

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACION ALELICA DE LA MUTACION CAUSANTE  
DE LA PARALISIS PERIODICA HIPERCALEMICA  
EN CABALLOS CUARTO DE MILLA Y SUS CRUZAS  
EN EL NORESTE DE MEXICO**

**Por**

**M.V.Z. JORGE MORENO CHAPA**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ENERO DE 2007**

TM

SF357

5

M6

2007

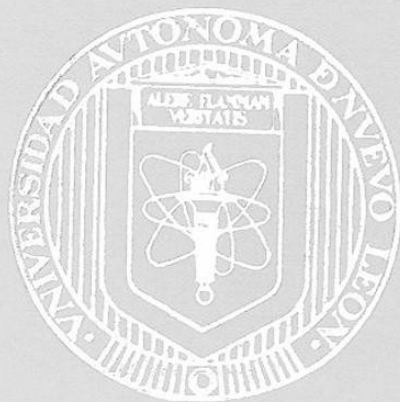
c.1



1080158502

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACION ALELICA DE LA MUTACION CAUSANTE  
DE LA PARALISIS PERIODICA HIPERCALEMICA  
EN CABALLOS CUARTO DE MILLA Y SUS CRUZAS  
EN EL NORESTE DE MEXICO

Por

M.V.Z. JORGE MORENO CHAPA

TESIS

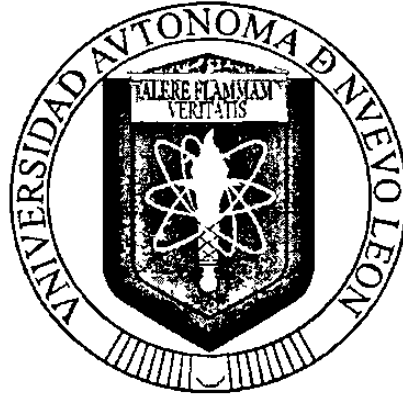
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

ENERO DE 2007

Rangel Fines  
UANL  
FONDO  
TES-S MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACIÓN ALÉLICA DE LA MUTACIÓN CAUSANTE DE LA  
PARÁLISIS PERIÓDICA HIPERCALÉMICA EN CABALLOS CUARTO DE  
MILLA Y SUS CRUZAS EN EL NORESTE DE MÉXICO

Por

M. V .Z. JORGE MORENO CHAPA

TESIS

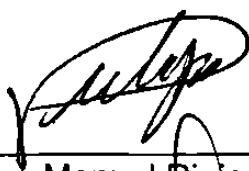
Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

ENERO, 2007

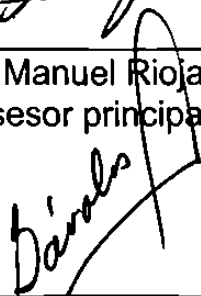
DETERMINACIÓN ALÉLICA DE LA MUTACIÓN CAUSANTE DE LA  
PARÁLISIS PERIÓDICA HIPERCALÉMICA EN CABALLOS CUARTO DE  
MILLA Y SUS CRUZAS EN EL NORESTE DE MÉXICO

APROBACIÓN DE TESIS



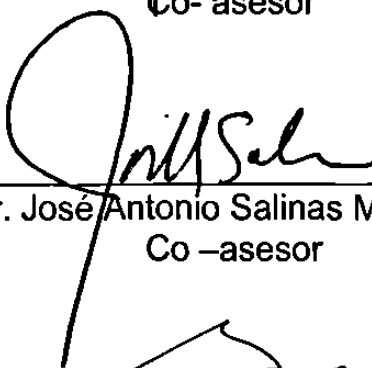
---

Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés  
Asesor principal



---

Dr. Guillermo Dávalos Aranda  
Co-asesor



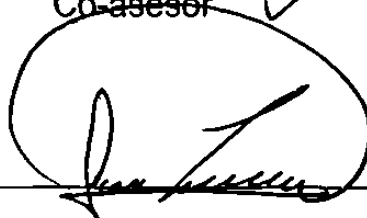
---

Dr. José Antonio Salinas Meléndez  
Co-asesor



---

Dr. Ramiro Avalos Ramírez  
Co-asesor



---

M. V. Z., M. C. José N. de Tellitu Schutz  
Co-asesor

## DEDICATORIA

Al gran espíritu que guía el destino de los hombres por haberme permitido cruzarme en el camino de mi esposa e hijos quienes han tenido a bien, soportarme en mis momentos de desesperación y fatiga; por el gran amor manifestado hacia mi ser eternamente reciban mi completo amor y agradecimiento por motivarme a que en el andar de mi camino haya tenido el cuidado de dejar una huella sobre esta tierra, tan profundamente grabada, que sirva en el futuro de guía para aquellos que caminan detrás de mi.

A mi hermano Chuy, por ser ejemplo de virtudes; quien ha sido el impulso y promotor de mi desarrollo, por haber sido soporte en mi andar y guía en la oscuridad de mis noches, por enseñarme a distinguir entre lo real y lo ilusorio, lo útil y lo inútil, lo recto y lo errado... por tu amor, te agradezco eternamente.

A mi madre Sra. Chapa, gracias por todo el apoyo, confianza y amor que siempre me has dado, por darme la oportunidad de lograr lo que anhelaba y por ser ejemplo de amor al hogar y al trabajo. Te quiero mucho.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés por su amistad en el campo deportivo y hoy en el campo de la ciencia y compartir sus conocimientos para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez por el apoyo y estímulo para seguir en la investigación.

Al MVZ M. C. José Nicolás de Tellitu Schutz por el apoyo en trabajo de laboratorio y su amistad.

Al Dr. Ramiro Ávalos Ramírez por su trabajo exigente para lograr el término de esta investigación.

Al Dr. Guillermo Dávalos por su apoyo como Director de esta Facultad.

Al Dr. Rafael Ramírez Romero por las facilidades brindadas como Jefe de Postgrado para la feliz culminación de este trabajo.

A Mariela Guzmán y al MVZ David Domínguez por los conocimientos técnicos que me brindaron en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de maestría y a la Facultad de Medicina Veterinaria por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado.

Al Ing. Juan Carlos Flores Tamez, por brindar las facilidades por ayudarme a lograr mi superación profesional.

*De aquello que otros me enseñaron, yo escribo con la esperanza de que llegue a las masas y aunque sólo sea en unos pocos, mi semilla dé frutos.*

*Muchas son las desilusiones del docente cuando contempla en su pensar que hay sordos que quieren serlo y ciegos que desean cubrir sus ojos.*

*Haz que en mi, perdure la ilusión de que éste, mi trabajo, ha sido motivo para ti, de desentrañar la vida.*

*“ser”*

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	4
1.1.1 Historia del ADN .....	5
1.1.2 Tipo de ADN .....	5
1.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	5
1.1.4 Polimorfismo de longitud de fragmentos de Restricción (RFLP) .....	6
1.1.5 HYPP Aspecto general .....	6
1.1.6 Signos clínicos.....	8
1.1.7 Causa de los ataques .....	11
1.1.8 Diagnóstico molecular HYPP .....	12
1.2 Objetivos .....	13
1.2.1 Objetivo General .....	13
1.2.2 Objetivo particular .....	14
1.2.3 Hipótesis .....	14

## CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
2.1 Obtención de muestras .....	15
2.2 Aislamiento del ADN.....	15
2.3 Amplificación por PCR.....	16
2.4 Análisis RFLP.....	18
2.5 Verificación de genotípicos. ....	18
2.6 Determinación de frecuencias génicas.....	19

## CAPÍTULO 3

RESULTADOS.....	20
3.1 Extracción de ADN .....	20
3.2 Amplificación mediante PCR.....	21
3.3 Análisis de RFLP .....	22
3.4 Determinación de la frecuencia alélica y genotípica.....	23

## CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN .....	26
-----------------	----

## CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES.....	28
-------------------	----

## CAPÍTULO 6

LITERATURA CITADA.....	29
------------------------	----

## CAPÍTULO 7

### APÉNDICES

Apéndice 1	
Material .....	35

Apéndice 2	
Equipo.....	36

Apéndice 3	
Contenido y concentración del estuche Taq & Go, Invitrogen) .....	37

Apéndice 4	
Preparación de soluciones y reactivos .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Certificado de Registro Genealógico de la asociación de caballos Cuarto de Milla de los E. U. A., especificando que el animal tiene un ancestro con la mutación causante de la HYPP .....	3
2 Caballo cuarto de milla "Impressive" .....	10
3 Ejemplo de interpretación de resultados del tratamiento de los productos de PCR con la enzima de restricción Taq I. ....	19
4 Ejemplo de visualización de purificación de ADN a partir de sangre. Puede verse que en algunas muestras no se visualiza el ADN en esta purificación, pero se obtuvo en un siguiente aislamiento .....	20
5 Ejemplo de visualización en el fotodocumentador Fluor-S MultimagerRT (Bio- Rad) de la purificación de ADN.....	21
6 Ejemplo de visualización de análisis RFLP .....	22

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Lugares donde se realizó el muestreo.....	16
2	Numero de individuos encontrados de cada genotipo.....	23
3	Frecuencia de los tres genotipos posibles.....	23

## ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BSA	Albúmina serica bovina
C	Citocina
°C	Grados centígrados
ddNTP	Didesoxinucleótido Trifosfato
dNTP's	Dinucleotidos Trifosfatos
DMC	Deficiencia Manosidasa Caprina
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra-ácetico
G	Guanina
KCL	Cloruro de potasio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
min	Minutos
MM	Homocigoto Dominante
Mm	Heterocigoto
mm	Homocigoto Recesivo



MgCl	Cloruro de Magnesio
ng	Nanogramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction )
pH	Concentración de iones de hidrógeno
pmol	Picomoles
Pol	Polimerasa
p.b.	Pares de Bases
RBC	Glóbulos rojos
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
T	Timina
TAE	Tris acetato EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRIS/HCL	Trisma base/ácido clorhídrico
μ l	Microlitros
μg	Microgramos

## RESUMEN

Jorge Moreno Chapa

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Laboratorio de Genética Veterinaria

Título del Estudio: Determinación alelica de la mutación causante de la parálisis periódica hipercalémica en caballos cuarto de milla y sus cruzas en el noreste de México.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias Veterinarias

Área de Estudio: Genética Animal

Propósito y Método de estudio: La enfermedad genética llamada parálisis periódica hipercalémica (HYPP), que tiene un tipo de herencia autosómico dominante, se presenta en los descendientes de un semental originario de los E. U. A. llamado "Impressive", el cual tuvo un gran número de descendientes, ya que los síntomas de la misma sólo se presentan en la edad adulta de los animales afectados. Es conocido que en México existen descendientes del semental mencionado, aunque a diferencia de lo que sucede en los E.U.A., no se requiere de una prueba genética para detectar la HYPP al momento en que se quiere registrar a los animales. Debido a lo anterior, no se conoce la frecuencia de esta mutación en el noreste de México. Por lo anterior, en el presente estudio se fijaron los objetivos de identificar animales portadores de la HYPP y de determinar su frecuencia génica y alélica. Para lograr lo anterior, se analizaron mediante la técnica de PCR-RFLP muestras sanguíneas de caballos cuarto de milla de la zona. Se amplificó el fragmento del gen que codifica la mutación causante de la HYPP. Se logró determinar que en la población analizada se detectaron individuos con los genotipos de afectado por HYPP, tanto en condición homocigoto como heterocigoto, por lo que se concluye la existencia de la mutación en Nuevo León, con una frecuencia relativamente alta.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Actualmente los programas de mejoramiento genético han originado que se enfoque la atención hacia los sistemas de cruzamiento, debido a las consecuencias genéticas que han resultado en líneas de caballos populares. Por esto, los criadores al utilizar un determinado semental por su popularidad incrementan en gran medida su participación dentro del banco genético total de una raza determinada; esto influye en la fijación de una característica en la población. En el caso particular del semental Impressive, que pertenece a la raza Cuarto de Milla, dadas su cualidades de conformación se utilizó su semen de manera intensa sin conocer que era portador de una mutación que se originó en él; ésta es una mutación de punto que consiste en una sustitución de Citosina a Guanina en el gen que codifica el dominio transmembranal de la sub-unidad alfa del canal de sodio muscular, lo cual origina susceptibilidad a episodios de parálisis muscular. Esta alteración se denomina parálisis periódica hipercalémica (HYPP por sus siglas en inglés) y se presenta en los animales Cuarto de Milla y sus cruas que tienen relación de parentesco con Impressive (MacArthur, 2006, Rudolph *et al.*, 1992).

Un informe publicado por la Universidad de Saskatchewan menciona que aproximadamente 50,000 caballos registrados de esta raza están relacionados en su genealogía a conocidos reproductores afectados por la enfermedad (Rudolph

et al., 1992); mientras que en otro estudio se menciona que se identificó a un antecesor común de un grupo de caballos afectados (Impressive), el cual por su gran popularidad contribuyó sustancialmente a la composición genética de 2.9 millones de caballos registrados, lo cual motivó la investigación del origen molecular de la enfermedad para identificar los portadores y disminuir su frecuencia en la población (Rudolph et al. , 1992).

Los caballos con esta mutación pueden ser reconocidos por una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo de Longitud en Fragmentos de Digestión (PCR-RFLP), la cual consiste en una amplificación de un fragmento específico del gen del canal de sodio seguida de una separación electroforética de los productos de PCR digeridos por la enzima de restricción Taq I de los productos amplificados (Rudolph et al., 1992).

A partir de la introducción de la prueba diagnóstica, los criadores de caballos Cuarto de Milla (Quarter Horse) y Pura Sangre (Thoroughbred) requieren de una prueba diagnóstica de HYPP para seleccionar reproductores libres de la enfermedad sobre todo en aquellos que tengan relación genealógica con el pedigrí fuente de la mutación génica (Fig. 1).

Certificate of Registration  
**AMERICAN QUARTER HORSE ASSOCIATION**  
 Amarillo, Texas 79168

NAME	REGISTRATION NUMBER	STATE / COUNTRY FOALED
CANELA JACKY BEE	4775637	MEXICO
COLOR	SEX	FOALED
SORREL	MARE	MARCH 03, 2005
BREEDER	AQHA ID NUMBER	CITY
GONZALEZ ALEJANDRO	2753382	MONTERREY NL 645 MEXICO
OWNER	AQHA ID NUMBER	CITY
GONZALEZ ALEJANDRO	2753382	MONTERREY NL 645 MEXICO

	SONNYS SONDANCE	1471409
SIRE	SONNYS STORMY BREEZE	3040062
STORMY BREEZE GOLD	3717874	STORMY BREEZE SAN
	MARIGOLD MANOR	2606369
	JACKYJAY	3207707
DAM	REGIA JACKY BEE	4175873
	TEE J BUFFIE BEE	2571548
	TEE J JACK WALKER	3207707
	TEE J PRIETA BOY	3000498
	JACKIE BEE	0205387
	REWA DIAMOND	0851778

MARKINGS  
 TWO STARS. NO OTHER MARKINGS.

This horse has an ancestor known to carry HYPP, designated under AQHA rules as a genetic defect. AQHA recommends testing to confirm presence or absence of this gene.

