

Álvarez Quiñónez, Ruth Isabel¹; Quiñones Pérez, Carlota²; López Rivero, Jose Luis¹; Vega-Pla, Jose Luis²

1.- Laboratorio de Biopatología Muscular. Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología. Universidad de Córdoba.

2.- Laboratorio de Investigación Aplicada. Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. Córdoba

La osteocondrosis es una alteración idiopática focal del hueso subcondral durante el proceso de crecimiento, con riesgo de inestabilidad y ruptura del cartílago articular adyacente, el cual puede desembocar en la aparición de una osteoartritis.

Se desconoce la etiología específica y la patogenia de esta enfermedad, si n embargo, se han propuesto varias teorías etiológicas para el inicio y progresión de la osteocondrosis incluyendo la heredabilidad.

El objetivo de este estudio ha sido detectar mutaciones en cinco genes candidatos para la osteocondrosis en el caballo Pura Raza Español.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigación Aplicada de la Cría Caballar de las Fuerzas Armadas del Ministerio de Defensa de España, seleccionando 46 caballos inscritos en el Libro Genealógico del Pura Raza Español pertenecientes al Centro Militar de Cría Caballar de Jerez, sometidos a las mismas condiciones nutricionales y físicas.

- De todos los animales muestreados, 23 evidenciaban signos radiográficos de osteocondrosis en la articulación tarsotibial (OC +); mientras que los restantes no evidenciaban lesiones radiográficas (OC -).

Se seleccionaron los siguientes cinco SNP: dbSNP 105547002 (OCD 1), dbSNP 73865948 (OCD 2), GenBank rs397140642 (OCD 3), GenBank rs69595660 (OCD 4) y dbSNP AAWR02028318 (OCD 5), de los cuales se diseñaron cinco parejas de cebadores con el programa Primer3Plus, se amplificaron y secuenciaron posteriormente

- Se extrajo el ADN de las muestras siguiendo un protocolo estándar
- Se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Se realizaron dos amplificaciones. (de 80-120 pb y de 150-300 pb), los cuales mostraron una eficiencia media (Figura 1), con una aparición de la señal en los ciclos 23-24.

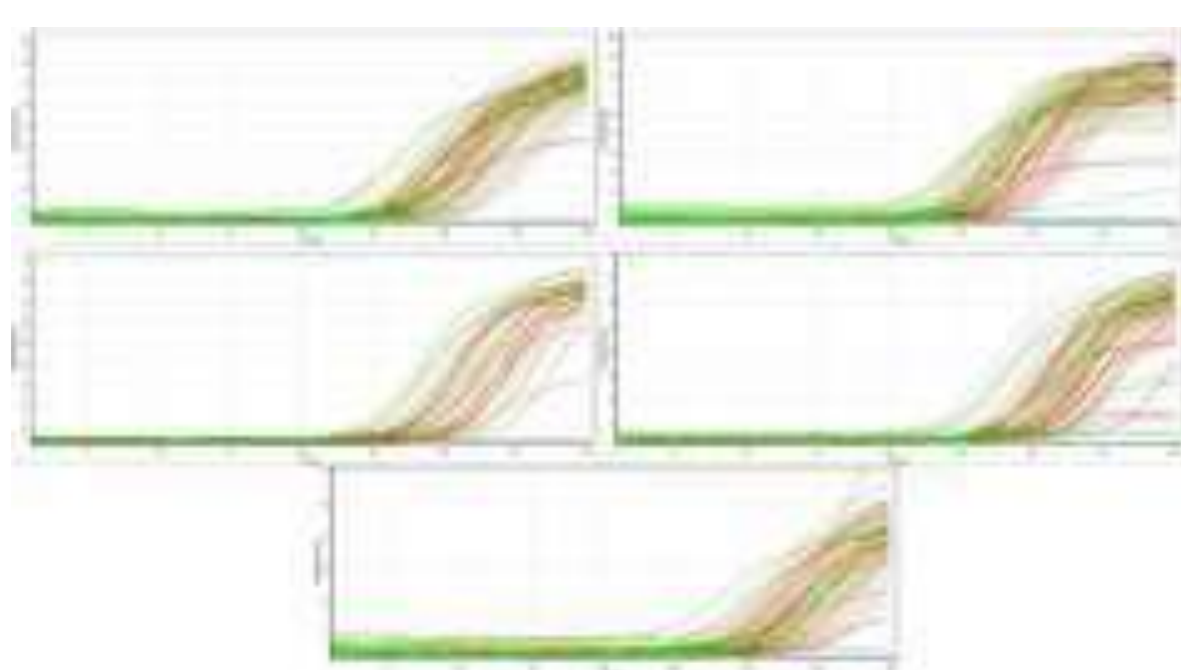


Figura 1. Primera fase de amplificación. Los fragmentos son de 80-100 pb. La amplificación comienza alrededor del ciclo 23-24. El control negativo (color azul) no se amplifica. Las muestras rojas son los animales OC+. Las muestras verdes, los animales OC-.

