

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

<u>Trabajo de Tesis Doctoral:</u>

Análisis genético de enfermedades osteoarticulares en animales de compañía

Tesista: Rudd Garcés, Gabriela

<u>Director</u>: Giovambattista, Guillermo

Directora: Padula, Gisel

<u>Año</u>: 2022

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP – CCT, La Plata, CONICET), bajo la dirección del Dr. Guillermo Giovambattista y la Dra. Gisel Padula.

RESUMEN

El sistema osteoarticular está formado por los huesos, articulaciones y ligamentos. Su función es permitir la estabilidad del cuerpo y la movilidad de sus diferentes partes. Las alteraciones en su desarrollo pueden conllevar a las enfermedades osteoarticulares hereditarias. Estas constituyen un grupo heterogéneo de trastornos que se caracterizan por el crecimiento, desarrollo y remodelación anormales de los huesos y los cartílagos. Tras décadas de desarrollo de la genética y gracias a los recientes avances tecnológicos, se han descubierto los mecanismos moleculares involucrados en numerosas de estas enfermedades, así como también los defectos genéticos subvacentes. La medicina de precisión basada en el ADN que utiliza métodos de vanguardia, como la secuenciación del genoma (WGS) y del transcriptoma completo (RNA-seq), se ha utilizado con éxito en los últimos años para el diagnóstico rutinario tanto en medicina humana como veterinaria. El descubrimiento de las variantes causantes de enfermedades permite a los criadores de perros y gatos evitar la propagación de dichas mutaciones en la raza afectada, mejorando en última instancia la salud de toda la población mediante una mejor gestión de la cría. Adicionalmente, la identificación de biomarcadores permite un diagnóstico más preciso en fase temprana de la enfermedad, mejorando así el bienestar animal y evitando pérdidas económicas en medicina veterinaria. Muchos trastornos osteoarticulares en humanos tienen una contraparte muy similar en los animales domésticos. Los modelos espontáneos en animales de raza pura, como los perros y gatos, que tienen una estructura poblacional única y una similitud física con los humanos son modelos valiosos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en humanos.

En esta tesis, se ha realizado el análisis de tres enfermedades osteoarticulares en animales de compañía aplicándose diferentes enfoques genéticos, con la ayuda de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). El uso intensivo de ciertos reproductores ha conducido a un alto grado de parentesco entre perros y gatos de pedigrí y, por lo tanto, a altos índices de consanguinidad facilitando la propagación de rasgos genéticos indeseables dentro de numerosas razas.

La metodología utilizada para el estudio de las dos displasias esqueléticas investigadas se basó en estudios de familia y se trata de patologías heredadas como rasgos monogénicos autosómicos recesivos. Se identificó una variante homocigota en un sitio de empalme (*splice site*) en el gen *PRKG2* en dogos argentinos afectados desde edad infantil por una forma de enanismo desproporcionado, mediante un estudio de análisis de ligamiento y mapeo de homocigosidad y, WGS de un animal afectado. PRKG2 codifica la proteína quinasa cGMP dependiente tipo 2, un conocido regulador de la diferenciación de los condrocitos. Las variantes de pérdida de función de *PRKG2* han sido asociadas previamente a enanismo desproporcionado en humanos, bovinos, ratones y ratas. La variante PRKG2:c.1634+1G>T identificada en esta tesis es el primer reporte en animales de compañía. En la familia de británico de pelo corto estudiada, dos gatitos compañeros de camada presentaron a los dos meses de edad paraparesia severa, hernia cerebelosa y coprostasis debido a malformaciones esqueléticas complejas. Los datos de WGS de ambos casos revelaron una variante homocigota de tipo corrimiento del marco de lectura (frameshift) en el gen LTBP3, codificante de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento transformante latente β (TGF- β), regulador clave de TGF- β implicado en la morfogénesis y remodelación ósea. Alteraciones en el gen LTBP3 se han observado previamente en displasias esqueléticas similares en humanos. Hasta la realización de esta tesis, la variante descubierta en la raza británico de pelo corto representa el primer reporte en animales domésticos. Finalmente, mediante un estudio de tipo caso-control en ovejeros alemanes, utilizando RNA-seg de sangre periférica como tejido indicador, se identificó el gen THBS4 como posible biomarcador circulante de la osteoartritis (OA) en perros. Estudios previos han reportado un incremento significativo en los niveles de expresión de THBS4 en humanos y modelos murinos con OA avanzada.

En conclusión, los resultados obtenidos con el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral contribuyen a la identificación de variantes genéticas candidatas a causar dos tipos de displasia esqueléticas y un gen candidato a biomarcador circulante de la OA. Se han aplicado diferentes enfoques genéticos, con la ayuda de tecnologías de NGS. Estos datos facilitan las pruebas genéticas que permitirían evitar la cría no intencionada de mascotas afectadas y aportan nuevas evidencias sobre el perfil de expresión de la OA canina.

ÍNDICE

Resumen		1
Introducc	ión	5
	Animales de compañía como modelo en enfermedades genéticas	6
	Enfermedades osteoarticulares hereditarias	8
	Displasias esqueléticas	9
	Osteoartritis	13
	Pruebas genéticas en medicina veterinaria	16
2	Métodos y tecnologías seleccionadas en los análisis genéticos	17
	Matrices de genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido	18
	Análisis de ligamiento	19
	Mapeo de regiones de homocigosidad	20
	Secuenciación de nueva generación (NGS)	21
	Secuenciación del transcriptoma completo (RNA-seq)	22
	Descubrimiento de variantes privadas, compartidas, raras o	
	específicas de la raza	25
Objetivos	e hipótesis de la tesis	29
Resultado	os y discusión	30
	Variante sitio de empalme (<i>splice site)</i> en el gen <i>PRKG2</i> en perros de raza	
	dogo argentino con enanismo desproporcionado	32
	Variante corrimiento del marco de lectura (<i>frameshift</i>) en el gen <i>LTBP3</i> en gat la raza británico de pelo corto con displasia esquelética compleja	os de 44
	Biomarcadores en sangre periférica de la osteoartritis en perros de la raza ove alemán: un enfoque transcriptómico	∍jero 65
Conclusio	ones	79
Anexos		85
Agradecir	nientos	88

Currículum Vitae	
Lista de publicaciones	90
Referencias bibliográficas	91

INTRODUCCIÓN

Animales de compañía como modelo en enfermedades genéticas

Los animales de compañía o mascotas mundialmente más populares son el perro y el gato, y como tales, son objeto de afecto y cuidados sin precedentes en nuestra sociedad. Las enfermedades naturales o espontáneas que los pueden afectar presentan una gran variabilidad en la susceptibilidad entre las distintas razas. Esto refleja las diferencias en la composición genética, la fisiología, el estilo de vida y el entorno, tal como sucede en las poblaciones humanas (Kol y col., 2015).

En el caso de los perros, una de las principales razones por las que son un foco de investigación dentro del campo de la genética está relacionada con la estructura específica de la población que se ha creado en los últimos 150-200 años (Larson y col., 2012). Mientras que la selección natural se produce de forma involuntaria cuando los animales se adaptan a un entorno cambiante, la selección artificial es un proceso llevado a cabo por el hombre para domesticar a los animales salvajes (Nielsen, 2005). Los perros domesticados fueron sometidos a una rigurosa selección de cría, por ejemplo, por rasgos de comportamiento y/o características morfológicas específicas, lo que condujo a la creación de cientos de razas de perros capaces de pastorear, proteger, cazar o guiar (Larson y col., 2012). Este proceso de selección se intensificó en los dos últimos siglos y dio lugar a poblaciones genéticas aisladas de razas caninas (Parker y col., 2010). Mientras que la variación genética entre las distintas razas permaneció intacta, la reducida variabilidad genética dentro de las razas funcionó como un amplificador genético y ofrece un "microscopio de disección genética" para la investigación (Lindblad-Toh y col., 2005; Parker y col., 2010; Larson y col., 2012; Van Steenbeek y col., 2016). Junto con la selección de rasgos únicos surgió un mayor riesgo de desarrollo de trastornos hereditarios específicos dentro de las razas, lo que proporcionó modelos fisiológicamente relevantes correspondientes a las condiciones humanas. El corto tiempo generacional y la endogamia para mantener los estándares raciales de las razas caninas condujeron a una mayor tasa de aparición de enfermedades recesivas hereditarias en comparación con los humanos. Los mutantes espontáneos en poblaciones de raza pura con una estructura tan singular hacen del perro un valioso modelo para el estudio de los trastornos que afectan también a los humanos (Andersson, 2016). Las variantes genéticas relacionadas a enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne, la narcolepsia y la osteogénesis imperfecta se identificaron por primera vez en caninos y posteriormente en humanos (Ostrander y col., 2000).

La iniciativa "One Health" ha reconocido que la salud de los seres humanos, los animales domésticos y el medio ambiente están estrechamente vinculados y tiene como objetivo "romper la barrera de las especies" en un impulso hacia un mejor vínculo entre la investigación médica y veterinaria para el beneficio del paciente humano y veterinario (Christopher, 2015). Al igual que los humanos, la esperanza de vida de los animales de compañía va en aumento. La medicina veterinaria ha hecho grandes avances en los últimos veinte años con el desarrollo de especialidades y subespecialidades, como el diagnóstico por imagen de última tecnología, la cirugía mínimamente invasiva y reconstructiva, el trasplante de órganos y los protocolos avanzados de quimioterapia y radioterapia, que son paralelos a la expansión de la medicina humana (Kol y col., 2015). Adicionalmente, se han secuenciado y anotado los genomas completos del perro (Parker y col., 2004) y del gato (Tamazian y col., 2014), lo que proporciona una poderosa herramienta para estudiar la predisposición genética y los patrones de expresión génica en las enfermedades que se producen de forma natural en estas especies.

La base molecular de los trastornos genéticos en los animales de compañía se reconoce cada vez más en especies y razas animales específicas (Kol y col., 2015). Se han identificado muchas enfermedades genéticas de origen natural en animales domésticos que a menudo están causadas por una mutación en un gen ortólogo y conducen a un fenotipo clínico comparable al observado en los pacientes humanos, incluyendo las alteraciones patológicas a nivel bioquímico y celular (Lairmore y Khanna, 2014; Kol y col., 2015). El catálogo público *Online Mendelian Inheritance in Animals* registra actualmente 842 rasgos o trastornos caninos y 395 felinos, de los cuales 542 y 260 se clasifican como modelos potenciales de enfermedades humanas, con 324 y 99 variantes genéticas causales conocidas, respectivamente (OMIA, <u>https://www.omia.org</u>, consultado el 9 de julio de 2022).

Muchos de estos trastornos genéticos se comparten entre perros y humanos (Tsai y col., 2007). Sin embargo, en comparación con los humanos, la identificación de una variante causante en los perros es generalmente más sencilla por las siguientes razones: en primer lugar, existe una gran diversidad de razas con características bien definidas, lo que permite estudios dentro de la raza y entre ellas. En segundo lugar, si la enfermedad es específica o más frecuente en una raza y, por lo tanto, en una población relativamente pequeña, es probable que solo haya un alelo de la enfermedad que sea idéntico por descendencia en todos los casos afectados. En tercer lugar, la diversidad genética dentro de una raza es baja y el desequilibrio de ligamiento en las razas caninas es aproximadamente cien veces mayor que en los humanos, lo que significa que se requieren menos marcadores genéticos en los estudios de asociación, lo que los convierte en

una herramienta poderosa (Lindblad-Toh y col., 2005; Sutter y col., 2004). En cuarto lugar, las familias numerosas y la información genealógica disponible también facilitan los métodos basados en la familia.

Al igual que ocurre en la genética clínica humana (Ashley, 2016), la medicina de precisión basada en el ADN y que utiliza la información genómica disponible ha demostrado ser adecuada para el diagnóstico de enfermedades raras en la medicina veterinaria (Jagannathan y col., 2019), debido al nivel de atención médica sin precedentes de que disponen los animales de compañía. Por lo tanto, la medicina humana y la veterinaria pueden beneficiarse mutuamente de la investigación que aplica el enfoque *"One Health"*.

Enfermedades osteoarticulares hereditarias

Las enfermedades osteoarticulares hereditarias son un grupo heterogéneo de alteraciones del desarrollo del sistema esquelético. Están caracterizadas por el crecimiento, desarrollo y remodelación anormales de los huesos y los cartílagos (Krakow, 2015). Abarcan un espectro de fenotipos amplios, desde embrionarios letales como la displasia tanatofórica, displasias esqueléticas graves como la osteogénesis imperfecta, a fenotipos leves como la baja estatura aislada o la enfermedad articular degenerativa prematura.

El esqueleto se forma durante dos procesos distintos: la osificación endocondral y la osificación membranosa. La osificación endocondral es responsable de la formación de la mayor parte del esqueleto apendicular de los mamíferos e implica una secuencia de procesos de desarrollo cuidadosamente orquestados. Estos incluyen el inicio de la yema de la extremidad embrionaria y su crecimiento a partir del mesodermo de la placa lateral, la especificación de las células mesenquimales para los futuros elementos de la extremidad, las condensaciones mesenquimales que desencadenan la diferenciación del cartílago, la osificación de los huesos en desarrollo y, por último, su crecimiento y maduración adecuados en el período postnatal (Provot y Schipani,2005; Hall y Miyake, 2000). La osificación membranosa es el acontecimiento del desarrollo en el que las células mesenquimales que se condensan progresan casi directamente a células óseas. Los huesos del cráneo, la clavícula lateral y el pubis se forman mediante la osificación mesenquimal. En el período postnatal, el crecimiento continúa a través de la placa de crecimiento del cartílago, en la que los condrocitos en reposo proliferan, sufren hipertrofia y luego apoptosis, convirtiéndose en el andamiaje de crecimiento del hueso (Ballock y O'Keefe, 2003). Múltiples mecanismos moleculares subyacen a la formación del esqueleto y

las perturbaciones de estos procesos altamente regulados pueden dar lugar a displasias esqueléticas.

La constitución genética es un factor relevante en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades, incluidas las de los huesos y las de las articulaciones. La variación fenotípica de los rasgos y las enfermedades del esqueleto son el producto de factores genéticos y ambientales. El grado en que la genética influye en el fenotipo varía en función de las distintas enfermedades del esqueleto. Sin embargo, el componente genético de los rasgos esqueléticos es grande y varía entre el 30%, en la osteoartritis (OA), y el 80%, en la densidad mineral ósea. Esto no significa que no hava ningún efecto del entorno. De hecho, estas variantes de la secuencia del ADN forman la plantilla sobre la que los factores ambientales pueden influir en el fenotipo (van Meurs y col., 2019). No sólo los genes que codifican proteínas específicas del tejido óseo o articular son fundamentales para la formación y el mantenimiento de los huesos y los cartílagos sino también otras proteínas que desempeñan un papel más ubicuo, como la regulación de la transcripción de genes, la división celular o la regulación del transporte intracelular, las cuales representan otra causa bien establecida de los trastornos óseos (Cammarata-Scalisi, 2020). La comprensión de estos genes permite delinear la extensión del espectro de la enfermedad asociada con un trastorno particular, proporciona un servicio de diagnóstico basado en el modo de herencia, así como un avance en la comprensión de las vías implicadas en el desarrollo y el mantenimiento del esqueleto (Krakow, 2015).

Displasias esqueléticas

Las displasias esqueléticas comprenden el grupo más grande y diverso de fenotipos entre las enfermedades óseas hereditarias. Dan lugar a una forma y tamaño anormales del esqueleto y a una desproporción de los huesos largos, la columna vertebral y la cabeza. Con frecuencia se presentan en el período neonatal con desproporción, anomalías radiográficas y, ocasionalmente, anomalías de otros sistemas de órganos (Krakow, 2015). Presentan todas las formas de herencia mendelianas, siendo la autosómica recesiva y la autosómica dominante las más frecuentes (Warman y col., 2010). Debido a su heterogeneidad, la clasificación puede basarse en la causa genética, la letalidad o la afectación de partes del esqueleto similares. El Comité de Nosología de la Sociedad Internacional de Displasias Esqueléticas reconoce 461 enfermedades diferentes, que se clasifican en 42 grupos en función de sus fenotipos clínicos, radiográficos y moleculares. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido identificar las

variantes causales que afectan a 437 genes diferentes en 425 de los 461 trastornos descriptos (Mortier y col., 2019).

El fenotipo y denominación más común de las displasias esqueléticas es el enanismo, término médico utilizado para denotar la baja estatura, y según la *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM; <u>https://www.omim.org/</u>, consultado el 10 de febrero de 2022) existen más de 200 tipos diferentes de displasias esqueléticas subyacentes en pacientes con fenotipos de enanismo primario o secundario. En función del fenotipo específico, el enanismo puede clasificarse como proporcionado o desproporcionado. En el enanismo proporcionado, se conservan las proporciones corporales normales, mientras que la estatura total se reduce. El enanismo desproporcionado implica alteraciones de la longitud relativa de las extremidades y cambios en las proporciones corporales (Sewell y col., 2015; Jain y Saber, 2021). Las displasias esqueléticas se presentan típicamente como estatura baja desproporcionada en la infancia (Jain y Saber, 2021). Las más comunes son la osteogénesis imperfecta, la acondroplasia y la osteopetrosis (Krakow, 2015).

En los animales domésticos se conocen varias enfermedades esqueléticas genéticas similares a los fenotipos humanos. Sin embargo, su descripción y clasificación está lejos de ser tan precisa. La disponibilidad cada vez más amplia de técnicas de NGS ha revolucionado también el reconocimiento de las mutaciones que causan estas enfermedades en los animales (Dittmer y Thompson, 2015). La base de datos OMIA enumera actualmente alrededor de 41 desórdenes esqueléticos hereditarios con variantes causales conocidas en diversas especies domésticas (Tabla S1). Aunque la mayoría de las displasias esqueléticas de los animales domésticos se consideran enfermedades, en algunos casos, la selección de atributos anatómicos deseados durante la domesticación y cría ha llevado a la fijación genética de malformaciones esqueléticas que se han convertido en estándares de la raza (Haase y col., 2016; Bannasch y col., 2020; Westworth y Sturges, 2010). En ciertos animales de ganado, algunos fenotipos de enanismo forman parte del estándar racial, como en los cerdos miniatura Banna chinos (Deng y col., 2011), los ponis Shetland (Rafati y col, 2016), el ganado Dexter (Cavanagh y col., 2007) y las cabras enanas de África Occidental (Bemji y col., 2018). A menudo, los animales heterocigotos son los que producen el enanismo deseado, mientras que los mutantes homocigotos son inviables (Boegheim y col., 2017).

Los perros representan la especie de mamíferos con la mayor diversidad fenotípica del esqueleto. Desde su domesticación, han sido objeto de una selección humana basada en diferentes tamaños y morfologías esqueléticas. Algunas alteraciones en la longitud de las

extremidades, que dan lugar a un enanismo desproporcionado, son resultado de la selección positiva en algunas razas (Bannasch y col., 2020). Durante el desarrollo de la raza, las extremidades desproporcionadamente cortas eran deseables por una serie de razones. Los perros con patas más cortas eran más lentos y la gente de a pie los encontraba más fáciles de usar para la caza, lo que dio lugar a los sabuesos de patas cortas. También eran capaces de seguir a los animales en pequeños agujeros y madrigueras, de ahí que muchos *terriers* tengan las patas más cortas (Morris, 2002; Young y Bannasch, 2006). Las alteraciones de la longitud de las extremidades cambian el aspecto y la finalidad de los perros y, por lo general, son invariables dentro de sus razas (Bannasch y col., 2020).

Un ejemplo de enanismo desproporcionado en perros, fijado por la selección positiva, es la condrodisplasia común causada por una inserción del retrogen FGF4 en el cromosoma 18 en el dachshund, el basset hound y muchas otras razas de patas cortas (Parker y col., 2009). Sin embargo, también hay formas de enanismo desproporcionado que no son deseadas, o que están asociadas a problemas de salud y representan problemas para el bienestar animal. Por ejemplo, otra inserción retrogénica del FGF4 en el cromosoma 12 causa condrodistrofia, que se asocia con la calcificación anormal de los discos intervertebrales y un riesgo enormemente mayor de prolapsos discales (Brown y col., 2017; OMIA 000157-9615). Una forma de condrodisplasia y extremidades cortas desproporcionadas está causada por una variante sin sentido (nonsense) en el gen ITGA10 presente en los perros oso de Carelia y en los elkhounds noruegos (Kyöstilä y col., 2013; OMIA 001886-9615). La displasia esquelética 2 (SD2) es una forma leve de enanismo desproporcionado en los labradores retriever, y el defecto genético causante es una variante con cambio de sentido (missense) en el gen COL11A2 (Frischknecht y col., 2013; OMIA 001772-9615). La osteocondrodisplasia se produce por una deleción de 130 kb en el gen SLC13A1 en los caniches miniaturas (OMIA 001315-9615). Los perros mutantes se caracterizan por laxitud articular, displasia epifisaria, cuerpos vertebrales y luxación de la articulación lumbosacra, así como opacidades corneales (Neff y col., 2012). La disostosis espondilocostal se caracteriza por un acortamiento del tronco, hemivértebras extensas y anomalías en las costillas en los schnauzers miniaturas y está causada por una variante de tipo frameshift en el gen HES7 (Willet y col., 2015; OMIA 001944-9615). Una deleción de más de 20kb en el gen COL9A2 (OMIA 001523-9615), una inserción de menos de 20kb y una variante de tipo sin sentido (nonsense) en el gen COL9A3 (OMIA 001522-9615) están asociadas a displasia óculo-esquelética 2, en la raza samoyedo, y displasia óculo-esquelética 1 en labrador retriever e inuit del norte. Los trastornos relacionados con las variantes en estos genes del colágeno son observables a las pocas

semanas de nacer y dan lugar a fenotipos de extremidades cortas, además de displasia vítrea (Goldstein y col., 2010).

Los gatos también pueden verse afectados por displasias esqueléticas. Individuos con extremidades cortas, pero con tamaño normal del cuerpo y la cabeza se han descrito independientemente en todo el mundo (Haase y col., 2016). Los gatos han sido criados selectivamente para generar fenotipos enanos desde mediados del siglo XX, el gato *munchkin* se considera como la raza enana original (*The International Cat Association*; <u>https://tica.org/</u> (consultado el 10 de febrero de 2022). En la actualidad, los cruzamientos entre gatos *munchkin* con otras razas dan lugar a gatos de extremidades cortas en una gama de diferentes razas. Una forma extrema de enanismo desproporcionado es el *squitten* o el gato canguro. Estos gatos tienen una hipoplasia radial-pulgares trifalángicos que que presenta un acortamiento variable de ambas extremidades anteriores con la ausencia casi completa de hueso en los casos graves. Los casos muy leves imitan un fenotipo de polidactilia con tres falanges en lugar de dos en el *pollex* o primer dedo (Lockwood y col., 2009).

En los gatos, sólo se han caracterizado unas pocas displasias esqueléticas a nivel molecular. La osteocondrodisplasia en los gatos scottish fold está causada por una variante missense en el gen TRPV4 (OMIA 000319-9685; Takanosu y col., 2008; Gandolfi y col., 2016). Una forma de condrodisplasia que representa el estándar de la raza, en los antes mencionados gatos munchkin de patas cortas, está causada por una gran deleción en el gen UGDH que codifica la UDPglucosa 6-dehidrogenasa (OMIA 000187-9685; Buckley y col., 2020; Struck y col., 2020). La braquicefalia extrema de los gatos birmanos se debe, en parte, a una deleción de 12 pb en el gen ALX1 que codifica la proteína homeobox 1 ALX (OMIA 001551-9685; Lyons y col., 2016). La polidactilia en los gatos está causada por las variantes de un solo nucleótido no codificantes en una región reguladora del gen SHH que codifica el homólogo Sonic hedgehog, un gen morfogénico del desarrollo (OMIA 000810-9685; Lettice y col., 2011). Una variante missense en el gen ACVR1 que codifica el receptor de activina A tipo I es la causa de fibrodisplasia osificante y malformaciones esqueléticas secundarias en gatos domésticos de pelo corto (OMIA 000388-9685; Casal y col., 2019). Adicionalmente, hay varias razas de gatos, como pixie bob, kurilian bobtail, american bobcat, japanese bobcat y manx, con colas acortadas o dobladas. Las variantes causantes de estas malformaciones espinales se han identificado en los genes TBXT (OMIA 000975-9685; Buckingham y col., 2013) y HES7 (OMIA 001987-9685; Lyons y col., 2016; Xu y col., 2016).