This is to certify that the above named and described horse has been registered in the Stud Book of The American Quarter Horse Association.  
 PROSPECTIVE PURCHASER — Check the horse's markings, color and age, against this certificate. This certificate is issued in sole reliance on written application submitted by the owner at time of foaling, without further verification by the Association. Ownership of this certificate is retained by the Association, and issued upon express condition that the Association has the continuing privilege to demand immediate return thereof for correction, cancellation, or any other official reason under Association rules, and pending resolution of the matter, the Association may retain possession thereof.

DATE ISSUED  
 MAY 09, 2006

*Bill Boney*  
 EXECUTIVE VICE-PRESIDENT

**TRANSFER RECORD**

The last name entered hereunder is the present owner of this horse as shown on the records of The American Quarter Horse Association. To transfer the within described horse, make transfer on a separate transfer form or bill of sale, which will be furnished free by the ASSOCIATION. Send it to the office of the American Quarter Horse Association—along with the registration certificate and the transfer fee. The transfer of ownership will then be made on this certificate and mailed as instructed.

FOR OFFICE USE ONLY - DO NOT WRITE ON THIS CERTIFICATE		
Date of Purchase	Name and Address of Owner as Shown by Transfer Record	Attest of Record by Executive Vice-President

Copyright 1974 AMERICAN QUARTER HORSE ASSOCIATION

Figura 1. Certificado de Registro Genealógico de la asociación de caballos Cuarto de Milla de los E. U. A., especificando que el animal tiene un ancestro con la mutación causante de la HYPP.

La ocurrencia y frecuencia entre los caballos Cuarto de Milla del alelo de la HYPP en México se ha limitado a resultados obtenidos al realizar la prueba diagnóstica que es requerida en animales que van a ser registrados en la asociación de criadores. Debido a esto, no existe un antecedente de monitoreo en la población general de caballos de esta raza, lo cual puede ayudar a establecer un banco de datos para identificar las líneas genealógicas afectadas y así restringir su utilización en programas de cruzamiento con la finalidad de eliminar y controlar la presencia de la mutación en nuestro país (Sloet van Oldruitenborgh y Oosterbaan 1999, Naylor *et al.* 1994a, Taylor *et al.* 1994b).

Los registros de datos de un programa de prueba de HYPP resultan imprescindibles para el control de esta enfermedad que hasta el momento no se diagnostica en laboratorios mexicanos, ya que las pérdidas que originaría por su afectación en la población equina a través de inseminación artificial, serían considerables por su rápido crecimiento en la misma.

## 1.1 ANTECEDENTES

### 1.1.1 Estructura del ADN.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) ha sido estudiado, en términos generales, desde que Chargaff estableció que la cantidad de adenina es igual a la de timina, y la de citosina es igual a la de guanina; asimismo, la estructura del ADN es de forma helicoidal, como lo establecieron Wilkins y Franklin. Con esta información, en 1953, Watson y Crick pudieron establecer que el ADN es una doble hélice y

que las bases nitrogenadas se encuentran en el interior de las mismas. De esta forma, la adenina se une con la timina mediante dos puentes de hidrógeno y la citosina se une con la guanina mediante tres puentes de hidrógeno, constituyendo los peldaños de la escalera de caracol. Los pasamanos de la misma escalera están constituidos por los azúcares (desoxirribosa) y los grupos fosfato (Karp, 1996).

### 1.1.2 Tipos de ADN.

Entre los tipos de ADN se pueden mencionar el ADN codificante (exones) y el ADN no codificante (intrones), ambos dentro de las secuencias de los genes. Además, existe el ADN regulador que se encuentra fuera de las secuencias de los genes, como las secuencias TATA, que se encargan de indicar a la ADN polimerasa el sitio de inicio de las secuencias codificantes (Karp 1998).

### 1.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

Durante la década de los '80, Kary Mullis diseñó una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular. A esta técnica se le dio el nombre de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Esta metodología tiene grandes ventajas, ya que es muy específica, potente y rápida, por lo que permite hacer estudios genéticos que hasta antes de su invención eran imposibles o requerían mucho tiempo. Una de sus desventajas

es que el segmento a amplificar debe ser, por lo general, previamente secuenciado, aunque en ocasiones se pueden utilizar iniciadores de PCR degenerados (con múltiples secuencias) (Glatzel 1997, Watson *et al.* 1992).

#### 1.1.4 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

Para poder determinar el genotipo de los individuos mediante PCR, por lo general se necesita que al producto de PCR se le realice un paso posterior a la amplificación, que consiste en digerir ese producto con una enzima de restricción. De esta forma, si se quiere distinguir entre un individuo que presenta una mutación y otro que no, se elige la enzima de restricción que reconozca su sitio de corte ya sea en un genotipo u otro, de forma que el corte se efectúe sólo en los individuos de un genotipo determinado. De esta forma se visualizarán una o dos bandas al analizar mediante electroforesis los productos de PCR digeridos (Griffiths *et al.* 1995, Puertas 1999).

#### 1.1.5 Parálisis periódica hipercalémica. Aspectos generales.

A partir de que la zona noreste del país es considerada estratégicamente comercial, la actividad pecuaria, específicamente la cría y reproducción de equinos, participa sustancialmente en su desarrollo; además, dado que se cuenta con las principales instalaciones del deporte ecuestre del país, se atrae la



atención de criadores extranjeros que participan en el desarrollo e intercambio en esta actividad.

Una de las razas de caballos de mayor utilidad en las distintas disciplinas ecuestres es la Cuarto de Milla, siendo una de sus principales características fenotípicas la desarrollada musculatura que presentan, la cual como motivo de selección de reproductores, originó a la vez la propagación de una enfermedad muscular denominada Parálisis Periódica Hipercalemica (HYPP). La HYPP resulta de una mutación de punto en el gen del canal de sodio de las células musculares. Los signos principales de la enfermedad son tremor muscular, debilidad, parálisis de músculos respiratorios y colapso; los cuales se manifiestan principalmente entre los dos a tres años de edad dependiendo de la influencia que tienen las prácticas de manejo y la alimentación que estimulan esta alteración (Duyn, y Haeringen 1995). La Parálisis Periódica Hipercalemica (HYPP) es una enfermedad muscular que afecta a los caballos Cuarto de Milla causada por un defecto genético hereditario que trastorna los canales de sodio de las membranas de las células musculares, esta mutación de punto se origina por la sustitución sencilla de citosina por guanina, en el dominio IV, de la región S transmembranal en los canales de sodio. El intercambio de citosina por guanina resulta en la sustitución de un residuo de leucina por fenilalanina, este es un proceso conservador ya que todos los canales de sodio del cerebro y músculo, tienen secuencias de subunidades alfa para fenilalanina en esta posición (Cannon *et al.* 1995, Rudolph, *et al.* 1992). Esta enfermedad es considerada de rasgo autosómico dominante que afecta a hembras y machos y es heredado de

generación a generación con igual frecuencia; afectando con mayor intensidad a los caballos homocigoto dominante (H/H) que los heterocigotos (N/H). Solamente el homocigoto recesivo (N/N) no es afectado. El resultado de cruzar un caballo afectado heterocigoto (N/H) con una yegua normal (N/N) es de 50% normales mientras que el otro 50% lleva la mutación (N/H). De tal forma, que sólo cruzando animales sanos (previamente detectados por diagnóstico molecular de Parálisis Periódica Hipercalemica), podría eliminarse la mutación (Naylor, *et al.* 1999, Spier, *et al.* 1990).

En un estudio realizado en Japón se encontró que existe un tipo de parálisis periódica hipercalemica en humanos, con la diferencia de que la sustitución de aminoácidos es diferente, ya que la treonina es substituida por una metionina (Arahata *et al.* 1993, Fontaine *et al.* 1990, Miller, *et al.* 2004, Ruscak 1997, Sakoda *et al.*, 1997).

