994	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	118-128
HTG10	21	Simple and compound	(TG) _n and TATC(TG) _n	Marklund <i>et al.</i> 1994	F: TTTTATTCTGATCTGCACATTT R: CAATCCCCGCCACCCCGGCA	95-115
LEX3	Xq	Simple	(TG) _n	Coogle <i>et al.</i> 1996	F: ACATCTAACCCAGTGCTGAGACT R: GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC	142-164
VHL20	30	Simple	(TG) _n	Van Haeringen <i>et al.</i> 1994	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGAGAATCTTCTCAG	87-105

Generalmente en los caballos se utilizan microsatélites dinucleótidos (diSTR, por su sigla en inglés *dinucleotide short tandem repeat*) (Tabla 1) frente a microsatélites tetranucleótidos (tetraSTR, por su sigla en inglés *tetranucleotide short tandem repeat*) que son utilizados en humanos y perros para hacer perfiles genéticos y test de paternidades. El poco uso de marcadores tetraSTRs en caballos se debe a que son escasos en el genoma de estos frente a humanos y perros. Los diSTRs a pesar de presentar ciertas desventajas técnicas frente a los tetraSTRs como lo son los “*stutter peaks*” que son picos que se muestran entre uno o más repetidos menos que el alelo verdadero debidos al deslizamiento de la polimerasa en síntesis de ADN durante la PCR, tienen algunas ventajas como son la gran cantidad de marcadores que existen y los amplicones chicos que generan. (34)

El sistema de nomenclatura actual utilizado en caballos para los casos perfil genético y verificación de parentesco se basa en la cantidad de repeticiones que se obtienen de la secuencia de cada marcador nombrado anteriormente (Tabla 1 – *Repeat sequence*) traducida a un sistema alfabético de alelos en el cual se observa los números de repeticiones (Tabla 2), la cual ha evolucionado de manera informal de discusiones entre laboratorios y está regulada internacionalmente dentro de la ISAG. Se le asigna una letra del abecedario dependiendo de cuantas veces se repite el marcador pudiendo determinar un perfil único para cada equino y facilitar el análisis de parentesco. Por ejemplo, si la secuencia repetida del marcador ASB2 se repite nueve veces se asignará el nombre de "B" y si la secuencia se repite diez veces se le asignará la letra "C", así sucesivamente para cada cantidad de repeticiones y los distintos marcadores (Tabla 2). Designaciones de alelos basado en el número de repeticiones se ha recomendado para la tipificación del ADN humano, perros, bovinos y gatos. (33)

Tabla 2. Conversión de la nomenclatura ISAG a la nomenclatura de números repetidos. Se observan las letras asociadas a los números de repeticiones más frecuentes dentro de estos marcadores, esto servirá para realizar un perfil genético único para cada animal. (33)

Repeat number	ISAG																
	AHT4	AHT5	ASB2	ASB17	ASB23	CA425	HMS1	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	LEX3	VHL20
9			B														
10			C														
11				D													
12					D	F							G				
13			F	F		G				K	G					F	I
14		H	G	G		H	I			L			I			G	J
15		I		H	G	I	J	H		M			J	K		H	K
16		J	I	I	H	J	K	I		N	J		K		H	I	L
17		K	J	J	I	K	L	J		O	K			M	I	J	M
18		L	K	K	J	L	M	K		P	L		M	N	J	K	N
19		M	L	L	K	M	N	L		Q	M		N	O	K	L	O
20		N	M	M	L	N		M	H		N		O	P	L	M	P
21		O	N	N		O					O		P		M	N	Q
22			O	O		P	Q	O			P		Q		N	O	R
23		Q	P	P				P			Q				O	P	
24			Q	Q	P			Q	L						P	Q	
25	H		R	R	Q			R	M						Q		
26	I		S	S	R			S	N						R		
27	J			T	S				O						S		
28	K				T			U	P						T		
29	L			V	U				Q								
30	M			W	V				R				K				
31	N								S				L				
32	O			Y									M				
33	P												N				
34	Q												O				
35	R												P				
36													Q				

1.4 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica utilizada en investigación y muy aplicada en la biotecnología, farmacia y medicina. Es rápida, precisa y requiere muy poca muestra. Usa un campo eléctrico para mover moléculas a través de un capilar estrecho, separándolas por tamaño y cargas eléctricas. Se pueden separar moléculas como ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides y fármacos.(35, 36)

En el análisis de ADN mediante electroforesis capilar, se utilizan marcadores fluorescentes para etiquetar los fragmentos antes de la separación. Los fragmentos se someten a un campo eléctrico que los mueve a través del capilar, separándolos según su tamaño. Los fragmentos más pequeños se mueven más rápido hacia el polo positivo que los más grandes, permitiendo la separación y análisis de múltiples fragmentos de ADN en una sola muestra con alta resolución y sensibilidad.(35, 36)

Las características descritas hacen de la EC un método eficiente y económico para separar cientos de componentes simultáneamente, utilizando pequeñas cantidades de muestras y reactivos. Por esta razón, se ha convertido en una técnica clave en la secuenciación y genotipado de ADN, así como en el análisis de mutaciones y polimorfismos genéticos.(35, 36)

El uso de marcadores polimórficos y mutacionales en el diagnóstico genético requiere de tecnología automatizada, ya que las técnicas convencionales como la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida son menos específicas, reproducibles y; consumen más tiempo y recursos. Además, estas técnicas suelen requerir más cantidad de muestra, por lo que han quedado casi en desuso. La electroforesis capilar automatizada se utiliza en el diagnóstico genético para dos áreas principales: la secuenciación (Figura 7)(37) y el análisis de fragmentos (Figura 8)(38). (35, 36)

En el caso del análisis de secuenciación de Sanger (Figura 7) es útil para detectar cambios puntuales en el ADN. Los pasos a seguir para realizar una secuenciación son los siguientes, una extracción de ADN y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés *Polimerase chain reaction*) con el fin de amplificar y obtener una gran cantidad de copias de la región de ADN que se desea secuenciar. Posteriormente, se realiza una purificación de la PCR para eliminar los componentes no deseados, como los deoxiribonucleótidos (dNTPs por

su sigla en inglés *deoxyribonucleotides*), enzimas y primers específicos. Luego, se realiza la secuenciación con dideoxinucleótidos (ddNTPs, por su sigla en inglés *dideoxyribonucleotides*) marcados con fluoróforos que en comparación a los dNTPs no contienen el extremo 3'OH libre lo que impide la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido deteniendo la cadena, es por esto que a los ddNTPs se los denomina “nucleótidos de terminación de cadena”. En este caso se utiliza un ratio dNTPs:ddNTPs con el fin de elongar y determinar el largo de los fragmentos producidos. Después, mediante otra purificación se eliminan los ddNTPs marcados sobrantes para evitar la competencia con la secuencia blanco en la detección. Posteriormente, se realiza la electroforesis capilar para detectar los distintos fragmentos de secuencia amplificados y determinar la secuencia final. Finalmente, se lleva a cabo el análisis de datos correspondiente. (37, 39, 40)

Un ejemplo de la secuenciación de SANGER es la detección las variantes en el gen EDNRB que causa el overo letal, una mutación de dos pares de bases que afecta a los caballos y que puede causar problemas de salud graves. Para detectarla se requiere una secuenciación precisa y detallada del ADN, lo que se logra mediante la técnica de secuenciación de SANGER. (37, 39, 40)

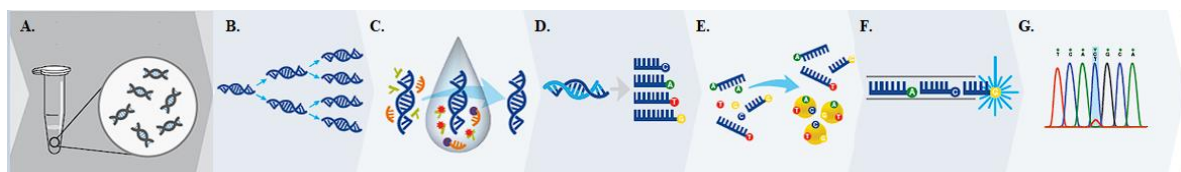


Figura 7. Representación esquemática para la secuenciación de SANGER. (A) Extracción del ADN; (B) PCR con primers específicos; (C) Purificación de PCR; (D) Secuenciación con ddNTPs marcados; (E) Purificación de secuencia; (F) Electroforesis capilar; (G) Análisis de datos. (37)

Por otro lado, el análisis de fragmentos (Figura 8) es una técnica útil para detectar cambios más grandes en el ADN, como inserciones o deleciones de varios pares de bases. Los pasos involucrados comienzan con la extracción de ADN y una PCR con primers específicos marcados para amplificar y generar una gran cantidad de copias de la región de interés. Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se realiza una electroforesis capilar y finalmente se lleva a cabo el análisis de los datos obtenidos correspondientes. (38)

Un ejemplo del análisis de fragmentos es la detección de las variantes del gen TRPM1 que causan la ceguera nocturna congénita estacionaria. La mutación responsable de esta

enfermedad es una inserción de 1378 pares de bases en el gen afectado. Para detectar esta mutación, se utiliza el análisis de fragmentos, que permite detectar la presencia o ausencia de esta inserción en el ADN. (38)

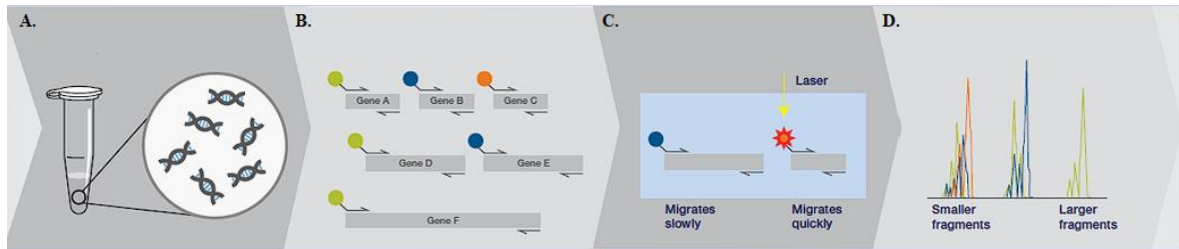


Figura 8. Representación esquemática para el análisis de fragmentos. (A) Extracción de ADN; (B) PCR con primers específicos marcados; (C) Electroforesis capilar; (D) Análisis de datos. (38)

Para llevar a cabo estas dos técnicas, se utilizará un analizador genético automático de alta capacidad. En este caso, el modelo 3500xL de Applied Biosystems (Figura 9), el cual ofrece varias ventajas frente a los métodos convencionales utilizados en la electroforesis convencional. Su capacidad de procesar hasta 24 muestras al mismo tiempo acelera significativamente el proceso de análisis y mejora la eficiencia del laboratorio. Además, es altamente preciso al reducir la posibilidad de errores humanos y minimizar la variabilidad en los resultados, garantizando una mayor reproducibilidad de los experimentos. El equipo también cuenta con un software integrado que permite el control de instrumentos, la recopilación de datos, el control de calidad, la determinación de la base o el tamaño de las muestras, así como el análisis de datos y la generación de informes de resultados.(41)



Figura 9. Analizador genético de Applied Biosystems modelo 3500xL, utilizado para realizar electroforesis capilar.(41)

1.5 Generalidades del laboratorio Genexa ADN evolutivo

1.5.1 Antecedentes

Es un laboratorio constituido por un equipo de larga trayectoria en el rubro de la genética molecular. Fueron pioneros en otra empresa llamada Genia y visualizaron la oportunidad de especializarse en el sector agropecuario y alimentario dando origen a Genexa (Figura 10). Por eso hablamos de evolución, y para llevarlo a la jerga de trabajo hablamos de un "ADN evolutivo".(42)

Es un laboratorio de biología molecular en Uruguay que ofrece técnicas innovadoras y servicios de laboratorio de diferentes complejidades para los sectores agropecuario y de alimentos. Además, se desarrollan nuevos productos a demanda.(42)

Se trabaja en la mejora continua de los procesos con el objetivo de lograr la excelencia en el producto, los mejores plazos y precios en el mercado. Cuentan con tecnología de última generación y un equipo conformado por capital humano altamente capacitado.(42)



Figura 10. Logo de Genexa ADN EVOLUTIVO.(43)

1.4.2 Visión

Ser una empresa de referencia tanto a nivel local como regional en la prestación de servicios de laboratorio y en el desarrollo de productos innovadores en los sectores agropecuario y alimentos con el objetivo de otorgar soluciones integrales a nuestros clientes, convirtiéndonos en socios estratégicos.

1.4.3 Misión

Satisfacer las necesidades de los clientes en análisis de laboratorio utilizando técnicas de biología molecular, tanto en el sector agropecuario como en alimentos ofreciendo soluciones tecnológicas innovadoras y apostando a la mejora continua.

1.4.4 Política de Calidad

En Genexa se comprometen a:

- 1) Conocer y entender las necesidades y expectativas del cliente o partes interesadas para brindarle un servicio preciso y confiable.
- 2) Poner a disposición de nuestros clientes equipamiento de vanguardia y los beneficios de nuevos desarrollos.
- 3) Apostar a la satisfacción del cliente que medimos en términos de fidelidad, confiabilidad y entrega a tiempo de los análisis.
- 4) Desarrollar servicios de alto valor agregado, con precios competitivos que aseguren un crecimiento sostenible.
- 5) Favorecer la realización profesional y personal de nuestros colaboradores, fomentando la capacitación continua y el desarrollo de valores esenciales.
- 6) Cuidar el medio ambiente a través de buenas prácticas profesionales.
- 7) Crear planes de trabajo y comunicación asidua con proveedores locales para garantizar la provisión de insumos.
- 8) Aplicar el concepto de mejora continua en nuestros procesos.

- 9) Cumplir con los requisitos legales y reglamentarios.
- 10) Analizar la competencia en busca de nuevas oportunidades y entablar alianzas o acuerdos nacionales o internacionales para aumentar las ventas y los servicios ofrecidos.
- 11) Ser referentes como laboratorio, lugar de trabajo y equipo humano en el desarrollo de nuevos productos a demanda del cliente y prestador de servicios utilizando tecnología de punta y con precios competitivos en el sector agropecuario y alimentos.

1.4.5 Actualidad de Genexa

A través del uso de los marcadores recomendados por la ISAG, Genexa brinda el servicio de verificación de ascendencia y/o descendencia de bovinos, equinos, ovinos, caninos, caprinos y aves por ADN utilizando equipamiento de última generación y bases de datos de más de 500.000 animales analizados. (32)

A partir de diferentes tipos de muestras biológicas se obtiene un perfil de ADN único del animal. El laboratorio realiza la determinación de paternidad y/o maternidad dentro del mismo servicio a través de la comparación del perfil de la cría con el o los perfiles del supuesto padre y/o madre. El laboratorio dispone de un panel adicional de marcadores recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para casos de una única exclusión.(32, 43)

Respecto a los análisis realizados en equinos, Genexa ofrece además de la tipificación equina varias otras enfermedades que afectan a estos animales tales como influenza equina, toxoplasmosis, neospora, parálisis periódica hipercalémica (HYPP), acumulación de glicógeno tipo IV y análisis de *array* que cuenta con 670.796 marcadores.(43)

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar dos ensayos con técnicas moleculares para identificar enfermedades genéticas hereditarias en caballos que causan la ceguera nocturna congénita estacionaria y el síndrome de overo letal blanco.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras en buenas condiciones de las dos razas de caballos a estudiar y extraer el ADN utilizando dos métodos, uno propio del laboratorio y otro con un kit comercial.
- Detectar la inserción de 1378 pb en el gen TRPM1 (ECA1) que causa ceguera nocturna congénita estacionaria y la mutación *missense* de un par de bases en el gen EDNRB (ECA17) que causa el overo letal. Determinando si un caballo es normal, portador o afectado para estas enfermedades.
- Determinar los parentescos de los caballos y verificar la heredabilidad de las enfermedades utilizando la tipificación mediante microsatélites. Además, de chequear mediante muestras controles y muestras de interlaboratorio la veracidad de los resultados obtenidos de las enfermedades.
- Determinar la viabilidad económica, posibles clientes, tamaño del mercado, precio de venta y competencias en la región a partir de un análisis del mercado.