Osteoartritis

La osteoartritis (OA) o enfermedad articular degenerativa es el trastorno articular degenerativo más común en humanos y animales de compañía (Mele, 2007; Martel-Pelletier y col., 2016; Cimino Brown, 2017). Según Lancet Commission on Osteoarthritis más de 500 millones de personas en todo el mundo estaban afectadas por esta enfermedad en el año 2020 (Hunter y col., 2020). La etiología implica la alteración metabólica del cartílago articular, el hueso subcondral, los ligamentos, la cápsula y la membrana sinovial; lo que conduce a la pérdida del cartílago articular, la esclerosis del hueso subcondral y la inflamación. La progresión de estas alteraciones estructurales provoca la insuficiencia articular, la pérdida de movilidad, el dolor y el detrimento de la calidad de vida (Zheng, 2005; Martel-Pelletier y col., 2016). Aunque la OA puede afectar a cualquier articulación, las más frecuentemente afectadas son la cadera, rodilla, mano, pie y columna vertebral (O'Neill y col., 2018). Los factores de riesgo asociados a la OA son heterogéneos; por ejemplo, la edad, el género, la obesidad, la biomecánica articular y los antecedentes genéticos son los más descritos (Martel-Pelletier y col., 2016; Abramoff y Caldera, 2020). La OA suele aparecer de forma secundaria a la displasia de cadera, la rotura del ligamento cruzado de la rodilla y la necrosis avascular del fémur (Jacobsen y Sonne-Holm, 2005; Kim, 2012; Simon y col., 2015).

Los modelos caninos se han utilizado durante mucho tiempo para estudiar los trastornos articulares, especialmente la OA, cuyos modelos se agrupan en espontáneos o inducidos quirúrgicamente (Mccoy, 2015). Las formas espontáneas de OA en perros son muy similares a las de los humanos y representan un problema de bienestar en la población canina mundial. La prevalencia descripta en la literatura presenta valores contradictorios. Las estimaciones basadas en datos de atención primaria han oscilado entre el 2,5% y el 6,6% (Anderson y col., 2018; O'Neill y col., 2014, respectivamente) y las basadas en datos de remisión se encuentran en el 20% (Pettitt y German, 2015) en la población canina del Reino Unido. La enfermedad se describe a menudo como secundaria, por lo que se estima que una anomalía articular primaria previa, como la rotura del ligamento cruzado o la luxación rotuliana en la rodilla, la displasia de cadera en la articulación coxofemoral, la fragmentación de la apófisis medial en el codo y la osteocondrosis disecante en el hombro predispone al desarrollo posterior de la OA (Alam y col., 2011; Anderson y col., 2018). Aunque los factores de riesgo entre humanos y perros son similares, los defectos hereditarios relacionados con la conformación del esqueleto de ciertas razas caninas se han asociado con el desarrollo de la enfermedad en estas últimas (Anderson y col., 2018). Las razas medianas y grandes, como el border collie, el bull mastif, el dogo de Burdeos, el pointer alemán,

14

el ovejero alemán, el *golden retriever*, el labrador *retriever*, el *old English sheepdog*, el *rottweiler*, el *collie* escocés y el *springer spaniel* han mostrado mayor probabilidad de diagnóstico de OA que las razas pequeñas y mixtas, incluso en los primeros años de vida (Anderson y col., 2018; O'Neill y col., 2020).

El diagnóstico de la OA en medicina humana y veterinaria suele realizarse mediante un examen clínico y una radiografía simple. En algunos casos, las imágenes por resonancia magnética y la tomografía computarizada (TC) son extremadamente útiles para identificar lesiones condrales tempranas y, por lo tanto, los factores que predisponen a la OA, como las lesiones meniscales y del ligamento cruzado (Abramoff y Caldera, 2020). A diferencia de los humanos, el diagnóstico de la OA en los perros no puede evaluarse basándose en los síntomas del paciente y, por lo general, cuando los propietarios detectan el desequilibrio de los movimientos de las extremidades y el dolor en sus mascotas, el estadio de la enfermedad ya está avanzado (Cimino Brown, 2017; Meeson y col., 2019). La duración de la OA en perros no está bien documentada en la literatura debido a la dificultad de precisar el inicio exacto de la enfermedad y a la limitada disponibilidad de datos clínicos de cohortes a largo plazo sobre casos confirmados. (Pettitt y German, 2015). Se ha reportado que el diagnóstico de la OA se ha realizado usualmente cuando los perros eran mayores. En los casos con fechas disponibles de diagnóstico y muerte, la proporción media de vida afectada por la OA fue del 11% (Anderson y col., 2018). Por lo tanto, la identificación de la degradación articular temprana es el reto más importante en la investigación y la atención clínica de la OA.

Aunque la etiología de la OA es compleja, los estudios genéticos y genómicos publicados en la última década han hecho avanzar la comprensión de los procesos moleculares que subyacen a esta enfermedad, y con ello la identificación y el uso de biomarcadores en el diagnóstico ha ganado interés (Reynard y Barter, 2020; Munjal y col., 2019; Mobasheri y Henrotin, 2010). Estudios de RNA-seq junto con el análisis de enriquecimiento de vías metabólicas en perros han revelado que los genes implicados en la estructura de la matriz extracelular, la transición epitelial a mesenquimal, la miogénesis, la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), ARNs no codificantes largos (IncRNA) y microARNs (miRNA) estaban enriquecidas en tejidos osteoartríticos (Todhunter y col., 2019; Reynard y Barter,2020; Yamazaki y col., 2021). En los perros, los pacientes naturales y los modelos de OA inducida experimentalmente se han utilizado ampliamente para identificar los biomarcadores asociados a la enfermedad (Meeson y col., 2019). Es difícil estudiar a los pacientes naturales, ya que muchos factores, como la raza, la edad, el nivel de actividad y la gravedad y duración de la enfermedad, no están estandarizados

(de Bakker y col., 2017). Sin embargo, dado que las regulaciones éticas en la investigación con animales se han vuelto más importantes, los pacientes representan el modelo más factible (The NC3Rs, <u>https://www.nc3rs.org.uk/</u>). Los tejidos y biofluídos más utilizados en la identificación de biomarcadores de OA son el cartílago, el líquido sinovial, la sangre y la orina (Munjal y col., 2019). Por ejemplo, en el líquido sinovial, las citoquinas, la proteína C reactiva y las metaloproteinasas de la matriz se han correlacionado con la fase inicial de la inflamación o la destrucción del tejido. Mientras que, en el cartílago, los productos de síntesis y degradación del colágeno tipo II, los proteoglicanos, el ácido hialurónico y la proteína de la matriz oligomérica del cartílago se asocian a la fase larga del daño articular (de Bakker y col., 2017). Los biomarcadores sistémicos (suero u orina) ofrecen un método alternativo potencial para cuantificar la carga corporal total de la OA (Kraus y col., 2010), siendo la sangre la más adecuada debido a su fácil recogida en pacientes y controles sanos, y al papel en muchas de las vías metabólicas, incluyendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Munjal y col., 2019).

Hasta ahora, dada la naturaleza heterogénea de la enfermedad y la falta de validación clínica suficiente, ningún biomarcador de OA canina se destaca como el *gold standard* (de Bakker y col., 2017). En este sentido, hay un enfoque creciente en el desarrollo de un panel de biomarcadores que podría cubrir una gama de efectos fisiopatológicos, como la síntesis y la degradación del cartílago, la sinovitis y la inflamación. La combinación de los biomarcadores existentes podría mejorar la precisión del pronóstico y ayudar a identificar a los pacientes de riesgo (Williams, 2009). Por tanto, la identificación de biomarcadores en sangre periférica, junto con el diagnóstico por imagen establecido, permitiría un diagnóstico más preciso de la OA mejorando el bienestar canino.

En comparación con los perros, los gatos pueden tener algunas ventajas cuando se trata de trastornos articulares degenerativos, ya que su menor peso corporal reduce el impacto mecánico de los trastornos hereditarios relacionados con el desarrollo de los huesos y los cartílagos (Haase y col., 2016). En los últimos años, ha habido una mayor conciencia de las implicaciones clínicas de la OA en los gatos (Robertson, 2019). Sin embargo, la evaluación molecular de esta enfermedad en gatos está fuera del alcance de estudio de esta tesis.

Pruebas genéticas en medicina veterinaria

Desde sus inicios, a principios de la década de 1990, el diagnóstico basado en el ADN en animales ha evolucionado hasta convertirse en un mercado en constante crecimiento con un valor económico anual de millones de dólares en la actualidad. Las primeras aplicaciones incluían análisis de identificación y control de parentesco, exámenes citogenéticos y pruebas para detectar alelos deletéreos conocidos que causan enfermedades hereditarias. El conocimiento cada vez más amplio de las correlaciones genotipo-fenotipo ha dado lugar al desarrollo de un número cada vez mayor de aplicaciones de diagnóstico. En la actualidad, se ha convertido en una práctica rutinaria el análisis de animales domésticos para determinar su parentesco, la presencia de alelos de enfermedades, los loci con influencia conocida en el rendimiento y también los genotipos que controlan rasgos morfológicos (Leeb, 2012).

En animales domésticos el mayor número de trastornos hereditarios se ha reportado en perros, seguidos de los gatos. Dado que muchos de estos trastornos se heredan de forma recesiva y ocurren con alta frecuencia en razas específicas o relacionadas debido a las prácticas comunes de endogamia, representan un grave problema de salud para los animales de compañía. Para abordar esta cuestión, es un tema prioritario la investigación exhaustiva de los trastornos hereditarios, desde las características clínico-patológicas hasta la base genética molecular de la enfermedad (Slutsky y col., 2013). El descubrimiento de variantes causales permite el desarrollo de pruebas genéticas, que son utilizados por los criadores de perros de todo el mundo para detener la propagación de enfermedades hereditarias y mejorar la salud general de las respectivas razas, al tiempo que se mantiene la diversidad genética que existe dentro de la raza (Leeb, 2012). Siguiendo esta línea, los progenitores utilizados en los programas de cría deben ser examinados para las mutaciones más comunes reconocidas para esa raza. Dos individuos portadores de la misma mutación recesiva no deben ser criados, para protegerlos de la producción de descendientes homocigotos afectados. Sin embargo, a menudo se fomenta la cría de portadores a no portadores para mantener la diversidad genética dentro de una raza. En estos cruces, se espera que aproximadamente la mitad de la descendencia sea portadora heterocigótica. Por lo tanto, la descendencia debe ser examinada para detectar las mutaciones de los padres y cualquier portador debe ser criado sólo con individuos homocigotos de tipo salvaje en el futuro. Este tipo de cría responsable puede conservar las características físicas y de comportamiento deseadas para una raza al tiempo que controla la aparición y la propagación de enfermedades hereditarias dentro de ella (Ramírez y col., 2017; Shaffer y col., 2019). De manera adicional, los criadores también pueden utilizar las pruebas genéticas para conocer los

genotipos de muchos rasgos deseados que forman parte del estándar racial, como el color y tipo de pelaje, aumentando así la probabilidad de producir mascotas con ciertas cualidades deseadas por los compradores y convirtiéndose potencialmente en criadores más eficientes a la vez que reducen los costos y el exceso de producción de mascotas. Por estas razones, el laboratorio no sólo proporciona información relevante sobre la salud animal, sino que también ofrece resultados útiles que apoyan los programas de cría, contribuyendo a garantizar generaciones sucesivas más sanas (Lyons, 2010; Lyons, 2012; Shaffer, 2019).

En la actualidad se dispone de diversas pruebas genéticas para los animales de compañía que apoyan la atención sanitaria veterinaria, la gestión de la raza, la identificación de la especie y las investigaciones forenses. Numerosos laboratorios privados y académicos de todo el mundo ofrecen estos servicios. En el caso de los perros, existen alrededor de 70 pruebas de enfermedades y 8 de rasgos genéticos. Para los gatos, el número es menor con 25 pruebas de enfermedades y 15 de rasgos correspondientes al color de pelaje. Además, se han desarrollado varios paneles comerciales de rasgos, parentesco y enfermedades, los cuales reúnen numerosos marcadores que son aplicables a todas las razas (*Veterinary Genetics Laboratory, University of California, Davis; PennGen Laboratories, University of Pennsylvania; World Small Animal Veterinary Association; VetGen*).

Métodos y tecnologías seleccionadas en los análisis genéticos

Los análisis genéticos, tal y como los conocemos hoy, comenzaron con la secuenciación del ADN en los años 70 (Padmanabhan y col., 1972) y los avances con la secuenciación de Sanger (Sanger y col., 1977). Esto hizo posible la secuenciación de genes candidatos para un fenotipo concreto, lo que podría revelar la causa genética subyacente. Otro avance importante tuvo lugar en 1983 con la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por parte de Mullis (Saiki y col., 1985), lo que facilitó aún más la secuenciación dirigida mediante la PCR y la secuenciación de Sanger. En la década de 1990 se popularizó la clonación posicional para localizar la región cromosómica de genes asociados a enfermedades. Una gran ventaja es su funcionamiento incluso sin conocimiento o hipótesis sobre la base biológica del trastorno, lo que lo convirtió en un método dominante para el descubrimiento de genes de enfermedades (Collins, 1995). Dos importantes métodos ampliamente aplicados, que comprende la clonación posicional, son el análisis de ligamiento (Vink y Boomsma, 2002) y el mapeo de homocigosidad (Vahidnezhad y col., 2018).

Más recientemente, las matrices de polimorfismo de nucleótido único específicas para cada especie, basadas en el genotipado simultáneo de miles de marcadores con posiciones cromosómicas conocidas, se han convertido en una herramienta rutinaria en el campo de la genética (Karlsson y Lindblad-Toh, 2008). Esto ha permitido el mapeo de un gran número de rasgos mediante métodos de ligamiento (Leegwater y col., 2007), homocigosidad (Drögemüller y col., 2009) y estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) (Karlsson y col., 2007; Drögemüller y col., 2008). Por último, las grandes mejoras en biología molecular e informática del siglo XXI permitieron que las tecnologías de secuenciación del genoma (WGS) se convirtieran en una poderosa herramienta de rutina en la medicina personalizada y de precisión para los seres humanos, así como para los animales de compañía (McGinn y Gut, 2013; Drögemüller y col., 2014).

En esta tesis, se ha utilizado una combinación de métodos para el mapeo, la detección y la validación de variantes genéticas putativas causantes de diferentes tipos de displasia esquelética, así como de potenciales biomarcadores para el diagnóstico de OA en animales de compañía. En los siguientes párrafos se describirán brevemente los métodos utilizados.

Matrices de genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido

Los genetistas caninos fueron de los primeros en impulsar la producción de matrices de genotipado de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de alta calidad para animales de compañía. Los SNP polimórficos se seleccionaron a partir de un mapa de 2,5 millones de ellos generado como parte del proyecto del genoma canino (Lindblad-Toh y col., 2005) y permitieron la aparición de varias plataformas de genotipado de SNP a gran escala. Estas plataformas posibilitaron estudiar la estructura de la población dentro de las distintas razas de perros y entre ellas, así como la variación genética asociada a enfermedades comunes y raras de relevancia para los humanos. Las primeras versiones de matrices creadas en torno al año 2007 contenían tan sólo 1.500 marcadores de SNP, y posteriormente fueron ampliadas a 22.000, 27.000 o 49.000 por diferentes fabricantes. En 2011, se desarrolló un *array* de SNP de alta densidad con 172k SNPs en colaboración con el consorcio LUPA (Lequarré y col., 2011). Las versiones más comunes utilizadas actualmente tienen 220k (CanineHD BeadChip, Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) o 710k marcadores (Axiom CanineHD Array, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Además, la imputación de genotipos desde *microarrays* de baja densidad a matrices SNP de alta densidad o incluso a una densidad de secuenciación del genoma

completo es posible con una alta precisión y se ha demostrado con éxito en perros (Friedenberg y Meurs, 2006; Hayward y col., 2019).

El diseño del *array* felino se benefició de los resultados de los diseños para perros, vacas, cerdos y caballos (Gandolfi y col., 2018). En el momento de la selección de SNP, el ensamblaje del genoma del gato no era tan robusto como el de estas otras especies. Sin embargo, la selección de razas de gatos muy diversas y de gatos domésticos de diversas regiones del mundo apoyó la identificación de más de 10 millones de SNPs para el diseño del *array* (Mullikin, 2010). La última versión del *array* felino contiene aproximadamente 63K variantes (Illumina Infnium iSelect cat *array*, San Diego, CA, Estados Unidos), siendo esta densidad mayor al número de SNPs incluidos en los *microarrays* de primera generación de equinos de (54,6K), caninos (49,6K) y bovinos (58,3K) (Matukumalli y col., 2009; Bannasch y col., 2010; McCue y col., 2012). Esta matriz de SNP de mediana densidad ha permitido que el mapeo de enfermedades y rasgos felinos evolucione de los análisis de ligamiento basados en familias a los GWAS para rasgos simples y poligénicos (Li y col., 2016). La matriz felina también ha permitido comprender la variación genética intra e inter poblacional de las razas felinas, realizar descripciones de alta resolución de huellas de selección en el genoma, y contar con un modelo comparativo más perfeccionado para la investigación biomédica humana (Gandolfi y col., 2018).

Análisis de ligamiento

El análisis de ligamiento genético es un enfoque de mapeo utilizado para examinar la segregación de un rasgo concreto en un pedigrí determinado para identificar las regiones cromosómicas donde se localiza el gen responsable del rasgo estudiado. La fase de enlace y la recombinación son conceptos clave en el análisis de ligamiento paramétrico y no paramétrico (Teare y Santibanez Koref, 2014). El ligamiento genético se produce cuando dos loci se heredan juntos debido a su proximidad, con más frecuencia de la esperada por el azar. Dos loci separados por un centimorgan (correspondiente a aproximadamente un millón de pares de bases) tienen una probabilidad del 1% de separarse durante un evento de recombinación en una meiosis. Con cada separación, la asociación no aleatoria de los alelos de dos loci (el desequilibrio de ligamiento) disminuye y sólo persiste a lo largo de las generaciones si los dos loci están físicamente muy cerca el uno del otro (Ott y col., 2015). En el análisis de ligamiento basado en parámetros, la co-segregación de los marcadores genéticos y un rasgo se estudian bajo un modelo específico basado en información conocida sobre el modo de herencia y la penetrancia.

El análisis de ligamiento sin parámetros estudia la probabilidad de que los alelos sean idénticos por descendencia y no requiere que se especifique un modo de herencia (Teare y Santibanez Koref, 2014).

El poder de ligamiento entre el rasgo y los loci marcadores se evalúa habitualmente mediante el valor de LOD (logaritmo de las probabilidades). Simplificadamente, se calcula mediante el logaritmo en base 10 de la probabilidad de observar los datos debido a un enlace verdadero (hipótesis alternativa) dividido por la probabilidad de observar los datos por azar (hipótesis nula). Tradicionalmente, un valor de LOD de 3 o superior se considera una prueba de ligamiento, mientras que una puntuación LOD de -2 o inferior permite excluir el ligamiento (Ott y col.,2015).

Mapeo de regiones de homocigosidad

El mapeo de homocigosidad, también llamado mapeo de autocigosidad, es un potente método para localizar variantes causales, bajo la premisa de ser idénticas por descendencia. El método funciona para los rasgos autosómicos recesivos (monogénicos), ya que se basa en la suposición de que un individuo afectado ha heredado dos copias idénticas de las regiones cromosómicas que portan el alelo de la enfermedad de un ancestro, al que es consanguíneo (Figura 1). En perros y gatos, la endogamia y el alto grado de parentesco dentro de las razas contribuyen a un elevado número de regiones genómicas largas que son homocigóticas (Sams y Boykom, 2019).



Figura 1. Segregación de un alelo recesivo de una enfermedad en un pedigrí. El individuo afectado ha heredado dos copias del alelo de la enfermedad (estrella). Dado que el alelo es idéntico por descendencia, está incluido en una región extendida de homocigosidad en el individuo afectado. Reproducido de Vahidnezhad y col. (2018). El locus putativo de la enfermedad suele estar flanqueado por unas pocas kilobases (kb) hasta varios megabases (Mb) de marcadores idénticos por descendencia porque las regiones cromosómicas tienden a transmitirse juntas. Tanto los datos de genotipado de matrices de polimorfismo de nucleótido único como los de secuenciación del genoma pueden ser investigados en busca de tales regiones extendidas de homocigosidad, también conocidas como *runs of homozygosity* (ROH) (Vahidnezhad y col., 2018).

En raras ocasiones, una enfermedad puede estar causada por variantes dominantes en un pedigrí consanguíneo, en cuyo caso el enfoque de mapeo de homocigosidad no dará los resultados esperados (Ott y col., 2015). Además de la detección de variantes deletéreas compartidas por los individuos afectados, la caracterización de las regiones extendidas de homocigosidad se utiliza en genética de poblaciones. Su longitud disminuye con la distancia genética debido a los eventos de recombinación y, por lo tanto, puede ser utilizada como una indicación de la endogamia reciente o antigua en la historia de la población de la raza estudiada. Los coeficientes de consanguinidad genómica estimados a partir de las regiones extendidas de homocigosidad han demostrado ser más fiables y precisos que los coeficientes basados en el pedigrí, especialmente en caso de información incompleta, poco fiable o ausente en el pedigrí (Curik y col., 2014).

Secuenciación de nueva generación (NGS)

La primera generación de la técnica de secuenciación comenzó con la invención inicial de la secuenciación del ADN (Padmanabhan y col., 1972) y avanza con la secuenciación de Sanger (Sanger y col., 1977). Esta técnica de secuenciación de primera generación se sigue aplicando hoy en día para la secuenciación selectiva de genes candidatos y la validación de los resultados obtenidos mediante la secuenciación de nueva generación. La razón es que produce resultados muy precisos de alrededor de una kilobase de longitud por un precio experimental relativamente bajo (Djakow y col., 2016).

Con el desarrollo de las técnicas de NGS (segunda y tercera generación) se hizo posible la secuenciación de alto rendimiento. Esto supuso una reducción del coste, el tiempo y el esfuerzo de la secuenciación (Koboldt y col., 2013), pero a menudo requirió una potencia computacional avanzada para manejar los grandes conjuntos de datos producidos (Gauthier y col., 2019). Estos métodos de secuenciación revolucionaron la genómica, ya que la secuenciación de ADN y ARN se hizo factible para todo el mundo, permitiendo su uso para la investigación y el diagnóstico

(Djakow y col., 2016; McGinn y Gut, 2013; Heather y Chain, 2016). Las diferentes plataformas de secuenciación de nueva generación no sólo se diferencian en las tecnologías utilizadas, sino también en otros factores como la velocidad, la longitud de lectura y el rendimiento (Suzuki y col, 2011). En la actualidad, la tecnología NGS de segunda generación más utilizada es *Illumina* (San Diego, California, Estados Unidos), seguida de Ion *Torrent* (Gilford, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) (Rothberg y col, 2011).

Illumina es el líder actual en la secuenciación de lectura corta que utiliza la secuenciación paralela masiva por síntesis con llamada de base óptica, que genera lecturas de extremo simple o emparejado de aproximadamente 150 pb de media. Una de las principales desventajas de esta tecnología es la incapacidad de resolver de forma fiable las regiones repetitivas y detectar variantes estructurales de mayor tamaño en el genoma. Las tecnologías de lectura larga, como la secuenciación de una sola molécula en tiempo real de *Pacific Biosciences* (Menlo Park, California, Estados Unidos) o la secuenciación por nanoporos de *Oxford Nanopore Technologies* (Oxford, Reino Unido) tratan de superar estos problemas. Ambas plataformas producen lecturas largas o ultralargas (>1 kb a 2 Mb) que permiten no sólo el análisis de variantes estructurales sino también ensamblajes genómicos *de novo* de alta calidad (Kumar y col., 2019).

En la presente tesis, todos los datos procedentes de secuenciación del genoma y de transcriptoma completo fueron producidos exclusivamente en instrumentos *Illumina*.

Secuenciación del Transcriptoma Completo (RNA-seq)

La tecnología de RNA- seq se desarrolló hace más de una década (Emrich y col., 2007) y desde entonces se ha convertido en una herramienta omnipresente en la biología molecular que está dando forma a casi todos los aspectos de nuestra comprensión de la función genómica. La secuenciación de ARN se utiliza sobre todo para analizar la expresión génica diferencial (DGE). Alrededor de cien métodos distintos se han derivado del protocolo estándar de RNA-seq (Illumina.com,<u>https://www.illumina.com/content/dam/illuminamarketing/documents/products/res</u> earch reviews/rna-sequencing-methods-review-web.pdf (2022).

El flujo de trabajo estándar comienza en el laboratorio, con la extracción de ARN, seguida del enriquecimiento del ARNm o la reducción del ARN ribosómico, la síntesis del ADNc y la preparación de una biblioteca de secuenciación ligada a un adaptador. A continuación, la biblioteca se secuencia con una profundidad de lectura de 10-30 millones de lecturas por muestra en una plataforma de alto rendimiento (normalmente *Illumina*) (Figura 2) (Stark y col., 2019).



Figura 2: Tecnologías y flujos de trabajo de secuenciación de ARN directa (azul), de lectura corta (negro) y de lectura larga (verde). La complejidad y los pasos de la preparación de las bibliotecas varía según el método específico utilizado. Los métodos de lectura corta y de lectura larga comparten varios de los pasos en sus protocolos, pero todos los métodos requieren un paso de ligadura del adaptador, y todos se ven afectados por la calidad de la muestra y los problemas computacionales antes de la preparación de la biblioteca y después de prepararla. Adaptado de Stark y col. (2019).