#### 1.1.6 Signos clínicos.

La patología que desarrolla este proceso de mutación es principalmente un repentino incremento en la concentración de potasio en suero, por arriba de 8 a 9 mEq/L; las altas concentraciones de potasio indican que se ha alterado la entrada y salida convencional de potasio. Este descontrol ocasiona un cambio de voltaje en las células musculares y por consecuencia espasmos involuntarios o una exagerada relajación muscular (Naylor J. M., 1994).

Los animales afectados con HYPP manifiestan ataques impredecibles de parálisis, debilidad y colapso; ocasionalmente la muerte súbita puede ocurrir debido a una parálisis severa, posiblemente debido a una falla del corazón o parálisis de los músculos respiratorios (Bailey *et al.* 1996, Spier S.J. 1999.).

El defecto genético que ocasiona HYPP se conoce como una mutación que ocurre como parte del proceso natural de evolución, la mayoría de estas mutaciones que constantemente están sucediendo no son compatibles con la vida. Por lo tanto, ésta mutación no se originó como el producto de endogamia, sino que se empezó a manifestar debido a las cruas selectivas de buscar animales con mejor musculatura. Además, como la HYPP es una enfermedad de heredabilidad dominante puede transmitirse a otras razas de caballos que utilicen Cuarto de Milla en su conformación genética (Naylor *et al.*, 1999, Nollet y Deprez, 2005).

Investigaciones recientes demuestran que en la mayoría de los caballos con HYPP que han sido analizados, se les ha encontrado la mutación; excepto a unos cuantos que tenían manifestaciones de HYPP, pero eran debidas a otro tipo de enfermedad muscular. De estos animales que mostraron la mutación sólo el 30% no había manifestado aún la enfermedad, lo que indica manifestaciones subclínicas de animales afectados (Pirila, *et al.* 2002, Ptacek *et al.* 1991).

En la Universidad de Davis, California (E.U.A.) se realizaron investigaciones para seguir el curso de la diseminación de la mutación y llegaron a un origen común, un semental de magnífica estructura física ideal para las actividades propias de su

especie, llamado "IMPRESSIVE" (Figura 2). Según estimaciones de los reproductores se ha logrado calcular que un solo semental valioso de la raza Pura Sangre Inglés puede llegar a contribuir hasta con un 30% de la constitución genética total de esa población (Spier, *et al.* 1990).



Figura 2. Caballo cuarto de milla "Impressive"

En este caso del cuarto de milla "IMPRESSIVE" ha tenido una gran difusión en EUA y por los antecedentes de intercambio comercial constante entre México y EUA se sospecha la presencia de la mutación genética en los animales que presentan signos clínicos de HYPP (Rudolph J. A. *et al.*, 1992, Zeilmann, 1993).

Este padecimiento también se le conoce como enfermedad del IMPRESSIVE, aunque es una enfermedad muscular que se ha reportado en varias líneas de caballos tales como Apaloosa y Pintos (Church 1995, Rudolph *et al.*, 1992).

Esta enfermedad aparece en caballos que desarrollan importante masa muscular, no importa si son caballos enteros, yeguas o castrados. Hipercalemia quiere decir aumento de potasio en sangre, lo cual produce convulsiones, trastornos respiratorios, parálisis y muerte en algunas ocasiones (Rudolph *et al*, 1992).

La HYPP es una enfermedad que se relaciona con la alimentación rica en potasio, en animales que están en reposo o en casos de estrés tales como transportación o eventos fuertes donde el caballo desgasta mucha energía y es confundida con síndrome de cólico ya que los animales afectados normalmente caen por la debilidad muscular, presentando similar incoordinación de las extremidades y los sonidos respiratorios. La diferencia entre HYPP y cólico es que la duración de una convulsión es muy rápida y el caballo está totalmente normal después de la recuperación y en el cólico se comporta totalmente diferente (Spier 1999).

#### 1.1.7 Causa de los ataques.

El potasio es un electrolito muy importante para la función normal de los músculos y tejido nervioso, de hecho cada célula del cuerpo contiene este importante electrolito, el cual está encargado de mantener el volumen de la célula y la actividad eléctrica del organismo. La cantidad de potasio en el organismo es regulada por algunas hormonas que son producidas por órganos como el páncreas, glándulas adrenales, tiroides etc.; los caballos ingieren grandes cantidades de potasio en los forrajes que son excretados por vía renal al exterior encontrando grandes cantidades de potasio en la orina. Inicialmente no se sabía

que es lo que causaba los síntomas de HYPP, si la falta de regulación hormonal o alteraciones musculares. Después de realizar estudios de comportamiento hormonal se encontró que los animales afectados por HYPP eran normales por lo que se excluyó esa posible causa (Duyn y Haeringen, 1995; Naylor 1994a).

Las investigaciones concluyeron en un origen genético, determinando que obedece a la presencia de un gen mutante en los animales provenientes del IMPRESSIVE, este gen es responsable del control de sodio y potasio. El ataque convulsivo proviene cuando el potasio sale de la célula al torrente sanguíneo y la célula se llena de sodio produciendo una alterada conducción eléctrica hacia los músculos desarrollando debilidad muscular, estado convulsivo y trastornos respiratorios (Taylor et al. 1992; Rudolph 1992, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan 1999, Spier 1999).

#### 1.1.8 Diagnóstico molecular de HYPP.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y la digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción (RFLP) hacen posible diagnosticar a los animales portadores o afectados con la mutación con una precisión de 99% (Bowling et al. 1996).

La técnica de PCR-RFLP se fundamenta en analizar el material genético de los caballos (Ácido DesoxirriboNucléico-ADN) mediante la amplificación del fragmento del gen donde ocurre la mutación a través de la amplificación *in vitro*

originada por la enzima termoestable llamada *Taq* polimerasa, proveniente de una bacteria (*Thermus aquaticus*), la cual efectúa el proceso de polimerización de una cadena complementaria de ADN, obteniéndose millones de copias del fragmento de interés (Watson *et al* 1992). Este fragmento es posteriormente digerido con la enzima de restricción *Taq* I que lo corta si no existe la mutación, originando dos fragmentos, mientras que si la hay sólo se genera un fragmento para encontrar la mutación dentro del gen específico. Esto consiste en una amplificación de un fragmento específico del gen del canal de sodio, el cual es después digerido con una endonucleasa (enzima de restricción *Taq* I) que lo corta si no existe la mutación, originando dos fragmentos, mientras que si la hay solo se genera un fragmento (Rudolph *et al.* 1992). Posteriormente se visualiza este polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) del ADN amplificado a través de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa logrando así identificar la mutación (Rudolph *et al.* 1992). Existe un estudio publicado en México sobre la frecuencia de HYPP, en el cual se menciona que se encontró que un 61.33% de los animales muestreados importados a México tenían el gen de HYPP (Ayala Valdovinos *et al.* 2006).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo general.

Determinación de la frecuencia de la mutación causante de la parálisis periódica hipercalemica en caballos cuarto de milla y sus cruzas en Nuevo León.

### 1.2.2 Objetivos particulares.

- A. Implementar la metodología para el diagnóstico molecular de la enfermedad Parálisis Periódica Hipercalemica en el Laboratorio de Genética de la Facultad.
- B. Estimar la frecuencia observada de la mutación en la muestra analizada.

### 1.2.3 Hipótesis

En los caballos Cuarto de Milla y sus cruzas del noreste de México existe una frecuencia significativa de la mutación causante de HYPP.



## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODO

#### 2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras colectadas consistieron en 5 ml. de sangre periférica de cada caballo, depositadas en tubos vacutainer con EDTA.