3. Materiales y métodos

Todos los reactivos, insumos y equipos utilizados durante este trabajo fueron brindados por el laboratorio Genexa ADN EVOLUTIVO.

3.1 Diseño de primers

Basándose en la bibliografía fueron sintetizados los primers específicos necesarios para cada una de las enfermedades lo cual fue solicitado a Macrogen.(20, 27)

Además, para la realización de las tipificaciones mediante microsatélites una técnica ya puesta a punto en el laboratorio donde ya se contaba los primers recomendados por la ISAG.

3.1.1 Complejo leopardo

Para la detección del genotipo que determina el complejo leopardo se utilizaron tres primers, dos *forwards* y uno *reverse* marcado con FAM (Tabla 3) y su diseño característico para detectar las variantes posibles del gen TRPM1 (Figura 11).

Tabla 3. Primers utilizados para amplificar las variantes del gen TRPM1.(20)

Código	Secuencia	Marcado
TRPM1-N-F	CCGACTTGGGTAGCAACTGA	-
TRPM1-M-F	AAGGGCAGTTAAAAGCAGCA	-
TRPM1-R	CTCGCAATCAGTGAATGAA	FAM

El fluoróforo FAM utilizado en el primer TRPM1-R permitirá la detección de los fragmentos obtenidos luego de realizar la electroforesis capilar.



Figura 11. Diseño de primers para detectar las variantes del gen TRPM1. Se observa en negro el gen normal y en rayas la inserción de 1378 pb.(20)

3.1.3 Tipificación equina

Para determinar el perfil genético de los equinos se utilizaron los 17 pares de primers marcados con cuatro fluoróforos distintos FAM, NED, VIC y PET para amplificar los microsatélites recomendados por la ISAG (Tabla 5) (Anexo 1). Es de suma importancia que amplicones obtenidos que están marcados con el mismo fluoróforo no tengan el mismo tamaño para evitar confusiones en la detección. Este ensayo se realizó para verificar las paternidades y la heredabilidad de las enfermedades.

Tabla 5. Primers utilizados en el primer mix de equinos.(32)

Primer	Forward*	Reverse
HTG7	NED- CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG	ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT
HTG6	VIC- CTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT	GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCTC
ASB23AD	VIC- GGCAGCAGGTTGGGAAGG	ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC
HTG10AD	NED- CCTAATGTCATATGGAAAGCCTTG	GGCTTTTTATTCTGATCTGTCACATTT
HTG4	FAM- CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC	CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC
AHT4	FAM- AACCGCCTGAGCAAGGAAGT	GCTCCCAGAGAGTTTACCCT
HMS7	FAM- CAGGAAACTCATGTTGATAACCATC	TGTTSTTGAAACATAACMTTGACTGT
HMS6	VIC- GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG	CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA
HMS2	NED- ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG	CTTGCAAGTCGAATGTGTATTAAATG
ASB17	PET- GAGGGCGGTACCTTTGTACC	ACCAGTCAGGATCTCCACCG
LEX3	PET- AACTCTAACCAGTGCTGAGACT	GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC
HMS1	PET- CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG	TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC
HMS3AD	FAM- ACATCAGTCAGAAGCTGCGAAC	CCTCTTGCTCTAAAGCCCCA
AHT5	VIC- ACGGACACATCCCTGCCTGC	GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC
VHL20AD	FAM- CGCAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG	GTAACTCAGGAGAATCTTCCTCAG
ASB2	VIC- CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG	CACAACTGAGTTCTCTGATAGG
CA425	PET- AGCTGCCTCGTTAATTCA	CTCATGTCGCTTGTCTC

*Se marcan todos los primers forward con el fin de identificarlos luego en la detección.

3.2 Muestras

A partir de los caballos seleccionados e identificados se tomaron muestras de pelos con bulbo los cuales fueron almacenados en sobres rotulados con la codificación del animal correspondiente para mantener la trazabilidad de estas. Para la extracción de la muestra se identificó y limpió el lugar de donde se iba a sacar el pelo para reducir el riesgo de contaminación de la muestra. Se separó un mechón de la crin o de la cola, se enrolló en el dedo índice y se tiró. Fue importante contar con un mechón de no menos de 20 o 25 pelos con bulbos debido a que el ADN nuclear se encuentra en esta zona. Cabe destacar que, aunque existen

otras matrices de muestras como la sangre, el semen o la biopsia, se eligió la extracción de pelos con bulbo porque es la menos invasiva para los animales

Se obtuvieron muestras de la cabaña “Haras Don Carmine” y “Sebastián Pimienta” quienes facilitaron muestras de las razas Appaloosa y Paint Horse, respectivamente.

3.3 Extracción de ADN

3.3.1 Método propio

Para extraer el ADN del pelo se cortaron 3 bulbos pilosos de cada muestra dentro de un tubo de 200 μ L correctamente rotulado con el código de muestra para seguir la trazabilidad y no generar resultados erróneos con otra muestra. Se procedió al aislamiento del ADN con un método propio del laboratorio el cual cuenta con una enzima para realizar la lisis de las células.

3.3.2 Método comercial

Para la extracción por el método comercial se utilizó un kit que contiene varias soluciones para realizar la extracción, precipitación de proteínas, lavados y rehidratación del ADN. Se podría procesar otro tipo de muestras con esta extracción tales como sangre, carne, hueso, cepillo bucal, hisopos o papeles con sangre. En este caso se realizó con pelos, para ello se utilizó un tubo de 1,5 mL en el cual se corta bulbos pilosos. Se le agregó la solución mencionada anteriormente y se incubó en un termobloque.

3.4 Cuantificación de ADN

Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorción de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

La determinación de la concentración y calidad del ADN se realizó mediante absorbancia a 260/280 nm utilizando el lector de microplaca Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan), la placa NanoQuant Plate™ y el software i-control.

3.5 Amplificación

Para las amplificaciones de las variantes del complejo leopardo y del overo letal se utilizó un mastermix comercial altamente específico. Este contiene una ADN polimerasa de alto rendimiento, termoestable, que sirve para una gran variedad de moldes y sumamente específica con una tasa de error de 1×10^7 en comparación a las polimerasas estándares que tienen una tasa de error 1×10^3 .

Para la amplificación de tipificación equina se utilizó otro mastermix comercial que permite realizar una PCR multiplex el cual nos brinda la capacidad obtener hasta 20 amplicones de una sola vez.

Se utilizaron termocicladores de tiempo final para realizar las amplificaciones, claramente con sus diferencias de ciclos debido a sus diferentes temperaturas de *annealing* y enzimas utilizadas.

En cada paso de amplificación debe utilizarse ADN en una concentración adecuada para que al interaccionar con los reactivos y pasen por su ciclo de amplificación el electroferograma obtenido no presente exceso o ausencia de señal. Para el análisis de fragmentos y el de tipificación mediante microsatélites se utilizó una concentración de 20 ng/ μ L mientras que para la secuenciación se utilizó de 150 ng/ μ L.

3.5.1 Complejo leopardo

Para amplificar los fragmentos de ADN relacionados con la enfermedad del LP, se empleó un mastermix que incluye una ADN polimerasa altamente específica, junto con los tres primers mencionados en el punto 3.1.1. La reacción se llevó a cabo en un termociclador tiempo final con las condiciones adecuadas para la amplificación. Después de completar el ciclo de amplificación, se purificó el ADN amplificado y se preparó para su carga en el equipo de detección.

3.5.2 Overo letal

Para la amplificación de la región asociada a la enfermedad LO se utilizó la técnica de secuenciación de Sanger. Se amplificaron las secuencias correspondientes utilizando los dos primers previamente mencionados en el punto 3.1.2 y un mastermix con una ADN polimerasa altamente específica. La reacción se llevó a cabo en un termociclador tiempo final con las condiciones adecuadas para la amplificación. Posteriormente, se realizó una reacción de purificación para eliminar los dNTPs y los primers restantes de la solución. Luego, se llevó a cabo la reacción de secuenciación utilizando el primer *reverse* y ddNTPs marcados con fluoróforos para teñir las bases, lo que permitió su detección posterior. Finalmente, se realizó una reacción de purificación de la secuencia para eliminar los ddNTPs sobrantes y el ADN resultante fue preparado para ser cargado en el equipo de detección.

3.5.3 Tipificación equina

La tipificación equina por microsatélites se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la ISAG. En primer lugar, se preparó un primer-mix con los primers mencionados en el punto 3.1.3 junto con el mastermix que permitió la amplificación de múltiples microsatélites simultáneamente. La reacción de amplificación se realizó en el termociclador, con el ciclo adecuado y tiempo final. Una vez finalizado el ciclo, el ADN se preparó para ser cargado en el equipo de detección, donde se llevó a cabo la identificación de los microsatélites y la tipificación equina.

3.6 Detección

Se utilizó el analizador genético de Applied Biosystems, específicamente la serie 3500 XL de 24 capilares para llevar a cabo la detección de los ensayos realizados. Este equipo cuenta con dos softwares incluidos: GeneMapper® para el análisis de fragmentos en el cual detectamos el complejo leopardo (LP) y la tipificación mediante microsatélites, y Sequence Analysis para el análisis de secuencias (LO).

Para el análisis de fragmentos se empleó formaldehído, un marcador de peso molecular o escalera de tamaño conocido llamada LIZ500 y el ADN previamente amplificado.

El formaldehído se usa para fijar el ADN, conservar su integridad evitando su degradación durante la electroforesis y facilitando la detección de los fragmentos de ADN. Para evitar la formación de estructuras secundarias en el ADN que puedan obstaculizar su separación por electroforesis, se suele enfriar rápidamente la muestra sumergiéndola en hielo durante 5 minutos después de desnaturalizarla a 99°C. Posteriormente, el ADN se carga en el equipo 3500xL para su análisis.

En cuanto al análisis de secuencias, se utilizó solución SAM, resina y el ADN previamente amplificado. La solución SAM es un tampón proveniente de un kit comercial utilizado para la reacción de secuencia que se utiliza para la preparación de las muestras, que ayuda a eliminar las impurezas y a preparar el ADN para la unión a la resina. La resina es un material que se utiliza para inmovilizar el ADN en una columna, para su posterior purificación y concentración antes de la secuenciación. Juntos, la solución SAM y la resina ayudan a garantizar la calidad y la pureza del ADN para su posterior análisis. Después de mezclar la muestra con la solución SAM y la resina por inversión, se carga en el equipo 3500xL para su análisis.

4. Resultados y discusión

4.1 Muestras

Se analizaron ejemplares de las dos razas en cuestión, Appaloosa y Paint Horse. Algunas muestras se obtuvieron en el lugar donde estaban los caballos y las restantes fueron enviadas al laboratorio por parte de los productores. En este caso, se utilizaron muestras de pelo como una opción de toma de muestras menos invasiva para los caballos (Figura 13). Aunque existen otras opciones, como la toma de muestras de sangre, semen o biopsias, que pueden proporcionar información más detallada o específica pero que son técnicas más invasivas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, en algunos casos, el análisis de otros tipos de muestras podría ser necesario para obtener información adicional. Por ejemplo, en el caso de la toma de muestras de sangre puede ser necesaria para detectar enfermedades infecciosas, analizar niveles de ciertas sustancias en la sangre, como electrolitos o hormonas.(44)

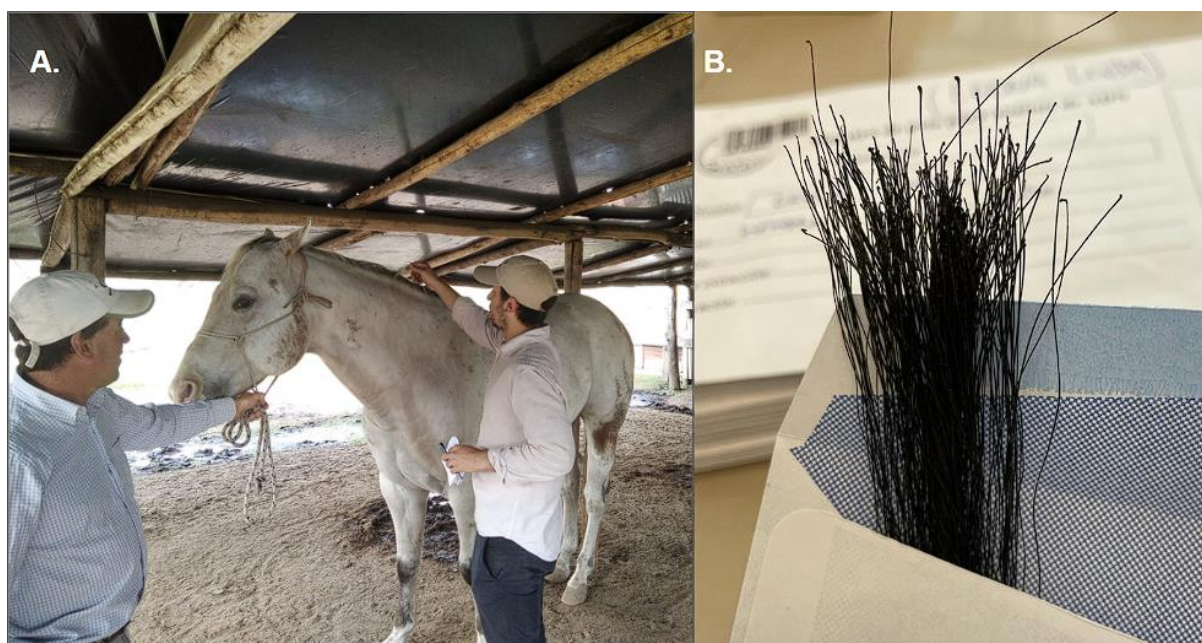


Figura 13. Toma de muestra. (A) Toma de la muestra de pelos desde un caballo en la cabaña “Haras Don Carmine”. (B) Pelo con bulbos pilosos obtenidos.