Los últimos pasos son computacionales: alineación y/o ensamblaje de las lecturas de secuenciación a un genoma de referencia, cuantificación de las lecturas que se superponen a los transcriptos, filtrado y normalización entre muestras, y modelización estadística de los cambios significativos en los niveles de expresión de genes individuales y/o transcritos entre grupos de muestras (Figura 3) (Stark y col., 2019).



Figura 3: Un tipo de flujo de trabajo de análisis de datos de secuenciación del transcriptoma entero (RNAseq) para la expresión génica diferencial (DGE). El análisis computacional de la DGE comienza con lecturas de secuenciación de ARN sin procesar en formato FASTQ. Los alineadores como TopHat, STAR o HISAT2 utilizan un genoma de referencia para mapear las lecturas a las ubicaciones genómicas y luego las herramientas de cuantificación, como HTSeq y featureCounts, asignan las lecturas a los genes. Después de la normalización (que se realiza normalmente utilizando métodos integrados en las herramientas de cuantificación o modelización de la expresión), la DEG se modela utilizando herramientas como edgeR, DESeq2 y limma+voom, y se genera una lista de genes o transcriptos expresados diferencialmente para su posterior visualización e interpretación. Adaptado de Stark y col. (2019).

La secuenciación de lectura corta se ha convertido en el método de facto para detectar y cuantificar la expresión génica de todo el transcriptoma, en parte porque es más barata y fácil de implementar que los *microarrays*, pero sobre todo porque genera datos completos y de alta calidad que capturan los niveles de expresión cuantitativa en todo el transcriptoma. Sin embargo, hay una serie de puntos en el proceso, tanto en la fase de preparación de la muestra como en la de análisis computacional, en los que se pueden introducir imperfecciones y sesgos (Stark y col., 2019).

Pacific Biosciences y Oxford Nanopore ofrecen tecnologías alternativas de lectura larga que permiten la secuenciación de moléculas individuales completas de ARN tras su conversión en ADNc (Sharon y col., 2013; Cartolano y col., 2016; Oikonomopoulos y col., 2016). Al eliminar la necesidad de ensamblar lecturas cortas de ARN, estos enfoques superan algunos de los problemas asociados a los análisis de lectura corta. Por ejemplo, se reduce la ambigüedad en el mapeo de las lecturas de la secuencia y se pueden identificar transcripciones más largas, lo que conduce a una captura más completa de la diversidad de isoformas. También se reduce la alta tasa de falsos positivos en la detección de empalmes por parte de muchas herramientas computacionales de ARN-secuencias cortas (Engström y col., 2013). Aunque los métodos de secuenciación del transcriptoma completo de lectura larga tienen actualmente costes experimentales más elevados, pueden detectar isoformas que los métodos de lectura corta no detectan, especialmente en regiones difíciles de secuenciar, pero clínicamente relevantes (Stark y col., 2019).

La utilización de la secuenciación de ARN ha contribuido a que conozcamos muchos aspectos de la biología, por ejemplo, al revelar el alcance del empalme de ARNm (Wang y col., 2008) y la regulación de la expresión génica por los ARN no codificantes (Djebali y col., 2012; Morris y Mattick, 2014) y los ARN potenciadores (Li y col., 2016). En la actualidad, los ARN codificantes de proteínas han sido los más estudiados, a pesar de que sólo representan una minoría de todas las moléculas de ARN en el transcriptoma. En cambio, el papel de los ARN no codificantes, incluidos los miARN, los IncARN y los circARN, en el proceso de desarrollo de las enfermedades sólo ha empezado a surgir en los últimos quince años (Mortazavi y col., 2008). Los miARN

regulan negativamente la expresión de los ARNm y, por lo tanto, interfieren en la regulación postranscripcional en varias enfermedades (Marioni y col., 2008). Del mismo modo, los IncARNs participan en los procesos celulares influyendo en las vías epigenéticas, postranscripcionales y traduccionales (Cloonan y col., 2008). Con la comprensión progresiva del papel de los ARN no codificantes en varias enfermedades, se han propuesto numerosos ARN no codificantes como prometedores biomarcadores de diagnóstico. Las ventajas de los ARN no codificantes como biomarcadores incluyen la facilidad de detección en los fluidos corporales, los patrones de expresión específicos del tipo de célula y las fluctuaciones en los niveles de expresión en respuesta al estrés o a la enfermedad mediante el uso de varios enfoques de cribado. Las moléculas de ARN identificadas en los fluidos corporales pueden ser validadas en grandes cohortes de muestras de pacientes y ser desarrolladas como nuevos biomarcadores de enfermedades (Lu y Thum, 2019).

Descubrimiento de variantes privadas, compartidas, raras o específicas de la raza

Utilizando los datos de secuenciación del genoma, es posible identificar las variantes causales putativas, incluso sin estrategias de mapeo previas, en los casos en los que sólo se dispone de un único animal afectado o de un número limitado de ellos. Los datos de secuenciación de lectura corta pueden ser analizados para revelar una gran parte de la variación genética que comprende variantes de un solo nucleótido (SNV) e inserciones-deleciones (indels) de pocos pares de bases. El número de variantes de un solo nucleótido identificadas supera ampliamente el número de marcadores incluidos en las matrices de genotipado (Jagannathan y col., 2019; Koboldt y col., 2013). Este amplio conjunto de datos de variantes de un solo nucleótido representa una parte de la variación normal de un individuo. Sin embargo, también puede contener la variante genética causante de la enfermedad hereditaria que padece el individuo. Las variantes patogénicas pueden identificarse comparando diferentes conjuntos de datos individuales entre sí. Especialmente en el caso de las enfermedades monogénicas raras, este enfoque es muy eficaz y ha llevado a un rápido aumento del número de variantes causales identificadas (Koboldt y col., 2013).

Para encontrar estas variantes, las lecturas obtenidas de secuenciación del genoma tienen que ser filtradas, deduplicadas y alineadas con una secuencia genómica de referencia. Posteriormente, las variantes de un solo nucleótido y las inserciones-deleciones son llamados, filtrados por calidad, y anotados para predecir el impacto de cada variante en el nivel de la

proteína (Depristo y col., 2011; McKenna y col., 2010). Una herramienta de vanguardia para detectar variantes de un solo nucleótido y pequeñas inserciones-deleciones es el *HaplotypeCaller* del *Genome Analysis Toolkit* (GATK) (McKenna y col., 2010).

Este enfoque suele aplicarse a un conjunto de animales tipo caso y control, y genera millones de variantes en todo el genoma. Por lo tanto, se utilizan estrategias de filtrado jerárquico para reducir el número de variantes. La Figura 4 ilustra las opciones de filtrado más usadas cuando se utiliza un gran conjunto de variantes detectadas a partir de datos de secuenciación de genoma.



Figura 4. Ilustración de las diferentes estrategias utilizadas al filtrar las variantes detectadas a partir de un gran conjunto de secuencias del genoma completo. Los perros de color rojo y gris representan los casos y los controles, respectivamente. Los perros rayados representan perros de control que también podrían ser portadores de las variantes. (A) Detección de variantes privadas exclusivas del caso o compartidas por varios casos, y ausentes en los controles. (B) Detección de variantes raras o enriquecidas presentes en uno o más casos, así como en un subconjunto de controles. (C) Detección de variantes específicas de la raza presentes en todos los animales de una raza y ausentes en todas las demás razas. Reproducido de Letko (2021).

Por lo general, uno o más casos se comparan con los controles, que pueden estar representados por animales no afectados conocidos para el fenotipo dado o por controles de la población incluso con un estado de salud desconocido de la misma raza, o por todos los genomas disponibles, incluyendo diferentes razas (Figura 4A). En el caso de variantes raras y enriquecidas, la frecuencia alélica alternativa en todos los genomas puede calcularse para detectar variantes asociadas a la enfermedad que son potencialmente compartidas por varios controles de raza debido, por ejemplo, a una penetrancia reducida o al estado de portador en rasgos recesivos, o animales de otras razas relacionadas debido a su historia compartida (Figura 4B). Para detectar

variantes fijas específicas de la raza, todos los animales de una raza analizados, independientemente de su fenotipo, se comparan con todos los animales de otras razas disponibles (Figura 4C). Para reducir aún más la lista de variantes asociadas a un rasgo, a menudo se realiza un filtrado basado en el modo de herencia, especialmente en los conjuntos de datos basados en tríos, en una lista conocida de genes candidatos, en la región de interés a partir de enfoques de mapeo anteriores, o basado en la estimación de los impactos funcionales.

La estimación del impacto funcional sigue siendo un reto, ya que las variantes genéticas pueden tener diferentes efectos, desde variantes que cambian las proteínas y alteran la función del gen hasta variantes no codificantes sin un impacto claro. Las variantes de un solo nucleótido más fáciles de detectar y evaluar son las alteraciones de los codones de inicio/parada y los cambios de marco de lectura, seguidos de los cambios de aminoácidos no sinónimos. Sin embargo, la mayor parte del conjunto de datos de polimorfismos consiste en variantes no codificantes. La evaluación del impacto potencial de las variantes de un solo nucleótido sinónimas o no codificantes requiere de un procesamiento bioinformático avanzado (Dunham y col., 2012).

Además de las variantes de un solo nucleótido y las inserciones-deleciones cortas, las variantes estructurales (SVs) juegan un papel prominente e importante no sólo en la evolución fenotípica sino también en los rasgos asociados a las enfermedades (Auton y col., 2015). Dichas variantes estructurales incluyen duplicaciones, deleciones, inversiones, translocaciones y variantes en el número de copias (CNV), que abarcan más de 50 bp (Andersson, 2013). Las SVs más grandes son generalmente más difíciles de detectar usando datos de lecturas cortas, ya que no se reportan en los programas de llamado y filtrado de variantes de un solo nucleótido e inserciones-deleciones cortos (Alkan y col., 2011). Además de las herramientas de llamada de variaciones estructurales disponibles, por ejemplo, *BreakDancer* (Chen y col., 2009) o *CNVfinder* (Fiegler y col., 2006), el enfoque más fiable para detectarlas es la inspección visual de las alineaciones de lecturas cortas de regiones genómicas limitadas mediante softwares como el *Integrated Genome Browser* (IGV; Robinson y col., 2011).

En esta tesis, las variantes patogénicas identificadas corresponden a variantes de un solo nucleótido.

Objetivo e hipótesis de la tesis

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar genéticamente desórdenes osteoarticulares en animales de compañía e identificar las variantes genéticas causales y posibles biomarcadores circulantes de las enfermedades estudiadas. Se espera que los resultados obtenidos puedan colaborar en la mejora del estado de salud de las razas caninas y felinas estudiadas mediante la cría selectiva contra las variantes deletéreas identificadas y, el empleo a futuro de los biomarcadores identificados en el diagnóstico clínico.

Para el desarrollo de la presente tesis se tuvieron en cuenta las siguientes hipótesis:

- 1. Tanto el enanismo desproporcionado como la displasia esquelética compleja tienen una herencia mendeliana simple.
- El perfil transcriptómico de sangre periférica es una buena herramienta para identificar biomarcadores de la osteoartritis canina.

Para tal fin, se investigaron en detalle los siguientes desórdenes osteoarticulares:

- 1. Enanismo desproporcionado en perros de la raza dogo argentino.
- 2. Displasia esquelética compleja en gatos de la raza británico de pelo corto.
- 3. OA en perros de la raza ovejero alemán.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se compilan tres trabajos independientes, con objetivos, metodologías y resultados diferentes. Los primeros dos fueron publicados en la revista *Genes* y el tercero está en proceso de edición para publicación. Debido a la compleja metodología bioinformática empleada, parte del material suplementario correspondiente a estos estudios es muy extenso e imposible de adjuntar en el cuerpo de esta tesis. La numeración de dicho material no es continua con el resto de las figuras y tablas de la tesis, cabe aclarar que se mantuvo la numeración original publicada en los repositorios en línea por lo que el lector podrá acceder fácilmente mediante el hipervínculo correspondiente (*).

1. Variante sitio de empalme (*splice site*) en el gen *PRKG2* en perros de la raza dogo argentino con enanismo desproporcionado.

Trabajo publicado en la revista *Genes* (Basel). 2021 Sep 24; 12(10):1489. DOI: <u>10.3390/genes12101489</u>

Resumen: Los fenotipos de enanismo se dan en muchas especies y pueden estar causados por factores genéticos o ambientales. En este trabajo se estudió una familia de nueve perros dogos argentinos, en la que dos perros estaban afectados por enanismo desproporcionado. Las radiografías de un perro afectado revelaron una disminución del nivel de osificación endocondral en sus placas de crecimiento y un cierre prematuro de las fisis distal del cúbito. El pedigrí de los perros presentaba evidencias de una herencia autosómica recesiva monogénica; el mapeo combinado de análisis de ligamiento y homocigosidad asignó la posición más probable de un posible defecto genético en 34 segmentos del genoma, con un total de 125 Mb. Se secuenció el genoma de un perro afectado y se comparó con 795 genomas controles. La priorización de las variantes privadas reveló una clara variante candidata principal para el enanismo observado. Esta variante, PRKG2:XM 022413533.1:c.1634+1G>T, afecta el sitio donante de empalme (splice site donor) y, por lo tanto, se predice que interrumpe la función del gen PKRG2 que codifica la proteína quinasa dependiente de cGMP tipo 2, un conocido regulador de la diferenciación de los condrocitos. Los genotipos de la variante PRKG2 fueron perfectamente asociados con el fenotipo en la familia de perros estudiada. Previamente se ha reportado que las variantes de pérdida de función de *PRKG2* causan un enanismo desproporcionado en humanos, bovinos, ratones y ratas. Junto con los datos comparativos de otras especies, estos resultados sugieren robustamente que PRKG2:c.1634+1G>T es una variante candidata a causar el fenotipo de enanismo observado en los perros dogo argentino.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el fenotipo e identificar un posible defecto genético subyacente para dicho caso.

<u>Metodología</u>

Declaración ética

Todos los perros de este estudio eran de propiedad privada y fueron examinados con el consentimiento informado de sus propietarios. El "*Cantonal Committee for Animal Experiments*" aprobó la toma de muestras de sangre (Cantón de Berna; permiso 71/19).

Muestras

Se investigó una familia de dogos argentinos, compuesta por tres padres no afectados, tres abuelos no afectados, dos crías afectadas y una cría no afectada. Los dos cachorros medio hermanos afectados, un macho y una hembra, presentaban deformidades esqueléticas. Se tomaron muestras de sangre de todos los perros.

Diagnóstico por imagen

Se adquirieron imágenes radiográficas de los miembros anteriores distales y de las articulaciones de la cadera utilizando una unidad de rayos X de alta frecuencia (Raffaello HF/40, ACEM s.p.a, Italia) montada con el sistema DR (Carestream DRX, Carestrem Health, Milán, Italia). Se obtuvieron proyecciones neutras mediolaterales y craneocaudales del radio y el cúbito, así como una proyección ventrodorsal de las articulaciones de la cadera con una abducción de los fémures. Las imágenes radiográficas se grabaron en formato DICOM y se transfirieron a un ordenador. Se utilizó un software de procesamiento de imágenes (OsiriX Lite-Versión 11, Pixmeo SARL, 2019) para visualizar las imágenes y realizar la evaluación. La TC de cuerpo entero se realizó bajo anestesia general utilizando un escáner de TC de 64 cortes (Brilliance CT 64 channel Philips Medical Systems Nederland) en pacientes en decúbito esternal. Los parámetros de adquisición y el algoritmo de filtrado se ajustaron en función de las diferentes regiones del cuerpo. Las imágenes DICOM disponible en el mercado (OsiriX Lite-Versión 11, Pixmeo SARL, 2019) para su evaluación. Para la TC de los miembros anteriores y posteriores, se realizó una reconstrucción multiplanar para obtener imágenes transversales, sagitales y dorsales de reformateo.

Extracción de ADN

El ADN genómico se purificó a partir de las muestras de sangre con EDTA a través del kit *Maxwell RSC Whole Blood Kit* utilizando un instrumento *Maxwell RSC* (Promega, Dübendorf, Suiza).

> Mapeo del genoma mediante análisis de ligamiento y homocigosidad

La familia de dogos argentinos fue genotipada con el *microarray Illumina* canine_HD BeadChip que contiene 22.853 marcadores (Neogen, Lincoln, NE, USA). Los genotipos de variantes de un solo nucleótido en crudo están disponibles en el archivo S1 (*). Los datos genotípicos se utilizaron para un análisis de vinculación paramétrica. Utilizando el programa PLINK v 1.09 (Purcell y col., 2007), se excluyeron los marcadores que estaban localizados en los cromosomas sexuales, o que faltaban en cualquiera de los nueve perros, que contenían errores mendelianos o que tenían

una frecuencia alélica menor a 0,01. Para el análisis de ligamiento paramétrico se utilizó un modelo de herencia autosómica recesiva con penetrancia completa, una frecuencia alélica de la enfermedad de 0,5 y el software Merlin (Abecasis y col., 2002). Se consideraron todos los intervalos con α = 1 como regiones ligadas que podrían albergar posibles defectos genéticos causantes. Los datos del genotipo de los dos hermanastros afectados se utilizaron para el mapeo de homocigosidad. Se excluyeron los marcadores con genotipos ausentes. Se utilizó la opción - homozyg-group en PLINK para obtener grupos de segmentos superpuestos y potencialmente coincidentes. Los intervalos de salida se compararon con los intervalos del análisis de ligamiento utilizando hojas de cálculo de Excel para encontrar regiones superpuestas, que se consideraron intervalos críticos. Los resultados del análisis de ligamiento y del mapeo de homocigosidad se presentan en la Tabla S1 (*).

> Secuenciación del genoma completo de un perro afectado

Se preparó una biblioteca de ADN *Illumina TruSeq* libre de PCR con un tamaño de inserción de aproximadamente 400 pb de un dogo argentino afectado. Se obtuvieron 221 milliones 2x150 bp de lectura de tipo apareadas (*paired-end*) en un instrumento *NovaSeq 6000*. Esto resultó en una cobertura de 25.3 ^x. Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia del perro CanFam3.1 según Jagannathan y col., (2019). Los datos de la secuencia se depositaron bajo el número de acceso del estudio PRJEB16012 y de la muestra SAMEA8157167 en el Archivo Europeo de Nucleótidos (<u>https://www.ebi.ac.uk</u>).

> Llamado y filtrado de variantes

La identificación de variantes fue realizada según Jagannathan y col., (2019). Se utilizó el software *SnpEff* (Cingolani y col., 2012), junto con la versión 105 de la anotación del NCBI del genoma de referencia CanFam 3.1, para predecir los efectos funcionales de las variantes identificadas. Para realizar el filtrado de variantes, se utilizaron 795 genomas controles. Se empleó un enfoque de filtrado estricto para identificar las variantes en las que el perro afectado era homocigoto para el alelo alternativo (1/1), mientras que los 795 genomas controles eran homocigotos para el alelo de referencia (0/0) o un genotipo ausente (./.). El resultado del filtrado de variantes se muestra en la Tabla S2 (*). Los números de acceso de todas las secuencias genómicas utilizadas para el análisis se recopilan en la Tabla S3 (*).

Las variantes privadas en el perro afectado se priorizaron según el conocimiento funcional. El análisis se concentró en las variantes que se predijo que cambiarían una proteína codificada (impacto *SnpEff* alto o moderado). Se realizó una priorización adicional basada en búsquedas en

bases de datos online OMIA, OMIM, MGI (<u>http://www.informatics.jax.org/</u>) y en la literatura científica.

> Análisis de genes

Se utilizó el genoma de referencia del perro CanFam3.1 y la versión 105 de la anotación del NCBI. La numeración del gen *PRKG2* canino corresponde a los números de acceso NCBI RefSeq XM_022413533.1 (ARNm) y XP_022269241.1 (proteína).

> Secuenciación por el método de Sanger

La variante *PRKG2*:XM_022413533.1:c.1634+1G>T se genotipificó utilizando la secuenciación Sanger directa de los amplicones de la PCR. Se amplificó un producto de PCR de 195 pb a partir de ADN genómico utilizando *AmpliTaqGold360Mastermix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos.) junto con los siguientes primers: 5'-TGC TTA GGT GGG GAG CTA TG-3' (primer F) y 5'-AAG AAA ACA CCA AAC ACC ATC A-3' (primer R). La PCR se llevó a cabo con una desnaturalización larga inicial de 10 minutos a 95 C°, seguida de 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 95 C°, 30 s de alineamiento a 60 C° y 60 s de polimerización a 72 C°. Al final se realizó una extensión final de 7 minutos a 72 C°. Se utilizó un analizador de fragmentos 5200 para el control de calidad de los productos de la PCR (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Tras el tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón y exonucleasa I, los amplicones de la PCR se secuenciaron en un analizador de ADN ABI 3730 (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias obtenidas se analizaron con el software *Sequencher 5.1* (GeneCodes, Ann Arbor, MI, Estados Unidos).

Resultados

> Investigación clínica y descripción del fenotipo

Un criador de perros de la raza dogo argentino identificó dos cachorros medio hermanos, un macho y una hembra, con deformidades esqueléticas que se hicieron evidentes a los 2 meses de edad. El fenotipo de enanismo en el cachorro macho nacido en el año 2018 era bastante grave, y requirió múltiples intervenciones quirúrgicas (Figura 5).


Figura 5. Morfología del perro macho afectado a los 2 años de edad. El caso (a la izquierda) y un dogo argentino típico (a la derecha) según el estándar de la Federación Cinológica Internacional (FCI). Nótese que el perro afectado ya había sido sometido a correcciones quirúrgicas de las extremidades anteriores antes de que se tomaran las fotos. (A) Vista lateral: La altura a la cruz del caso es de 58,5 cm en comparación con el estándar de la raza de 60-68 cm (altura ideal 64-65 cm). La longitud del cuerpo en el perro afectado también es más corta. (B) Vista desde un ángulo de 45 grados: son evidentes las anomalías angulares de la cabeza y de las extremidades anteriores desproporcionadamente grandes. (C) Surco vertical pronunciado entre los ojos del perro afectado.

A los 3 meses de edad, las anomalías más evidentes en el caso del macho consistían en un acortamiento de las extremidades con un aumento de las deformidades angulares que se manifestaban en los miembros anteriores, que estaban rotados hacia fuera (carpo valgo) (Figura 6A). Las anomalías del esqueleto de los miembros anteriores ya habían provocado anomalías en la marcha. Por lo tanto, el perro fue presentado a un cirujano veterinario ortopédico que diagnosticó un cierre bilateral prematuro de la fisis cubital distal. Los hallazgos radiográficos eran

indicativos de una asincronía de crecimiento entre el radio y el cúbito que causaba una incongruencia húmero-cubital. La radiografía demostró una calcificación insuficiente en la placa de crecimiento durante la formación del hueso. Para corregir esta situación, el perro fue sometido a una cirugía correctiva que consistió en la elongación del cúbito mediante una osteotomía dinámica proximal del cúbito, seguida un mes después de una hemiepifisiodesis de las fisis proximal y distal del radio (Figura 6B).



Figura 6. Hallazgos radiológicos en el perro macho afectado. (A) Radiografías ortogonales del plano frontal (izquierda) y sagital (derecha) del miembro anterior derecho a los tres meses de edad. Deformidades angulares representadas por el acortamiento del cúbito y la subsiguiente flexión del radio que causan incongruencia de la articulación del codo y carpo valgo. (B) Radiografías tomadas después de la corrección quirúrgica a los cuatro meses de edad. Evidencia de la cirugía correctiva que incluye la ostectomía del cúbito en la diáfisis media y la presencia de placas y tornillos para cerrar las placas de crecimiento del radio. (C-F) Tomografía computarizada de todo el cuerpo a los 2 años de edad. Imágenes de reconstrucción multiplanar en 3D que destacan la morfología de (C, D) el cráneo y las extremidades delanteras, y (E, F) las extremidades traseras.

Cuando el perro tuvo diez meses, se desarrollaron signos de displasia de cadera con cojera de la extremidad posterior izquierda y atrofia muscular moderada. El examen radiográfico mostró un grave remodelado de la articulación de la cadera y se llevó a cabo su sustitución total. Además de las anomalías apendiculares ortopédicas, otros signos de enanismo desproporcionado se hicieron evidentes durante la adolescencia. A los 2 años de edad, el fenotipo se caracterizó por unas piernas cortas y un cuerpo y cuello proporcionalmente más cortos. La cabeza había desarrollado una cara relativamente ancha, una nariz ligeramente girada hacia arriba y un *stop* del arco cigomático bien delimitado. También era evidente un pronunciado surco vertical entre los ojos (Figura 5C). La alteración de la morfología de la cabeza y la cara se reflejaba también en la alteración de las dimensiones del cráneo. La distancia entre el punto más lateral del arco cigomático era mayor que para el estándar de la raza del perro (Tabla S4*, Figura 6C).

La media hermana afectada también nació en 2018. Su fenotipo fue diagnosticado en base a las fotografías clínicas (Figura 7), pero el propietario no aceptó el examen clínico y radiológico detallado de la perra.



Figura 7. Fenotipo clínico de la perra afectada (DG0005). (A) Esta perra tenía extremidades cortas con deformidades angulares y una rotación hacia fuera de las patas. (B) Vista frontal de las extremidades delanteras acortadas.