- Fueron sometidas a una electroforesis en un gel de agarosa (3%) para valorar la pureza del producto amplificado. En todos los casos, se observó una banda sencilla aproximadamente a la altura del tamaño esperado. (Figura 2)



Figura 2. Resultado de la electroforesis gel de agarosa. Todos los productos de la amplificación avanzaron en un frente común, sin observarse bandas extra y con el tamaño esperado según el marcador de pesos moleculares empleado. E: marcador de pesos moleculares; M: amplicones.

Con el análisis de curvas de fusión se comprobó que todos los fragmentos amplificados mostraban variabilidad entre individuos (Figura 3), los cuales fueron agrupados en función de la forma de la curva y del punto de fusión en la fase de separación.

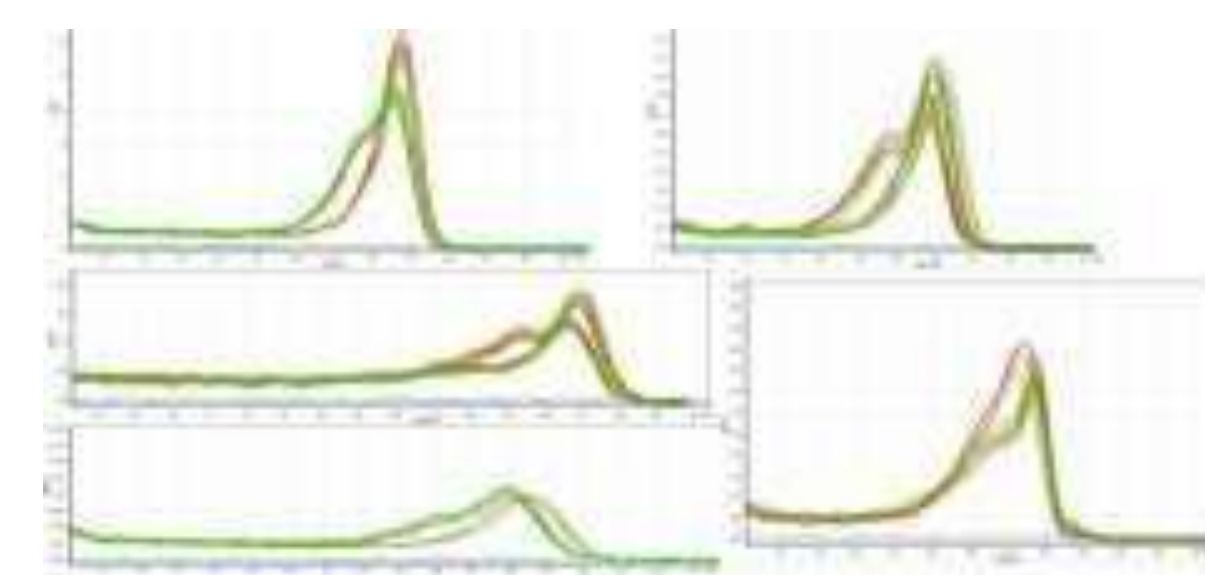


Figura 3. Análisis de curvas de fusión en la primera fase de amplificación. Los fragmentos son de 80-100 pares de bases. En todos los casos se observa variabilidad entre individuos (curvas simples o dobles). Las muestras rojas son los animales OC+. Las muestras verdes, de animales OC-. Las muestras azules son el control negativo.