Se obtuvieron muestras de sangre de una parte representativa de equinos de la raza cuarto de milla de 3 municipios de Nuevo León (Allende, Cadereyta y Santiago), 2 municipios de Coahuila (Arteaga y Saltillo) y 1 de Tamaulipas (Villagrán).

En total se obtuvieron 300 muestras de sangre, a todas las cuales se les extrajo el ADN (Tabla 1).

#### 2.2 AISLAMIENTO DE ADN

Se utilizó el estuche comercial Puregene de la marca Genomic DNA Purification Kit de Gentra Systems (De Tellitu Schutz 2006). Una vez aislado el ADN se procedió a verificar su aislamiento mediante corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 30% a 70 volts por 30 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis vertical para geles de poliacrilamida. El material y equipo de laboratorio utilizados se describen en los Apéndices 1 y 2.

Tabla 1. Lugares en los que se realizó el muestreo.

<i>Lugar</i>	<i>Nombre</i>	<i>Municipio</i>	<i>No. de muestras</i>
Nuevo León	El Fraile	Allende	50
Nuevo León	Los Cavazos	Santiago	100
Coahuila	Lienzo Charro	Arteaga	50
Coahuila	Lienzo Charro	Saltillo	50
Tamaulipas	La Retama	Villagrán	50
Total			300

### 2.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR.

Los iniciadores a utilizar permiten la amplificación, por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, de la secuencia correspondiente al segmento del gen donde ocurre la mutación, específicamente en la base nitrogenada 2188 de su ADNc. Los iniciadores de PCR son los siguientes (Rudolph *et al.* 1992):

IVS2F: 5'-GGGGAGTGTGTGCTCAAGATG-3'

IVS3R: 5'-AATGGACAGGATGACAACCAC-3'

La mezcla de reacción que se utilizará para la amplificación es la siguiente, empleando el estuche para PCR Taq & Go (Gentra Systems). (Rudholp *et al.* 1992).

Taq & Go .....	10 $\mu$ L
Iniciador 1 .....	0.5 $\mu$ L
Iniciador 2 .....	0.5 $\mu$ L
ADN .....	5.0 $\mu$ L
Agua ultrapura .....	34 $\mu$ L

Una vez obtenida la mezcla fue sometida al siguiente programa de PCR en el Termociclador MJ Research PTC-100.

1. Desnaturalización inicial a 94° C por un minuto.
2. Treinta ciclos de desnaturalización a 94° C por un minuto, alineación a 60° C por 1 minuto y extensión a 72° C por un minuto.
3. Extensión final a 72° C por 10 minutos (Rudholp *et al.* 1992).

Además, para determinar la temperatura óptima de alineación se utilizó un termociclador de gradientes PX2 Thermal Cycler (Termo), determinándose que la mejor temperatura fue de 64° C (Bladbjerg *et al.* 2002).

Al término de esto se procedió a correr los productos de PCR en el gel de poliacrilamida al 30% para identificar los productos amplificados, marcando el ADN con bromuro de etidio y visualizándolos mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador, de acuerdo con la metodología convencional.

## 2.4 ANÁLISIS RFLP.

Una alícuota (10 $\mu$ l) de los productos de PCR obtenidos se sometió a digestión incubándose por una hora a 65 ° C en presencia de la enzima de restricción Taq1, la cual corta el producto de PCR en un sitio específico para los animales que no presentan la mutación (O'Rourke *et al.* 2006, Rudholp *et al.* 1992).

## 2.5 VERIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS

Las bandas observadas por efecto de la digestión de los productos de PCR por la enzima de restricción, deben de evidenciar los siguientes genotipos:

Normal (homocigoto recesivo, N/N): una banda de 64 p. b. y una banda de 28 p.b.

Afectado (heterocigoto, N/H): una banda de 92 pb, una de 64 p. b. y una de 28 p.b.

Afectado (homocigoto dominante, H/H): una banda de 92 p. b. (Rudholp *et al.* 1992).

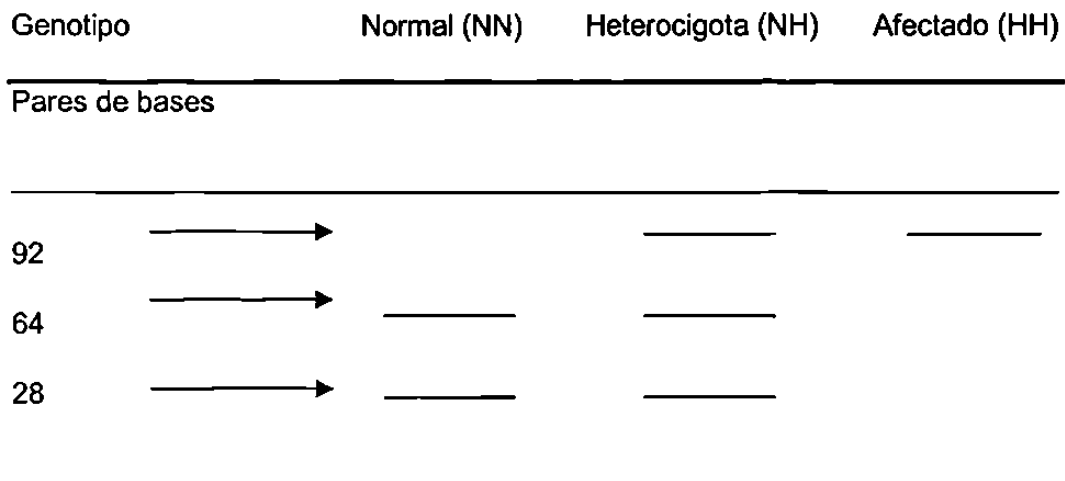


Figura 3. Ejemplo de interpretación de resultados del tratamiento de los productos de PCR con la enzima de restricción Taq I. Se muestra los genotipos homocigoto dominante (normal, NN) en el carril 1, heterocigoto (portador, NH) en el carril 2 y homocigoto recesivo (afectado, HH) en el carril 3.

## 2.6 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS GÉNICAS

El porcentaje de cada genotipo se determinó mediante conteo directo al observar los resultados moleculares. El número de animales de cada genotipo se dividió entre el número total de animales para determinar las frecuencias de cada genotipo (NN normal homocigoto, NH afectado heterocigoto, HH afectado homocigoto) (Riojas et al. 2005).

# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS

### 3.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Del total de 300 muestras de sangre obtenidas, se obtuvo ADN purificado de todas las muestras (Figura 2). La calidad del ADN genómico extraído se comprobó mediante su corrimiento electroforético y de acuerdo a la intensidad de la banda obtenida, por apreciación visual, las muestras se diluyeron a una concentración aproximada de  $50 \text{ ng} / \mu \text{L}$ .

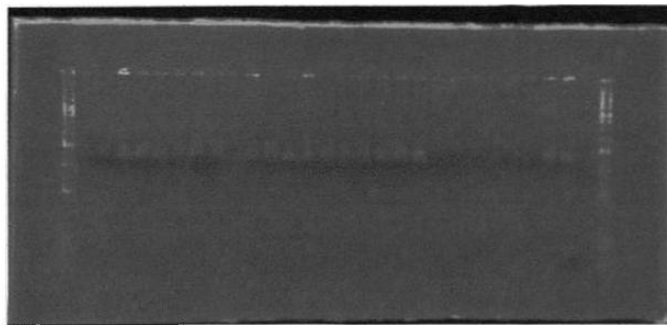


Figura 4. Ejemplo de visualización de purificación de ADN a partir de sangre. Puede verse que en algunas muestras no se visualiza el ADN en esta purificación, pero se obtuvo en un siguiente aislamiento.