Obtener muestras de pelo con bulbos es importante porque es donde se encuentra el ADN nuclear. El ADN nuclear es el tipo de ADN que se utiliza más comúnmente en los análisis genéticos, ya que contiene la mayoría de los genes que determinan las características hereditarias de un organismo, como la predisposición a ciertas enfermedades, rasgos físicos y

otros rasgos complejos. La raíz o el bulbo piloso del cabello es donde se encuentra el ADN nuclear, por lo que es esencial obtener una muestra de cabello que incluya esta parte del folículo para asegurar la presencia de ADN nuclear.(45)

Sin la presencia del bulbo piloso, si se obtiene ADN solo se obtendrá ADN mitocondrial, que es menos útil en los análisis genéticos debido a que solo contiene información limitada sobre ciertos rasgos hereditarios. El tallo del cabello, que se origina a partir del bulbo piloso, es el que se observa en la superficie del cuero cabelludo y se proyecta fuera de la piel. Sin embargo, el tallo del cabello sufre un proceso de queratinización y endurecimiento, lo que provoca la degradación del núcleo y la disminución de la cantidad de ADN nuclear presente en la muestra. Por esta razón, la obtención de una muestra de cabello con el bulbo piloso es esencial para asegurar la presencia de ADN nuclear y obtener resultados más precisos en los análisis genéticos.(45, 46)

Se rotuló con un código interno en el laboratorio para mantener la trazabilidad de las muestras durante los pasos del ensayo el cual consta de un número especificando el animal de referencia y se denominó a los caballos de raza Appaloosa como “APP” y a los Paint Horse como “PH”. Además, en los animales que se sabía la ascendencia se solicitó a los criadores que nos facilitaran esta información con el fin de realizar posteriormente el test de paternidad o también llamado cruzamiento.

4.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se realizaron dos técnicas distintas, una propia de Genexa que se denominó con la letra “P” y una comercial con la letra “W”. Luego de seguir los pasos de extracción y cuantificación se observa las distintas concentraciones obtenidas para cada muestra (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de métodos de extracción de ADN. Se observa la absorbancia a 260 nm, absorbancia a 280 nm, concentración en ng/μL, relación A260/280 y código de muestra.

EXTRACCIÓN PROPIA					EXTRACCIÓN COMERCIAL				
260	280	ng/μl	Ratio	Muestra	260	280	ng/μl	Ratio	Muestra
0,078	0,077	78,00	1,01	PH1-P	0,144	0,067	144,00	2,13	PH1-W
0,079	0,078	79,40	1,02	PH2-P	0,162	0,077	162,10	2,11	PH2-W
0,056	0,067	56,00	0,83	PH3-P	0,069	0,031	68,70	2,25	PH3-W
0,172	0,160	172,30	1,07	PH4-P	0,243	0,116	243,40	2,11	PH4-W
0,129	0,117	128,60	1,10	PH5-P	0,263	0,125	263,40	2,10	PH5-W
0,196	0,176	195,60	1,11	PH6-P	0,405	0,194	405,40	2,09	PH6-W
0,168	0,143	168,50	1,18	PH7-P	0,309	0,147	308,90	2,10	PH7-W
0,064	0,072	64,40	0,89	PH8-P	0,112	0,053	112,30	2,11	PH8-W
0,060	0,067	60,30	0,91	APP1-P	0,037	0,015	36,80	2,50	APP1-W
0,111	0,105	110,70	1,06	APP2-P	0,501	0,241	501,40	2,08	APP2-W
0,112	0,104	111,50	1,07	APP3-P	0,291	0,139	290,90	2,09	APP3-W
0,128	0,119	128,40	1,08	APP4-P	0,248	0,118	247,80	2,10	APP4-W
0,064	0,072	64,40	0,89	APP5-P	0,112	0,053	112,30	2,11	APP5-W
0,164	0,137	164,40	1,20	APP6-P	0,362	0,174	362,10	2,08	APP6-W
0,101	0,104	100,70	0,97	APP7-P	0,119	0,057	119,10	2,10	APP7-W
0,157	0,139	156,80	1,13	APP8-P	0,209	0,101	208,80	2,08	APP8-W
0,069	0,079	68,90	0,88	APP9-P	0,180	0,087	179,80	2,07	APP9-W
0,075	0,073	75,40	1,03	APP10-P	0,146	0,071	145,60	2,06	APP10-W
0,123	0,110	122,90	1,12	APP11-P	0,316	0,154	316,20	2,05	APP11-W
0,072	0,074	71,50	0,96	APP12-P	0,058	0,028	58,00	2,04	APP12-W
0,106	0,095	105,80	1,11	APP13-P	0,540	0,266	539,60	2,03	APP13-W
0,108	0,096	108,20	1,12	APP14-P	0,262	0,127	262,10	2,06	APP14-W
0,120	0,106	119,80	1,12	APP15-P	0,398	0,193	397,70	2,07	APP15-W
0,103	0,094	102,50	1,08	APP16-P	0,573	0,282	572,70	2,03	APP16-W
0,041	0,048	40,80	0,85	APP17-P	0,011	0,003	10,90	3,76	APP17-W
0,196	0,176	195,60	1,11	APP18-P	0,405	0,194	405,40	2,09	APP18-W

La relación A260/280 se utiliza para determinar la pureza del ADN, se considera que una pureza óptima tiene un valor entre 1,8-1,9. Un valor menor a 1,8 indica una posible presencia de proteínas u otros contaminantes. Un valor mayor a 2,1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra (47, 48)

Se observa en general que la técnica de extracción comercial proporciona una mayor cantidad de ADN en comparación con la técnica de extracción propia esto se debe a que se utiliza más cantidad de pelos respecto a la propia, siendo 15 pelos para la comercial y 3 pelos para la propia siendo una de las razones porque cuantifica mayor cantidad de ADN.

Además, la extracción comercial cuenta con soluciones para realizar la precipitación de proteínas, lavados y rehidratación del ADN, lo que contribuye a obtener una mayor cantidad de ADN nuclear de forma eficiente. La extracción propia tiene un promedio de concentración de 249.05 ng/ μ L y un promedio de ratio de 2.17, mientras que la propia tiene 109.67 y 1.03 respectivamente.

En algunos casos, como en las muestras APP1, APP12 y APP17 (Tabla 6) que no tenían bulbos los bulbos necesarios para realizar la extracción de forma correcta, se observó una concentración de ADN mayor mediante la técnica de extracción propia en comparación con la extracción comercial. Esto puede deberse a que en la extracción comercial se está cuantificando únicamente el ADN nuclear (ADNnu) ya que al realizar la purificación se retiran las proteínas de la solución, mientras que en la técnica propia se puede estar cuantificando proteínas. Esto se contrasta con el ratio de las muestras mediante extracción propia donde se ven números menores a 1.8.

Es importante destacar que el ADN obtenido de ambas técnicas es válido y suficiente para realizar los ensayos correspondientes. Si bien la técnica de extracción comercial proporciona una mayor cantidad de ADNnu, la extracción propia es una opción más económica. Sin embargo, en algunos casos donde el ADN se encuentra en concentraciones demasiado bajas, como en la muestra APP17-W (Tabla 6) extraída con la técnica comercial no llega al mínimo requerido para realizar la técnica de fragmentos, esto puede influir en la PCR y, por lo tanto, en la calidad de los resultados obtenidos. En estos casos, si los resultados obtenidos no alcanzan la calidad necesaria, se solicita al productor una nueva muestra. En conclusión, ambas técnicas han demostrado ser eficientes en la extracción de ADN a partir de pelos y deben elegirse según las necesidades y objetivos específicos de cada experimento.

Para saber para cuantos ensayos podemos utilizar la muestra es variable ya que depende de concentración obtenida de la extracción, lo cual varía dependiendo la calidad de la muestra y cuantos bulbos se utilicen para realizar la extracción de ADN.

Se utilizaron concentraciones de 20 ng/ μ L para el análisis de fragmentos y 150 ng/ μ L para el análisis de secuencia. Se realizaron las diluciones adecuadas para cada muestra previo a la amplificación.

4.3 Amplificación y detección

Para la puesta a punto de la amplificación se utilizó el ADN obtenido de la extracción comercial teniendo en cuenta que se obtiene el ADN nuclear más puro con los pasos de purificación que esta técnica tiene. Se realizaron pruebas de temperatura de annealing de la primera PCR con muestras controles en un gel de Agarosa (Figura 14). Esta prueba se realizó con el fin de poder amplificar ambos genes en el mismo termociclador ahorrando tiempos y equipos en uso. Se establecieron tres parámetros para la amplificación utilizando las recomendaciones del kit comercial utilizado para la amplificación: la concentración de los reactivos, la cantidad de ciclos y el tiempo. Posteriormente, se probó la concentración de ADN para cada ensayo, siendo necesaria una menor cantidad de ADN para los fragmentos en comparación con la secuenciación.

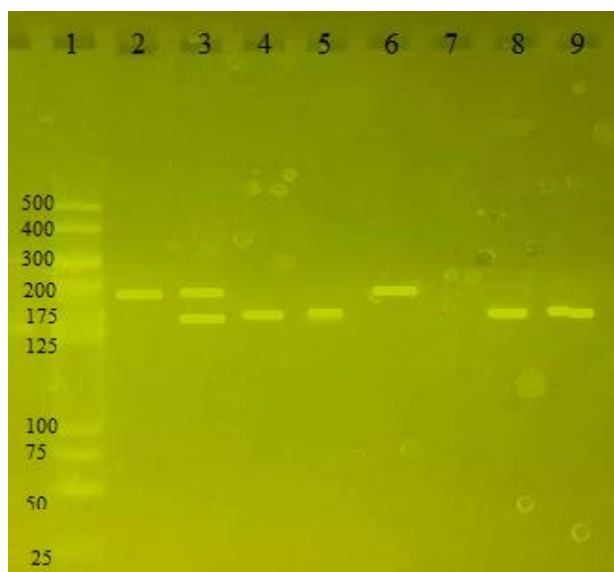


Figura 14. Prueba inicial en gel de agarosa con dos temperaturas de annealing para la PCR. En el carril 1 se encuentra el MPM, del 2-5 Tm “A” y de 6-9 Tm “B”. Se probaron las mismas muestras control para verificar la mejor Tm de la primera PCR. (1) Marcador de peso molecular (HyperLadder™ 25 pb); (2) APP10 - LP/LP; (3) APP2 - LP/lp; (4) PH8 - LO/lo; (5) PH1 - lo/lo; (6) APP10 - LP/LP; (7) APP2 - LP/l; (8) PH8 - LO/lo; (9) PH1 - lo/lo.

Este ensayo se realizó para comprobar cuál de las Tm serviría para los dos ensayos con el fin de realizar la primera amplificación de las enfermedades en conjunto ahorrando tiempos y utilizar un solo termociclador. A pesar de que en el caso del ensayo detectado mediante secuenciación LO no vamos a tener un resultado visual a partir del gel, a raíz de esta prueba se obtuvo que la mejor temperatura de amplificación para cumplir esto era la Tm “A” ya que se

visualizan las bandas desde el carril 2 al 5, sin embargo, en la Tm “B” en el carril 7 no se observan bandas dando como resultado que esta temperatura no sirve para este ensayo. Se seleccionó la Tm “A” para continuar.

Además, se observa que el tamaño de bandas es el esperado para los dos ensayos. En el análisis de fragmentos para detectar el LP se espera del alelo normal una banda de 168 pb y el mutado una banda de 225 pb, mientras que en el análisis de secuencia se espera un fragmento amplificado de unos 190 pb.

En el caso de las tipificaciones de equinos ya se tenía puesto a punto en el laboratorio el procedimiento a realizar para ello y todos los parámetros mencionados anteriormente.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado con el fin de probar los dos métodos de extracción y además corroborar el análisis.

Se llevaron a cabo dos enfoques distintos para detectar las mutaciones, ya que la inserción responsable de la CSNB se detecta mediante análisis de fragmentos, mientras que la mutación puntual de dos pares de bases asociada al overo letal se detecta mediante secuenciación.

4.3.1 Complejo leopardo

Según el diseño de primers planteado, cuando el tamaño de la amplificación es de 186 pb el alelo es normal, mientras que si el resultado es de un amplicón de 225 pb el alelo es afectado. A continuación, se observan los posibles resultados esperados al realizar el ensayo de complejo leopardo (Tabla 7).

Tabla 7. Cuadro de interpretación de la para el complejo leopardo (LP).

Genotipo	Animal	Resultado
lp/lp	Normal	Dos copias del alelo normal presentes.
LP/lp	Portador	El alelo mutante y el normal están presentes. El caballo es portador de la CSNB y tiene riesgo de contraer ERU.
LP/LP	Afectado	Dos copias del alelo mutado presentes. El caballo desarrollará la CSNB y tiene riesgo mas alto de contraer ERU.

*Riesgo de ERU: LP/LP > LP/lp > lp/lp.

El análisis de fragmentos se realizó en el software GeneMapper™ ID-X, el cual tenemos que configurarlo con nuestras necesidades previamente de forma correcta para poder visualizar el resultado obtenido. Por ejemplo, existe una pestaña que se llama “*Analysis method*” previo a correr el ensayo donde se pueden determinar valores teóricos generales para el análisis de fragmentos desde un número de tolerancia en donde podría caer un alelo, los fluoróforos a utilizar, la calidad del alelo obtenido, etc. Otra pestaña que se debe modificar se llama “*panel*” donde en este caso son valores más específicos de lo que vas a estudiar cómo sería el nombre de los marcadores, los rangos teóricos de donde podrían caer nuestros marcadores y el rango teórico de donde se observarían los alelos dentro de estos marcadores o también denominado “*bins*”, en este caso no se observan bins ya que es un análisis de dos fragmentos nada más por lo que es algo más simple en comparación a la tipificación por microsatélites que si se observaran más detalles como estos. Otra pestaña por configurar sería la escalera o marcador de peso molecular que se utilice asignándole los distintos tamaños de fragmentos que estas traen con el fin que se asignen de forma correcta. También, se puede seleccionar los distintos fluoróforos a observar ya que en este caso se utiliza únicamente el FAM, mientras que más adelante en la tipificación se utilizaran más. En este caso vamos a estar tratando con un “*Analysis method*” llamado equinos y “*panel*” que se diseñó para este ensayo denominado “*Leopardo Appaloosas*”, en donde se definen en que ubicación deberían observar los alelos normales y los mutados según la bibliografía. Como se observa están marcados con el FAM el cual se visualiza de color azul en el programa (Figura 15-17).

Se observan los resultados obtenidos de realizar el análisis de fragmentos (Figura 15-17), en el caso que esté presente únicamente el alelo normal se obtiene un pico a los 186 pb siendo homocigota normal (Figura 15), en el caso que se tenga los dos alelos se obtiene dos picos el normal a los 186 pb y el mutado a los 225 pb siendo heterocigota (Figura 16), y si tenemos únicamente el alelo mutado a los 225 pb es un homocigota mutado (Figura 17).



Figura 15. Análisis de fragmentos. Muestra APP5-W homocigota normal (lp/lp). Se observa únicamente el alelo normal.

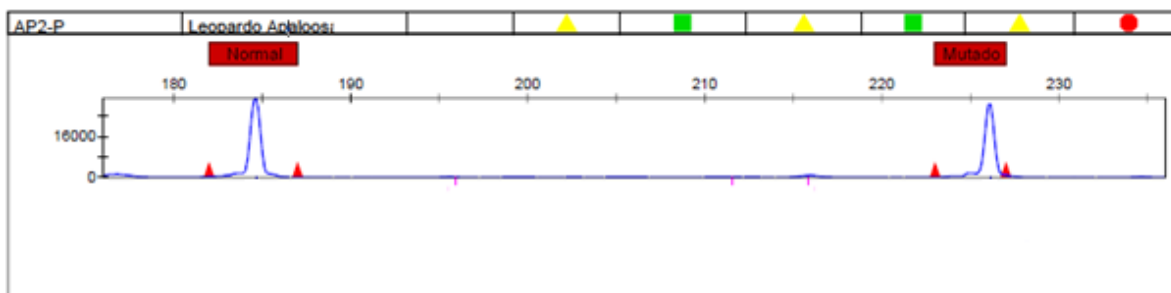


Figura 16. Análisis de fragmentos. Muestra APP2-P heterocigota LP/lp. Se observa los dos alelos, el normal y el mutado.