Análisis genético

Los dos medios hermanos con enanismo desproporcionado procedían de una familia muy endogámica. Los cachorros afectados nacieron de padres normales. Las relaciones del pedigrí sugerían un modo de herencia monogénico autosómico recesivo del trastorno (Figura 8). El análisis de ligamiento de esta familia reveló 48 segmentos genómicos ligados que comprendían 711 Mb en total. Posteriormente, se aplicó un enfoque de mapeo de homocigosidad a dos medios hermanos afectados. Estos animales compartieron 78 regiones homocigóticas en todo el genoma. La intersección de los intervalos ligados y homocigotos consistía en 34 segmentos del genoma con un total de 125 Mb que correspondían aproximadamente al 5% del genoma del perro de 2,4 Gb (Tabla S1*).





Para obtener una visión general de todas las variantes en el intervalo crítico, el genoma completo de un perro afectado fue secuenciado con una cobertura de 25.3 [×]. Las variantes de un solo nucleótido y las inserciones-deleciones cortas fueron identificados con respecto al ensamblaje del genoma de referencia CanFam3.1. Luego estas variantes fueron comparadas con los datos de la secuencia del genoma completo de 9 lobos y 786 perros controles de razas genéticamente diversas (Tabla 1).

Pasos de filtrado	Variantes
Variantes homocigotas en todo el genoma	2.625.704
Variantes homocigotas privadas (ausentes en los 795 genomas controles)	2,007
Variantes homocigotas privadas en los 125 Mb del intervalo crítico	196
Variantes con impacto en nivel proteína en el intervalo crítico	3

 Tabla 1. Variantes detectadas por la re-secuenciación del genoma completo de un perro afectado.

Sólo se identificaron tres variantes privadas con impacto en nivel proteína en las regiones ligadas y homocigotas (Tabla 2). La priorización de estas variantes, según el conocimiento funcional de los genes afectados reveló una variante candidata principal para el enanismo desproporcionado observado, la variante *PRKG2*:XM_022413533.1:c.1634+1G>T. Las otras dos variantes afectaban a genes sin función conocida en el desarrollo o el crecimiento del esqueleto.

Chr.	Posición	Ref.	Alt.	Gen	HGVS-c	HGVS-p	
12	1.411.804	С	А	NELFE	c.7G>T	p.Val3Leu	
23	50.457.119	G	С	LEKR1	c.206G>C	p.Arg69Thr	
32	5.299.068	С	А	PRKG2	c.1634+1G>T		

Tabla 2. Detalles de las tres variantes candidatas con impacto en nivel proteína.

El gen *PRKG2* codifica la proteína quinasa dependiente del GMPc tipo 2. La variante de *PRKG2* en los perros afectados representaba una variante *splice site donor* que anularía completamente la función de *PRKG2*. Esta variante fue validada mediante secuenciación Sanger (Figura 9) en todos los perros de la familia estudiada. Los dos casos fueron homocigotos para el alelo mutante, mientras que los padres, un abuelo y el medio hermano no afectado eran portadores heterocigotos. Los demás familiares no afectados no fueron portadores del alelo mutante (Figura 8).



Figura 9. Electroferogramas Sanger representativos de un control, un portador y un perro afectado que ilustran la variante *PRKG2*:c.1634+1G>T. La línea vertical discontinua indica el límite exón/intrón.

Discusión

En este estudio, se identificó una nueva forma de enanismo desproporcionado en perros de la raza dogo argentino. La introducción de esta raza argentina en Europa se produjo hace unos 50 años y sólo hay unos pocos criaderos en Europa (dogo argentino-breeders and Kennels-EuroBreeder.com). Esto puede haber contribuido a un nivel particularmente alto de endogamia en la población europea y promovido la aparición de una nueva enfermedad recesiva.

Utilizando un enfoque de genes candidatos posicionales junto con la secuenciación del genoma completo, identificamos la variante de tipo *splice site PRKG2*:c.1634+1G>T como la variante causante más probable de un enanismo desproporcionado heredado en la familia dogo argentino estudiada.

En los vertebrados mandibulados hay dos formas de la proteína quinasa dependiente del GMPc, los tipos 1 y 2, que están codificados por genes distintos, *PRKG1* y *PRKG2*, respectivamente. En los seres humanos, la PRKG2 se expresa en gran medida en los huesos (osteoblastos y condroblastos), el intestino, el cerebro y el riñón (Orstavik y col., 1996). Este gen representa un buen candidato funcional para el fenotipo de enanismo desproporcionado debido a su rol en la organización de la placa epifisaria. La formación ósea se produce a través de dos mecanismos

diferentes: la osificación membranosa y la endocondral. La mayoría de los huesos craneofaciales se desarrollan a través de la osificación membranosa. En cambio, el crecimiento longitudinal de los huesos largos y de las vértebras ocurre mediante el proceso de osificación endocondral en la placa epifisaria, que es el resultado de la proliferación e hipertrofia de los condrocitos y de la síntesis de la matriz cartilaginosa (Kronenberg, 2003). En la placa epifisaria, PRKG2 se expresa predominantemente en los condrocitos proliferativos tardíos y pre-hipertróficos y favorece su diferenciación hipertrófica (Yuasa y col., 2010).

La señalización de PRKG2 conduce a la fosforilación del factor de transcripción SRY-box 9 (SOX9) y consecuentemente la inhibición de su entrada al núcleo celular. SOX9, miembro de la familia SOX, es un potente inhibidor de la diferenciación hipertrófica de los condrocitos y, por tanto, regula la condrogénesis (Akiyama y col., 2002). La forma no fosforilada de SOX9 activa la expresión del colágeno tipo II, una de las principales proteínas de la matriz del cartílago. Tras la fosforilación de SOX9, la expresión de colágeno cambia del colágeno tipo II (estado proliferativo) al colágeno tipo X (estado hipertrófico) (Koltes y col., 2015). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la ausencia de SOX9 en la zona hipertrófica de la placa epifisaria normal, mientras que la localización nuclear de SOX9 era visible en la capa intermedia de la placa epifisaria anormal (Chikuda y col., 2004). Por lo tanto, PRKG2 desempeña un papel de interruptor molecular, acoplando el cese de la proliferación de condrocitos y el inicio de las fases de crecimiento hipertrófica y de diferenciación, mediante la fosforilación de SOX9 (Koltes y col., 2015).

Díaz-González y colaboradores (2020) identificaron dos variantes en estado homocigotas, de tipo mutación sin sentido (*nonsense*) y de cambio en el marco de lectura (*frameshift*), que causaron la pérdida de función del gen *PRKG2* en dos niñas no emparentadas. Las pacientes presentaban una estatura desproporcionada severa debido a varios factores, como acortamiento acromesomélico de las extremidades, braquidactilia, platispondilia de leve a moderada y aumento progresivo de alteraciones metafisarias de los huesos largos. Los progenitores de ambas niñas eran portadores heterocigotos en cada caso de estas mutaciones del gen *PRKG2*. Estos hallazgos también fueron apoyados por análisis de *nonsense-mediated mRNA decay* (Díaz-González y col., 2020).

El enanismo desproporcionado en la raza bovina Angus americano está causado por una variante de tipo sin sentido en el gen *PRKG2* (OMIA: 001485-9913). La transfección de células de hepatoma humano con el alelo bovino mutante redujo la capacidad de *PRKG2* para inhibir la expresión del colágeno tipo II mediante la regulación de SOX9 (Koltes y col., 2009).

Por otro lado, se ha reportado que los ratones homocigotos nulos para *Prkg2* desarrollan enanismo con una morfología anormal del cráneo y extremidades y vértebras cortas, el cual es causado por un grave defecto en la osificación endocondral en la placa epifisaria (Pfeifer y col., 1996; Miyazawa y col., 2002). Adicionalmente, la rata miniatura Ishikawa de Komeda es un mutante natural causado por una mutación autosómica recesiva que involucra una delación de 220 pb que abroga la función del dominio quinasa de *Prkg2*. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos en estas ratas mostraron la placa epifisaria expandida y una alteración de la cicatrización ósea con una acumulación anormal de condrocitos no hipertróficos conduciendo a un retraso del crecimiento óseo longitudinal (Chikuda y col., 2004).

La variante *PRKG2*:c.1634+1G>T identificada en los perros dogo argentino muy probablemente conduce a una pérdida completa de la función de la proteína codificada por este gen. Análisis experimentales a nivel de transcripción o proteína para proporcionar pruebas funcionales de esta hipótesis no pudieron ser realizados debido a la ausencia de muestras de tejido adecuadas de los perros afectados y controles. Sin embargo, los genotipos en la variante de tipo *splice site* co-segregaron con el enanismo desproporcionado en la familia estudiada, y el alelo mutante estaba ausente en 795 genomas de perros y lobos genéticamente diversos. Estos datos, junto con el conocimiento sobre el efecto funcional de las variantes de *PRKG2* en humanos, bovinos, ratones y ratas con fenotipos de enanismo desproporcionado, sugieren robustamente que *PRKG2*:c.1634+1G>T es efectivamente la variante causante del fenotipo de enanismo observado en los perros dogo argentino.

En resumen, se describe una nueva forma de enanismo desproporcionado heredado en perros dogo argentino y se proporciona la variante de tipo *splice site PRKG2*:c.1634+1G>T como variante causal candidata. El fenotipo se hereda como un rasgo autosómico recesivo y muestra paralelismos con las formas de enanismo desproporcionado previamente reportadas en pacientes humanos y en el ganado Angus americano. Nuestros datos facilitan la realización de pruebas genéticas en perros dogo argentino para evitar la cría no intencionada de más cachorros afectados.

Materiales suplementarios

En <u>https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12101489/s1</u> están disponibles: Archivo S1: Genotipos de variantes de un solo nucleótido de nueve perros dogos argentinos. Tabla S1: Datos de ligamiento y homocigosidad. Tabla S2: Variantes privadas en el genoma del dogo argentino

afectado DG0003. Tabla S3: Números de acceso de 787 secuencias del genoma de perros y 9 de lobos. Tabla S4: Medidas cefalométricas calculadas mediante reconstrucciones 3D por TC del perro afectado DG0003 a los dos años de edad. (*) Este material no sigue la numeración consecutiva de la tesis, con el objetivo que el lector pueda encontrarlas con su numeración original en el sitio online de la revista donde fue publicado.

2. Variante *frameshift* en el gen *LTBP3* en gatos de la raza británico de pelo corto con displasia esquelética compleja

Trabajo publicado en la revista *Genes* (Basel). 2021 Nov 29;12(12):1923. DOI: <u>10.3390/genes12121923</u>

Resumen: En este estudio se investigó una familia de gatos de la raza británico de pelo corto altamente consanguínea, en la que dos crías estaban afectadas por paraparesia deteriorada debido a malformaciones esqueléticas complejas. Las radiografías de ambos gatos afectados revelaron deformaciones vertebrales con una marcada estenosis del canal vertebral desde T11 hasta L3. Además, se encontró compresión de la médula espinal, hernia cerebelosa, coprostasis e hipogangliosis. El pedigrí sugería una herencia autosómica recesiva monogénica de la patología. Se secuenció el genoma completo de un gato afectado y se comparó con 62 genomas felinos controles. El análisis de los datos arrojó 55 variantes privadas con impacto en el nivel proteína, de las cuales sólo una estaba localizada en un probable gen candidato funcional, LTBP3. La variante c.158delG o p.(Gly53Alafs*16) es una deleción de 1 pb que produce un corrimiento en el marco de lectura que produce la pérdida del 95% de la proteína codificada por este gen. LTBP3 codifica la proteína de unión al factor de crecimiento β latente, que es un conocido regulador clave del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y está implicado en la morfogénesis y remodelación ósea. Los genotipos de la variante LTBP3:c.158delG cosegregaron perfectamente con el fenotipo en la familia investigada. Los datos experimentales disponibles, junto con los conocimientos actuales sobre las variantes de LTBP3 y su impacto funcional en pacientes humanos y ratones, sugieren a LTBP3:c.158delG como la variante candidata causante de las malformaciones esqueléticas observadas en los gatos británicos de pelo corto. Hasta donde se sabe, este estudio representa el primer informe de displasia esquelética compleja relacionada con LTBP3 en animales domésticos.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el fenotipo clínico y radiológico e investigar un posible defecto genético subyacente.

<u>Metodología</u>

> Declaración ética

Todos los gatos de este estudio eran de propiedad privada y fueron examinados con el consentimiento informado de sus propietarios. El "*Cantonal Committee for Animal Experiments*" aprobó la toma de muestras de sangre (Cantón de Berna; permiso 71/19).

> Muestras

Se investigaron dos gatos de la raza británico de pelo corto afectados por malformaciones esqueléticas complejas. Los gatos afectados, un macho y una hembra, eran compañeros de camada. Además, se obtuvieron muestras de sangre de ambos padres, de seis gatos de la misma raza no relacionados y de 90 gatos de otras razas diversas.

Exámenes clínicos

Se realizó un examen clínico y neurológico general a los dos gatos afectados y a sus padres. Se obtuvieron radiografías de tórax y abdomen de ambos gatos en proyecciones latero-lateral y ventro-dorsal. En el gato macho eutanasiado se realizó una TC (Philips Brilliance CT, Philips Medical Systems, Cleveland, OH, USA) y una resonancia magnética (RM, Phillips Achieva 3 Tesla RM Scanner, Phillips Medical Systems). Se obtuvieron imágenes de CT sagital y transversal e imágenes ponderadas en T1 y T2 (RMN). Se tomó líquido cefalorraquídeo (LCR) *post mortem* mediante punción suboccipital y se analizó.

> Necropsia y examen histopatológico

Se realizó una necropsia completa del gato macho siguiendo el protocolo estándar. Se tomaron muestras de tejido de todos los órganos y se fijaron en formol neutro al 10% durante 24 horas. Los tejidos fijados con formol se recortaron y se incrustaron en parafina, antes de realizar la histología rutinaria, la tinción con *Luxol-Fast-Blue* y la inmunohistoquímica en secciones de tejido de 2-3 µm de grosor.

Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, las secciones de tejido se desparafinaron y rehidrataron por inmersión en Roticlear (Carl Roth, A538.1, Karlsruhe, Alemania), seguido de isopropanol y etanol al 96% durante 2 minutos cada uno. La peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de etanol al 85% con 0.5% de H_2O_2 durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de la recuperación del antígeno por ebullición durante 20 minutos en tampón citrato 10 mM (pH 6) en el microondas. Los enlaces inespecíficos se bloquearon con suero de cabra (dilución 1:5) durante 20 minutos. Los anticuerpos primarios (proteína precursora de Alzheimer A4, a.a. 66-81 de APP (N-terminal), clon 22C11, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania; MAB348; dilución 1:2000; mAb de ratón marcador de neurofilamentos anti-pan-neuronal SMI-311, Merck Millipore; NE1017, dilución 1:1000) se incubaron a 4 °C durante la noche. El anticuerpo secundario (IgG antiratón de cabra biotinilado, Vector BA9200; dilución 1:200) se incubó durante 1,5 horas, y las señales positivas se visualizaron utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Kit, Vectastain, PK6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) y 0,1 g de hidrato de 3,3'diaminobenzidina-tetrahidrocloruro (DAB) en 200 mL de PBS con 0,03% de H₂O₂. Los tejidos se deshidrataron en alcohol y se montaron con Roti-Histokit II (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania, T160.1).

Extracción de ADN

Se realizó el mismo procedimiento descripto en la sección 1 de Resultados y Discusión.

Secuenciación del genoma completo de un gato afectado

Se preparó una biblioteca de ADN *Illumina TruSeq* libre de PCR con un tamaño de inserción de aproximadamente 400 pb de un gato afectado. Se colectaron 296 millones 2x150 pb de tipo apareado (*paired-end*) en un instrumento *NovaSeq 6000* (32.3× de cobertura). Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia del gato Felis_catus_9.0 según Jagannathan y col. (2019). Los datos de la secuencia se depositaron bajo el número de acceso del estudio PRJEB7401 y de la muestra SAMEA8609185 en el Archivo Europeo de Nucleótidos (https://www.ebi.ac.uk).

Llamado y filtrado de variantes

La identificación de variantes y la predicción de los efectos funcionales de dichas variantes fueron realizadas según se describe en la sección 1 de Resultados y discusión, con la diferencia que en este estudio se utilizó la versión 104 de la anotación del NCBI para el genoma de referencia

Felis_catus_9.0. Para el filtrado de variantes se utilizaron 62 genomas de controles (Tabla S1*). El enfoque de filtrado estricto se realizó según se describe en la sección 1 de Resultados y discusión. El resultado del filtrado de variantes se muestra en la Tabla S2*. Las variantes privadas en el gato afectado se priorizaron según se describe en la sección homóloga del estudio 1.

> Análisis de genes

Se utilizó el genoma de referencia del gato Felis_catus_9.0 y la versión 104 de la anotación del NCBI. La numeración del gen *LTBP3* felino corresponde a los números de acceso NCBI RefSeq XM_023240055.1 (ARNm) y XP_023095823.1 (proteína).

> Genotipado dirigido y secuenciación por el método de Sanger

La variante LTBP3:c.158delG se genotipó mediante secuenciación Sanger directa de los amplicones de la PCR. Se amplificó un producto de PCR de 557 pb a partir de ADN genómico utilizando AmpliTagGold360Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) junto con los primers 5'-CGCTTCCTGTTCCTCC-3' (primer F) y 5'-AGACCCTACCACCAGGTA-3' (primer R). La PCR y la reacción de secuenciación se realizó según se describe en la sección 1 de resultados y discusión. La variante CAPN1:c.1295G>A se genotipó con la misma metodología los siguientes primers para la amplificación por PCR: 5'-V CCTCCTAGCCACCTTCTG-3' (primer F) y 5'- GTTCGGTGATCGTGAT-3' (primer R).

Los genotipos de las variantes de *CAPN1* y *LTBP3* también se extrajeron del archivo gvcf del 99 *Lives Consortium* (versión con 340 gatos) según (Buckley y col., 2020).

Resultados

> Descripción del fenotipo

Se investigaron dos compañeros de camada de la raza felina británico de pelo corto, un macho y una hembra, con paraparesia deteriorada, y sus padres no afectados. La camada estaba formada por dos gatos afectados y tres no afectados. El criador observó los primeros signos de paraparesia en las extremidades traseras en los gatitos afectados a las 8 semanas de edad. A las 10 semanas de edad, un examen clínico y neurológico demostró lordosis y escoliosis, mielopatía T3-L3 y reducción de la motilidad del intestino. Ambos gatitos mostraban paraparesia ambulatoria (Vídeo S1*). Los análisis de hematología y de líquido cefalorraquídeo fueron inconspicuos. La radiografía demostró graves deformaciones de la columna vertebral y una marcada coprostasis (Figura 10 y Figura S1 *). Debido a la gravedad de los signos clínicos, ambos gatos fueron eutanasiados.



Figura 10. Fenotipo clínico. (A) Fotografía de la gata afectada. (B) Radiografía en proyección latero-lateral de la gata. (C) Radiografía en proyección ventro-dorsal de la gata. Obsérvese la lordosis, la malformación de la columna vertebral en la región torácica y el agrandamiento del abdomen debido a la coprostasis.

El examen *post mortem* del gato afectado mediante CT y RM confirmó la deformación de múltiples cuerpos vertebrales torácicos. De T11 a L3, había una estenosis moderada a marcada del canal vertebral (estrechamiento lateral), así como una compresión secundaria del tejido de la médula espinal, que podría haber provocado la mielopatía T3-L3. Las imágenes de resonancia magnética también revelaron una dilatación ascendente y descendente del canal central de la médula espinal (hidromielia) y una hernia cerebelosa (Figura 11).



Figura 11. Imágenes de TC/RM del gato afectado. (A) TC de la región torácica en vista dorsal. (B) RM sagital de la columna vertebral. (C) TC transversal del cuerpo vertebral a nivel de Th13. (D) Imagen de TC transversal del cuerpo vertebral a nivel de L5. (E) RM sagital del cerebro con hernia cerebelosa (flecha blanca).

En la necropsia se corroboraron las múltiples malformaciones esqueléticas con piernas acortadas, desviaciones de la columna vertebral y aplanamiento del occipucio con estrechamiento de la fosa craneal caudal. Partes del cerebelo caudal y del vermis estaban irreversiblemente dislocados en el foramen magnum con una prominente deformación indentada (Figura 12).



Figura 12. Gato afectado, cerebro dorso-caudal y cerebelo. El cerebelo muestra compresión dorsal (flechas) y herniación del vermis cerebeloso.

La columna vertebral torácica mostraba una leve curvatura dorsal (cifosis) con una siguiente deformación ventral moderada (lordosis) y una desviación lateral menor (escoliosis) acompañada de una estenosis focal del canal espinal en T11-12. El hueso laminar cortical ventral de los cuerpos vertebrales mostró un aumento de la densidad y un engrosamiento de hasta 1 mm y el hueso primario del cuerpo vertebral y del fémur estaba dispuesto de forma irregular (Figuras 13 y 14).



Figura 13. Gato afectado, corte longitudinal de la columna vertebral con las costillas. (A) Cifosis (flecha negra) y lordosis (flecha blanca) de la columna vertebral torácica. (B) Ampliación de Th9 con cuerpo vertebral en forma de reloj de arena. (C) Tinción HE correspondiente de Th9 con representación de la estructura ósea.



Figura 14. Corte longitudinal de la columna vertebral torácica del gato afectado (A) y un gato no afectado (B) de la misma edad. Cabeza del fémur del gato afectado (C) y control (D). (A) Gato afectado con cuerpos vertebrales en forma de reloj de arena. Las crestas marginales con placas de crecimiento y discos intervertebrales muestran una prominente expansión dorsal y ventral. El hueso laminar cortical ventral muestra un aumento de la densidad y un engrosamiento de hasta 1 mm (*). El hueso entretejido del cuerpo vertebral muestra una disposición irregular. (B) Columna vertebral torácica de un gato europeo de pelo corto de la misma edad con cuerpos vertebrales normales. El hueso laminar cortical es delgado con formación ósea incompleta en la sección y cartílago conservado. Las trabéculas del hueso entretejido muestran una orientación longitudinal general con puentes cruzados ocasionales. Aumento 1,03x, HE. (C) La cabeza femoral del gato afectado muestra una forma irregular del hueso epifisario con ondulación del cartílago de la placa epifisaria. El hueso trabecular de la metáfisis muestra una osificación regular. Sin embargo, en comparación con la arquitectura ósea del gato de control, las trabéculas parecen estar dirigidas de forma más bien aleatoria con una densidad equitativa en toda la metáfisis. (D) El fémur del gato control muestra una arquitectura regular de la cabeza femoral con un crecimiento direccional y una mayor densidad de hueso trabecular en las proximidades del hueso cortical (remodelación). Aumento 0,59x, HE.

A excepción de la compresión del cerebelo caudal, el examen histopatológico del cerebro no presentó ninguna anomalía. La compresión de la médula espinal torácica estaba asociada a un daño de la mielina acentuado en los funículos dorso-laterales, pero también se observaba en los aspectos ventrales con dilatación de las vainas de mielina, hinchazón axonal (formación de

esferoides) y degeneración (Figura 15). La coprostasis fue causada por constricciones anulares del colon y del recto con distensión de los aspectos anteriores (Figura 16).



Figura 15. Gato afectado, médula espinal torácica, funículo dorso-lateral. (A) Desprendimiento de mielina (#) con dilatación de las vainas de mielina e hinchazón axonal "esferoides" (flechas). Aumento 20x, barra 50 μm, HE. (B) Acumulación de proteína precursora de beta-amiloide (beta APP) en el axoplasma (flechas). Aumento 20x, barra 50 μm, IHC, beta-APP.



Figura 16. Gato macho afectado, colon y recto. (A) Dilatación del colon con constricciones anulares (flechas blancas) y contracción distal del recto. (B) Colon y recto abiertos con aumento del grosor de la pared intestinal y arrugamiento de la mucosa en las zonas constreñidas (flechas blancas).

Las zonas constreñidas del intestino mostraban una marcada hipertrofia de la capa muscular (Figura 17) con pérdida de neuronas en el plexo submucoso y mientérico (hipoganglionosis). El engrosamiento de la pared intestinal se acompañaba de la proliferación de tejido conectivo fibroso vascularizado (tejido de granulación) en la submucosa, entre las capas musculares, así como en la subserosa. A pesar de la pérdida de neuronas, había una proliferación excesiva de fibras nerviosas entrelazadas en el tejido de granulación y que atravesaban las capas musculares (Figura 18).



Figura 17. Gato afectado, colon. (A) Zona dilatada del colon con grosor normal de las capas musculares intestinales (doble flecha: ~980 µm) y mucosa normal (~500 µm). (B) Zona constreñida del colon con marcada hipertrofia y engrosamiento de las capas musculares (doble flecha: ~3290 µm) e inflamación con formación de tejido de granulación entre las capas musculares (véase también la Figura S8). La mucosa muestra un grosor normal (~525 µm). Aumento 2x, barras 500 µm, HE.