### 3.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR.

Del total de 300 muestras de ADN obtenidas, se les realizó el proceso de PCR a 54, pero sólo se ha obtenido el producto de PCR en 51 muestras (Tabla 2). Sólo se amplificaron 54 muestras de ADN debido a que se agotaron los iniciadores de PCR. Lo anterior fue debido a que gran parte de los iniciadores se utilizaron durante la estandarización del procedimiento de PCR, por lo que para el momento en que se obtuvo una correcta amplificación del producto de PCR ya se contaba con poca cantidad de los mismos.

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de visualización de amplificación por PCR. Se utilizó el marcador de peso molecular Hiperladder V para verificar el tamaño de los productos de PCR.

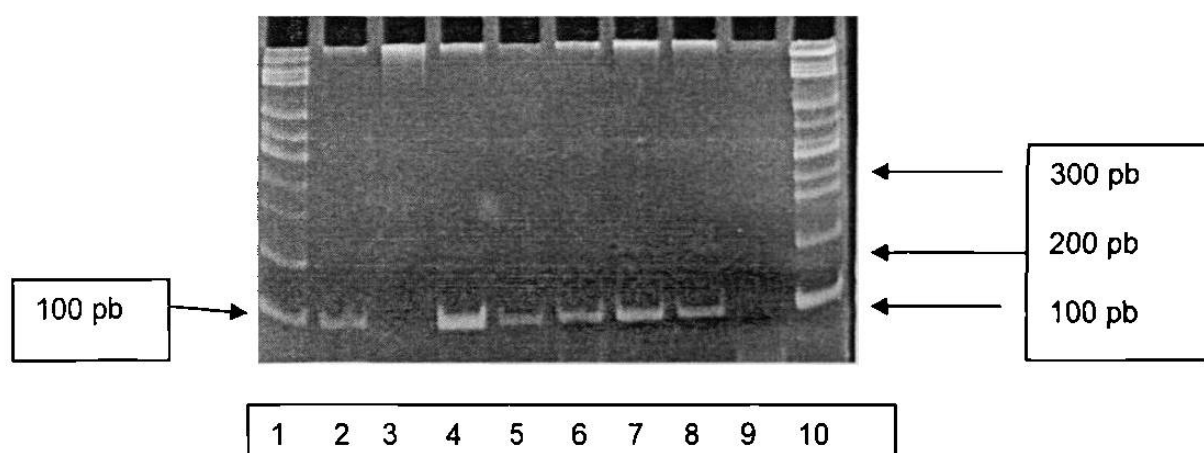


Figura 5. Ejemplo de visualización en el fotodocumentador Fluor- S Multimager<sup>RT</sup> (Bio- Rad) de la purificación de ADN a partir de muestras sanguíneas. Carriles 1 y 10: Marcador de peso molecular; carriles 2 a 8: productos de PCR; Carril 9: control negativo.

Puede verse que todas las muestras, excepto la del carril 3, mostraron el producto de PCR esperado de 92 p. b. La muestra de la cual no se obtuvo amplificación fue procesada posteriormente para obtener el producto de PCR.

### 3.3 ANÁLISIS RFLP.

Del total de 51 productos de PCR amplificados, se logró obtener la digestión mediante enzima de restricción de todos los 51 productos (Tabla 2).

En la figura 4 se muestra un ejemplo de digestión mediante RFLP. Puede verse que no es posible distinguir el producto de digestión de 28 pares de bases. Sin embargo, es posible determinar los genotipos de los animales analizados, ya que el homocigoto dominante (HH, doble afectado) tiene una banda de 92 p .b. el heterocigoto (HN, afectado) tiene dos bandas, una de 92 pb. y otra de 64 p. b, mientras que el homocigoto recesivo (NN, normal) tiene una banda de 64 p. b .

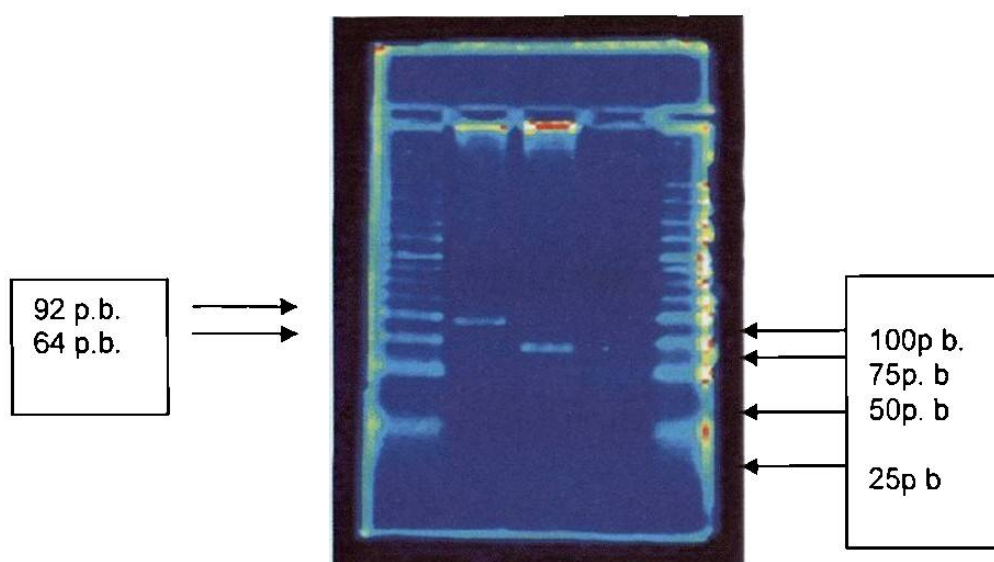


Figura 6. Ejemplo de visualización de análisis RFLP. Puede verse que la Muestra 1 tiene las bandas de 92 y 64 p. b., mientras que la muestra 2 solo tiene la banda de 64 p. b. La banda de la muestra 3 es un dímero de iniciador



Tabla 2. Muestras analizadas de acuerdo al lugar de procedencia.

<i>Lugar</i>	<i>Nombre</i>	<i>Municipio</i>	<i>No. de muestras</i>
Nuevo León	El Fraile	Allende	13
Nuevo León	Los Cavazos	Santiago	13
Coahuila	Lienzo Charro	Arteaga	8
Coahuila	Lienzo Charro	Saltillo	10
Tamaulipas	La Retama	Villagrán	7
Total			51

### 3.4 DETERMINACIÓN DE FRECUENCIA GENOTÍPICA

Los genotipos que se obtuvieron de un total de 51 muestras analizadas se muestran en la tabla 3. Esta tabla muestra que 43 animales no presentaron la mutación, por lo que no la transmitirán a sus descendientes, mientras que 8 sí la presentaban, 7 de forma heterocigótica y 1 en forma homocigótica. Debido a que la HYPP es una mutación con un tipo de herencia mendeliana autonómica dominante, estos 8 individuos transmitirán la mutación a sus descendientes, el heterocigoto a la mitad de ellos y el homocigoto a todos.

Tabla 3. Número de individuos encontrados de cada genotipo.

<i>Genotipos</i>	<i>Cantidad</i>
Homocigoto recesivo (N/N, normal)	43
Heterocigoto (N/H, afectado)	7
Homocigoto dominante H/H, afectado	1

Las frecuencias génicas encontradas en el presente estudio se muestran en la Tabla 4. Puede verse que el genotipo homocigoto recesivo (normal) tuvo una frecuencia de 84.32%, el genotipo heterocigoto (afectado) de 13.72% y el homocigoto dominante (afectado) de 1.96%. Esto indica que la frecuencia de genotipos con la mutación, los cuales originan individuos afectados por la misma, es la suma de las frecuencias de los genotipos heterocigoto y homocigoto dominante, en total 15.68%.

Tabla 4. Frecuencias de los tres genotipos posibles.