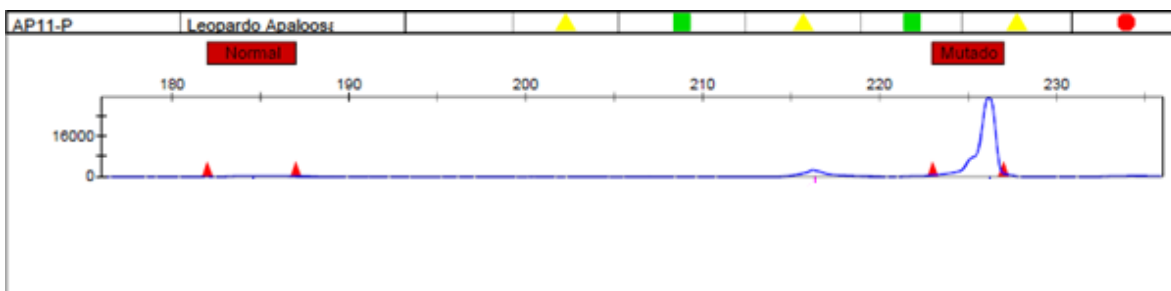


Figura 17. Análisis de fragmentos. Muestra APP11-P homocigota mutado LP/LP. Se observa únicamente el alelo mutado.

Se obtuvieron buenos resultados con las dos técnicas de extracción, ya sea utilizando la técnica comercial (Figura 15) como la propia (Figura 16 y 17).

Luego de analizar las 18 muestras por duplicado para determinar la robusticidad del método, se obtienen los siguientes resultados: 1 muestra homocigota normal lp/lp, 8 muestras heterocigotas LP/lp y 9 muestras homocigotas mutados LP/LP (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de resultados obtenidos del complejo leopardo.

Código	Resultado	Animal
APP1	LP/LP	Afectado
APP2	LP/lp	Portador
APP3	LP/lp	Portador
APP4	LP/lp	Portador
APP5	lp/lp	Normal
APP6	LP/LP	Afectado
APP7	LP/lp	Portador
APP8	LP/LP	Afectado
APP9	LP/LP	Afectado
APP10	LP/LP	Afectado
APP11	LP/LP	Afectado
APP12	LP/LP	Afectado
APP13	LP/lp	Portador
APP14	LP/LP	Afectado
APP15	LP/LP	Afectado
APP16	LP/lp	Portador
APP17	LP/lp	Portador
APP18	LP/lp	Portador

Únicamente un animal es normal correspondiendo al 6% de la población analizada, el 44% de los animales son portadores de la enfermedad CSNB y tienen riesgo de contraer ERU, y el 50% de los animales son afectados con CSNB y riesgos más altos de contraer ERU (Figura 18).

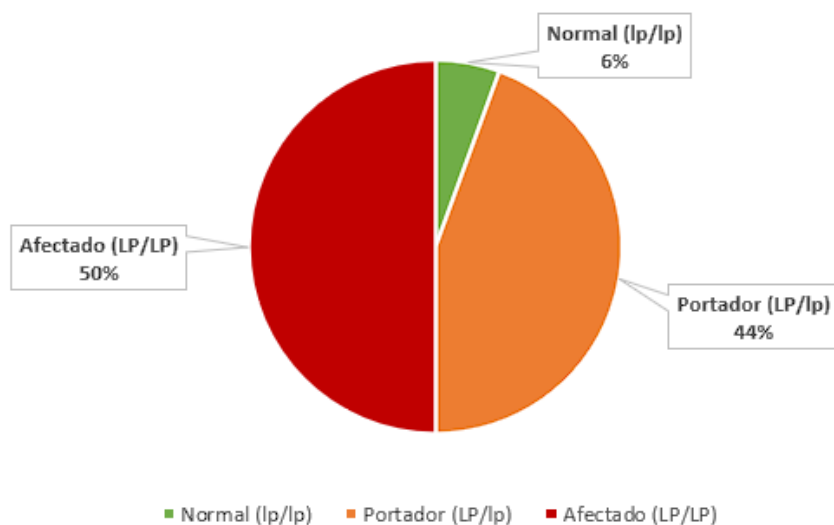


Figura 18. Resultados obtenidos en porcentajes del complejo leopardo.

Estos resultados no representan la incidencia general de la enfermedad del 30% ya que el número de muestras analizadas es pequeño y pertenece a un único productor. (14) En este caso, es una incidencia elevada debido a que se utiliza principalmente un padrillo que es afectado (APP8 o APP1) o portador (APP2 o APP3) para reproducirse (Figura 19). Se contaba con información del 72% de un padre o madre para estos caballos.

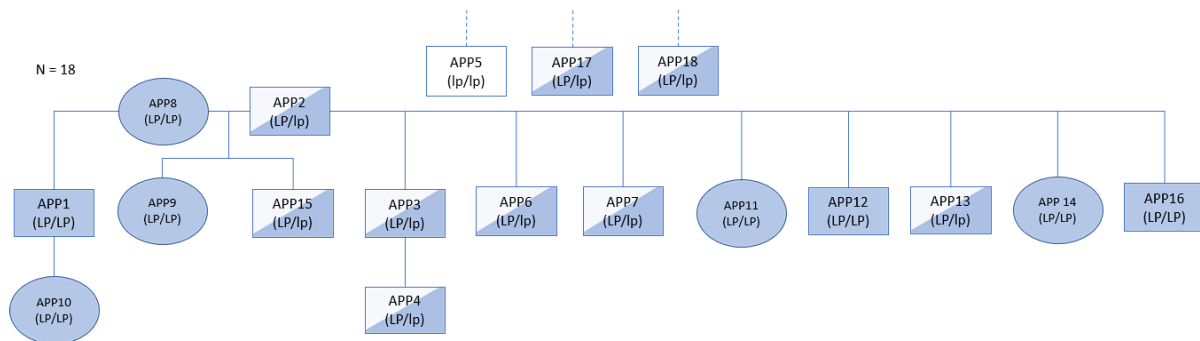


Figura 19. Árbol genealógico. Se ve la alta incidencia de la enfermedad debido a los padres portadores o afectados que se utilizaron para realizar el cruzamiento. No se contaba con información de ascendencia de las muestras APP5, APP17 y APP18.

En otro estudio con 43 caballos analizados se obtuvo que el 32% eran homocigotas normales, el 28% eran heterocigotas y el 40% restante eran homocigotas mutados. (13) Por otra parte, en otro estudio realizado con 146 caballos se obtuvo que el 16% eran animales homocigotas normales, el 40% eran heterocigotas y el 44% restante eran homocigotas mutados. (49)

Como forma de verificar que el ensayo se haya realizado de forma correcta se contaba con muestras control que fueron enviadas con anterioridad al Laboratorio de Veterinaria Genética de la Universidad de California Davis, una de ellas fue la APP10 que fue homocigota mutado (LP/LP) (Anexo 2) y la otra fue la APP2 siendo heterocigota (LP/lp). Además, para esta enfermedad se participó en *el comparison test internacional* organizado por la ISAG donde se procesaron tres muestras enviadas como control con resultados conocidos, los cuales fueron concluyentes a los obtenidos.

4.3.2 Overo letal

Para detectar la mutación *missense* se realizó una secuenciación de SANGER donde buscamos obtener la secuencia blanco GGGCATCA(TC/AG)GGAAACT. Se probó cuál de los dos primers revelaba mejor la secuencia en el cual se obtuvo que el primer “LWO-R” tenía una

mejor resolución frente al “LWO-F”. Como se observa (Figura 20) el primer F no tiene nada obtenido, mientras que el primer R se obtiene una buena cantidad de picos demostrando que anduvo la reacción. El pico principal que está en el F y R es la inyección inicial en el programa.

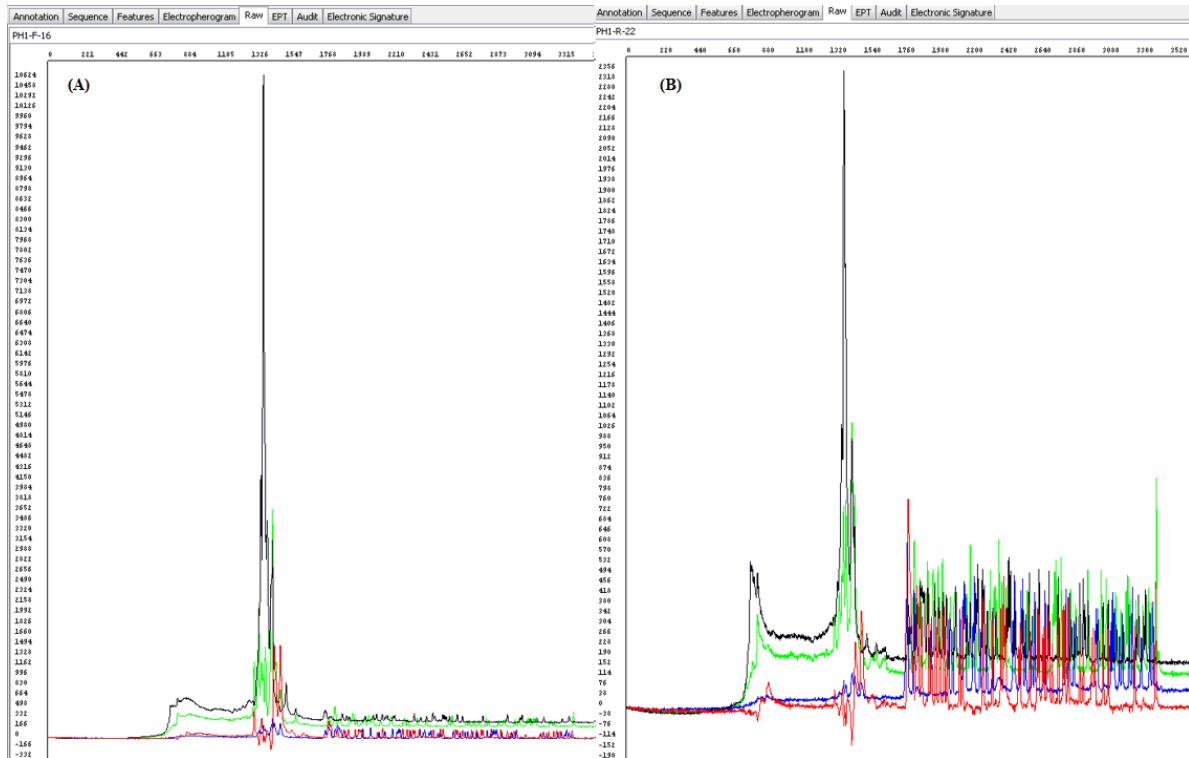


Figura 20. Análisis de secuencias, comparación de revelado con primer F (A) y primer R (B), se observan los resultados obtenidos en formato “Raw”. Es una forma rápida de observar si funcionó o no la reacción de secuencia.

Antes de empezar a analizar las secuencias en el software Sequencing Analysis™ se realizó un paso previo debido a que se utilizó el primer *reverse* para detectar la secuencia, se utilizaron dos herramientas de este software el “*reverse complement*” y el “*find*” (Figura 21). La herramienta “*reverse complement*” se utilizó para que pasar de la dirección 5’>3’ a la 3’>5 y haciendo el complemento con el fin de observar la secuencia de forma correcta. Además, se utilizó una herramienta denominada “*find*” que te busca en toda la secuencia obtenida las bases en cuestión que le propongas. En este caso se tomaron algunas pares de bases previas al lugar de la mutación y se buscó con el fin de facilitar el análisis de resultados de las muestras, esta búsqueda se puede realizar manualmente buscando la zona de interés.

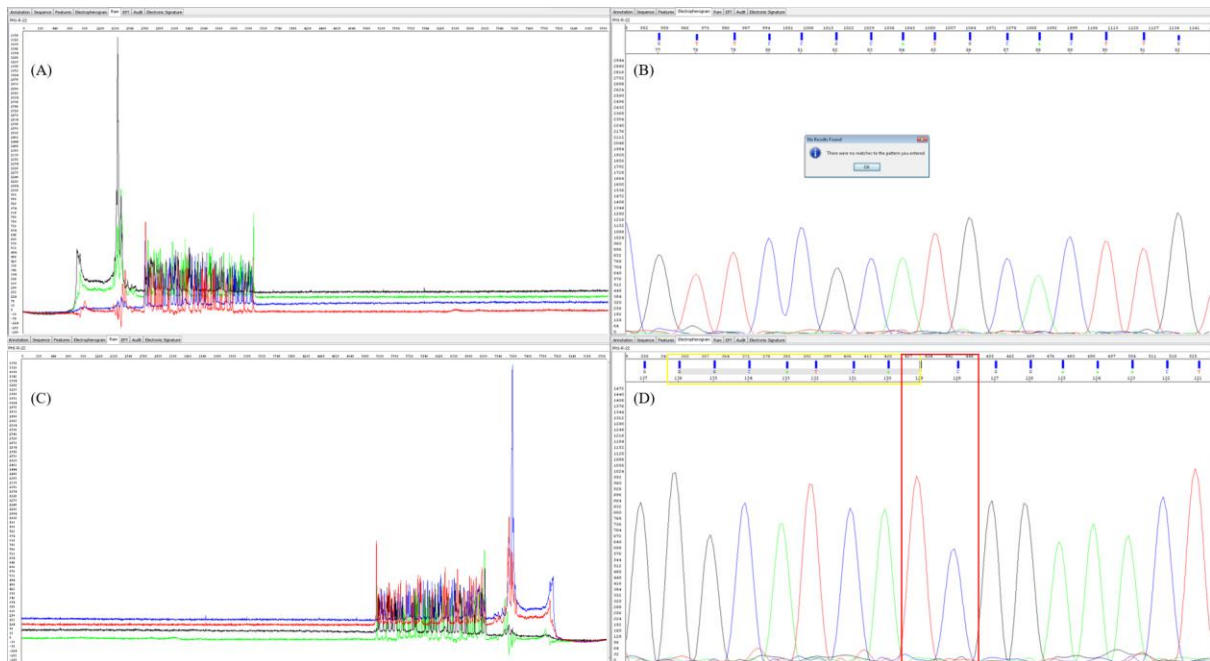


Figura 21. Análisis de secuencias, demostración de las herramientas “reverse complement” y “find” en la muestra PH1-W para encontrar la zona de mutación. (A) Se observa la data “raw” demostrando que hay buena resolución (B) Se utilizó la herramienta find y no se encontró ninguna concidencia (C) Se utilizó la herramienta “reverse complement” dando vuelta la secuencia y haciendo las bases complementarias (D) Se volvió a utilizar la herramienta “find”, donde se observa que se obtuvo la zona previa de la mutación correctamente subrayadas en gris dentro del recuadro amarillo y las bases de la zona de mutación dentro del recuadro rojo.