Figura 18. Gato afectado, hipoganglionosis, colon. (A) Una sola neurona en el plexo mientérico. (B) Cuatro neuronas en el plexo submucoso. Aumento 10x, barras 100 µm, IHC, n-NF. El engrosamiento de la pared intestinal se acompañó de la proliferación de tejido conectivo fibroso vascularizado (tejido de granulación) en la submucosa, entre las capas musculares (*) así como subserosa (*). A pesar de la pérdida de neuronas, había una proliferación excesiva de fibras nerviosas entrelazadas en el tejido de granulación (#) y que atravesaban las capas musculares.

Análisis genético

Los dos gatos afectados procedían de una familia muy endogámica. El padre y la madre eran medios hermanos. Las relaciones del pedigrí sugerían un modo de herencia autosómico recesivo monogénico del rasgo (Figura 19).



Figura 19. Pedigrí de la familia de gatos investigada. Los símbolos negros indican los gatos afectados y los símbolos blancos indican los gatos no afectados. Los cuadrados y los círculos representan machos y hembras, respectivamente. Nótese los múltiples bucles de consanguinidad en este pedigrí. Los genotipos de la variante *LTBP3*:c.158del se muestran en los gatos de los que se disponía de muestras.

El genoma del gato macho afectado se secuenció con una cobertura de 32,3× y se llamaron las variantes con respecto al genoma de referencia Felis_catus_9.0. Posteriormente, se buscaron variantes homocigóticas privadas en el genoma del gato afectado que no estaban presentes en los 62 genomas controles. Se detectaron 55 variantes privadas con impacto en el nivel proteína en 28 genes (Tabla 3).

Pasos de filtrado	Variantes
Variantes en todo el genoma	5.759.180
Variantes privadas (ausentes en los 62 genomas controles)	7398
Variantes privadas con impacto en nivel proteína	55

 Tabla 3. Variantes homocigóticas detectadas por la re-secuenciación del genoma completo de un gato afectado.

A continuación, se priorizaron las 55 variantes que cambian las proteínas según los conocimientos funcionales sobre los genes alterados. Dos variantes cercanas en el cromosoma D1 afectaban a genes con potencial relevancia para el fenotipo observado. El gato afectado tenía una variante de tipo mutación sin sentido (*missense*) en el gen *CAPN1*, XP_023095818.1:p.(Arg432His), y una de tipo de corrimiento del marco de lectura (*frameshift*) en el gen *LTBP3* (Figura 20). La variante *LTBP3* se consideró la causa más probable del fenotipo observado (véase la discusión). Esta variante candidata, una deleción de 1 pb en el primer exón del gen *LTBP3*, puede designarse como ChrD1:110,690,432delC (genoma de referencia Felis_catus_9.0). Esta variante *frameshift*, XM_023240055.1:c.158delG, se prevé que trunca el 95% del marco de lectura abierto, XP_023095823.1:p.(Gly53Alafs*16).



Figura 20. Detalles de la variante *LTBP3*:c.158delG, p.(Gly53Alafs*16). Arriba, captura de pantalla del Visor de Genómica Integrativa (IGV) que muestra las alineaciones de lectura corta del gato afectado y de un gato de control en la posición de la deleción, que afecta a la parte codificante del primer exón. Nótese que en la captura de pantalla de IGV, la base 110.690.428 está eliminada, lo que representa la primera posición posible de la deleción. Teniendo en cuenta la regla 3' de la nomenclatura HGVS, la designación correcta de la variante es ChrD1:110,690,432delC (genoma de referencia Felis_catus_9.0). Abajo, representación esquemática de los dominios estructurales de la proteína LTBP3 felina (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?seqinput=XP_023095823.1). La variante p.(Gly53Alafs*16) se localiza al inicio de la proteína y predice la ablación de 1234 aa de los 1302 aa totales de la proteína de tipo salvaje.

Posteriormente, se realizó el genotipado de las variantes *CAPN1* y *LTBP3* en los padres y en los dos gatos afectados mediante secuenciación Sanger. Los dos casos fueron homocigotos para el alelo mutante, mientras que los padres eran portadores heterocigotos. La segregación de los

genotipos fue compatible con un modo de herencia monogénico autosómico recesivo. También se genotiparon las dos variantes en otros 6 gatos de la misma raza y en otros 90 gatos genéticamente diversos. Los alelos mutantes *CAPN1* y *LTBP3* estaban ausentes en todos los gatos de control no emparentados analizados (Tabla 4).

Fonotino	CAPN1:c.1295G>	LTBP3:c.158delG
renoupo	Α	
Casos (<i>n</i> = 2)	A/A	del/del
Padres no afectados ($n = 2$)	G/A	wt/del
Gatos de la misma raza no afectados ($n = 6$)	G/G	wt/wt
Gatos de razas diversas (<i>n</i> = 90)	G/G	wt/wt

Tabla 4. Asociación de los genotipos en las variantes CAPN1 y LTBP3 con la malformación esquelética.

Finalmente se extrajeron los genotipos de estas dos variantes de 340 genomas de gatos del 99 *Lives Consortium*. Un total de 8 gatos de razas diversas de los 340 gatos portaban el alelo mutante *CAPN1* en estado heterocigoto (frecuencia alélica 1,2%), mientras que ninguno de los gatos portaba el alelo mutante *LTBP3*.

Discusión

Este trabajo describe los hallazgos clínicos y patológicos de una nueva forma de displasia esquelética heredada en dos gatos hermanos de la raza británico de pelo corto. La malformación craneal detectada, con indentación del hueso occipital y hernia cerebelosa a través del foramen magnum se asemeja a la "malformación tipo Chiari" de los perros (Rusbridge y Knowler, 2003; Minato y Baroni, 2018; Rusbridge, 2020; Driver y col., 2013). Dado que el examen histopatológico del cerebelo y del tronco cerebral no presentaba ningún signo de siringomielia, es probable que la ataxia en los gatos afectados no fuera causada únicamente por la protrusión del vermis cerebeloso en el foramen magnum. Es más probable que la ataxia y la debilidad de las extremidades traseras que se han descrito sean consecuencia de los procesos degenerativos de la médula espinal torácica y se deban a la compresión de la médula espinal.

La densidad y la orientación del hueso trabecular eran anormales, lo que podría indicar problemas de remodelación fisiológica. No obstante, no está claro si una posible alteración de la

remodelación ósea es totalmente responsable de las deformaciones esqueléticas o si la postura corporal y la marcha anormales de los gatos pueden haber contribuido a la orientación aberrante del hueso trabecular.

El examen histopatológico del colon reveló una hipoganglionosis segmentaria y distal con hipertrofia de la musculatura y de las fibras nerviosas, así como una inflamación crónica con formación de tejido de granulación. Estos hallazgos se asemejan a otro informe de un caso de un gato con hipoganglionosis colónica congénita (Roe y col., 2010) y a los criterios de diagnóstico del megacolon congénito, conocido como "enfermedad de Hirschsprung" (HSCD) en humanos (Szylberg y Marszałek, 2014). La aganglionosis, observada en la HSCD, se ve ocasionalmente junto con malformaciones esqueléticas complejas (Amiel y Lyonnet, 2001) y podría estar causada por una migración y diferenciación alteradas de las células madre neurales de la cresta neural (Jaroy y col.,2011). Sin embargo, en los gatos estudiados, un defecto primario de la cresta neural parece poco probable. Los datos obtenidos sugieren que la displasia esquelética causó daños neuronales secundarios durante el desarrollo pre y postnatal.

El análisis genético reveló dos variantes privadas de cambio de proteína estrechamente vinculadas en el gato afectado, una mutación sin sentido (missense) en el gen CAPN1 y una variante que produce un cambio en el marco de lectura (frameshift) en el gen LTBP3. CAPN1 codifica la proteína calpaína 1, una proteasa ampliamente presente en el SNC. La calpaína 1 está implicada en la plasticidad sináptica, la reestructuración sináptica y la maduración y el mantenimiento de los axones (Chandramohanadas y col., 2009). Las variantes de pérdida de función en CAPN1 provocan paraplejia espástica autosómica recesiva-76 en pacientes humanos (Gan-Or y col., 2016) y ataxia espinocerebelosa en perros de la raza Parson Russell Terriers (Forman y col., 2013). Además, ratones, zebrafish y C. elegans knockout para Capn1 exhiben un fenotipo similar (Gan-Or y col., 2016; Su y col., 2021). Sin embargo, en este estudio no está claro si la variante CAPN1:p.Arg432His en el gato afectado tiene algún impacto en la función de la calpaína 1. Incluso si la función de la calpaína 1 estuviera comprometida, esto no explicaría el fenotipo esquelético, pero podría haber contribuido al fenotipo neurológico. Como el alelo mutante CAPN1 también estaba presente en una frecuencia baja en el repositorio de datos de 99 Lives Consortium, considero que el impacto funcional importante de la variante CAPN1 sería improbable.

Por otro lado, LTBP3:c.158delG representa una excelente candidata como variante causal del fenotipo esquelético observado. Esta variante es una deleción de 1 par de bases en el primer exón del gen, conduce a un codón de terminación prematuro y se predice que trunca el 95% del

marco de lectura abierto. Por lo que se considera que los gatos mutantes homocigotos no podrían expresar una proteína *LTBP3* funcional. *LTBP3* codifica la proteína de unión al factor de crecimiento transformante β latente 3, que se expresa de forma ubicua. Hay 4 isoformas de LTBPs y tienen un papel clave en la señalización del factor de crecimiento transformante beta 1 y la homeostasis ósea (Robertson y col., 2015; Rifkin y col., 2018).

TGF- β , con sus tres isoformas codificadas por los genes TGFB1, TGFB2 y TGFB3, es una importante citoquina que interviene en el crecimiento y la remodelación de los huesos y muchos otros tejidos (Koli y col., 2001). El TGF- β se sintetiza como una molécula precursora inactiva que se escinde proteolíticamente en el retículo endoplásmico para producir un homodímero de TGFβ en complejo con el péptido asociado a la latencia (LAP). Este complejo se denomina complejo latente pequeño (SLC). LTBP3 y otros miembros de la familia LTBP se unen al SLC, formando enlaces disulfuro covalentes con el LAP (Chen y col., 2001; Tzavlaki y Moustakas, 2020) y dan lugar al gran complejo latente (LLC). El LLC se procesa posteriormente en el aparato de Golgi, se exporta de la célula y finalmente se deposita en la matriz extracelular (Figura 21) (Zilberberg y col., 2012; Tzavlaki y Moustakas, 2020). La activación de la señalización de TGF-β requiere la degradación del LAP o la liberación de homodímeros de TGF-ß activos desde el LLC mediante proteasas de la matriz extracelular (Rifkin y col., 2018; Koli y col., 2001; Chen y col., 2001; Tzavlaki y Moustakas, 2020). Luego, TGF-β activo se asocia a los receptores de señalización tipo I y tipo II formando un complejo heteromérico (Figura 22). Finalmente, este complejo activa la cascada de señalización SMADs por fosforilación. El complejo SMADs se traslada al núcleo donde se asocia con factores de transcripción de alta afinidad que se unen al ADN (Figura 23) (Tzavlaki y Moustakas, 2020).

La homeostasis ósea se mantiene mediante ciclos continuos de resorción ósea por parte de los osteoclastos y de formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos y los osteocitos. La señalización mediada por TGF-β regula este proceso. TGF-β puede actuar como quimio atrayente y reclutar tanto a los pre-osteoblastos como a los pre-osteoclastos a las zonas de remodelación ósea y también promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de los osteoclastos (Tzavlaki y Moustakas, 2020). En dosis bajas, TGF-β aumenta la secreción de RANKL (receptor activador del ligando NF-kB) y suprime la expresión del inhibidor OPG (osteoprotegerina), promoviendo así la osteoclastogénesis mediante la activación de la señalización RANK en los pre-osteoclastos. A dosis elevadas, suprime a RANKL y aumenta la expresión de OPG, inhibiendo así la osteoclastogénesis. Este efecto bifásico limita la degradación ósea excesiva en presencia de altos niveles de TGF-β activo derivados de la

conversión del TGF- β latente por las proteasas y el ácido secretado por los osteoclastos durante la degradación ósea) (Tzavlaki y Moustakas, 2020). La deficiencia de LTBP3 reduce la activación del TGF- β y, por tanto, puede disminuir la proliferación celular asociada y la diferenciación osteogénica (Koli y col., 2008).



Figura 21. Biosíntesis y deposición extracelular de TGF-β. Tomado de Tzavlaki y Moustakas (2020). doi:10.3390/biom10030487.



Figura 22. Activación del TGF-β latente. Tomado de Tzavlaki y Moustakas (2020). doi:10.3390/biom10030487.



Figura 23. Vía de señalización celular TGF-β/SMAD. Tomado de Tzavlaki y Moustakas (2020). doi:10.3390/biom10030487.

La desregulación de la vía de señalización de TGF-β está asociada a numerosas enfermedades humanas con una destacada afectación del sistema esquelético (MacFarlane y col., 2017). Alrededor de 17 variantes patogénicas en el gen *LTBP3* han sido reportadas en humanos y asociadas con varios desórdenes incluyendo, displasia acromélica (ACMICD; OMIM #102370), displasia geleofísica 3 (GPHYSD3; OMIM #617809), y anomalías dentales y estatura corta (DASS; OMIM #601216) (Figura 24). El DASS se hereda como un rasgo autosómico recesivo y las características clínicas pueden incluir oligodoncia, amelogénesis imperfecta, baja estatura, braquiolmia y escoliosis, platispondilia, epífisis en forma de cono, infratubulación de los huesos largos y, en algunos casos, también defectos cardíacos (Noor y col., 2009; Huckert y col., 2015; Dugan y col., 2015; Kaur y col., 2015; Kaur y col., 2020; Stanley y col., 2021). El fenotipo autosómico dominante de GPHYSD3 y ACMICD se solapa con el de DASS e incluye estatura baja, braquidactilia, movimientos restringidos en las articulaciones del codo y la muñeca, y rasgos faciales dismórficos (McInerney-Leo y col., 2016; Marzin y col., 2021).



Figura 24. Representación esquemática del gen *LTBP3* y de los dominios estructurales de la proteína LTBP3 en humanos. Las mutaciones identificadas están indicadas con triángulo (DASS), círculo (ACMICD) y cuadrado (GPHYSD3). Tomado de Intarak y col (2019).

Adicionalmente, el fenotipo de los ratones $Ltbp3^{-/-}$ homocigotos nulos se ha caracterizado por huesos endocondrales más cortos y un tamaño total menor en comparación con sus compañeros de camada de tipo salvaje. Los ratones $Ltbp3^{-/-}$ también desarrollaron malformaciones craneofaciales y curvatura de las vértebras torácicas/cervicales (escoliosis). Además, el examen histológico de los esqueletos de los ratones $Ltbp3^{-/-}$ reveló un aumento de la masa ósea y la persistencia de restos de cartílago en el hueso trabecular, lo que indica un defecto en la resorción ósea. Se ha sugerido que la falta de Ltbp3 provoca una disminución de los niveles de TGF- β en el hueso y el cartílago, lo que altera la función de los osteoclastos y el recambio óseo en los ratones mutantes (Dabovic y col., 2002; Dabovic y col., 2002; Dabovic y col., 2005).

La variante de *LTBP3*, c.158delG, p.(Gly53Alafs*16), en los gatos británicos de pelo corto de este estudio conduce a un codón de terminación prematuro muy temprano. Consideramos, por tanto, poco probable que se exprese alguna proteína LTBP3 funcional en los gatos mutantes homocigotos. No se pudo realizar una confirmación experimental a nivel de transcripción o proteína, ya que no se disponía de muestras de tejido adecuadas. Sin embargo, la co-segregación genotipo-fenotipo en la familia junto con el conocimiento existente sobre el efecto funcional de las variantes de *LTBP3* en humanos y ratones con fenotipos de displasia esquelética

apoyan a *LTBP3*:c.158delG como variante candidata causante del fenotipo esquelético en los gatos afectados.

En resumen, se ha caracterizado una nueva forma de displasia esquelética con herencia autosómica recesiva en gatos británicos de pelo corto y se ha identificado una variante que produce un corrimiento en el marco de lectura (*frameshift*) en el gen *LTBP3*, c.158delG, como candidata causante de la displasia esquelética compleja. Estos datos permiten realizar pruebas genéticas para evitar la cría involuntaria de más gatos afectados y proporcionan un modelo potencial de animales grandes espontáneos para la displasia esquelética relacionada con *LTBP3*.

Materiales suplementarios

En <u>https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12121923/s1</u> están disponibles: Tabla S1: Números de acceso de 63 genomas felinos. Tabla S2: Variantes privadas en el genoma del gato afectado secuenciado. Vídeo S1: Fenotipo clínico de la gata afectada. (*) Este material no sigue la numeración consecutiva de la tesis, con el objetivo que el lector pueda encontrarlas con su numeración original en el sitio online de la revista donde fue publicado.

3. Biomarcadores en sangre periférica de la osteoartritis en perros de la raza ovejero alemán: un enfoque transcriptómico

Resumen: Las formas caninas de OA son muy similares a las de los humanos y representan un problema de bienestar en la población canina mundial. En este estudio, se investigó el perfil transcriptómico de sangre periférica en perros de la raza ovejero alemán para identificar biomarcadores de OA. El experimento de *bulk* RNA-seq se realizó en una cohorte de 12 perros adultos, 5 afectados y 7 no afectados. Las radiografías de los perros afectados revelaron OA avanzada en las articulaciones de la cadera, el codo y la rodilla. Se identificaron un total de 23.284 genes expresados, de los cuales 14.977 presentaron más de 10 lecturas en todas las muestras. De acuerdo a este filtro, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) el cual no separó los grupos casos y controles. Adicionalmente, el análisis de expresión mostró 3 genes expresados diferencialmente (DEGs), *THBS4* y *LOC106559672* sobre expresados y *LOC106559235* sub expresado en comparación con los perros controles P ajustada (FDR) (<

0,05). El gen *THBS4* codifica a la proteína de la matriz extracelular trombospondina 4, implicada en la regulación de la remodelación de tejidos. Estudios previos han identificado un incremento significativo de la expresión de trombospondina-4 (TSP-4) en cartílago articular de pacientes con OA severa, en comparación con el cartílago de donantes sanos. Basado en el previo conocimiento funcional, y en la evidencia de la sobre expresión de *THBS4* en ovejeros alemanes aportada en este estudio, sugerimos a *THBS4* como gen candidato a biomarcador para la OA canina. Sin embargo, son necesarios futuros estudios a niveles de expresión génica (RT-PCR) y proteína, en un mayor número de individuos para la validación de *THBS4* como biomarcador de diagnóstico.

El objetivo de este estudio fue identificar el perfil transcriptómico de la sangre periférica en ovejeros alemanes con OA, y nuevos biomarcadores putativos de esta enfermedad.

<u>Metodología</u>

> Declaración ética

Los perros de este estudio eran de propiedad privada y fueron examinados con la aprobación de los propietarios.La "Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, aprobó la toma de muestras de sangre y las radiografías (008-00-17). Todos los perros eran pacientes del hospital de pequeños animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata.

> Cohorte de animales y diagnóstico por imagen

En este estudio se incluyeron 12 perros de la raza ovejero alemán. Se utilizó un examen radiológico (GBA-Mobilex 150 HF, Argentina y Fujifilm FCR PRIMA II Image Reader / FCR PRIMA Console, Japón) para evaluar los signos de OA en los perros. Se tomaron radiografías mediolaterales estándar de las articulaciones del codo y la rodilla. Además, se tomó una vista ventro-dorsal extendida de la pelvis para evaluar las articulaciones coxofemorales. Se realizaron estudios radiográficos de múltiples articulaciones para registrar el estado general de cada perro (Carrig, 1997). Se registraron los signos inespecíficos de la OA, como la formación de entesofitos y osteofitos, la alteración patológica del hueso subcondral (formación de quistes, esclerosis ósea y remodelación) y los espacios articulares de grosor variable (Allan y Davies, 2018). Según el diagnóstico radiológico, los animales se agruparon en casos (N = 5) y controles (N = 7). El umbral

de edad se estableció por encima de los tres años en los perros controles. Se registraron datos de peso corporal, edad, sexo y estado de esterilización de cada perro mediante un examen clínico.

> Extracción de ARN y construcción de librerías

El ARN se aisló de sangre conservada en RNAlater con el kit RiboPure™-Blood (Ambion, Life Technologies, CA, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante. El control de calidad del ARN se evaluó con un Bioanalizador (DEDAE00884, Agilent, Santa Clara, CA, E). Se utilizó 1 ug de cada muestra de ARN de alta calidad (número de integridad del ARN (RIN) > 8) para la preparación de librerías de ADNc de tipo non-stranded y paired-end (NEBNext Ultra II RNA Library Prep, Illumina). Las librerías de ADNc total multiplexadas se secuenciaron en un carril utilizando el instrumento NovaSeg 6000 2x150 bp. Los archivos de salida de NovaSeg Xp se convirtieron en formato FASTQ y se desmultiplexaron. Las lecturas de secuencias se recortaron (trimming) utilizando el programa fastp v0.12.5 (Chen y col., 2018). Las secuencias filtradas se combinaron en un archivo FASTQ utilizando el programa FastQC v0.11.7 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastgc/). Las secuencias fastg, los datos procesados y los metadatos están disponibles en el repositorio Gene Expression Omnibus del NCBI con el número de acceso GSE191273.

> Mapeo contra el genoma de referencia

Todas las lecturas que pasaron el control de calidad fueron mapeadas al genoma de referencia canino CanFam3.1 utilizando la versión 105 de la anotación del NCBI, con el alineador HISAT2 v2.1.0 (Kim y col., 2015). Las lecturas se alinearon utilizando los parámetros por defecto. Los archivos sam de salida de HISAT2 fueron transformados en archivos binarios bam utilizando *SAMtools* v1.8 (Li y col., 2009). La abundancia de lecturas se calculó utilizando el algoritmo *featureCounts* (Liao y col., 2014) como parte del paquete *Subread* v2.0.1.

> Expresión diferencial

Se utilizó el paquete DESeq2 (Love y Huber, 2014) para leer la matriz de conteo obtenida por el *featureCounts*. Los transcriptos con menos de 10 lecturas en todas las muestras fueron excluidos de los análisis posteriores. Los datos de reconteo se sometieron a una transformación logarítmica regularizada y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para visualizar la agrupación de los grupos casos y controles. Posteriormente se utilizó el programa *DESeq2* v1.26.0 para evaluar la expresión diferencial entre grupos. *DESeq2* aplica un modelo lineal

generalizado (GLM) a los datos de recuento asumiendo una distribución binomial negativa. Para cada gen, los recuentos de lecturas se ajustaron a un GLM con modelo de diseño (~condición) donde la condición era el factor de interés con dos estados: OA afectados y controles. Se consideró que los transcriptos tenían una expresión diferencial si P adjustada era menor a 0,05. *DESeq2* calcula el valor de P adjustada mediante el método de Benjamini-Hochberg false Discovery rate (FDR) para ajustar las pruebas de hipótesis múltiples.

Resultados

Descripción fenotípica

En este estudio se utilizó una cohorte de 12 perros ovejero alemán, incluyendo 5 perros con OA (1 hembra intacta, 2 hembras castradas y 2 machos intactos; perros entre 1 y 8 años de edad) y 7 perros de control sanos (1 hembra intacta, 1 hembra castrada, 3 machos intactos y 2 machos castrados; perros entre 3 y 6 años de edad). Una hembra castrada con OA tenía sobrepeso; el resto de los perros tenía un peso corporal normal. El examen radiográfico demostró la afectación de la articulación de la cadera en 3 perros, la afectación de la articulación del codo y la rodilla en un perro y la afectación de la cadera y el codo en otro. Los signos radiológicos de los perros con la cadera afectada incluían incongruencias articulares como luxación y subluxación coxofemoral, formación de osteofitos pericondrales, remodelación de la cabeza y el cuello del fémur, esclerosis ósea subcondral, aplanamiento del acetábulo y formación de osteofitos en el margen acetabular craneal. Los perros con afectación del codo mostraban formación de osteofitos y entesofitos pericondrales, esclerosis y remodelación del hueso subcondral, aumento de la opacidad y borrosidad sobre la apófisis coronoides medial y adelgazamiento del espacio articular (Figura 25B). El perro con OA de rodilla mostraba formación de entesófitos en el margen ventral de la rótula. Todos estos hallazgos correspondían a signos graves de OA. En las historias clínicas no se encontraron registros de lesiones articulares anteriores al diagnóstico de OA. Sin embargo, no podemos excluir formalmente la existencia previa de una displasia de cadera de inicio temprano. Por el contrario, las articulaciones sanas mostraban superficies óseas subcondrales y márgenes articulares bien definidos. Las zonas periarticulares, donde se unen los ligamentos y los tendones, presentaban un contorno cortical liso. El espacio articular aparecía como una zona radiolúcida entre las superficies de las placas óseas subcondrales adyacentes (Figura 25A). Los datos del fenotipo y los hallazgos radiológicos de todos los perros se indican en la Tabla 5 y el archivo S1(*).

Tabla 5. Datos fenotípicos de los ovejeros alemanes utilizados en este estudio. La edad y el peso corporal se muestran en años y kilogramos (kg), respectivamente. Se indican el sexo y el estado de esterilización. Se muestra los hallazgos radiológicos de los 5 casos, todos presentaban un estado progresivo de OA.