<i>Genotipos</i>	<i>Frecuencia %</i>
Normal N/N	84.32
Heterocigoto N/H	13.72
Afectado H/H	1.96

La frecuencia de los tres genotipos observados en la presente investigación, permiten inferir que la proporción de animales portadores indica un riesgo considerable de la propagación de la enfermedad en una población si no se establece un control sobre los programas de cría para evitar la utilización de los reproductores con esta alteración genética.

## CAPÍTULO 4.

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron 51 muestras de 5 ranchos localizados en el noreste de México (Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas). No fue posible obtener producto de PCR en 3 muestras de las cuales se les realizó la amplificación, quizá debido a errores de preparación de la mezcla de reacción para PCR. Lo ideal sería que en estas muestras se repitiera el proceso de amplificación; sin embargo, debido a que se agotaron los iniciadores de PCR no fue posible realizar la repetición. Se encontraron 8 animales con la mutación causante de HYPP, 7 en forma heterocigoto (NH) y uno en forma homocigoto (HH). Los restantes 43 tuvieron el genotipo normal (NN). Estos resultados se tradujeron en frecuencias génicas para los tres genotipos de 84.32% en el homocigoto normal, 13.72 en el heterocigoto afectado y 1.96 en el homocigoto afectado.

La enfermedad causada por la mutación se ha descrito desde 1990 (Spier et al, 1990, Rudolph et al., 1992). Sin embargo, aunque existen muchos estudios sobre los síntomas, aspectos fisiológicos y caracterización molecular de la enfermedad, se han publicado pocos informes sobre la frecuencia de individuos afectados.

Uno de los estudios que mencionan la frecuencia de la mutación se realizó recientemente en Guadalajara, México. En el mismo se menciona que el 43.0% tuvieron genotipo normal (homocigoto recesivo), 54.0% fueron heterocigotos y 3% mutante (homocigoto dominante) (Ayala Valdovinos et al. 2006).

En el presente estudio los resultados fueron a grandes rasgos parecidos, aunque el genotipo más frecuente no fue el heterocigoto, sino el normal (homocigoto recesivo), seguidos por el homocigoto dominante (doble afectado).

El número de muestra del estudio mencionado fue de 75 animales, el cual no es muy diferente del que tiene el presente estudio (51 animales). Sin embargo, en el presente estudio el genotipo más frecuente fue el normal (homocigoto recesivo), mientras que en estudio realizado en Guadalajara fue el heterocigoto. Hay que hacer notar que la diferencia, en ese estudio, entre los genotipos más frecuentes es poca (43% normal y 54% heterocigoto), mientras que en el presente estudio esta diferencia fue mucho mayor (84.32% normal y 13.72% heterocigoto).

Al considerar la suma de individuos con la mutación (tanto heterocigotos como homocigoto dominantes), en el presente estudio se obtuvo un 98.04% de individuos afectados, lo cual es muy parecido a lo obtenido en el trabajo realizado en Jalisco (97% de individuos afectados). Lo anterior indica que la frecuencia de individuos afectados en ambos estudios es muy similar, aunque la distribución de genotipos afectados sea diferente. De forma general se puede mencionar que en el noreste de México se encontró un mayor número de caballos cuarto de milla sin la mutación causante de HYPP, mientras que en el occidente de México el mayor número de individuos se concentraba en los heterocigotos para la mutación.

Se planea analizar un mayor número de animales posteriormente, con lo cual se apoyará o se corregirá el resultado obtenidos en el presente estudio.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio determinan que aun cuando existe una frecuencia pequeña de la mutación en forma homocigótica, la presencia de una proporción superior al 15 % en la manifestación de genotipos heterocigotos, influyen sobre la propagación y crecimiento de la alteración en la población si no se establece una estrategia de control a través de la identificación precisa de reproductores portadores.

La implementación de la metodología para el diagnóstico molecular de la parálisis periódica hipercalémica se puede considerar útil en el control del pedigrí, sin embargo se requiere una estrategia de obligatoriedad del análisis para fines de disminuir o eliminar esta alteración.

## CAPÍTULO 6

### LITERATURA CITADA

Arahata, K., Wang, J., Feero, W.G., Hayakawa, H, Honda, K., Sugita, H., Hoffman, E.P. 1993. Identification of a Thr-to-Met mutation in a skeletal muscle sodium channel gene in hyperkalemic periodic paralysis of a Japanese family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 20: 342-345.

Ayala Valdovinos, M.A., Anguiano Estrella, R., Plascencia Botello, J. et al. 2006. Prevalencia del gen de la parálisis periódica hipercalémica (HYPP) equina y del gen del síndrome overo letal blanco (OLWS) en caballos importados a México. XXVIII Congreso Anual AMMVEE. Monterrey, N.L., México.

Bailey, J.E., Pablo, L., Hubbell, J.A. 1996. Hyperkalemic periodic parálisis episode during halothane anesthesia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208(11):1859-1865.

Bowling, a .t; Byrns, g; Spier, S.1996. Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in Quarter Horses. *Animal genetics* (27):279-281.

Bladbjerg EM, Gram J, Jespersen J, de Maat MP.2002. Internal quality control of PCR-based genotyping methods *Vascul Pharmacol.* Aug; 39(3):127-9.

Cannon SC, Hayward LJ, Beech J, Brown RH Jr. 1995 Sodium channel inactivation is impaired in equine hyperkalemic periodic paralysis. *J Neurophysiol.* 73 (5): 1892-9.

Carr EA, Spier SJ, Kortz GD, Hoffman EP. 1996 Laryngeal and pharyngeal dysfunction in horses homozygous for hyperkalemic periodic paralysis. *J Am Vet Med Assoc.* 15; 209(4):798-803.

Church S. 1995 Periodic paralysis in Australian quarter horses. *Hyperkalemic Aust Vet J.*; 72(8):314-6.

De Tellitu Schutz, J. N. 2006. Determinación de la frecuencia alélica de la deficiencia de manosidasa caprina en 6 municipios de Nuevo León mediante análisis PCR-RFLP. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U. A. N. L.

Duyn, R. J.; Haeringen, H. 1995. American Quarter Horses and HYPP *Tijdschr Diergeneeskd* 120(2):46-47.

Fontaine, B., Khurana, T.S., Hoffman, E.P., Bruns, G.A., Haines, J.L., Trofatter, J.A., Hanson, M.P., Rich, J., McFarlane, H., Yasek, D.M. et al. 1990. Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* 250:1000-1002.



Glatzel, P. S. 1997. Significance of biotechnology in reproductive biology and veterinary medicine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*110: 166-170.

Griffiths, A. J. F., Jeffrey, H., Susuki, D.T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. 1995. *Genética*. 5ta. Edición. Editorial MacGraw- Hill. Interamericana.p.p. 430, 446,470.

Karp, G. 1996 *Biología Celular y Molecular*, Edit. McGraw Hill. México.

Karp, G. 1998. *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial MacGraw-Hill. Interamericana. P.p.418-19.

Meyer TS, Fedde MR, Cox JH, Erickson H.H. 1999. Hyperkalaemic periodic paralysis in horses: a review. *Equine Vet. J.*; 31(5):362-7.

Miller TM, Dias da Silva MR, Miller HA, Kwiecinski H, Mendell JR, Tawil R, McManis P, Griggs RC, Angelini C, Servidei S, Petajan J, Dalakas MC, Ranum LP, Fu YH, Ptacek LJ. 2004 Correlating phenotype and genotype in the periodic paralyses *Neurology*. 9; 63(9):1647-55.

Naylor J M. 1994a. Equine hiperkalemic periodic paralysis, review and implications. *Can. Vet Journal* (35):279-285.

Naylor JM. 1994b. Selection of quarter horses affected with hyperkalemic periodic paralysis by show judges. *J Am Vet Med Assoc.*; 204(6):926-8.