A continuación, se observan los posibles resultados esperados al realizar el ensayo de overo letal (Tabla 9). En este caso no se obtuvieron animales afectados LO/LO ya que se trata de una enfermedad letal y estos animales se mueren a los pocos días de nacer.

Tabla 9. Cuadro de interpretación para el overo letal (LO).

Genotipo	Animal	Resultado
lo/lo	Normal	Dos copias del alelo normal presentes.
LO/lo	Portador	El alelo mutante y el normal están presentes. El caballo es portador del LO.
LO/LO	Afectado	Dos copias del alelo mutado presentes. El caballo desarrollará el LO.

Luego de analizar la secuencia y encontrar el sitio de la mutación, se observa que las bases quedan marcadas en este caso la A en azul, T en rojo, G en negro y C en verde. Arriba de estas bases se ve la calidad del pico obtenido el cual puede ser azul, amarillo o rojo, siendo el azul la mejorar calidad. En el recuadro más arriba se observa la posición de la secuencia y a la izquierda del gráfico la intensidad de fluorescencia.

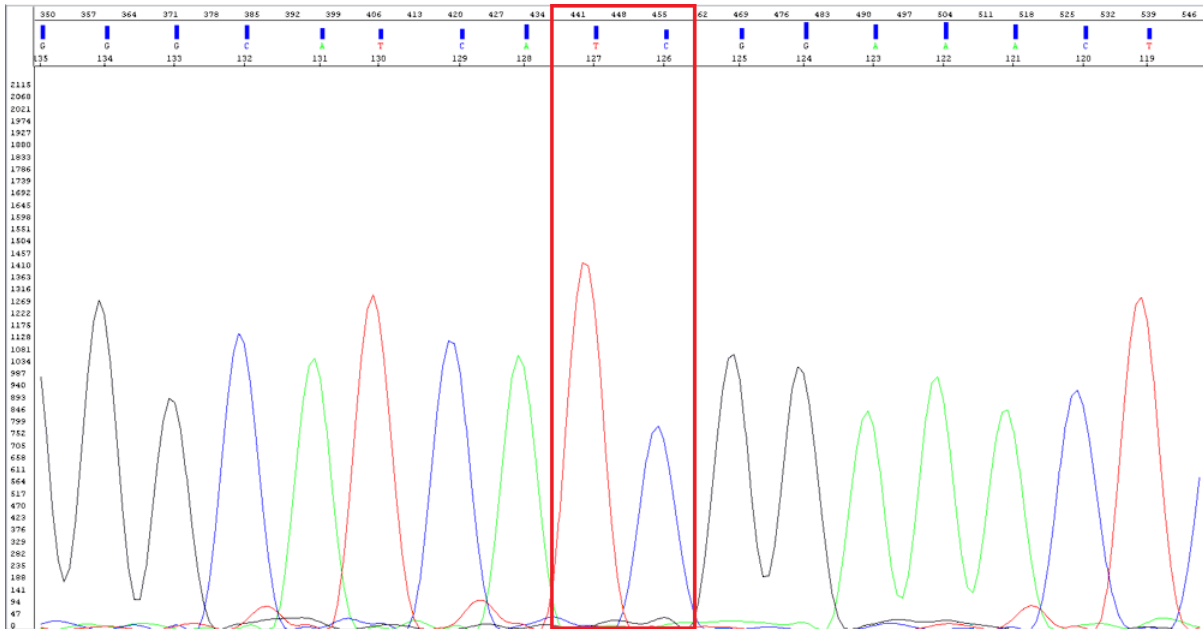


Figura 22. Análisis de secuencias. Muestra PH1-P lo/lo. Se observa la secuencia normal del gen EDNRB GGGCATC(AT)GGAAACT. En rojo se observa las dos pares de bases normales de la secuencia.

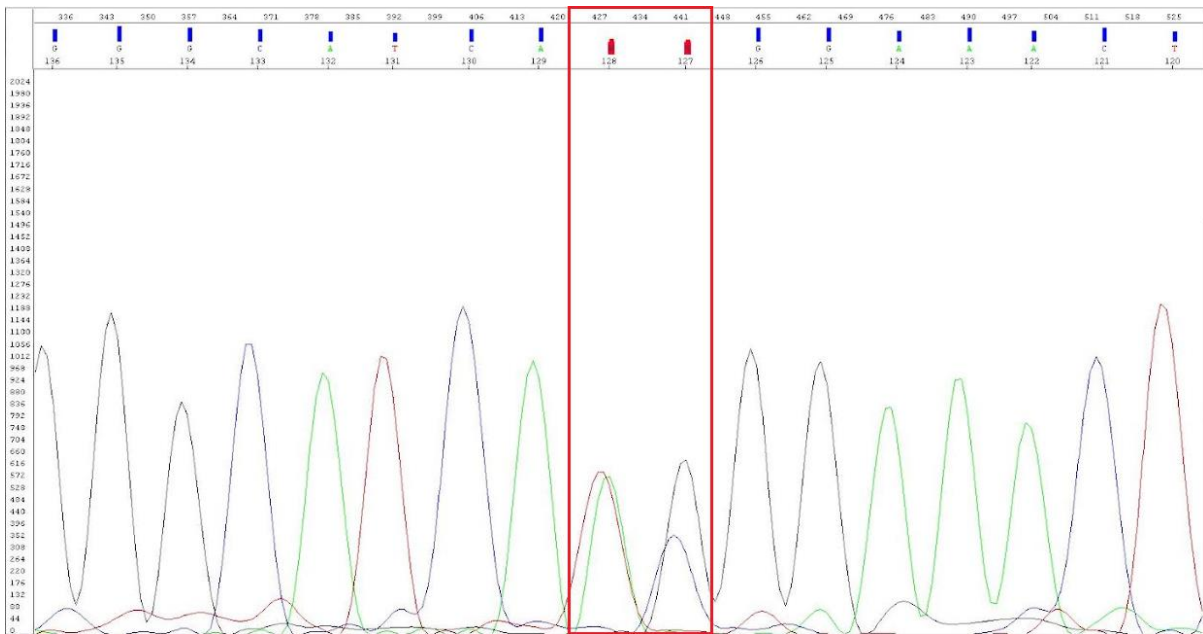


Figura 23. Análisis de secuencias. Muestra PH8-W LO/lo. Se observa la secuencia mutada del gen EDNRB GGGCATCA(TC/AG)GGAAACT, en este caso el equipo no es capaz de detectar las bases asociadas a la secuencia por lo que genera una letra roja en los dos casos. En rojo se observa las dos pares de bases mutadas.

La secuencia normal es GGGCATC(TC)GGAAACT (Figura 22) y la heterocigota es GGGCATCA(TC-AG)GGAAACT donde se observa que el equipo no logra determinar qué base es y nos da un error demostrando que hay una mutación en esa posición ya que se observan

las 2 pares de bases normales y las 2 pares de bases mutadas (Figura 23). En el caso que sea un animal homocigota mutado la secuencia sería GGGCATC(AG)GGAAACT.

Luego de analizar todas las 8 muestras por duplicado y para verificar la robusticidad del método se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 10), en donde 7 muestras con resultados homocigotas normales lo/lo y 1 muestra con resultado heterocigota LO/lo. Como era de esperar no se obtuvo resultado homocigotas por tratarse de una enfermedad hereditaria letal.

Tabla 10. Resultados obtenidos del overo letal.

Código	Resultado	Animal
PH1	lo/lo	Normal
PH2	lo/lo	Normal
PH3	lo/lo	Normal
PH4	lo/lo	Normal
PH5	lo/lo	Normal
PH6	lo/lo	Normal
PH7	lo/lo	Normal
PH8	LO/lo	Portador

Como se observa, contamos únicamente con 1 animal portador del gen LO correspondiendo al 13% de las muestras y los 7 restantes son normales correspondiente al 87% de esta población analizada (Figura 24).

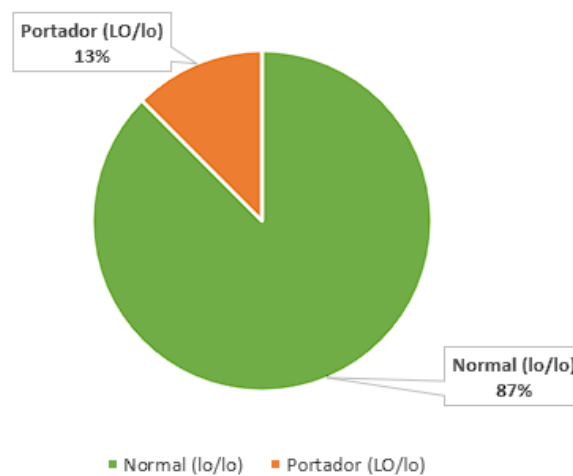


Figura 24. Resultados obtenidos en porcentajes del overo letal.

En otro estudio que se analizaron 136 caballos han obtenido que el 59,4 % eran homocigotas normales (lo/lo), 33,3% eran heterocigotas (LO/lo) y el otro 7,2% era homocigota letal (LO/LO). (22) Por otra parte, en otro estudio que se analizaron 143 caballos se obtuvo que el 58% eran homocigotas normales (lo/lo), 34.9% eran heterocigotas (LO/lo) y el otro 7,7% eran homocigotas mutados (LO/LO). (27) Para obtener la muestra de los animales que eran afectados se extrajo sangre al nacer y luego se realizó la extracción de ADN a partir de esta.

En este caso es importante que se no se utilice el animal portador para reproducirse de forma de eliminar la mutación del rodeo ya que la enfermedad producida en el animal afectado es letal, en este caso se le hizo saber al criador de su animal portador para que no se lo utilice para cruzarlo. También, se recomienda realizar el test genético a todos los animales para saber cuáles podemos cruzar y mejorar genéticamente la población.

Como forma de verificar la veracidad del ensayo se contaba con muestras control previamente enviadas al Laboratorio de Veterinaria Genética de la Universidad de California Davis. Una de ellas fue la PH8 heterocigota (LO/lo) (Anexo 3) y la otra PH1 homocigota normal (lo/lo).

4.3.3 Tipificación equina

Se obtuvieron los perfiles equinos mediante la tipificación por microsatélites, antes de empezar a analizar los resultados se debe chequear que la escalera LIZ500 se haya asignado de forma correcta ya que es un estándar de tamaños internos para la electroforesis. Es un control interno que contiene 17 controles de tamaños de 35 pb a 500 pb y en el cual el R^2 de los puntos debe ser mayor a 0,9999 (Figura 25). Esta escalera se debe controlar en todas las muestras, ya que en el caso que estén mal asignados los tamaños puede interferir en la asignación de los alelos en los marcadores amplificados.

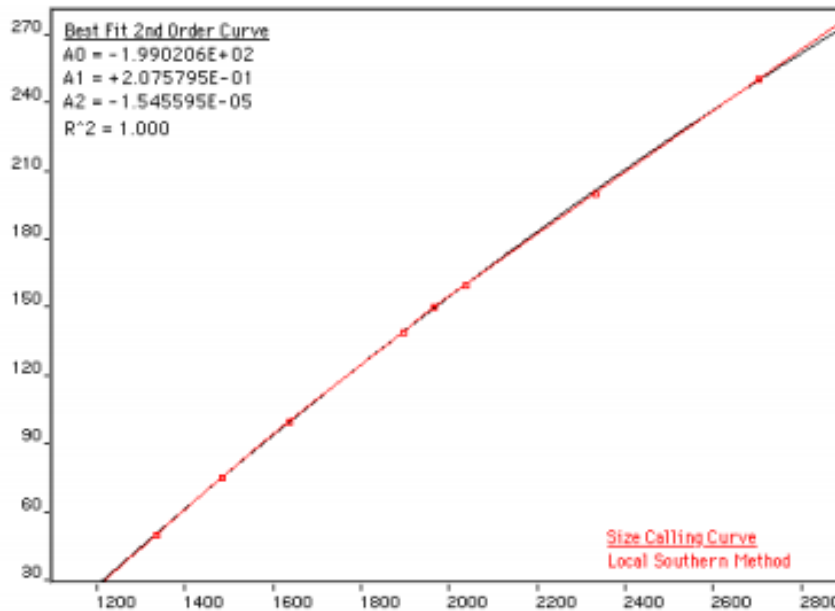


Figura 25. Control interno de tamaños LIZ500 con un R² de 1.

Para marcar a la escala LIZ500 y los 17 marcadores de la ISAG se utilizan 5 fluoróforos FAM, VIC, NED, PET y LIZ (Figura 26) para que se puedan detectar en el AB 3500 xL.

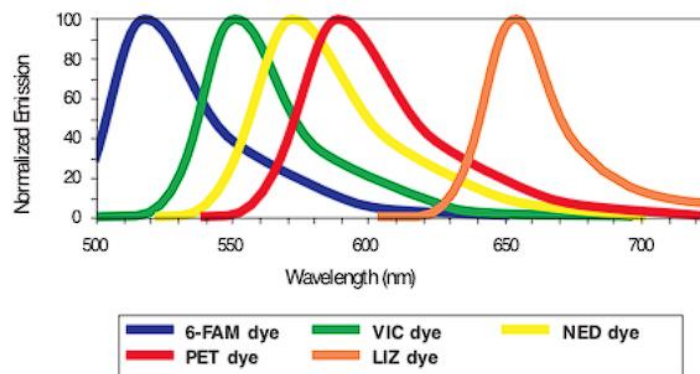


Figura 26. Espectro de emisión de los 5 fluoróforos utilizados para marcar la escala y los 17 marcadores utilizados para la tipificación de equinos.

A continuación, se observa uno de los perfiles que se obtuvo al realizar la tipificación equina (Figura 27). Podemos ver que cada marcador cuenta con un límite de rango delimitado por dos triángulos rojos. Debajo de su nombre en color gris se encuentran los llamados “bins” que denotan las posibles posiciones de los alelos de estos marcadores los cuales se estudiaron anteriormente sabiendo la frecuencia con la que se obtienen estos.

Cada caballo va a tener para cada marcador uno o dos alelos ya sea homocigota o heterocigota, generando un perfil específico para cada uno de ellos. Por lo que se puede confirmar su ascendencia o descendencia a partir de esto, sabiendo que se hereda un alelo materno y el otro paterno.