En la secuenciación de las regiones seleccionadas se pueden observar las diferentes curvas obtenidas, en el caso del OC1 (Figura 4), se puede apreciar que en la posición 78 se ha detectado una mutación C por T

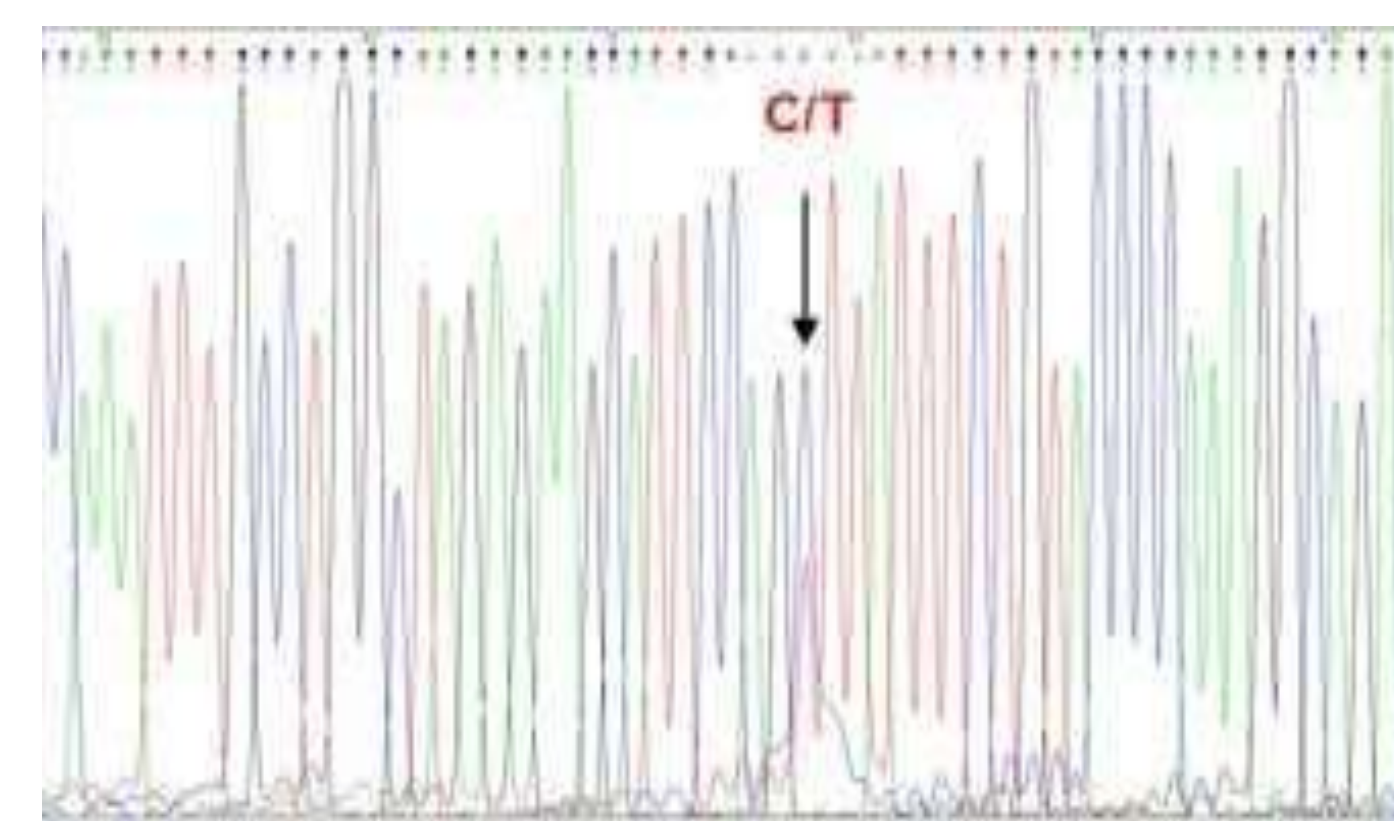


Figura 4. Secuenciación del caso OC1. Polimorfismo C/T por en la posición 78

Se estudió la asociación entre la caracterización genotípica de las muestras para cada uno de los genes y la presencia o ausencia de osteocondrosis mediante la prueba de χ^2 de Pearson, el cual no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) por lo cual, se rechaza la hipótesis planteada en este estudio.

Así, los resultados de la prueba exacta de Fisher fueron: $p = 0,463$ para la región 1; $p = 0,729$ para la región 2; $p = 1,000$ para la región 3; $p = 0,292$ para la región 4; y $p = 0,709$ para la región 5.

El análisis de curvas de fusión es una técnica rápida y de bajo costo para la caracterización de mutaciones, aunque el posible carácter multifactorial de la osteocondrosis impide asociar una de las mutaciones estudiadas con la presencia de lesiones de osteocondrosis en el caballo Pura Raza Español.