Muestra	Edad	Peso corporal	Sexo	Articulación afectada por OA
1	3	35	Macho entero	-
2	3	37	Macho entero	-
3	3	24	Macho entero	-
4	8	37	Macho castrado	-
5	3	36	Macho castrado	-
6	6	31	Hembra castrada	-
7	4	30	Hembra castrada	-
8	8	45	Macho entero	Ambas articulaciones del codo mostraban formación de osteofitos y entesofitos pericondrales, esclerosis ósea subcondral, remodelación del hueso subcondral, adelgazamiento del espacio articular y aumento de la opacidad y borrosidad sobre la apófisis coronoides medial. La articulación de la rodilla derecha presentaba formación de entesofitos en los márgenes de la rótula.
9	1	36	Macho entero	La articulación coxofemoral derecha presentaba luxación y aplanamiento del acetábulo. La articulación coxofemoral izquierda presentaba subluxación, remodelación del cuello femoral, esclerosis ósea subcondral y aplanamiento del acetábulo. Se observó la formación de osteofitos en el margen acetabular craneal.
10	8	24	Hembra castrada	Subluxación coxofemoral bilateral. Remodelación de la cabeza y el cuello del fémur, formación de osteofitos pericondrales, esclerosis ósea

				subcondral y formación de osteofitos en
				el margen acetabular craneal.
11	7	40	Hembra castrada	Ambas articulaciones del codo
				presentaban un aumento de la
				opacidad y borrosidad sobre la apófisis
				coronoides medial. Articulaciones de la
				cadera con remodelación de la cabeza
				y el cuello del fémur en las
				articulaciones de la cadera, formación
				de osteofitos pericondrales, esclerosis
				del hueso subcondral y aplanamiento
				del acetábulo y formación de osteofitos
				en el margen acetabular craneal.
				Subluxación coxofemoral izquierda.
12	8	34	Hembra entera	La articulación izquierda presentaba
				remodelación de la cabeza y el cuello
				del fémur, formación de osteofitos
				pericondrales y esclerosis ósea
				subcondral.





Figura 25. Radiografías de la articulación del codo de dos perros de la raza ovejero alemán. (A) Proyección mediolateral de la articulación normal del codo derecho de un macho de 3 años. (B) Proyección mediolateral de la articulación del codo derecho de un macho de 8 años con una marcada OA. Se observa

la formación de hueso nuevo periarticular en la apófisis coronoides y en el margen caudal de la tróclea humeral. Nótese el adelgazamiento del espacio articular y la remodelación de las superficies articulares.

> Secuenciación y genes expresados diferencialmente

Se registraron entre 20,3 y 36,3 millones de lecturas únicas y duplicadas por muestra. Se identificaron un total de 23.284 genes expresados, de los cuales 14.977 presentaron 10 lecturas en todas las muestras. La matriz de conteo cruda de salida del *featureCounts* se encuentra disponible en el archivo S2*.

La Figura 26 muestra la agrupación de las muestras en función de sus perfiles de expresión. El PCA no separó las muestras controles de las afectadas. Sin embargo, se aplicó el modelo GLM, asumiendo que un pequeño conjunto de genes podría expresarse diferencialmente entre casos y controles.





Utilizando el enfoque del modelo GLM se identificaron 3 DEGs, P adjustada (FDR) (< 0,05), *THBS4* y *LOC106559672* sobre regulados y *LOC106559235* sub regulado en perros con OA (Figura 27). Entre ellos, *LOC106559672* fue eliminado por el NCBI debido a que fue no detectado en el último ensamblaje del genoma de referencia UU_Cfam_GSD_1.0 y, LOC106559235 representa un RNA no codificante sin ortólogos determinados aún. El gen *THBS4*, que codifica la proteína de la matriz extracelular trombospondina 4, está implicado en el mecanismo de reparación del cartílago durante el proceso de patogénesis de la OA. Según la evidencia
funcional consideramos a *THBS4* como gen candidato a biomarcador (véase discusión). La Tabla S1* muestra el resultado del análisis de expresión diferencial con los 14.977 genes de salida del *DESeq2*.



Figura 27. Gráfico Volcano de los genes expresados diferencialmente (DEGs) entre casos y controles. El gráfico visualiza las diferencias entre las transcripciones en ambos grupos ordenadas por log2FoldChange y -log10 del valor P. Los puntos rojos representan los 3 DEGs sobre y sub regulados P adjustada (FDR) < 0,05.

Discusión

En este estudio, se utilizaron datos de RNA-seq obtenidos de sangre periférica de perros de la raza ovejero alemán afectados por OA y de controles sanos, para detectar el perfil de expresión génica e identificar posibles biomarcadores de OA. Se utilizaron muestras de sangre teniendo en cuenta que las células sanguíneas periféricas circulantes son un tejido sustituto que contiene perfiles transcripcionales que se correlacionan con la patogénesis de la OA (Rockett y Burczynski, 2006), evitando así la toma de muestras más invasivas como el líquido sinovial o la biopsia de cartílago, y siguiendo las directrices de "*The National Centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research*". Los estudios de expresión génica en sangre han indicado redes de transcripciones coexpresadas con diferentes niveles de abundancia entre la OA y los controles sanos en humanos, caballos y ratas (Kamm y col., 2013; Ramos y col., 2014; Korostyński y col., 2017; Shi y col., 2019). Esta evidencia apoya que los perfiles de

expresión sanguínea pueden ser útiles para la evaluación de marcadores moleculares que ayuden en el diagnóstico de la OA en perros.

El PCA mostró que los casos y controles no se separaron según la condición establecida. Esto puede deberse a que sólo un pequeño conjunto de datos entre los 14.977 transcriptos expresados con más de 10 lecturas en todas las muestras se expresa de forma diferencial entre los grupos. Para identificar los DEGs se utilizó un valor de P adjustado y FDR < 0,05 siendo el mínimo recomendado para análisis de RNA-seq (Koch y col., 2018). Se utilizaron estos dos filtros estrictos para minimizar el efecto de heterogeniedad entre los grupos y el pequeño número de muestras. Subsecuentemente, se identificaron solo 3 DEGs en los perros afectados por OA. Entre ellos, el único gen con ortólogos y función descripta en el NCBI fue *THBS4*. En consecuencia, se investigó su posible rol en la patogénesis de la OA de acuerdo con el conocimiento funcional existente.

Se consideró que el gen *THBS4* es un buen candidato a biomarcador de OA. Es un gen conservado que codifica a la TSP-4, un importante regulador de la organización y producción de la matriz extracelular y de la remodelación de los tejidos durante la respuesta a las lesiones (Stenina-Adognravi y Plow, 2017). En el tejido óseo TSP-4 se expresa en la zona de condrocitos hipertróficos del cartílago transitorio durante la osificación endocondral (Andres Sastre y col., 2021; Jeschke y col., 2015). En humanos se ha demostrado la sobre regulación de TSP-4 en cartílago durante la OA severa, sugiriéndose que TSP-4 activa mecanismos para proteger y reparar la matriz extracelular en el cartílago articular (Maly y col., 2019; Maly y col., 2021).

Experimentos realizados con ratones *thbs4*^{-/-} han revelado una clara relación entre este gen y el proceso de patogénesis de la OA. Los estudios histológicos mostraron una reducción significante del volumen y el grosor del cartílago articular en ratones deficientes de *thbs4* en comparación con los animales controles. Además, los análisis por micro CT del hueso subcondral de ratones *thbs4*^{-/-} indicaron un aumento significativo de la degradación de la superficie ósea, y una disminución del grosor y la densidad mineral ósea. Finalmente, en contraste con los ratones *thbs4*^{wt/wt}, la deficiencia de *thbs4* impidió la capacidad de inhibir la degradación del cartílago en el modelo murino osteoartrítico (Maumus y col., 2016; Jeschke y col., 2015).

Por otro lado, en el suero de pacientes con OA se han detectado incremento en los niveles de TSP-4 total, y en anticuerpos IgG contra epitopos específicos. Sin embargo, los valores no han sido significativos en comparación con el suero de donantes controles (Maly y col.,2019; Ruthard y col., 2018; Andres Sastre y col., 2021; Jeschke y col., 2015).

En resumen, *THBS4* se considera un marcador del cartílago e indicador de la OA en estado avanzado, por lo que ha sido sugerido como un candidato atractivo para ser evaluado con fines de ingeniería de tejidos óseos. Sin embargo, su idoneidad como biomarcador circulante de la OA necesita futuros estudios en cohortes mayores de pacientes.

Finalmente, basándonos en los valores significativos de expresión de *THBS4* en nuestro estudio, y en el conocimiento funcional sobre su rol en la OA en pacientes y modelos murinos, consideramos este gen como biomarcador candidato de OA en caninos. Sin embargo, debido a las limitaciones de este estudio, es necesario validar este resultado en una cohorte mayor de perros ovejeros alemanes y otras razas susceptibles a la OA. Así como cuantificar la expresión de genes candidatos mediante RT-PCR.

Material suplementario

Los datos transcriptómicos utilizados en este estudio están disponibles en GEO <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE191273</u>. Los siguientes archivos: Archivo S1. Radiografías de los 12 ovejeros alemanes estudiados; Archivo S2 (featureCounts matriz de conteo) y Tabla S1. Resultados del análisis de expresión diferencial están disponibles en el siguiente link: <u>https://drive.google.com/drive/folders/1PuMo4iR0fK-HPzdE0OHX10DWNkEanpNb?usp=sharing</u>.

CONCLUSIONES

Durante mis estudios de doctorado, he realizado el análisis genómico de tres enfermedades osteoarticulares en animales de compañía. Por un lado, he investigado la base molecular de dos displasias esqueléticas hereditarias y, por el otro, el perfil transcriptómico circulante de la OA. Como resultado, he contribuido a la identificación de las variantes genéticas candidatas a ser las responsables de los fenotipos de displasias esqueléticas y he aportado nueva evidencia sobre la expresión circulante de gen candidato a biomarcador de la OA.

En el caso de las displasias esqueléticas estudiadas, enanismo en dogo argentino y displasia esquelética compleja en británico de pelo corto, se realizaron estudios genéticos basados en la estructura familiar. La hipótesis en ambos casos estaba sustentada en el análisis de pedigrís que evidenciaban una alta endogamia y sugerían una herencia autosómica recesiva de la enfermedad. En el caso del enanismo en dogo argentino, de los 795 genomas controles analizados, 9 correspondían a lobos y ninguno portaba el alelo mutante de *PRKG2*, de este modo se podría excluir el efecto de un alelo ancestral fijado en la población canina. Sin embargo, ninguno de estos genomas controles correspondían a dogos argentinos, por lo que no se puede descartar la presencia de este alelo en otros criaderos y poblaciones de esta raza. Por otro lado, el alelo mutante de LTBP3 causante de la forma rara de displasia esquelética en británico de pelo corto, no se encontró en los 402 genomas felinos controles analizados ni en los 96 secuenciados por Sanger. Dentro de estos gatos controles estaban incluidos 10 británicos de pelo corto, por lo que en este caso es posible suponer que LTBP3:c.158delG no sería un alelo específico de la raza o al menos no ha tenido suficiente penetrancia en la población racial. Estos resultados sugieren que ambas variantes alélicas se habrían originado y dispersado por el denominado efecto de reproductores populares o sire effect, siendo en consecuencia fijadas en algunos criaderos. Posteriormente, la alta endogamia propició la presencia del estado homocigoto del alelo mutante y consecuentemente del fenotipo en los animales afectados. En este sentido, está ampliamente descripto en perros y gatos con pedigrí, que el alto grado de parentesco general subraya el elevado riesgo de aparición de enfermedades mendelianas recesivas. Por otra parte, la fijación o el enriquecimiento de muchos alelos no caracterizados en varios genes debido al uso excesivo de unos pocos reproductores populares podría explicar la aparición y predisposición general a ciertas enfermedades raras (Lindblad-Toh y col., 2005; Matsumoto y col., 2021).

La suposición de que el alelo responsable de la enfermedad es raro y sólo está presente en los animales afectados, pero no en los controles no relacionados, hace que la secuenciación del genoma, sola o combinada con el mapeo genético, sea un enfoque extremadamente poderoso, incluso con un pequeño número de casos. En esta tesis, las dos familias (canina y felina) investigadas consistían en pocos miembros y no más de dos animales afectados. La estrategia de mapear regiones homocigotas y ligadas mediante matrices de SNPs, junto con la secuenciación del genoma de un caso, permitieron la determinación de intervalos genómicos críticos asociados a una enfermedad mendeliana y la posterior identificación dentro de estas regiones de posibles variantes causales. Adicionalmente, la validación de estas variantes en los parientes y otros animales controles mediante secuenciación Sanger, constituye una combinación muy eficaz de herramientas para detectar enfermedades recesivas monogénicas simples.

Sin embargo, en algunos casos cuando se dispone de un solo animal afectado, sin padres ni parientes cercanos, la probabilidad de detectar y validar el defecto genético subyacente disminuye. Esto es particularmente así, cuando ninguna variante de un solo nucleótido con impacto alto en la proteína codificada es detectada en genes candidatos mediante el protocolo de filtrado y la identificación de variantes. Así también, cuando no se identifican SVs en exones de genes candidatos mediante inspección visual en IGV. En este sentido, durante el desarrollo del doctorado he trabajado con otras enfermedades óseas sin poder dilucidar la causa genética, ejemplos fueron la osteopetrosis en gatos main coon y la hiperostosis del cráneo en labrador retriever. En ambos proyectos, luego de la secuenciación del genoma completo de los casos únicos, se identificaron variantes heterocigotas en genes candidatos para estos fenotipos. Sin embargo, para corroborar la aparición de una mutación de novo dominante, es necesario genotiparla en ambos padres sanos y, por ende, no se pudo proseguir con la investigación. Adicionalmente, he investigado la osificación incompleta del cóndilo humeral y el enanismo en labradores retrievers. Las familias estudiadas estaban incompletas debido a que la muestra de uno de los progenitores no estaba disponible. Luego de secuenciar el genoma completo de un caso y no encontrar variantes candidatas, se realizó el análisis de homocigosidad entre hermanos afectados terminando con más de 60 regiones homocigotas de varios Kbs. Al no disponer del genotipo de uno de los padres, no se pudo realizar análisis de ligamiento en la familia y, por tanto, no fue posible reducir el intervalo de las regiones homocigotas a unos pocos Kbs para ser inspeccionados visualmente en IGV. Finalmente, cuando una variante heterocigota o con bajo impacto en la proteína en un gen candidato es detectado, existe la posibilidad de realizar experimentos de expresión (RT-PCR, Northern blot), a nivel proteico (inmunohistoquímica, hibridación in situ) o edición génica mediante CRISPR/Cas9 para comprobar la correlación fenotipo-genotipo. Sin embargo, se necesitan muestras adicionales de tejidos que a veces son

de difícil o imposible acceso si el animal afectado está vivo y, en el caso de los experimentos funcionales los costos son muy elevados. Por tanto, la relación costo-tiempo-beneficio es fundamental para definir el seguimiento de una investigación.

En el presente trabajo de investigación, los estudios *in silico* de las variantes candidatas identificadas indicaron que estas mutaciones afectaron la transcripción y funcionalidad de la proteína, *splice site* y *frameshift*. Además, estaban perfectamente asociadas con el fenotipo en la población estudiada. Esto es coherente con los trastornos mendelianos que suelen deberse a alelos raros, deletéreos y con alta penetrancia (Di Rienzo, 2006).

En humanos se han reportado displasias esqueléticas causadas por variantes en estos dos genes. Los fenotipos asociados a disfuncionalidad en PRKG2 incluyen la displasia acromesomélica 4 (AMD4) y la displasia espondilometafisaria tipo pagnamenta (SMDP). La AMD4 se caracteriza por baja estatura desproporcionada, platispondilia, braquidactilia, ensanchamiento ilíaco y alteraciones metafisarias de los huesos largos que aumentan progresivamente con la edad. Mientras que la SMDP se identifica por baja estatura y ligera platispondilia sin desproporción entre las extremidades con cambios metafisarios leves. Estos fenotipos coinciden parcialmente con el descripto en el dogo argentino afectado por enanismo. Se han identificado 3 variantes patogénicas de tipo nonsense y frameshift en humanos. En el caso de la displasia compleja en gatos de la raza británico de pelo corto, causada por LTBP3:c.158delG, los fenotipos y variantes causales ortólogos en humanos son más diversos. Se han identificado más de 15 variantes heterogéneas en todo el gen LTBP3 relacionadas con trastornos recesivos y dominantes, caracterizados por numerosos trastornos esqueléticos, dentales y en ocasiones cardíacos. A diferencia del fenotipo felino investigado en esta tesis, los trastornos en humanos causados por defectos en LTBP3 no han mostrado letalidad a edades tempranas.

Debido al pequeño número de pacientes humanos con enfermedades esqueléticas raras, y a las grandes listas de variantes identificadas a partir de la secuenciación del genoma, podría ser difícil identificar la variante patogénica. Por lo tanto, la disponibilidad de modelos animales clínicamente relevantes, reproducibles y representativos es crucial (Gurda y col., 2017). Los trastornos hereditarios que se producen de forma natural en los perros y gatos, suelen ser ortólogos de los que se encuentran en los seres humanos y, en comparación con los modelos de ratón, proporcionan un sistema de animales grandes más relevante que permite el desarrollo de, por ejemplo, estudios de biodistribución precisos debido al mayor tamaño del cerebro y del cuerpo,

o estudios de eficacia y seguridad a largo plazo debido a su mayor duración (Gurda y col., 2017). Asimismo, la asignación de nuevas funciones a los genes asociados a la enfermedad en los estudios en animales de compañía conduce al descubrimiento de nuevos candidatos funcionales para afecciones humanas similares. Por ejemplo, la osteogénesis imperfecta relacionada con el gen *SERPINH1* en perros *dachshund* (Drögemüller y col., 2009) se caracterizó antes de que se descubrieran las primeras variantes de este gen en pacientes humanos (Christiansen y col., 2010), aportando pruebas adicionales a la relación causal. Las variantes en los genes *PRKG2* y *LTBP3*, junto con los fenotipos aquí descritos, pueden ser tomados como modelos para entender la herencia de los trastornos esqueléticos aún no explicados en humanos.

En cuanto a la OA, representa una enfermedad genéticamente compleja. Varios estudios han identificado numerosos loci de riesgo en humanos y perros, aunque el rol del componente ambiental y genético está aún en discusión (Boer y col., 2021; arcOGEN Consortium y col., 2012; Steinberg y col., 2021; Mikkola y col., 2019; Mikkola y col., 2019). El objetivo de esta tesis no se centró en encontrar la causa genética de la OA, sino en identificar nuevos marcadores que puedan contribuir a su diagnóstico en la medicina veterinaria. Para ello, se combinó la herramienta de RNA-seq con un tejido de fácil acceso como la sangre, sustituyendo al hueso o tejido articular, que, debido a las nuevas directrices éticas en investigación veterinaria, son cada vez más difíciles de conseguir en pacientes. El bulk RNA-seq tiene la desventaja de no ser una técnica específica debido a que detecta todo transcripto expresado, independientemente de su relación con el trastorno estudiado. Este estudio estuvo limitado por la heterogeneidad de los grupos y el número de muestras, razón por lo que no se detectaron diferencias en los perfiles de expresión entre casos y controles. Esto refleja las consecuencias de trabajar con pacientes, en los cuales no se pueden controlar todas las variables. Consideramos que este mismo estudio pudiera tener resultados mas favorables si se repitiera en una cohorte mayor y se utilizara la RT-PCR como herramienta de validación. Lamentablemente, en el presente estudio no hubo muestras disponibles para experimentos de expresión.

Más allá de la descripción molecular, en esta tesis el diagnóstico preciso por imagen de las tres enfermedades fue clave para la asignación de los fenotipos y el posterior análisis genético. Las displasias esqueléticas y la OA en mascotas resultan difíciles de diagnosticar por los dueños y criadores, ya que muchas veces se pueden confundir con otros traumatismos. Tal fue el caso del enanismo en el dogo argentino investigado. Como el cachorro era pequeño se creía que podía tener algún desbalance nutricional u hormonal y luego se le realizaron varias intervenciones quirúrgicas correctivas. No fue hasta los dos años de edad cuando se sospechó un posible

defecto genético y se realizó un estudio por imágenes más profundo y certero. Para la OA, el estudio radiográfico de todas las articulaciones de riesgo permitió separar los grupos casos y controles y, en los animales afectados permitió seleccionar aquellos con un estado progresivo de la enfermedad. En este sentido, una recopilación precisa, sistemática y, en última instancia, ontológica de los fenotipos (fenotipado profundo) adquiere cada vez más importancia a medida que el número de trastornos hereditarios conocidos aumenta muy rápidamente, junto con la conciencia de que diferentes variantes genéticas son responsables de fenotipos confusos. Aunque esto ya está bien establecido en la medicina humana, la caracterización de los casos clínicos atípicos en los animales tiene una importancia fundamental en la medicina veterinaria y humana (Dragicevich y col., 2020).

En conclusión, en esta tesis se refuerza el gran potencial del diagnóstico de precisión basado en la secuenciación del genoma en medicina veterinaria utilizando grandes conjuntos de datos producidos con técnicas de NGS asequibles. Por un lado, la combinación de la secuenciación del genoma y el mapeo genético es un enfoque poderoso para identificar variantes candidatas causantes de trastornos óseos monogénicos en animales domésticos. Las variantes identificadas proporcionan la base para las pruebas genéticas, pudiéndose desarrollar pruebas sencillas basadas en la técnica de PCR para la gestión de la cría y la erradicación de los trastornos monogénicos como objetivo a largo plazo. Esta estrategia se ha adoptado con éxito en los últimos años, tal como lo demuestra el descenso del número de perros afectados, así como de las frecuencias de variantes asociadas a enfermedades en varias razas, tras la disponibilidad comercial de las pruebas de ADN (Lewis y Mellersh, 2019). En los animales de raza pura, el análisis de las enfermedades monogénicas es sencillo debido a la arquitectura genética única, la estructura de la población y las prácticas de cría. Esto permite la identificación de nuevos genes candidatos para trastornos genéticos que no han sido reportados antes en humanos. Adicionalmente, se analizó por primera vez el perfil transcriptómico en sangre de perros afectados por OA, contribuyendo a la identificación de un potencial biomarcador, que siendo validado en estudios posteriores pudiera complementar al diagnóstico por imagen de la OA. La sangre puede ser un buen tejido indicador de OA, pero futuros estudios serán necesarios para validarlo.

De esta manera, la investigación de las enfermedades osteoarticulares en animales de compañía puede conducir a nuevos conocimientos sobre las funciones biológicas, nuevos genes candidatos y biomarcadores para las enfermedades osteoarticulares en humanos y otras especies.

ANEXOS

Tabla S1. Enfermedades hereditarias esqueléticas en animales domésticos con variante causal conocida

 reportadas en OMIA.