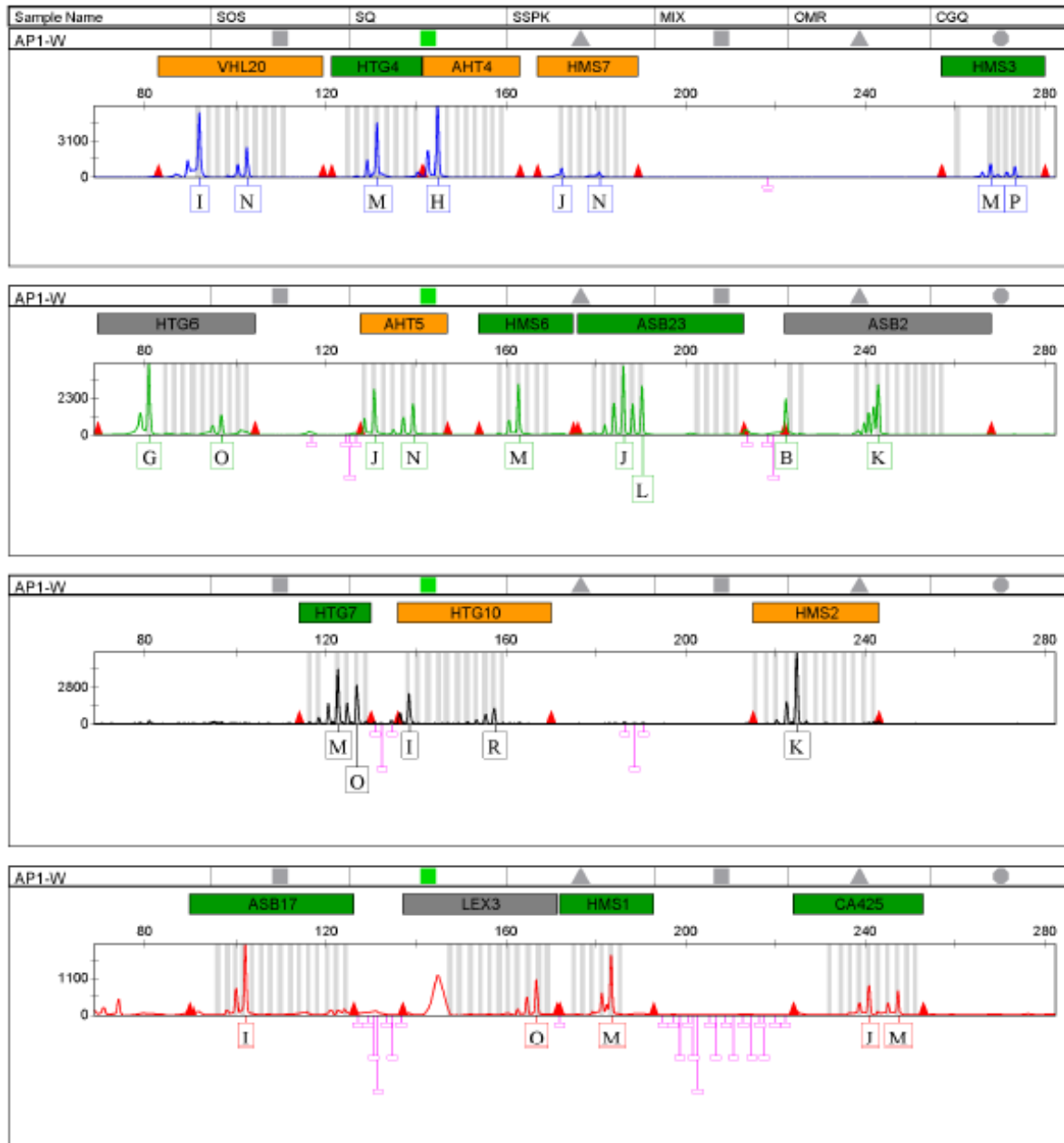


Figura 27. Perfil equino obtenido al realizar la tipificación por microsatélites y analizado a través del programa GeneMapper™ ID-X Software asociado al analizador genético 3500 xL. En la parte izquierda del gráfico se observa la intensidad de la señal obtenida, y arriba de este podemos ver el tamaño del fragmento obtenido. Los marcadores están marcados con los siguientes fluoróforos: FAM en azul, VIC en verde, NED en negro y PET en rojo.

A partir de los resultados obtenidos para cada marcador se establece el perfil del animal en un formato que permite el chequeo de su descendencia con sus supuestos padres (Tabla 11).

Tabla 11. Perfil genético obtenido para el animal APP1. Se observan los 17 marcadores y sus alelos respectivos.

Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425
APP1	IN	MM	HH	JN	MP	GO	JN	MM	JL	BK	MO	IR	KK	II	OO	MM	JM

Teniendo en cuenta el perfil genético de cada animal, sabiendo en algún caso quienes son sus progenitores y en conjunto con el resultado obtenido para cada enfermedad es posible realizar los cruzamientos y observar cómo se transmite esta mutación. Tenemos dos resultados posibles, cuando los padres coinciden se denomina inclusión y cuando los padres no coinciden se denomina exclusión. En los casos que se cuenta con muestras de los supuestos padres se realizaron los análisis de paternidades y/o maternidades correspondientes.

4.3.3.1 Complejo leopardo

Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 12-29), cabe destacar que no se contaba con todos los padres y madres de los caballos. Igualmente, con uno de ellos podemos confirmar su ascendencia.

Tabla 12. Resultado obtenido para la muestra APP1.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP1	IN	MM	HH	JN	MP	GO	JN	MM	JL	BK	MO	IR	KK	II	OO	MM	JM	LP/LP
Madre	APP8	NP	MM	HO	JO	NP	GO	JJ	MP	JS	KK	OO	IR	K.K	IN	MO	MM	JM	LP/LP

Tabla 13. Resultado obtenido para la muestra APP2.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/lp

Tabla 14. Resultado obtenido para la muestra APP3.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP3	IM	KK	HL	MN	IP	JO	JM	PP	IJ	IN	KO	OR	KM	FN	PP	MM	MM	LP/lp
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/lp

Tabla 15. Resultado obtenido para la muestra APP4.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP4	MM	KM	HH	LN	IP	OP	JM	MP	IK	KN	KO	LO	KK	FM	MM	MM	MM	LP/lp
Padre	APP3	IM	KK	HL	MN	IP	JO	JM	PP	IJ	IN	KO	OR	KM	FN	PP	MM	MM	LP/lp

Tabla 16. Resultado obtenido para la muestra APP5.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP5	IM	KK	JJ	LN	OP	OP	JN	LL	LU	KM	KN	OO	KR	OR	PP	JM	IL	lp/lp

Tabla 17. Resultado obtenido para la muestra APP6.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP6	IM	KK	HL	LM	IM	JJ	JJ	PP	IJ	NN	KK	IO	KM	FN	PP	JM	MN	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 18. Resultado obtenido para la muestra APP7.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP7	IR	KM	JL	LL	PP	GO	JM	PP	GI	IM	KO	IO	KM	FR	MM	JJ	NN	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 19. Resultado obtenido para la muestra APP8.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP8	NP	MM	HO	JO	NP	GO	JJ	MP	JS	KK	OO	IR	KK	IN	MO	MM	JM	LP/Ip

Tabla 20. Resultado obtenido para la muestra APP9.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP9	IP	MM	HJ	LO	PP	OO	JM	PP	IS	KN	KO	IO	KM	FI	FO	MM	JM	LP/Ip
Madre	APP8	NP	MM	HO	JO	NP	GO	JJ	MP	JS	KK	OO	IR	KK	IN	MO	MM	JM	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 21. Resultado obtenido para la muestra APP10.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP10	IN	KM	HO	JL	IP	GO	JK	MP	IJ	KK	MO	IK	KM	GI	FO	MM	JM	LP/Ip
Padre	APP1	IN	MM	HH	JN	MP	GO	JN	MM	JL	BK	MO	IR	KK	II	OO	MM	JM	LP/Ip

Tabla 22. Resultado obtenido para la muestra APP11.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP11	IM	KM	HJ	LN	PP	JO	JJ	PP	IJ	IN	KK	IO	JK	GR	FH	MM	NN	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 23. Resultado obtenido para la muestra APP12.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP12	IN	KM	HL	JN	MP	GO	JM	MP	IJ	KN	OP	IO	LM	FR	LL	MM	MN	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 24. Resultado obtenido para la muestra APP13.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP13	IM	MO	J	N	M,R	JO	JN	P	IL	IK	O	IO	LM	G,R	M	JM	MN	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 25. Resultado obtenido para la muestra APP14.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP14	IL	MM	HJ	NN	MP	GG	JO	MM	JK	KK	MO	IO	IK	IM	OO	MM	JO	LP/Ip
Padre	APP1	IN	MM	HH	JN	MP	GO	JN	MM	JL	BK	MO	IR	KK	II	OO	MM	JM	LP/Ip

Tabla 26. Resultado obtenido para la muestra APP15.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP15	NN	KM	LO	JN	MN	GO	JJ	MP	IS	IK	OO	OR	KM	FI	MM	MM	JN	LP/Ip
Madre	APP8	NP	MM	HO	JO	NP	GO	JJ	MP	JS	KK	OO	IR	KK	IN	MO	MM	JM	LP/Ip
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/Ip

Tabla 27. Resultado obtenido para la muestra APP16.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP16	IM	KK	HJ	LL	IM	JP	JM	MP	IK	KN	KO	LO	KM	GR	KK	JM	MM	LP/LP
Padre	APP2	IN	KM	JL	LN	MP	JO	JM	PP	II	IN	KO	OO	JM	FR	FF	JM	MN	LP/lp

Tabla 28. Resultado obtenido para la muestra APP17.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP17	LL	MM	HH	JM		OO	JJ	KM	GK		OO	RR	RR	QR	PP	MM	II	LP/lp

Tabla 29. Resultado obtenido para la muestra APP18.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	APP18	LR	MM	JO	JO	II	GJ	JK	KP	KL	NN	MO	IO	HI	LM	HM	JJ	NO	LP/lp

Se observa que el caballo APP2 (Tabla 13) heterocigota para la mutación se lo utilizó muchas veces para realizar cruzamientos, por lo que se observa que los hijos son portadores o afectados con la CSNB.

También, se observa que del cruzamiento de los mismos padres APP2 y APP8 (Tabla 20 y 26) nacieron dos hijos distintos genóticamente los cuales son las dos posibilidades de cruzamiento de acuerdo con los genotipos paterno y materno. En el primer caso APP9 (Tabla 20) el animal es homocigota mutado (LP/LP), y en el segundo caso el animal APP15 (Tabla 26) es heterocigoto (LP/lp).

De la muestra APP17 (Tabla 28) para realizar el perfil se utilizó la muestra obtenida con la extracción propia (APP17-P) (40.80 ng/μl y 0.85 ratio), ya que para la extracción comercial (APP17-W) no se obtuvo suficiente ADN (10.90 ng/μl y 3.76 ratio). Esto se puede observar en los dos cromatogramas obtenidos para esta muestra (Figura 28), ya que cuando se utilizó la comercial no se obtuvo nada además de ruidos y en la propia se pudieron obtener la mayoría de los marcadores.

En el perfil de la izquierda (APP17-P) se pudieron obtener los marcadores que se utilizaron para realizar el perfil de esta muestra, a pesar de tener cantidad suficiente de ADN el ratio no es el mejor por lo que podría estar inhibiendo la PCR. Es por esto que capaz no se obtuvieron todos los marcadores necesarios para completar el perfil de esta muestra. En el perfil de la derecha (APP17-W) que se ven muchos “OL” lo que significa que se detectó un alelo fuera de su posición teórica, en este caso no se amplificó ningún marcador. En este caso se observa la

importancia de tener una buena muestra, habría que volver a solicitar la muestra para poder identificar el parentesco correctamente.

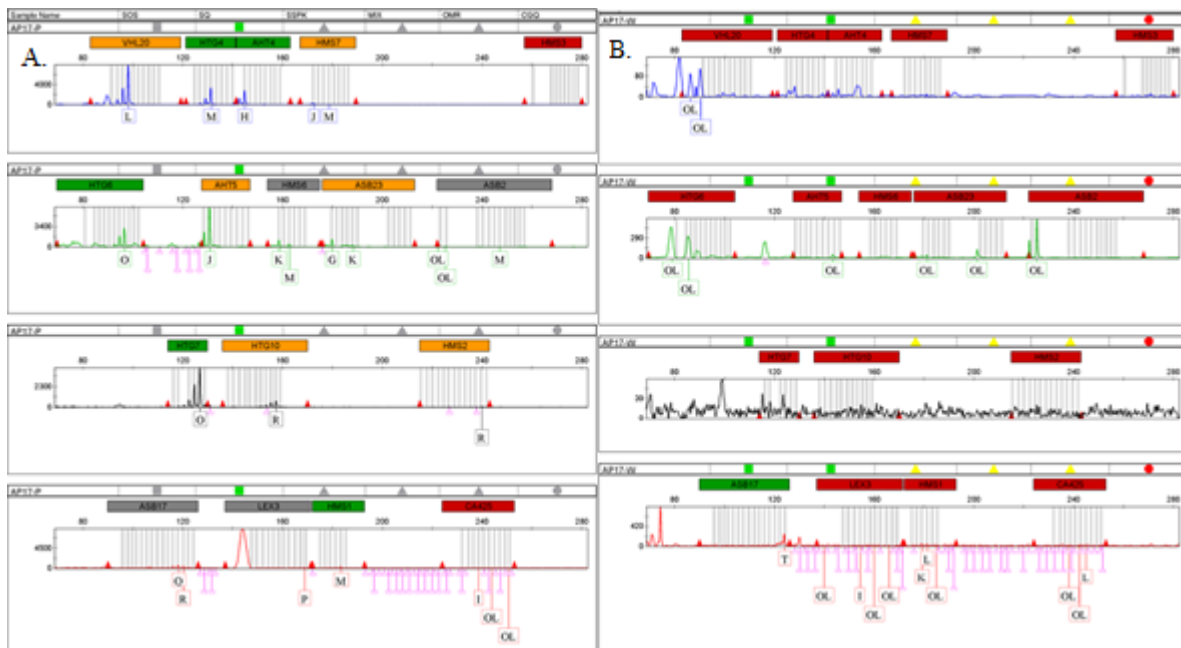


Figura 28. Análisis de tipificación por microsatélites en una muestra con pocos bulbos pilosos. (A) Se observa el perfil que se obtuvo con la extracción propia (APP17-P). (B) Se observa el obtenido con la extracción comercial (APP17-W).

De todas formas, se pudo obtener que el animal era heterocigota para la mutación (Tabla 28). Esto puede deberse a que para el ensayo de tipificación mediante microsatélites al ser 17 pares primers utilizados para generar el perfil generen competencia entre ellos por el ADN al realizar la PCR, en comparación al ensayo para detectar la mutación que son únicamente 3 primers.

4.3.3.2 Overo letal

Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 30-37), teniendo padres para 3 de 8 casos lo que significa el 37% de esta población.

Tabla 30. Resultado obtenido para la muestra PH1.

Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo PH1	LN	KM	JK	NO	NP	GG	JK	MO	JK	KR	MN	LO	KK	NQ	MM	MM	NN	lo/lo

Tabla 31. Resultado obtenido para la muestra PH2.

Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo PH2	IR	KM	HJ	LO	IN	OO	JK	MO	KL	KM	KO	OO	HL	GQ	FF	JK	NN	lo/lo

Tabla 32. Resultado obtenido para la muestra PH3.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH3	LM	KL	JO	LO	IN	GO	JJ	LO	JL	IK	MO	LO	HK	MN	MM	JM	NN	lo/lo
Padre	PH1	LN	KM	JK	NO	NP	GG	JK	MO	JK	KR	MN	LO	KK	NQ	MM	MM	NN	lo/lo

Tabla 33. Resultado obtenido para la muestra PH4.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH4	NQ	KM	KO	KO	NR	GO	JK	MO	JJ	KQ	MO	OO	IK	GN	GM	MM	JN	lo/lo
Padre	PH1	LN	KM	JK	NO	NP	GG	JK	MO	JK	KR	MN	LO	KK	NQ	MM	MM	NN	lo/lo

Tabla 34. Resultado obtenido para la muestra PH5.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH5	LQ	KM	JO	NN	PP	GO	JK	MM	JJ	BK	KN	OR	HK	NR	FM	MM	JN	lo/lo
Padre	PH1	LN	KM	JK	NO	NP	GG	JK	MO	JK	KR	MN	LO	KK	NQ	MM	MM	NN	lo/lo

Tabla 35. Resultado obtenido para la muestra PH6.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH6	LR	MM	JO	JO	II	GJ	JK	KP	KL	NN	MO	IO	HI	LM	HM	JJ	NO	lo/lo

Tabla 36. Resultado obtenido para la muestra PH7.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH7	MR	KP	KN	LM	IM	GJ	KN	PP	LU	MQ	NO	MO	HK	NN	NN	MM	GO	lo/lo

Tabla 37. Resultado obtenido para la muestra PH8.