Naylor, J.M.; Nickel, D.D.; Trimino, G; card, C; Lighthfoot, K; Adams, G. 1999. Hyperkalemic Periodic Paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co dominant genetic condition. *Equine Vet, Journal* (31):153-159.

Naylor, J.M., Robinson, J.A., Bertone, J. 1992. Familial incidence of hyperkalemic periodic paralysis in quarter horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:340-342.

Nollet, H, Deprez, P. 2005. Hereditary skeletal muscle diseases in the horse. *Vet Q.* 27(2):65-7.

O'Rourke, B.A., Dennis, J.A., Healy, P.J. 2006. Internal restriction sites: quality assurance aids in genotyping. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 195-197.

Pirila R, Lehmus S, Somer H, Baumann P. 2002 Hyperkalemic periodic paralysis *Duodecim.* 118(14):1475-9.5.

Puertas, M. J. 1999. *Genética Fundamentos y Perspectivas*, Segunda edición, Editorial McGraw- Hill Interamericana. p.p. 321.

Riojas-Valdés, V. M., Canales-Zambrano, J. C., Gómez-de-la-Fuente, J. C., Dávalos-Aranda, G., Hernández-Vidal, G., Salinas-Meléndez, J. A. 2005. Frecuencia alélica del síndrome de estés porcino en Nuevo León mediante análisis PCR-RFLP. *Vet. Méx.* 36 (3): 261-267.

Ptacek,L.J.,Tyler,F;Trimmer,J.S.;Agnew,W.S;Leppert,M.1991 Analysis in a large Hyperkalemic Periodic Paralysis pedigree supports tight linkage to a sodium channel locus. Am .J. Human Genetic 49 (2):378- 382.

Rudolph,J.A.;Spier,S.J.;Byrns,G.;Rojas,C.V.;Bernoco,D.;Hoffman,E.P.1992.Periodic Paralysis in Quarter Horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. Natural Genetic (7):141-147.

Rudolph 1996 Sillen, A, Wadelius, C.; Sundvall , M.; Ahisten, G.; Gustavson, K. H. 1996. Hyperkalemic Periodic Paralysis causing by recurring mutation in the adult muscles sodium channel alpha-subunit gene. Genetic Cons.7(4):267-275.

Ruscak, J. 1997. Molecular genetics of sodium channel myopathies. Bratisl. Lek. Listy. 98:701-707.

Sakoda, S., Nakagawa, M., Arimura, Y., Arimura, K., Osame, M. 1997. Familial hyperkalemic periodic paralysis: a brief review of the adult human skeletal muscle sodium channel and the application of LA-PCR to the SCN4A gene analysis. Nippon Rinsho 55:3253-3258.

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. 1999. HYPP: hyperkalemic periodic paralysis in the horse. Tijdschr. Diergeneeskd. 124:176-181.

Spier, S J, 1999. Current facts about Hyperkalemic Periodic Paralysis in horse.(hypp ) Disease. <http://www.vgl.ucdavis.edu/~lvmillon/hypp.html>.

Spier, S. J.; Carlson, G P.; Holliday, T . A.1990. Hiperkalemic Periodic Paralysis in horses .J. Am. Vet, Med, Association (197):1009-1.

Watson, D. J., Witkowsky, J., Gilman, M., Zoller, M. 1992. Recombinant DNA. Primera reimpression en español. Scientific American Books. p.p. 83-94.

Zeilmann M. 1993 hyperkalemic periodic paralysis in horses Tierarztl Prax. 21(6):524-7.

# CAPÍTULO 7

## APÉNDICES

### Apéndice1. Material.

Tubos Eppendorf

Muestras de sangre con EDTA.

Micropipeta 0.5-10  $\mu$ L, BioRad

Micropipeta 2-20  $\mu$ L, BioRad

Micropipeta 20-200  $\mu$ L, BioRad

Micropipeta 100-1000  $\mu$ L, BioRad

Puntillas para micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 $\mu$ l.

Gradillas

Papel absorbente

Solución de lisis RBC (glóbulos rojos)

Solución de leucocitos

Proteína precipitadora

Isopropanol al 100%

Etanol al 70 %

Solución hidratadora

Muestras de sangre con EDT

## Apéndice 2. Equipo.

Fuente de poder Power Pac 3000, BioRad

Sistema de Documentación Fluor-S MultImager, BioRad

Sistema de electroforesis Mini-Sub Cell GT, BioRad

Sistema de electroforesis Sub-Cell, BioRad

Sistema de electroforesis, Sub-Cell, BioRad

Peines para electroforesis, BioRad

Microcentrífuga 5415-C

Homogenizador Orbitron

Vortex Genie con accesorios

Sistema purificador de NANOpure, Brandstead

Máquina de hielo frapé

Termociclador M.J. Research

Potenciómetro Z 28302

Balanza OAHUS B 6402

Balanza analítica Z 37324-9

Estación de PCR

Cámara fotográfica

Micropipeta 20-200  $\mu$ L, BioRad

Micropipeta 100-1000  $\mu$ L.

## Apéndice 3

### Contenido y concentración del estuche TAQ & GO<sup>RT</sup> (Invitrogen).

Mezcla maestra 1X

Tris/HCl	10mM
pH (25° )	9.0
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Triton	0.1%
BSA	0.2 mg/ml
dNTP's	100 µM cada uno
<i>Taq</i> ADN Pol	0.02U/µl (= 1 U por 50 µl PCR)
Glicerol	1.8 %

## Apéndice 4

### Preparación de soluciones y reactivos.

#### Amortiguador TBE 1 X

En 900 ml de agua nanopure agregar 100 ml de TBE 10 X y agitar vigorosamente.

#### Amortiguador TBE 10 X pH 8.0 (Tris-borato 0.9M, EDTA 0.02 M).

En 800 ml de agua bidestilada agregar 7.4448 gr. de EDTA, nivelando el pH a 8.0, agregar 108 gr. de Trizma base y 55 gr. de ácido bórico, homogenizar y aforar a 1000 ml y esterilizar.

#### Gel de poliacrilamida al 30 %

Se agregan 0.4 g de agarosa en 100 ml de amortiguador TBE 1 X y se pone a calentar en un horno de microondas por espacio de 2 minutos para que exista ebullición, se le agregan 300 µl de bromuro de etidio al 0.1 %.

#### Bromuro de etidio a 0.1 %

Se adicionan 20 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) en 200 ml de agua bidestilada.



Amortiguador TAE 1 X.

Se agregan 20 ml de TAE 50 en 1000 ml de agua bidestilada con filtro del equipo nanopure, se agita bien la mezcla para que exista homogeneidad.

Amortiguador TAE 50 X (Tris-HCL 1M, EDTA 100 mM).

Mezclar 12.5 ml. de Tris-.HCL 2M, pH 8.0, con 10 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0 y aforar a 50 ml de agua bidestilada y esterilizar.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jorge Moreno Chapa

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias

Título de la Tesis:

“Determinación de la frecuencia alélica de la Parálisis Periódica Hipercalemica en caballos cuarto de milla y sus cruizas en el Noreste de México”

Campo de Estudio: Genética Animal

Datos Personales:

Nacido en Monterrey, Nuevo León el 5 de Agosto de 1956. Hijo de Jesús Moreno Muñoz y Lucinda Chapa Treviño.

Educación:

Egresado de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista del Centro de Estudios Universitarios de Monterrey, N.L. en 1981. Título obtenido en 1981.

Experiencia profesional:

Clínica particular de 1981 a la fecha en el Cercado, N. L.

Promotor de la Brigada de Educación para el Desarrollo Rural número 38 de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria. SEP de 1985 a la fecha.