Número de OMIA	Fenotipo	Especie	Gen
OMIA 002443-9913	Osteopetrosis	Bos taurus/bovino	SLC4A2
OMIA 001985-9913	Enanismo	Bos taurus/bovino	GON4L
OMIA 002223-9913	Hiperplasia interdigital	Bos taurus/bovino	ROR2
OMIA 001887-9913	Osteopetrosis con hamartomas gingivales	Bos taurus/bovino	CLCN7
OMIA 002381-9913	Displasia esquelética-cardio- entérica	Bos taurus/bovino	MAP2K2
OMIA 001926-9913	Acondrogénesis tipo II	Bos taurus/bovino	COL2A1
OMIA 002127-9913	Osteogénesis imperfecta, tipo Il	Bos taurus/bovino	COL1A1
OMIA 001703-9913	Condrodisplasia	Bos taurus/bovino	FGFR3
OMIA 001340-9913	Malformación vertebral compleja	Bos taurus/bovino	SLC35A3
OMIA 001271-9913	Enanismo	Bos taurus/bovino	ACAN
OMIA 000187-9913	Condrodisplasia	Bos taurus/bovino	EVC2
OMIA 001485-9913	Enanismo	Bos taurus/bovino	PRKG2
OMIA 002465-9615	Anomalía dental-esquelética y retinal	Canis lupus familiaris/perro	MIA3
OMIA 001485-9615	Enanismo	Canis lupus familiaris/perro	PRKG2 [#]

OMIA 001400-9615	Condrodisplasia	Canis lupus familiaris/perro	SLC13A1
OMIA 000157-9615	Enfermedad del disco	Canis lupus familiaris/perro	FGF4 retrogen en
	intervertebral, tipo l		Chr12
OMIA 000975-9615	Cola corta	Canis lupus familiaris/perro	Т
OMIA 002126-9615	Osteogénesis imperfecta tipo III	Canis lupus familiaris/perro	COL1A1
OMIA 002133-9615	Displasia esquelética	Canis lupus familiaris/perro	FGF4 retrogen
OMIA 002112-9615	Osteogénesis imperfecta	Canis lupus familiaris/perro	COL1A2
OMIA 001522-9615	Displasia óculo-esquelética I	Canis lupus familiaris/perro	COL9A3
OMIA 001483-9615	Osteogénesis imperfecta	Canis lupus familiaris/perro	SERPINH1
OMIA 001944-9615	Disostosis espondilocostal, autosómica recesiva	Canis lupus familiaris/perro	HES7
OMIA 001523-9615	Displasia óculo-esquelética II	Canis lupus familiaris/perro	COL9A2
OMIA 001886-9615	Condrodisplasia, extremidades cortas desproporcionadas	Canis lupus familiaris/perro	ITGA10
OMIA 001772-9615	Displasia esquelética 2 (SD2)	Canis lupus familiaris/perro	COL11A2
OMIA 002068-9796	Enanismo	Equus caballus/caballo	B4GALT7
OMIA 001271-9796	Enanismo	Equus caballus/caballo	ACAN
OMIA 002013-9796	Atavismo esquelético	Equus caballus/caballo	SHOX
OMIA 002485-9685	Displasia esquelética	Felis catus/ gato domestico	LTBP3 [#]
OMIA 000187-9685	Condrodisplasia	Felis catus/ gato domestico	UGDH
OMIA 000975-9685	Cola corta	Felis catus/ gato domestico	Т
OMIA 001987-9685	Cola corta y enroscada (<i>bobtail</i> japonés)	Felis catus/ gato domestico	HES7
OMIA 000388-9685	Fibrodisplasia osificante	Felis catus/ gato domestico	ACVR1
OMIA 000303-9031	Enanismo autosómico	Gallus gallus/chicken	C1H12ORF23

OMIA 000810-9031	Polidactilia	<i>Gallus gallus</i> /chicken	sLMBR1, SHH
OMIA 000006-9031	Acondroplasia	<i>Gallus gallus</i> /gallo	IHH
OMIA 000299-9986	Enanismo	Oryctolagus cuniculus/conejo	HMGA2
OMIA 001703-9940	Condrodisplasia	Ovis aries/oveja	FGFR3
OMIA 001400-9940	Condrodisplasia	<i>Ovis aries</i> /oveja	SLC13A1
OMIA 001718-9823	Enanismo, condrodisplasia metafisaria de Schmid	Sus scrofa/cerdo	COL10A1

Agradecimientos

Durante estos 5 años de doctorado, con una primera etapa en Argentina y un periodo final en Suiza, tuve la oportunidad de trabajar en grupos diferentes y conocer a muchas personas que formaron parte y apoyaron este trabajo de tesis en todas sus fases.

A mi director Guillermo Giovambattista y directora Gisel Padula, gracias por seleccionarme para realizar este doctorado, por darme libertad de elección y por su buena disposición.

A Tosso Leeb por aceptarme e integrarme en su grupo en la Universidad de Berna, por su enseñanza y consejos profesionales que dejaron una impronta en mi carrera como científica.

A los veterinarios colaboradores por el análisis de los fenotipos, y propietarios de mascotas por donar las muestras.

A todos los trabajadores del Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando Noel Dulout, principalmente a mis compañeros de doctorado con los que compartí muchos años de estudio, camaradería y amistad.

A todo el equipo del Instituto de Genética de la Universidad de Berna por el estupendo ambiente laboral, las largas horas de investigación compartidas y los viajes a la montaña.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina y la Comisión federal de becas para estudiantes extranjeros de Suiza por financiar este doctorado.

Mi más cálido agradecimiento para mi familia, en especial a mi madre, por darme la educación, los valores y el apoyo necesarios para decidir emprender este camino profesional y personal lejos de mi país natal.

A Gonzalo Chernitsky, por ser mi compañero incondicional y por hacer este camino recorrido más feliz.

Currículum Vitae

Datos personales

Nombre	Gabriela Rudd Garcés
Fecha de nacimiento	22 de Diciembre de 1992
ORCID	https://orcid.org/0000-00 01-7043-3117
Nacionalidad	cubana y argentina

Educación académica

04/2017-06/2022	Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
09/2010 – 06/2015	Licenciatura en Biología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Becas

04/2017-06/2022	Programa de Becas de Doctorado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.
09/2020- 08/2021	Becas de excelencia del gobierno suizo para estudiantes y artistas extranjeros (estancia de investigación).

Conferencias internacionales

09/2021	38º Conferencia de la Sociedad Internacional de Genética Animal <i>(online)</i>
	 "PRKG2 splice site variant in Dogo Argentino dogs with dwarfism"
	"Transcriptomic profile of peripheral whole blood reveals novel
	potential diagnostic gene biomarkers of Degenerative Joint Disease
	in German Shepherd dogs".
09/2019	37º Conferencia de la Sociedad Internacional de Genética Animal, Lleida, España.
	 "Analysis of clinical samples from Doberman and Toy Poodle dogs with a targeted next-generation genotyping system".

Lista de publicaciones

- Rudd Garces G, Christen M, Loechel R, Jagannathan V and Leeb T. *FYCO1* frameshift deletion in Wirehaired Pointing Griffon dogs with juvenile cataract. Genes 2022, 13(2), 334
- Rudd Garces G, Knebel A, Hülskötter K, Jagannathan V, Storks T, Hewicker-Trautwein M, Leeb T and Volk H. A. *LTBP3* frameshift variant in British Shorthair cats with complex skeletal dysplasia. Genes 2021, 12(12), 1923.
- Rudd Garces G, Turba ME, Muracchini M, Diana A, Jagannathan V, Gentilini F, Leeb T. *PRKG2* Splice Site Variant in Dogo Argentino Dogs with Disproportionate Dwarfism. Genes 2021, 12, 1489.
- Rudd Garces G, Arizmendi A, Barrientos LS, Crespi JA, Morales H, Peral García P, Padula G, Giovambattista G. Epidemiology of Cranial Cruciate Ligament Rupture and Patellar Luxation in Dogs from the Province of Buenos Aires, Argentina. Vet Comp Orthop Traumatol 2021; 34: 24–31.
- A. H. Falomir-Lockhart, M. F. Ortega Masague, G. Rudd Garces, M. E. Zappa, P. Peral Garcia, H. F. Morales, F. D. Holgado, A. Rogberg Munoz and G. Giovambattista.
 Polledness in Argentinean Creole cattle, five centuries surviving. Animal Genetics 2019, 50, 381–385.

Articulos pendiente de publicación

- A. Arizmendi, G. Rudd Garces, J.A. Crespi, L.H. Olivera, L.S. Barrientos, P. Peral García, and G. Giovambattista. Analysis of dog clinical samples with targeted NGS genotyping. Bajo revisión en Gene (GENEJOURNAL-D-22-01073).
- Padula G, Rudd Garces G, Vercellini R, Arias D. O, Peral-García P and G. Giovambattista. Preliminary Transcriptomic Analysis of Peripheral Blood from German Shepherd Dogs with Degenerative Joint Disease for the Identification of Diagnostic Biomarkers. Bajo revisión en Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology (Manuscript ID VCOT-22-08-0088).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecasis, G.R.; Cherny, S.S.; Cookson, W.O.; Cardon, L.R. Merlin—Rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. Nat. Genet. 2002, 30, 97–101.

Abramoff B, Caldera FE. (2020) Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. Med Clin North Am. Mar;104(2):293-311.

Akiyama, H.; Chaboissier, M.-C.; Martin, J.F.; Schedl, A.; de Crombrugghe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev. 2002, 16, 2813–2828.

Alam, M. R., Lee, H. B., Kim, M. S. & Kim, N. S. Surgical model of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs. Veterinarni Medicina 56, 123–130 (2011).

Alkan C, Coe BP, Eichler EE. Genome structural variation discovery and genotyping. Nat Rev Genet. 2011; 12: 363–376.

Allan, G., & Davies, S. (2018) Radiographic Signs of Joint Disease in Dogs and Cats. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology, 403–433.

Amiel, J.; Lyonnet, S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: A review. J. Med. Genet. 2001, 38, 729–739.

Andersson L. Molecular consequences of animal breeding. Curr Opin Genet Dev. 2013; 23: 295–301.

Andersson, L. Domestic animals as models for biomedical research. Ups. J. Med. Sci. 2016, 121, 1–11.

Andres Sastre E, Maly K, Zhu M, Witte-Bouma J, Trompet D, Böhm AM, Brachvogel B, van Nieuwenhoven CA, Maes C, van Osch GJVM, Zaucke F, Farrell E. Spatiotemporal distribution of thrombospondin-4 and -5 in cartilage during endochondral bone formation and repair. Bone. 2021 Sep;150:115999.

arcOGEN Consortium; arcOGEN Collaborators, Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, Rayner NW, Day-Williams AG, Lopes MC, Boraska V, Esko T, Evangelou E, Hoffman A, Houwing-Duistermaat JJ, Ingvarsson T, Jonsdottir I, Jonnson H, Kerkhof HJ, Kloppenburg M, Bos SD, Mangino M, Metrustry S, Slagboom PE, Thorleifsson G, Raine EV, Ratnayake M, Ricketts M, Beazley C, Blackburn H, Bumpstead S, Elliott KS, Hunt SE, Potter SC, Shin SY, Yadav VK, Zhai G, Sherburn K, Dixon K, Arden E, Aslam N, Battley PK, Carluke I, Doherty S, Gordon A, Joseph J, Keen R, Koller NC, Mitchell S, O'Neill F, Paling E, Reed MR, Rivadeneira F, Swift D, Walker K, Watkins B, Wheeler M, Birrell F, Ioannidis JP, Meulenbelt I, Metspalu A, Rai A, Salter D, Stefansson K, Stykarsdottir U, Uitterlinden AG, van Meurs JB, Chapman K, Deloukas P, Ollier WE, Wallis GA, Arden N, Carr A, Doherty M, McCaskie A, Willkinson JM, Ralston SH, Valdes AM, Spector TD, Loughlin J. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. Lancet. 2012 Sep 1;380(9844):815-23.

Ashley, E.A. Towards precision medicine. Nat. Rev. Genet. 2016, 17, 507–522.

Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015; 526: 68–74.

Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. The Journal of Bone & Joint Surgery. 2003; 85(4):715–726.

Bannasch, D. et al. Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach. Plos One 5, e9632 (2010).

Bannasch, D.L.; Baes, C.F.; Leeb, T. Genetic variants affecting skeletal morphology in domestic dogs. Trends Genet. 2020, 36, 598–609.

Bemji, M.N.; Isa, A.M.; Ibeagha-Awemu, E.M.; Wheto, M. Polymorphisms of caprine GnRHR gene and their association with litter size in West African Dwarf goats. Mol. Biol. Rep. 2018, 45, 63–69.

Boegheim, I.J.M.; Leegwater, P.A.J.; van Lith, H.A.; Back, W. Current insights into the molecular genetic basis of dwarfism in livestock. Vet. J. 2017, 224, 64–75.

Boer CG, Hatzikotoulas K, Southam L, Stefánsdóttir L, Zhang Y, Coutinho de Almeida R, Wu TT, Zheng J, Hartley A, Teder-Laving M, Skogholt AH, Terao C, Zengini E, Alexiadis G, Barysenka A, Bjornsdottir G, Gabrielsen ME, Gilly A, Ingvarsson T, Johnsen MB, Jonsson H, Kloppenburg M, Luetge A, Lund SH, Mägi R, Mangino M, Nelissen RRGHH, Shivakumar M, Steinberg J, Takuwa H, Thomas LF, Tuerlings M; arcOGEN Consortium; HUNT All-In Pain; ARGO Consortium; Regeneron Genetics Center, Babis GC, Cheung JPY, Kang JH, Kraft P, Lietman SA, Samartzis D, Slagboom PE, Stefansson K, Thorsteinsdottir U, Tobias JH, Uitterlinden AG, Winsvold B, Zwart JA, Davey Smith G, Sham PC, Thorleifsson G, Gaunt TR, Morris AP, Valdes AM, Tsezou A, Cheah KSE, Ikegawa S, Hveem K, Esko T, Wilkinson JM, Meulenbelt I, Lee MTM, van Meurs JBJ, Styrkársdóttir U, Zeggini E. Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. Cell. 2021 Sep 2;184(18):4784-4818.e17. Erratum in: Cell. 2021 Nov 24;184(24):6003-6005.

Brown, E.A.; Dickinson, P.J.; Mansour, T.; Sturges, B.K.; Aguilar, M.; Young, A.E.; Korff, C.; Lind, J.; Ettinger, C.L.; Varon, S.; et al. FGF4 retrogene on CFA12 is responsible for

chondrodystrophy and intervertebral disc disease in dogs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2017, 114, 11476–11481.

Buckingham, K.J.; McMillin, M.J.; Brassil, M.M.; Shively, K.M.; Magnaye, K.M.; Cortes, A.; Weinmann, A.S.; Lyons, L.A.; Bamshad, M.J. Multiple mutant T alleles cause haploinsufficiency of Brachyury and short tails in Manx cats. Mamm Genome 2013, 24, 400–408.

Buckley, R.M.; Davis, B.W.; Brashear, W.A.; Farias, F.H.G.; Kuroki, K.; Graves, T.; Hillier, L.W.; Kremitzki, M.; Li, G.; Middleton, R.P.; et al. A new domestic cat genome assembly based on long sequence reads empowers feline genomic medicine and identifies a novel gene for dwarfism. PLoS Genet. 2020, 16, e1008926.

Buckley, R.M.; Davis, B.W.; Brashear, W.A.; Farias, F.H.G.; Kuroki, K.; Graves, T.; Hillier, L.W.; Kremitzki, M.; Li, G.; Middleton, R.P.; et al. A new domestic cat genome assembly based on long sequence reads empowers feline genomic medicine and identifies a novel gene for dwarfism. PLoS Genet. 2020, 16, e1008926.

Cammarata-Scalisi F. The new Nosology and classification of genetic skeletal disorders. Arch Argent Pediatr 2020;118(2):86-88.

Carrig CB. (1997) Diagnostic imaging of osteoarthritis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 27: 777-814.

Cartolano, M., Huettel, B., Hartwig, B., Reinhardt, R. Schneeberger, K. cDNA library enrichment of full length transcripts for SMRT long read sequencing. PLOS ONE 11, e0157779 (2016).

Casal, M.L.; Engiles, J.B.; Pipan, M.Z.; Berkowitz, A.; Porat-Mosenco, Y.; Mai, W.; Wurzburg, K.; Xu, M.Q.; Allen, R.; O'Donnell, P.A.; et al. Identification of the identical human mutation in ACVR1 in 2 cats with fibrodysplasia ossificans progressiva. Vet. Pathol. 2019, 56, 614–618.

Cavanagh, J.A.; Tammen, I.; Windsor, P.A.; Bateman, J.F.; Savarirayan, R.; Nicholas, F.W.; Raadsma, H.W. Bulldog dwarfism in Dexter cattle is caused by mutations in ACAN. Mamm. Genome 2007, 18, 808–814.

Chandramohanadas, R., Davis, P. H., Beiting, D. P., Harbut, M. B., Darling, C., Velmourougane, G., Lee, M. Y., Greer, P. A., Roos, D. S., Greenbaum, D. C. Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. Science 324: 794-797, 2009.

Chen K, Wallis JW, McLellan MD, Larson DE, Kalicki JM, Pohl CS, et al. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. Nat Methods. 2009; 6: 677–681.

Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics. Sep 1;34(17): i884-i890.

Chen, Y.; Dabovic, B.; Annes, J.P.; Rifkin, D.B. Latent TGF- β binding protein-3 (LTBP-3) requires binding to TGF- β for secretion. FEBS Lett. 2002, 517, 277–280.

Chikuda, H.; Kugimiya, F.; Hoshi, K.; Ikeda, T.; Ogasawara, T.; Shimoaka, T.; Kawano, H.; Kamekura, S.; Tsuchida, A.; Yokoi, N.; et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. Genes Dev. 2004, 18, 2418–2429.

Christiansen, H.E.; Schwarze, U.; Pyott, S.M.; AlSwaid, A.; Al Balwi, M.; Alrasheed, S.; Pepin, M.G.; Weis, M.A.; Eyre, D.R.; Byers, P.H. Homozygosity for a Missense Mutation in SERPINH1, which Encodes the Collagen Chaperone Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogenesis Imperfecta. Am. J. Hum. Genet. 2010, 86, 389–398.

Cimino Brown D. (2017) What can we learn from osteoarthritis pain in companion animals? Clin Exp Rheumatol. Sep-Oct;35 Suppl 107(5):53-58.

Cingolani, P.; Platts, A.; Wang, L.L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Land, S.J.; Lu, X.; Ruden, D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly 2012, 6, 80–92.

Cloonan, N. et al. Stem cell transcriptome profiling via massive- scale mRNA sequencing. Nat. Methods 5, 613–619 (2008).

Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. Nat Genet. 1995; 9: 347–350.

Curik, I.; Ferenčaković, M.; Sölkner, J. Inbreeding and runs of homozygosity: A possible solution to an old problem. Livest. Sci. 2014, 166, 26–34.

Dabovic, B.; Chen, Y.; Colarossi, C.; Obata, H.; Zambuto, L.; Perle, M.A.; Rifkin, D.B. Bone abnormalities in latent TGF-β binding protein (Ltbp)-3–null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-β bioavailability. J. Cell Biol. 2002, 156, 227–232.

Dabovic, B.; Chen, Y.; Colarossi, C.; Zambuto, L.; Obata, H.; Rifkin, D.B. Bone defects in latent TGF-β binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-β presentation. J. Endocrinol. 2002, 175, 129–141.

Dabovic, B.; Levasseur, R.; Zambuto, L.; Chen, Y.; Karsenty, G.; Rifkin, D.B. Osteopetrosis-like phenotype in latent TGF- β binding protein 3 deficient mice. Bone 2005, 37, 25–31.

de Bakker E, Stroobants V, VanDael F, Ryssen BV, Meyer E. Canine synovial fluid biomarkers for early detection and monitoring of osteoarthritis. Vet Rec. 2017 Apr 1;180(13):328-329.

Deng, J.Z.; Hao, L.L.; Li, M.T.; Lang, S.; Zeng, Y.Z.; Liu, S.C.; Zhang, Y.L. Growth hormone and receptor gene mutations in Chinese Banna miniature pig. Anim. Cells Syst. 2011, 15, 310–314.

Depristo, M.A.; Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K. V.; Maguire, J.R.; Hartl, C.; Philippakis, A.A.; Del Angel, G.; Rivas, M.A.; Hanna, M.; et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat. Genet. 2011, 43, 491–501. Di Rienzo A. Population genetics models of common diseases. Current opinion ingenetics & development. 2006;16(6):630-6.

Díaz-González, F.; Wadhwa, S.; Rodriguez-Zabala, M.; Kumar, S.; Aza-Carmona, M.; Sentchordi-Montané, L.; Alonso, M.; Ahmad, I.; Zahra, S.; Kumar, D.; et al. Biallelic cGMP-dependent type II protein kinase gene (PRKG2) variants cause a novel acromesomelic dysplasia. J. Med. Genet. 2020.

Dittmer KE, Thompson KG. Approach to Investigating Congenital Skeletal Abnormalities in Livestock. Vet Pathol. 2015 Sep;52(5):851-61.

Djakow J, Kramná L, Dušátková L, Uhlík J, Pursiheimo J-P, Svobodová T, et al. An effective combination of sanger and next generation sequencing in diagnostics of primary ciliary dyskinesia. Pediatr Pulmonol. 2016; 51: 498–509.

Djebali, S. et al. Landscape of transcription in human cells. Nature 489, 101–108 (2012).

Dogo Argentino-Breeders and Kennels-EuroBreeder.com. Available online: https://www.eurobreeder.com/breeds/dogo_argentino.html

Dragicevich, C.J.; Jones, J.C.; Bridges, W.; Dunn, H. Computed tomographic measures of funnel-shaped lumbar vertebral canal and articular process dysplasia malformations differ between German Shepherd and Belgian Malinois military working dogs. Front. Vet. Sci. 2020, 7, 275.

Driver, C.J.; Volk, H.A.; Rusbridge, C.; Van Ham, L.M. An update on the pathogenesis of syringomyelia secondary to Chiari-like malformations in dogs. Vet. J. 2013, 198, 551–559.

Drögemüller, C.; Becker, D.; Brunner, A.; Haase, B.; Kircher, P.; Seeliger, F.; Fehr, M.; Baumann, U.; Lindblad-Toh, K.; Leeb, T. A Missense Mutation in the SERPINH1 Gene in Dachshunds with Osteogenesis Imperfecta. PLoS Genet. 2009, 5, e1000579.

Drögemüller, C.; Karlsson, E.K.; Hytönen, M.K.; Perloski, M.; Dolf, G.; Sainio, K.; Lohi, H.; Lindblad-Toh, K.; Leeb, T. A Mutation in Hairless Dogs Implicates FOXI3 in Ectodermal Development. Science 2008, 321, 1462–1462.

Drögemüller, M.; Jagannathan, V.; Howard, J.; Bruggmann, R.; Drögemüller, C.; Ruetten, M.; Leeb, T.; Kook, P.H. A frameshift mutation in the cubilin gene (CUBN) in Beagles with Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). Anim. Genet. 2014, 45, 148–150.

Dugan, S.L.; Temme, R.T.; Olson, R.A.; Mikhailov, A.; Law, R.; Mahmood, H.; Noor, A.; Vincent, J.B. New recessive truncating mutation in LTBP3 in a family with oligodontia, short stature, and mitral valve prolapse. Am. J. Med. Genet. Part A 2015, 167, 1396–1399.

Dunham, I.; Kundaje, A.; Aldred, S.F.; Collins, P.J.; Davis, C.A.; Doyle, F.; Epstein, C.B.; Frietze, S.; Harrow, J.; Kaul, R.; et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 2012, 489, 57–74.

Emrich, S. J., Barbazuk, W. B., Li, L, Schnable, P. S. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. Genome Res. 17, 69–73 (2007).

Engström, P. G. et al. Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA- seq data. Nat. Methods 10, 1185–1191 (2013).

Fiegler H, Redon R, Andrews D, Scott C, Andrews R, Carder C, et al. Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. Genome Res. 2006; 16: 1566–1574.

Forman, O.P.; De Risio, L.; Mellersh, C.S. Missense mutation in CAPN1 is associated with spinocerebellar ataxia in the Parson Russell Terrier dog breed. PLoS ONE 2013, 8, e64627.

Friedenberg, S.G.; Meurs, K.M. Genotype imputation in the domestic dog. Mamm. Genome 2016, 27, 485–494.

Frischknecht, M.; Niehof-Oellers, H.; Jagannathan, V.; Owczarek-Lipska, M.; Drögemüller, C.; Dietschi, E.; Dolf, G.; Tellhelm, B.; Lang, J.; Tiira, K.; et al. A COL11A2 mutation in Labrador retrievers with mild disproportionate dwarfism. PLoS ONE 2013, 8, e60149.

Gandolfi B, Alhaddad H, Abdi M, Bach LH, Creighton EK, Davis BW, Decker JE, Dodman NH, Ginns El, Grahn JC, Grahn RA, Haase B, Haggstrom J, Hamilton MJ, Helps CR, Kurushima JD, Lohi H, Longeri M, Malik R, Meurs KM, Montague MJ, Mullikin JC, Murphy

WJ, Nilson SM, Pedersen NC, Peterson CB, Rusbridge C, Saif R, Shelton GD, Warren WC, Wasim M, Lyons LA. Applications and efficiencies of the first cat 63K DNA array. Sci Rep. 2018 May 4;8(1):7024. doi: 10.1038/s41598-018-25438-0. Erratum in: Sci Rep. 2018 Jun 4;8(1):8746. Erratum in: Sci Rep. 2019 Mar 12;9(1):4664.

Gandolfi, B.; Alamri, S.; Darby, W.G.; Adhikari, B.; Lattimer, J.C.; Malik, R.; Wade, C.M.; Lyons, L.A.; Cheng, J.; Bateman, J.F.; et al. A dominant TRPV4 variant underlies osteochondrodysplasia in Scottish fold cats. Osteoarthr. Cartil. 2016, 24, 1441–1450.

Gan-Or, Z.; Bouslam, N.; Birouk, N.; Lissouba, A.; Chambers, D.B.; Verlepe, J.; Androschuk, A.; Laurent, S.B.; Rochesfort, D.; Spiegelman, D.; et al. Mutations in CAPN1 cause autosomal-recessive hereditary spastic paraplegia. Am. J. Hum. Genet. 2016, 98, 1038–1046.

Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, Derome N. A brief history of bioinformatics. Brief Bioinform. 2019; 20: 1981–1996.

Goldstein O, Guyon R, Kukekova A, et al. COL9A2 and COL9A3 mutations in canine autosomal recessive oculoskeletal dysplasia. Mamm Genome 2010; 21: 398–408.

Gurda, B.L.; Bradbury, A.M.; Vite, C.H. Canine and Feline Models of Human Genetic Diseases and Their Contributions to Advancing Clinical Therapies . Yale J. Biol. Med. 2017, 90, 417–431.

H. G. Parker, L. V. Kim, N. B. Sutter, S. Carlson, T. D. Lorentzen, T. B. Malek, G. S. Johnson, H. B. DeFrance, E. A. Ostrander, L. Kruglyak, Genetic structure of the purebred domestic dog. Science 304, 1160–1164 (2004).