	Codigo	VHL20	HTG4	AHT4	HMS7	HMS3	HTG6	AHT5	HMS6	ASB23	ASB2	HTG7	HTG10	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	CA425	Resultado
Hijo	PH8	IM	KK	JJ	LN	OP	OP	JN	LL	LU	KM	KN	OO	KR	OR	PP	JM	IL	LO/lo

En los casos que se cuenta con los padres (Tabla 32-34) se observa que se mantiene la herencia del alelo normal, y se puede inferir que el genotipo materno puede ser normal (lo/lo) o heterocigota (LO/lo) pero que en estos tres casos le pasó a la progenie únicamente su alelo normal. Obviamente, el animal homocigota mutado (LO/LO) no puede participar en los cruzamientos ya que la enfermedad es letal, es de suma importancia que se evite cruzar animales que contengan la mutación presente con el fin de eliminarla del rodeo.

5. Análisis económico

En el marco de esta tesis se realizó un análisis de mercado tanto a nivel nacional como regional realizando entrevistas y encuestas con el fin de determinar la cantidad de caballos registrados, cuantos criadores de estas razas existen, el conocimiento sobre estas enfermedades y precios de los test genéticos en el mercado regional. Por otra parte, identificamos la competencia evaluando sus fortalezas y debilidades.

Además, se realizó un análisis económico con el fin de determinar los costos de los insumos, RRHH y otros gastos necesarios para realizar estudios en cuestión, entre ellos, luz, agua, servicios técnicos, logística, amortización de equipos y gastos administrativos.

Teniendo en cuenta estos análisis se evaluó cual podría ser la ganancia abarcando cierto porcentaje del mercado nacional y regional teniendo en cuenta los costos de realizar un ensayo ya sea por extracción de ADN propia o comercial (Anexo 4).

5.1 Análisis de mercado

5.1.1 Nivel nacional

A nivel nacional, se entrevistó a Álvaro Garmendia el jefe de Registros Genealógicos de la Asociación Rural del Uruguay (ARU) y se obtuvo datos respecto a los criadores y cantidades de caballos que hay de estas dos razas en Uruguay. El registro genealógico hace referencia a obtener el perfil genético de un animal y guardarlo en una base de datos, lo que permite conocer el origen y genealogía de cada animal. Esto permite contar con un pedigree de reconocimiento y contribuir a la mejora genética.

Al hablar con Garmendia se supo que, tanto los Appaloosa como los Paint Horse son dos razas pequeñas en relación con los caballos criollos (80% de los caballos en Uruguay), pero se puede ver que los Paint Horse vienen con un crecimiento muy bueno en el mercado nacional.

Para la raza Appaloosa existen 15 criadores los cuales registraron 36 caballos en el año 2022 y una totalidad de 1945 caballos registrados desde el inicio de esta raza en Uruguay.

Respecto a los Paint Horse existen 24 criadores los cuales en el último año registraron 115 caballos y una totalidad de 722 caballos en total registrados desde su ingreso al país.

Por otra parte, se entrevistó a Nicola de Angelis criador de la raza Appaloosa y dueño de la Haras Don Carmine quien trajo su primer ejemplar en el año 2005 y en el día de hoy cuenta con 85 caballos en su posesión los cuales podrían ser posibles caballos por estudiar. Además, comentó que tuvo casos de ceguera en su manada con algún fallecimiento.

Se entrevistó a Diego Lorio presidente de la sociedad Paint Horse quien nos comentó que estos caballos aparecieron el año 2008 y que hoy en día están ganando poder en el mercado nacional debido a que tienen chances de comportarse de buena forma ya sea en línea de trabajo, conformación y carrera. También, comentó que en su manada tuvo un caso de LO el cual no fue detectado hasta la muerte del animal.

Se entrevistó a Sebastián Pimienta criador de la raza Paint Horse, el cual tiene 8 caballos en su poder hoy en día y comentó que tuvo un fallecimiento correspondiente a un caballo recién nacido en su campo era de color blanco y nunca supieron la causa de muerte.

5.1.2 Nivel regional

En el pasado, los primeros caballos de las razas Appaloosa y Paint Horse que se introdujeron en el país eran de origen brasileño. Con el tiempo, debido al crecimiento de estas razas en el país, se ha visto un aumento en la venta de caballos nacidos en territorio nacional hacia otros países, como Brasil y Argentina.

Se consultó a Juan Carlos Herrera encargado de los registros genealógicos de la Sociedad Rural de Argentina (SRA), la cantidad de criadores que tiene el país y la cantidad de animales que existen de estas razas. De la raza Appaloosa existen 21 criadores los cuales registraron 75 caballos en el año 2022. Además, pudimos saber que la raza llegó en el año 1998 y existen 1011 registros hoy en día. Respecto a los Paint Horse se obtuvo que, existen 17 criadores los cuales en el último año registraron 70 caballos. También se pudo obtener que la raza llegó en el año 2010 y existen 700 registros hoy en día.

Los datos de Brasil fueron obtenidos por la sociedad Appaloosa, la cual menciona que la raza tiene más de 25 años en el país y cuenta con más de 25.000 animales registrados, lo que convierte a Brasil en el segundo país con mayor cantidad de animales de esta raza después de Estados Unidos. (50) En cuanto a la raza Paint Horse, los datos se obtuvieron de la cadena Globo, la cual informa que hay más de 30.000 animales registrados y más de 7.000 haras en Brasil. (51)

Los clientes potenciales para estos caballos incluyen a las sociedades de caballos Paint y Appaloosa en cada país, las cuales son importantes para llegar masivamente a los criadores de estas razas, ya que se encargan del registro y nucleación de los criadores. También están incluidas las haras especializadas en la cría de caballos de estas razas y los criadores individuales de caballos Appaloosa y Paint Horse.

En cuanto a los competidores en la región, se ha evaluado las fortalezas y debilidades de cada uno de ellos:

- En Uruguay, no se cuenta con laboratorios que realicen ninguno de los dos análisis necesarios para la evaluación de las razas Appaloosa y Paint Horse.
- En Argentina, la Sociedad Rural de Argentina es un competidor fuerte, ya que se encarga de los registros y cuenta con años de experiencia en el mercado. Sin embargo, no realiza la detección del overo letal y sus precios son elevados.
- En Brasil existen varios competidores destacados, entre ellos se encuentra
 - o Neogen un competidor internacional con años de experiencia y buena calidad de resultados.
 - o Clinilabvet es un competidor regional con pocos años en el mercado, pero con una respuesta rápida y precios altos según la opinión de un productor.
 - o Laboratorioraca es un competidor regional con pocos años en el mercado del cual no se tienen muchas referencias.

En cuanto a los costos en la región:

- En Argentina, se pudo verificar que el análisis de fragmentos para el gen LP se encuentra a un precio de 57 USD y no se pudo encontrar competencia para LO.
- En Brasil, el costo de los estudios para las dos enfermedades ronda en el precio de 55 USD.

- Existe otra forma de detección de la CSNB, que es mediante un ERG, pero solo se encontró en Brasil a un precio de 165 USD.

5.2 Factibilidad económica

Para la determinación de costos se tuvo en cuenta todos los pasos necesarios para llegar al resultado final (Tabla 38). Se consideró el costo de recursos humanos, el uso de instalaciones y equipos, y otros gastos mencionados anteriormente. Además, al cálculo se sumó un 20% en el que se tuvo en cuenta posibles errores, repeticiones y controles necesarios para los ensayos.

Teniendo en cuenta que generalmente se utilizan dos controles para una muestra, uno negativo y otro positivo, al realizar más de una muestra en un mismo ensayo haría que los costos disminuyeran frente a procesar una sola muestra.

Tabla 38. Costo bruto de los ensayos realizados comparando las técnicas de extracción propia con la comercial. El desglose de cómo se obtuvo el costo bruto por ensayo se observa en el Anexo 4 - Costo.

Ensayo	Propia	Comercial
Fragmentos	21,7	25,5
Secuenciación	25,3	29,1
Tipificación	28,9	32,7

Se observa que la extracción propia es menos costosa que la comercial, y como se obtiene ADN válido para realizar los ensayos optamos por elegir esta como preferencia. Existen tipos de matrices como la sangre, el semen, o biopsias que no se pueden procesar con la extracción propia en el caso que se tenga que realizar con la técnica de extracción comercial el precio aumentaría.

A efectos de evaluar la inversión realizada en la puesta a punto se calculó el gasto en RRHH y la cantidad de muestras procesadas en todo el desarrollo (Anexo 4 – Costo).

Teniendo en cuenta el costo por ensayo y determinando un margen de ganancia del 50% se obtuvo el precio de venta al mercado (Tabla 39). En todos los casos estamos tomando el gasto de extracción propia del ADN dentro del precio final del estudio, sabiendo que esta es la menos costosa.

Tabla 39. Precio de venta al mercado.

Precio de venta: 50% de ganancia		
Ensayo	Propia	Comercial
Fragmentos	32,6	38,3
Secuenciación	38,0	43,7

*Nos quedamos con el de menor precio

Partiendo de todos los animales de la región y fijando un 10% de los animales totales como promedio de registros se obtuvo un mercado potencial. Luego de esto, se consideró tanto el mercado nacional como regional al momento de determinar la ganancia anual, y se decidió tomar una postura conservadora con relación al porcentaje de participación en cada país. En concreto, se fijó un 40% para Uruguay, un 20% para Argentina y un 3% para Brasil. (Anexo 4 – Ganancia).

Al tomar en cuenta la inversión realizada para la puesta a punto, que fue de 6.691 USD, y proyectando a 5 años (Anexo 4 – Indicadores de rentabilidad), se obtuvo una VAN de 8.091 USD, un TIR de 49% y un período de dos años y un mes para la recuperación de la inversión. En vista de estos resultados, se puede afirmar que el proyecto es altamente rentable.

6. Conclusiones y perspectivas a futuro

6.1 Conclusiones

Se logró cumplir con el objetivo general de este trabajo de desarrollar dos técnicas para detectar las enfermedades ceguera nocturna congénita y el síndrome de overo letal en el laboratorio de biología molecular Genexa ADN evolutivo.

A continuación, se verán las conclusiones referidas a los objetivos específicos:

- Se lograron obtener muestras de las dos razas en cuestión para estudiar y se obtuvo ADN utilizando dos métodos de extracción de ADN. Seleccionando la extracción propia como la mejora alternativa ya sea en términos técnicos y económicos.
- Se lograron detectar las posibles variantes de los genes TRPM1 y EDNRB que causan la CSNB y el LO respectivamente. Determinando si el animal es normal, portador o afectado para la enfermedad.
- Se utilizó la tipificación mediante microsatélites para corroborar el parentesco y verificar la heredabilidad de las enfermedades confirmando los datos provistos por los criadores. Por otro lado, se confirmó la veracidad de los resultados con muestras controles enviadas previamente a VGL y muestras interlaboratorio confirmando el resultado.
- Se logró determinar que el proyecto era viable, teniendo una buena rentabilidad y un buen retorno de la inversión en poco tiempo.

6.2 Perspectivas a futuro

En los animales que presentan la mutación LP/LP en la raza appaloosa se podría verificar mediante una electrorretinografía (ERG) que realmente presentan la ceguera nocturna congénita. A pesar de ser un análisis caro, se podría corroborar la eficacia de realizar el test genético preventivo.

Se debe contactar a los demás criadores de estas dos razas para ofrecerles la oportunidad de mejorar genéticamente su manada, eliminando los genes que causan estas dos enfermedades en los caballos mediante el ensayo propuesto. De esta manera, se puede mejorar significativamente la salud y el bienestar de los caballos en las manadas de estos criadores.

7. Referencias bibliográficas

1. Millon L V, Cecilia M, Penedo T. Chromosomal abnormalities and DNA genotyping in horses. 2009.
2. Richer CL, Power MM, Klunder LR, McFEELY RA, Kent MG. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). 1990.
3. Genetic Alliance. Inheritance patterns - Understanding Genetics. [Internet] NCBI. 2009 [accessed 2023 Jan 6]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115561/>
4. Derks MFL, Steensma M. Review: Balancing Selection for Deleterious Alleles in Livestock. *Frontiers in Genetics*. 2021;12. doi:10.3389/fgene.2021.761728
5. Finno CJ, Bannasch DL. Applied equine genetics. *Equine Veterinary Journal*. 2014;46(5):538–544. doi:10.1111/evj.12294
6. Finno CJ, Spier SJ, Valberg SJ. Equine diseases caused by known genetic mutations. *Veterinary Journal*. 2009;179(3):336–347. doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.016
7. Horse Genome Project. [Internet] Broad Institute. 2007 [accessed 2022 Apr 22]. Disponible desde: <https://www.broadinstitute.org/horse/horse-genome-project>
8. National Institute of Health. Horse Genome Assembled. [Internet] National Institute of Health. 2007 [accessed 2022 Apr 22]. Disponible desde: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/horse-genome-assembled>
9. Online Mendelian Inheritance in Animals. *Equus caballus* mendelian disorder. [Internet] The University of Sydney. 1992 [accessed 2023 Jan 9]. Disponible desde: https://www.omia.org/results/?gb_species_id=9796&search_type=advanced&singlelocus=yess
10. Webb AA, Cullen CL. Neurology Neurologie Coat color and coat color pattern-related neurologic and neuro-ophthalmic diseases. 2010.
11. Raudsepp T, Finno CJ, Bellone RR, Petersen JL. Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. *Animal Genetics*. 2019;50(6):569–597. doi:10.1111/age.12857
12. Rowe A., Hill E., Duggan V. Role of vet in equine genetic disease testing. *Veterinary Ireland Journal - UCD*. 2020.
13. Bellone RR, Holl H, Setaluri V, Devi S, Maddodi N, Archer S, Sandmeyer L, Ludwig A, Foerster D, Pruvost M, et al. Evidence for a Retroviral Insertion in TRPM1 as the Cause of

Congenital Stationary Night Blindness and Leopard Complex Spotting in the Horse. PLoS ONE. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0078280

14. Terziotti H, Diaz S, Zapata G. Estatus de la Ceguera Nocturna Congénita estacionaria en caballos Appaloosa de Argentina. Agrarias. UNLZ. 2020;7(4):178–182.

15. Clínica Oftalmológica TACIR. Las enfermedades oculares más raras. [Internet] 2020 [accessed 2023 Mar 28]. Disponible desde:

<https://www.grupocastanera.com/blog/enfermedades-oculares-raras>

16. Rebecca Bellone VF (US);, Heather Mark Holl BN (US);, Samantha Ann Brooks VEN (US);, George Forsyth A (CA). Identification of the causative mutation for leopard complex spotting and congenital stationary night blindness in equines and a method for testing for same. 2011.

17. Equine Recurrent Uveitis: The Latest. [Internet] THE HORSE. 2018 [accessed 2023 Feb 19]. Disponible desde: <https://thehorse.com/162726/equine-recurrent-uveitis-the-latest/>

18. Rockwell H, Mack M, Famula T, Sandmeyer L, Bauer B, Dwyer A, Lassaline M, Beeson S, Archer S, McCue M, et al. Genetic investigation of equine recurrent uveitis in Appaloosa horses. Animal Genetics. 2020;51(1):111–116. doi:10.1111/age.12883

19. Rochester Institute of Technology. Rods & Cones. [Internet] Rochester Institute of Technology. 2015 [accessed 2023 Feb 20]. Disponible desde: https://www.cis.rit.edu/people/faculty/montag/vandplite/pages/chap_9/ch9p1.html

20. Bellone et al. Identification of the causative mutation for leopard complex spotting and congenital stationary night blindness in equines and a method for testing for same. 2011.

21. Uveítis recurrente equina. [Internet] IVO Oftalmología Veterinaria. 2015 Jul 6 [accessed 2023 Mar 24]. Disponible desde: <https://ivoft.com/patologias/uveitis-recurrente-equina/>

22. Metallinos DL, Bowling AT, Rine J. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. 1998.

23. Yang GC, Croaker D, Zhang AL, Manglick P, Cartmill T, Cass D. A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease (HSCR). Human Molecular Genetics. 1998;7(6).

24. Elizabeth M. Santschi D, Paul D. Vrotsos B, Amanda K. Purdy B, James R. Mickelson P. Incidence of the endothelin receptor B mutation that causes lethal white foal syndrome in white-patterned horses. 2001.

25. Santschi EM, Vrotsos PD, Mickelson JR. The Impact of the Mutation Causing Overo Lethal White Syndrome on White Patterning in Horses. Department of Veterinary Pathbiology, University of Minnesota and Department of Surgical Sciences, University of Wisconsin. 2001.
26. Mouegellefile N, Santschi EM, Purdy AK, Valberg SJ, Vrotsos PD, Kaese H, Mickelson JR. Mammalian Genome Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. 1998.
27. Danika Metallinos, Jasper Rine, Ann Bowling. Horse endothelin-b receptor gene and gene products. 2002.
28. Greenstein Baynash A, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of Endothelin-3 with Endothelin-B Receptor Is Essential for Development of Epidermal Melanocytes and Enteric Neurons. 1994.
29. Hispalabs. Síndrome Blanco Letal del Overo (OLWS). [Internet] HISPALABS. 2022 [accessed 2023 Mar 24]. Disponible desde: <https://hispalabs.com/producto/olws-sindrome-blanco-letal-del-overo/>
30. Levinson G, Gutman GA. Slipped-Strand Mismatching: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution?. Department of Microbiology and Molecular Genetics. University of California, Irvine. 1987.
31. Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research. European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg. 1984.
32. International Society for Animal Genetics. Principal page. [Internet] ISAG 2020 [accessed 2023 Feb 6]. Disponible desde: <https://www.isag.us/>
33. Van De Goor LHP, Panneman H, Van Haeringen WA. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: Allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. Animal Genetics. 2010;41(2):122–127. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x
34. Luttman AM, Komine M, Thaiwong T, Carpenter T, Ewart SL, Kiupel M, Langohr IM, Venta PJ. Development of a 17-Plex of Penta- and Tetra-Nucleotide Microsatellites for DNA Profiling and Paternity Testing in Horses. Frontiers in Veterinary Science. 2022;9. doi:10.3389/fvets.2022.861623
35. Doroteo MC. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. Laboratorio de Tejido Conjuntivo – México. 2012.
36. Lele M, Lele SM, Petersen JR, Mohammad A. Capillary Electrophoresis General Overview and Applications in the Clinical Laboratory.

37. Sanger sequencing. Generate high-quality data with our proven workflow. Thermo Scientific. AppliedBiosystems. 2019.
38. DNA fragment analysis by capillary electrophoresis Go beyond sequencing. .Thermo Scientific. AppliedBiosystems. 2019.
39. Differences between dNTP and ddNTP. [Internet] BYJU's. 2020 [accessed 2023 Apr 2]. Disponible desde: <https://byjus.com/biology/difference-between-dntp-and-ddntp/>
40. Unmodified dideoxy-Nucleoside triphosphates (ddNTPs) [Internet] Jena Bioscience. 2020 [accessed 2023 Apr 2]. Disponible desde: <https://www.jenabioscience.com/nucleotides-nucleosides/nucleotides-by-application/on-dna/sequencing-snp-genotyping/unmodified-ddntps>
41. User guide. Applied Biosystems® 3500 / 3500xL Genetic Analyzer 3500 Series Software. 2013.
42. Genexa ADN evolutivo. Filiación en equinos. [Internet] Genexa ADN evolutivo 2020 [accessed 2023 Feb 6]. Disponible desde: <https://www.genexa.com.uy/servicio/3/filiacion-en-equinos>
43. Genexa - Adn evolutivo. – Pagina principal [Internet] Genexa ADN evolutivo 2020 [accessed 2023 Feb 6]. Disponible desde: <https://www.genexa.com.uy/inicio>
44. Alhaddad H, Maraqa T, Alabdulghafour S, Alaskar H, Alaqeely R, Almathen F, Alhajeri BH. Quality and quantity of dromedary camel DNA sampled from whole-blood, saliva, and tail-hair. PLoS ONE. 2019;14(1). doi:10.1371/journal.pone.0211743
45. Graziano L, El-Mogy M, Haj-Ahmad Y. Isolation of DNA from Hair Follicles and Hair Shafts using Norgen's Dried Blood Spot Genomic DNA Isolation Kit. Norgen Biotek Corp. Thorold, ON Canada. 2016.
46. Guan Z, Zhou Y, Liu J, Jiang X, Li S, Yang S, Chen A. A Simple Method to Extract DNA from Hair Shafts Using Enzymatic Laundry Powder. PLoS ONE. 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0069588
47. TECAN. NanoQuant Plate™ Quick Guide. 2013.
48. Hue NT, Thi N, Linh T. Evaluation of the Human Genomic DNA Extraction from Hair Root Method. School of Biotechnology, International University, VNU, HCM City. 2013.
49. Bellone RR, Forsyth G, Leeb T, Archer S, Sigurdsson S, Imstrand F, Mauceli E, Engensteiner M, Bailey E, Sandmeyer L, et al. Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1: A candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. Briefings in Functional Genomics and Proteomics. 2010;9(3):193–207. doi:10.1093/bfgp/elq002

50. A Raça Appaloosa no Brasil [Internet] ABCCAppaloosa 2019 [accessed 2023 Feb 6].
Disponível desde: <http://www.appaloosa.com.br/>
51. Raça de cavalo 'Paint Horse' está ganhando mais espaço no Brasil [Internet] NOSSO CAMPO, 2015 [accessed 2023 Feb 6]. Disponível desde: <https://g1.globo.com/sao-paulo/sorocaba-jundiai/nosso-campo/noticia/2015/06/o-cavalo-paint-horse-esta-ganhando-mais-espaco-no-brasil.html>

8. Anexos

Anexo 1. Certificado de la ISAG.

															
<h3>Certificate of Participation</h3>															
This is to certify that ISAG Institutional Member															
Genexa Montevideo, Uruguay															
has participated in the															
2020-2021 International Horse (<i>Equus caballus</i>) STR DNA Typing Comparison Test															
with the following result:															
Absolute genotyping accuracy rank: 1															
Total number of participating labs: 94															
THE SCORING SYSTEM:															
Based on the twelve (12) ISAG recommended Equine (<i>Equus caballus</i>) STR DNA Markers (AHT4, AHT5, ASB17, ASB2, ASB23, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, VHL20)															
Absolute genotyping accuracy (Aga): $(Nga - Gea) / Nga$ (as percentage) considers the total number of discrepancies, that is genotyping errors and "blanks" (no genotype reported)															
Nga: total number of expected genotypes (reference samples not included) Gea: total number of genotype errors, including blanks															
<table border="1" data-bbox="395 772 603 936"><thead><tr><th colspan="2">Absolute genotyping Accuracy</th></tr><tr><th>Rank</th><th>% Labs</th></tr></thead><tbody><tr><td>1: 100% – 98%</td><td>83</td></tr><tr><td>2: 97.9% – 95%</td><td>9.6</td></tr><tr><td>3: 94.9% – 90%</td><td>4.2</td></tr><tr><td>4: 89.9% – 80%</td><td>1.1</td></tr><tr><td>5: Below 80%</td><td>2.1</td></tr></tbody></table>		Absolute genotyping Accuracy		Rank	% Labs	1: 100% – 98%	83	2: 97.9% – 95%	9.6	3: 94.9% – 90%	4.2	4: 89.9% – 80%	1.1	5: Below 80%	2.1
Absolute genotyping Accuracy															
Rank	% Labs														
1: 100% – 98%	83														
2: 97.9% – 95%	9.6														
3: 94.9% – 90%	4.2														
4: 89.9% – 80%	1.1														
5: Below 80%	2.1														
 President: Dr. Clare Gill	 Secretary: Dr. Sofia Mikko														
<small>ISAG is a scientific society that provides a forum for the exchange of information, methods and materials between members and for standardization of genotyping nomenclature. ISAG is not involved in the accreditation of service genotyping laboratories or institutions and ISAG does not regard participation in its Comparison Tests as indicating that a laboratory is internationally accredited. This certificate reflects the laboratory performance in the specific comparison test.</small>															

Anexo 2. Muestra correspondiente a APP10 (LP/LP).



HORSE COAT COLOR / PATTERN TEST REPORT

<i>Provided Information:</i> Name: BLANCH Registration:	
YOB: Sex: Mare Breed: Appaloosa	

RESULT	INTERPRETATION	RESULT	INTERPRETATION
RED FACTOR	Not requested.	SPLASHED WHITE	Not requested.
AGOUTI	Not requested.	TOBIANO	Not requested.
CREAM	Not requested.	LEOPARD	2 copies of LP detected. Horse will have congenital stationary night blindness (CSNB) and is at risk for developing equine recurrent uveitis (ERU).*
PEARL	Not requested.	LP/LP	
SILVER	Not requested.	PATTERN-1	Not requested.
DUN	Not requested.	BRINDLE 1	Not requested.
CHAMPAGNE	Not requested.	TIGER EYE	Not requested.
LETHAL WHITE OVERO	Not requested.	MUSHROOM (SHETLAND PONY)	Not requested.
SABINO 1	Not requested.	GRAY	Not requested.
DOMINANT WHITE (W5, W10, W20, W22)	Not requested.	ROAN	Not requested.

Anexo 3. Muestra correspondiente a PH8 (LO/lo).



HORSE COAT COLOR / PATTERN TEST REPORT

<i>Provided Information:</i> Name: COA16 Registration:	
YOB: Sex: Unknown Breed: Paint Horse	

RESULT		INTERPRETATION	RESULT		INTERPRETATION
RED FACTOR		Not requested.	SPLASHED WHITE		Not requested.
AGOUTI		Not requested.	TOBIANO		Not requested.
CREAM		Not requested.	LEOPARD		Not requested.
PEARL		Not requested.	PATTERN-1		Not requested.
SILVER		Not requested.	BRINDLE 1		Not requested.
DUN		Not requested.	TIGER EYE		Not requested.
CHAMPAGNE		Not requested.	MUSHROOM (SHETLAND PONY)		Not requested.
LETHAL WHITE OVERO	N/O	1 copy of lethal white overo detected.	GRAY		Not requested.
SABINO 1		Not requested.	ROAN		Not requested.
DOMINANT WHITE (W5, W10, W20, W22)		Not requested.			

Anexo 4. Cálculos realizados sobre los costos y posibles ganancias de los ensayos realizados.

COSTO:														
Ensayo	(USD)	20%*	Costo bruto unitario*			Cantidades de ensayos			Costo bruto total					
Ext. Propia	0,10	0,12	Ensayo	Propia	Comercial	Muestra	Propia	Comercial	Ensayo	Propia	Comercial	Total (USD)		
Ext. Comercial	3,27	3,92	Fragmentos	21,7	25,5	APP*	18	18	Fragmentos	391	459	850		
Fragmentos	6,00	7,20	Secuenciación	25,3	29,1	PH**	8	8	Secuenciación	203	233	436		
Secuenciación	9,00	10,80	Tipificación	28,9	32,7	TIP***	26	26	Tipificación	752	850	1.602		
Tipificación	12,00	14,40	*El costo bruto unitario se obtiene de realizar la sumatoria de los ensayos de la tabla anterior, teniendo en cuenta el 20% de controles y posibles repeticiones, el trabajo de los RRHH, la técnica de extracción realizada ya sea propia o comercial, y el ensayo a realizar. Dependiendo estas variables se obtiene el costo bruto unitario por ensayo.			*Appaloosa = Fragmentos, **Paint Horse = Secuenciación, ***APP + PH = TOT = Tipificación			TOTAL DESARROLLO		USD 2.888			
RRHH**	12,00	14,40				TOTAL VALIDACIÓN*		USD 2.000						
* Controles y repeticiones. **Horas de RRHH aproximadas para realizar un ensayo completo.									*Para validar se destinaría 2000 USD con el fin de mandar nuestras muestras y futuras muestras para confirmar el ensayo.					
RRHH para el desarrollo: sueldos, salario vacacional, aguinaldo, etc														
			Empleado	Nominal	x14 /12	Hs Totales	\$ x H	USD X H	REALES*					
			Analista	44.154	51.513	200	258	6	1.288					
			Supervisor	88.309	103.027	40	515	13	515					
						TOTAL RRHH		USD 1.803						
						TOTAL (DESARROLLO + RRHH)		USD 6.691						
GANANCIA:														
			Costo bruto unitario			Precio de venta: 50% de ganancia			Margen de ganancia					
			Ensayo	Propia	Comercial	Ensayo	Propia	Comercial	Ensayo	Propia				
			Fragmentos	21,7	25,5	Fragmentos	32,6	38,3	Fragmentos	10,9				
			Secuenciación	25,3	29,1	Secuenciación	38,0	43,7	Secuenciación	12,7				
			Tipificación fue para confirmar herencia unicament			*Nos quedamos con el de menor precio								
			Animales registrados			Mercado potencial			Mercado posible			Ganancia posible		
			Pais	APP	PH	APP	PH	%	APP	PH	Pais	APP	PH	
			URU	1.945	722	195	72	40%	78	29	URU	845	366	
			ARG	1.011	700	101	70	20%	20	14	ARG	220	177	
			BRA	25.000	30.000	2.500	3.000	3%	75	90	BRA	815	1.139	
						*10% registros anuales						TOTAL	1.879	1.682
												GANANCIA TOTAL		USD 3.561
INDICADORES DE RENTABILIDAD:														
DATOS			Inversión	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	VAN		8.091			
*Crecimiento esperado 5%			- 6.691	3.561	3.739	3.926	4.123	4.329	TIR		49%			
*Tasa VAN 10%			- 6.691	1,10	1,21	1,33	1,46	1,61	PR		2,117369			
			- 3.453	- 363	2.587	5.403	8.091							