Haase, B.; Mazrier, H.; Wade, C.M. Digging for known genetic mutations underlying inherited bone and cartilage characteristics and disorders in the dog and cat. Vet. Comp. Orthop. Traumatol. 2016, 29, 269–276.

Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays. 2000; 22(2):138–147.

Hayward, J.J.; White, M.E.; Boyle, M.; Shannon, L.M.; Casal, M.L.; Castelhano, M.G.; Center, S.A.; Meyers-Wallen, V.N.; Simpson, K.W.; Sutter, N.B.; et al. Imputation of canine genotype array data using 365 whole-genome sequences improves power of genome-wide association studies. PLOS Genet. 2019, 15, e1008003.

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016; 107: 1–8.

Huckert, M.; Stoetzel, C.; Morkmued, S.; Laugel-Haushalter, V.; Geoffroy, V.; Muller, J.; Clauss, F.; Prasad, M.K.; Obry, F.; Raymond, J.L.; et al. Mutations in the latent TGF-β binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. Hum. Mol. Genet. 2015, 24, 3038–3049.

Intarak N, Theerapanon T, Thaweesapphithak S, Suphapeetiporn K, Porntaveetus T, Shotelersuk V. Genotype-phenotype correlation and expansion of orodental anomalies in LTBP3-related disorders. Mol Genet Genomics. 2019 Jun;294(3):773-787.

Jacobsen, S. & Sonne-Holm, S. (2005) Hip dysplasia: a significant risk factor for the development of hip osteoarthritis. A cross-sectional survey. Rheumatology 44, 211–218. Jagannathan, V.; Drögemüller, C.; Leeb, T.; Dog Biomedical Variant Database Consortium, (DBVDC). A comprehensive biomedical variant catalogue based on whole genome sequences of 582 dogs and eight wolves. Anim. Genet. 2019, 50, 695–704.

Jain, M.; Saber, A.Y. Dwarfism. In StatPearls [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563282/ (acceso 16 October 2020).

Jaroy, E.G.; Acosta-Jimenez, L.; Hotta, R.; Goldstein, A.M.; Emblem, R.; Klungland, A.; Ougland, R. "Too much guts and not enough brains": (epi)genetic mechanisms and future therapies of Hirschsprung disease—A review. Clin. Epigenetics 2019, 11, 1–11.

Jeschke A, Bonitz M, Simon M, Peters S, Baum W, Schett G, Ruether W, Niemeier A, Schinke T, Amling M. Deficiency of Thrombospondin-4 in Mice Does Not Affect Skeletal Growth or Bone Mass Acquisition, but Causes a Transient Reduction of Articular Cartilage Thickness. PLoS One. 2015 Dec 2;10(12):e0144272.

Johnston, S. A. Osteoarthritis - joint anatomy, physiology, and pathobiology. Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice 27, 699–723 (1997).

Karlsson, E.K.; Baranowska, I.; Wade, C.M.; Salmon Hillbertz, N.H.C.; Zody, M.C.; Anderson, N.; Biagi, T.M.; Patterson, N.; Pielberg, G.R.; Kulbokas, E.J.; et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. Nat. Genet. 2007, 39, 1321–1328.

Karlsson, E.K.; Lindblad-Toh, K. Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. Nat. Rev. Genet. 2008, 9, 713–725.

Kaur, R.; Siddiqui, I.; Mathur, V.; Jana, M.; Kabra, M.; Gupta, N. Bi-allelic loss-of-function novel variants in LTBP3 -related skeletal dysplasia: Report of first patient from India. Am. J. Med. Genet. Part A 2020, 182, 1944–1946.

Kim HK. (2012) Pathophysiology and new strategies for the treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. J Bone Joint Surg Am. Apr 4;94(7):659-69. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat Methods 12, 357–360.

Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. Cell. 2013; 155: 27–38.

Koch CM, Chiu SF, Akbarpour M, Bharat A, Ridge KM, Bartom ET, Winter DR. A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018 Aug;59(2):145-157.

Kol A, Arzi B, Athanasiou KA, Farmer DL, Nolta JA, Rebhun RB, Chen X, Griffiths LG, Verstraete FJ, Murphy CJ, Borjesson DL. Companion animals: Translational scientist's new best friends. Sci Transl Med. 2015 Oct 7;7(308):308ps21.

Koli, K.; Ryynänen, M.J.; Keski-Oja, J. Latent TGF-β binding proteins (LTBPs)-1 and-3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Bone 2008, 43, 679–688.

Koli, K.; Saharinen, J.; Hyytiäinen, M.; Penttinen, C.; Keski-Oja, J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-β. Microsc. Res. Tech. 2001, 52, 354–362.

Koltes, J.E.; Kumar, D.; Kataria, R.S.; Cooper, V.; Reecy, J.M. Transcriptional profiling of PRKG2-null growth plate identifies putative down-stream targets of PRKG2. BMC Res. Notes 2015, 8, 177.

Koltes, J.E.; Mishra, B.P.; Kumar, D.; Kataria, R.S.; Totir, L.R.; Fernando, R.L.; Cobbold, R.; Steffen, D.; Coppieters, W.; Georges, M.; et al. A nonsense mutation in cGMP-dependent type II protein kinase (PRKG2) causes dwarfism in American Angus cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009, 106, 19250–19255.

Krakow, D. Skeletal dysplasias. Clin. Perinatol. 2015, 42, 301–319.

Kraus, V.B., Kepler, T.B., Stabler, T., Renner, J., Jordan, J., 2010. First qualification study of serum biomarkers as indicators of total body burden of osteoarthritis. Public Library of Science One 5, e9739.

Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. Nature 2003, 423, 332–336.

Kumar, K.R.; Cowley, M.J.; Davis, R.L. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. Semin. Thromb. Hemost. 2019, 45, 661–673.

Kyöstilä, K.; Lappalainen, A.K.; Lohi, H. Canine chondrodysplasia caused by a truncating mutation in collagen-binding integrin alpha subunit 10. PLoS ONE 2013, 8, e75621.

Lairmore, M. D., and Khanna, C. (2014). Naturally occurring diseases in animals: contributions to translational medicine. ILAR J. 55, 1–3.

Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., et al. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 8878–8883.

Leeb, T. Animal DNA diagnostics – Personal genomics for our pets and livestock is at the Horizon. Mol. Cell. Probes 2012, 26, 223.

Leegwater, P.A.; van Hagen, M.A.; van Oost, B.A. Localization of White Spotting Locus in Boxer Dogs on CFA20 by Genome-Wide Linkage Analysis with 1500 SNPs. J. Hered. 2007, 98, 549–552,

Lequarré, A.S.; Andersson, L.; André, C.; Fredholm, M.; Hitte, C.; Leeb, T.; Lohi, H.; Lindblad-Toh, K.; Georges, M. LUPA: A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. Vet. J. 2011, 189, 155–159.

Letko, Anna (2021). Molecular characterization of rare forms of canine neurological diseases as potential models for similar human diseases. (PhD Thesis). Universität Bern, Bern. <u>https://boristheses.unibe.ch/2789/</u>.

Lettice, L.A.; Hill, A.E.; Devenney, P.S.; Hill, R.E. Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. Hum. Mol. Genet. 2008, 17, 978–985.

Lewis, T.W.; Mellersh, C.S. Changes in mutation frequency of eight Mendelian inherited disorders in eight pedigree dog populations following introduction of a commercial DNA test. PLoS One 2019, 14, 1–21.

Li G, Hillier LW, Grahn RA, Zimin AV, David VA, Menotti-Raymond M, Middleton R, Hannah S, Hendrickson S, Makunin A, O'Brien SJ, Minx P, Wilson RK, Lyons LA, Warren WC, Murphy WJ. A High-Resolution SNP Array-Based Linkage Map Anchors a New Domestic Cat Draft Genome Assembly and Provides Detailed Patterns of Recombination. G3 (Bethesda). 2016 Jun 1;6(6):1607-16.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. (2009) 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. Aug 15;25(16):2078-9.

Li, W., Notani, D., Rosenfeld, M. G. Enhancers as non- coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. Nat. Rev. Genet. 17, 207–223 (2016).

Liao Y, Smyth GK, Shi W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics. Apr 1;30(7):923-30.

Lindblad-Toh, K.; Wade, C.M.; Mikkelsen, T.S.; Karlsson, E.K.; Jaffe, D.B.; Kamal, M.; Clamp, M.; Chang, J.L.; Kulbokas, E.J.; Zody, M.C.; et al. Genomic sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature 2005, 438, 803–819. Ilumina.https://www.illumina.com/content/dam/illumina-

marketing/documents/products/research_reviews/rna-sequencing-methods-review-web.pdf (2022).

Lockwood A, Montgomery R, McEwen V. Bilateral radial hemimelia, polydactyly and cardiomegaly in two cats. Vet Comp Orthop Traumatol 2009; 22: 511-513.

Love MI, Huber W, A S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15(12):550.

Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol. 2019 Nov;16(11):661-674.

Lyons LA. Feline genetics: clinical applications and genetic testing. Top Companion Anim Med. 2010 Nov;25(4):203-12.

Lyons LA. Genetic testing in domestic cats. Mol Cell Probes. 2012 Dec;26(6):224-30.

Lyons, L.A.; Creighton, E.K.; Alhaddad, H.; Beale, H.C.; Grahn, R.A.; Rah, H.; Maggs, D.J.; Helps, C.R.; Gandolfi, B. Whole genome sequencing in cats, identifies new models for blindness in AIPL1 and somite segmentation in HES7. BMC Genom. 2016, 17, 265.

Lyons, L.A.; Erdman, C.A.; Grahn, R.A.; Hamilton, M.J.; Carter, M.J.; Helps, C.R.; Alhaddad, H.; Gandolfi, B. Aristaless-like homeobox protein 1 (ALX1) variant associated with craniofacial structure and frontonasal dysplasia in Burmese cats. Dev. Biol. 2016, 409, 451–458.

M. M. Christopher, One health, one literature: Weaving together veterinary and medical research. Sci. Transl. Med. 7, 303fs36 (2015).

MacFarlane, E.G.; Haupt, J.; Dietz, H.C.; Shore, E.M. TGF-β family signaling in connective tissue and skeletal diseases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2017, 9, a022269.

Maly K, Schaible I, Riegger J, Brenner RE, Meurer A, Zaucke F. The Expression of Thrombospondin-4 Correlates with Disease Severity in Osteoarthritic Knee Cartilage. Int J Mol Sci. 2019 Jan 21;20(2):447.

Maly K, Andres Sastre E, Farrell E, Meurer A, Zaucke F. COMP and TSP-4: Functional Roles in Articular Cartilage and Relevance in Osteoarthritis. Int J Mol Sci. 2021 Feb 24;22(5):2242.

Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., Gilad, Y. RNA- seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res. 18, 1509–1517 (2008).

Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier JP. (2016) Osteoarthritis. Nat Rev Dis Primers. Oct 13; 2:16072.

Marzin, P.; Thierry, B.; Dancasius, A.; Cavau, A.; Michot, C.; Rondeau, S.; Baujat, G.; Phan, G.; Bonnière, M.; Le Bourgeois, M.; et al. Geleophysic and acromicric dysplasias: Natural history, genotype-phenotype correlations, and management guidelines from 38 cases. Genet. Med. 2021, 23, 331–340.

Matsumoto Y, Ruamrungsri N, Arahori M, Ukawa H, Ohashi K, Lyons LA, Ishihara G. Genetic relationships and inbreeding levels among geographically distant populations of Felis catus from Japan and the United States. Genomics. 2021 Jan;113(1 Pt 1):104-110. Matukumalli, L. K. et al. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. Plos One 4, e5350 (2009).

Maumus M, Toupet K, Djouad F, *et al.* A7.02 Protective effect of thrombospondin-4 expressing mesenchymal stem cells in osteoarthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2016;75:A56.

Mccoy, A. M. (2015). Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. Vet. Pathol. 52, 803–818.

McCue, M. E. et al. A high density SNP array for the domestic horse and extant perissodactyla: Utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. Plos Genet 8 (2012).

McGinn, S.; Gut, I.G. DNA sequencing – spanning the generations. N. Biotechnol. 2013, 30, 366–372.

McInerney-Leo, A.M.; Le Goff, C.; Leo, P.J.; Kenna, T.J.; Keith, P.; Harris, J.E.; Steer, R.; Bole-Feysot, C.; Nitschke, P.; Kielty, C.; et al. Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. J. Med. Genet. 2016, 53, 457–464.

McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytsky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res. 2010, 20, 1297–1303.

Meeson RL, Todhunter RJ, Blunn G, Nuki G, Pitsillides AA. (2019) Spontaneous dog osteoarthritis - a One Medicine vision. Nat Rev Rheumatol. May;15(5):273-287.

Mele, E. (2007) Epidemiology of osteoarthritis. Veterinary Focus 17, 4–10.

MGI – Mouse Genome Informatics. Available online: http://www.informatics.jax.org/ (acceso el 31 January 2022).

Mikkola L, Holopainen S, Pessa-Morikawa T, Lappalainen AK, Hytönen MK, Lohi H, livanainen A. Genetic dissection of canine hip dysplasia phenotypes and osteoarthritis reveals three novel loci. BMC Genomics. 2019 Dec 27;20(1):1027.

Mikkola LI, Holopainen S, Lappalainen AK, Pessa-Morikawa T, Augustine TJP, Arumilli M, Hytönen MK, Hakosalo O, Lohi H, Iivanainen A. Novel protective and risk loci in hip dysplasia in German Shepherds. PLoS Genet. 2019 Jul 19;15(7):e1008197.

Minato, S.; Baroni, M. Chiari-like malformation in two cats. J. Small Anim Pract. 2018, 59, 578–582.

Miyazawa, T.; Ogawa, Y.; Chusho, H.; Yasoda, A.; Tamura, N.; Komatsu, Y.; Pfeifer, A.; Hofmann, F.; Nakao, K. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. Endocrinology 2002, 143, 3604–3610.

Mobasheri A, Henrotin Y. (2010) Identification, validation and qualification of biomarkers for osteoarthritis in humans and companion animals: mission for the next decade. Vet J. Aug;185(2):95-7.

Morris, D. (2002) Dogs: The Ultimate Dictionary for Over 1,000 Dog Breeds, Trafalgar Square.

Morris, K. V. and Mattick, J. S. The rise of regulatory RNA. Nat. Rev. Genet. 15, 423–437 (2014).

Mortazavi, A., Williams, B. A., Mccue, K., Schaeffer, L., Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA- Seq. Nat. Methods 5, 621–628 (2008).

Mortier, G.R.; Cohn, D.H.; Cormier-Daire, V.; Hall, C.; Krakow, D.; Mundlos, S.; Nishimura, G.; Robertson, S.; Sangiorgi, L.; Savarirayan, R.; et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. Am. J. Med. Genet. Part A 2019, 179, 2393–2419.

Mullikin, J. C. et al. Light whole genome sequence for SNP discovery across domestic cat breeds. BMC genomics 11, 406 (2010)

Munjal A, Bapat S, Hubbard D, Hunter M, Kolhe R, Fulzele S. (2019) Advances in Molecular biomarker for early diagnosis of Osteoarthritis. Biomol Concepts. Aug 9;10(1):111-119.

National Centre for the replacement, refinement, and reduction of animals in research (NC3Rs). https://www.nc3rs.org.uk/). Consultado el 16 de marzo.

Neff, M.W.; Beck, J.S.; Koeman, J.M.; Boguslawski, E.; Kefene, L.; Borgman, A.; Ruhe, A.L. Deletion of the sulfate transporter SLC13A1 is associated with an osteochondrodysplasia in the Miniature Poodle breed. PLoS ONE 2012, 7, e51917. Nielsen, R. Molecular Signatures of Natural Selection. Annu. Rev. Genet. 2005, 39, 197–218.

Noor, A.; Windpassinger, C.; Vitcu, I.; Orlic, M.; Rafiq, M.A.; Khalid, M.; Malik, M.N.; Ayub, M.; Alman, B.; Vincent, J.B. Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-β binding protein 3. Am. J. Hum. Genet. 2009, 84, 519–523.

O'Neill, D. G., Church, D. B., McGreevy, P. D., Thomson, P. C. & Brodbelt, D. C. Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England. PLoS ONE 9, e90501, (2014).

Oikonomopoulos, S., Wang, Y. C., Djambazian, H., Badescu, D., Ragoussis, J. Benchmarking of the Oxford Nanopore MinION sequencing for quantitative and qualitative assessment of cDNA populations. Sci. Rep. 6, 31602 (2016).

OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals. Sydney School of Veterinary Science. Disponible online: https://omia.org/ (acceso el 9 de Julio 2022).

OMIM – Online mendelian Inheritance in Man. Available online: https://www.omim.org/ (acceso el 10 de Febrero 2022).

O'Neill TW, McCabe PS, McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018 Apr;32(2):312-326.

Orstavik, S.; Solberg, R.; Taskén, K.; Nordahl, M.; Altherr, M.R.; Hansson, V.; Jahnsen, T.; Sandberg, M. Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 220, 759–765.

Ostrander EA, Galibert F, Patterson DF. Canine genetics comes of age. Trends Genet. 2000 Mar;16(3):117-24.

Ott, J.; Wang, J.; Leal, S.M. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. Nat. Rev. Genet. 2015, 16, 275–284.

Padmanabhan R, Padmanabhan R, Wu R. Nucleotide sequence analysis of DNA. Biochem Biophys Res Commun. 1972; 48: 1295–1302.

Parker, H. G., Shearin, A. L., and Ostrander, E. A. (2010). Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. Annu. Rev. Genet. 44, 309–336.

Parker, H.G.; VonHoldt, B.M.; Quignon, P.; Margulies, E.H.; Shao, S.; Mosher, D.S.; Spady, T.C.; Elkahloun, A.; Cargill, M.; Jones, P.G.; et al. An expressed fgf4 retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. Science 2009, 325, 995–998.

PennGen Laboratories, University of Pennsylvania. https://www.vet.upenn.edu/

Pettitt, R. A; German, A. J. Investigation and management of canine osteoarthritis. In Practice 37, 1–8 (2015).

Pfeifer, A.; Aszódi, A.; Seidler, U.; Ruth, P.; Hofmann, F.; Fässler, R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. Science 1996, 274, 2082–2086.

Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. Biochemical and biophysical research communications. 2005; 328(3):658–665.

Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.I.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A tool set for whole genome association and population-based linkage analyses. Am. J. Hum. Genet. 2007, 81, 559–575.

Rafati, N.; Andersson, L.S.; Mikko, S.; Feng, C.; Raudsepp, T.; Pettersson, J.; Janecka, J.; Wattle, O.; Ameur, A.; Thyreen, G.; et al. Large deletions at the SHOX locus in the pseudoautosomal region are associated with skeletal atavism in Shetland Ponies. G3 (Bethesda) 2016, 6, 2213–2223.

Ramirez CJ, Carl C, Ballif BC, Shaffer LG (2017) Importance of standards and guidelines for veterinary genetic laboratory services. JAVMA 250:747.

Reynard LN, Barter MJ. (2020) Osteoarthritis year in review 2019: genetics, genomics and epigenetics. Osteoarthritis Cartilage. Mar;28(3):275-284.

Rifkin, D.B.; Rifkin, W.J.; Zilberberg, L. LTBPs in biology and medicine: LTBP diseases. Matrix Biol. 2018, 71–72, 90–99.

Robertson SA. Moving forward with detecting osteoarthritis in cats. Vet Rec. 2019 Dec 21;185(24):754-756.

Robertson, I.B.; Horiguchi, M.; Zilberberg, L.; Dabovic, B.; Hadjiolova, K.; Rifkin, D.B. Latent TGF-β-binding proteins. Matrix Biol. 2015, 47, 44–53.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol. 2011 Jan;29(1):24-6.

Rockett, J.C., Burczynski, M.E. (2006) Introduction to surrogate tissue analysis. In: Burczynski, M.E., Rockett, J.C.(Eds.), Surrogate Tissue Analysis. Taylor & Francis Group, pp. 3–11. Roe, K.A.M.; Syme, H.M.; Brooks, H.W. Congenital large intestinal hypoganglionosis in a domestic shorthair kitten. J. Feline Med. Surg. 2010, 12, 418–420.

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature. 2011; 475: 348–352.

Rusbridge, C. New considerations about Chiari-like malformation, syringomyelia and their management. Practice 2020, 42, 252–267.

Rusbridge, C.; Knowler, S.P. Hereditary aspects of occipital bone hypoplasia and syringomyelia (Chiari type I malformation) in cavalier King Charles spaniels. Vet. Rec. 2003, 153, 107–112.

Ruthard J, Hermes G, Hartmann U, Sengle G, Pongratz G, Ostendorf B, Schneider M, Höllriegl S, Zaucke F, Wagener R, Streichert T, Klatt AR. Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Sep 10;503(3):1273-1277.

Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (80-). 1985; 230: 1350–1354.

Sams, A.J.; Boyko, A.R. Fine-Scale Resolution of Runs of Homozygosity Reveal Patterns of Inbreeding and Substantial Overlap with Recessive Disease Genotypes in Domestic Dogs. G3 (Bethesda) 2019, 9, 117–123.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci. 1977; 74: 5463–5467.Sewell, M.D.; Chahal, A.; Al-Hadithy, N.; Blunn, G.W.; Molloy, S.; Hashemi-Nejad, A. Genetic skeletal dysplasias: A guide to diagnosis and management. J. Back Musculoskelet. Rehabil. 2015, 28, 575–590.

Shaffer LG, Sundin K, Geretschlaeger A, Segert J, Swinburne JE, Royal R, Loechel R, Ramirez CJ, Ballif BC. Standards and guidelines for canine clinical genetic testing laboratories. Hum Genet. 2019 May;138(5):493-499.

Shaffer LG. Special issue on canine genetics: animal models for human disease and gene therapies, new discoveries for canine inherited diseases, and standards and guidelines for clinical genetic testing for domestic dogs. Hum Genet. 2019 May;138(5):437-440.

Sharon, D., Tilgner, H., Grubert, F., Snyder, M.A single- molecule long- read survey of the human transcriptome. Nat. Biotechnol. 31, 1009–1014 (2013).

Simon, D. et al. (2015) The relationship between anterior cruciate ligament injury and osteoarthritis of the knee. Adv. Orthop.1–11.

Slutsky J, Raj K, Yuhnke S, Bell J, Fretwell N, Hedhammar A, Wade C, Giger U. A web resource on DNA tests for canine and feline hereditary diseases. Vet J. 2013 Aug;197(2):182-7.

Stanley, S.; Balic, Z.; Hubmacher, D. Acromelic dysplasias: How rare musculoskeletal disorders reveal biological functions of extracellular matrix proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2021, 1490, 57–76.

Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. Nat Rev Genet. 2019 Nov;20(11):631-656.

Steinberg J, Southam L, Roumeliotis TI, Clark MJ, Jayasuriya RL, Swift D, Shah KM, Butterfield NC, Brooks RA, McCaskie AW, Bassett JHD, Williams GR, Choudhary JS, Wilkinson JM, Zeggini E. A molecular quantitative trait locus map for osteoarthritis. Nat Commun. 2021 Feb 26;12(1):1309.

Stenina-Adognravi O, Plow EF. Thrombospondin-4 in tissue remodeling. Matrix Biol. 2019 Jan;75-76:300-313.

Struck, A.-K.; Braun, M.; Detering, K.A.; Dziallas, P.; Neßler, J.; Fehr, M.; Metzger, J.; Distl, O. A structural UGDH variant associated with standard Munchkin cats. BMC Genet. 2020, 21, 67.

Su W, Bi X, Wang Y, Baudry M. Changes in neurodegeneration-related miRNAs in brains from CAPN1-/- mice. BBA Adv. 2021; 1:100004.

Sutter NB, Eberle MA, Parker HG, Pullar BJ, Kirkness EF, Kruglyak L, et al. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in Canis familiaris. Genome research.2004;14(12):2388-96.

Suzuki S, Ono N, Furusawa C, Ying B-W, Yomo T. Comparison of Sequence Reads Obtained from Three Next-Generation Sequencing Platforms. Bereswill S, editor. PLoS One. 2011; 6: e19534.

Szylberg, L.; Marszałek, A. Diagnosis of Hirschsprung's disease with particular emphasis on histopathology. A systematic review of current literature. Prz. Gastroenterol. 2014, 9, 264–269.

Takanosu, M.; Takanosu, T.; Suzuki, H.; Suzuki, K. Incomplete dominant osteochondrodysplasia in heterozygous Scottish Fold cats. J. Small Anim. Pract. 2008, 49, 197–199.

Tamazian G, Simonov S, Dobrynin P, Makunin A, Logachev A, Komissarov A, Shevchenko A, Brukhin V, Cherkasov N, Svitin A, Koepfli KP, Pontius J, Driscoll CA, Blackistone K, Barr C, Goldman D, Antunes A, Quilez J, Lorente-Galdos B, Alkan C, Marques-Bonet T, Menotti-

Raymond M, David VA, Narfström K, O'Brien SJ. Annotated features of domestic cat - Felis catus genome. Gigascience. 2014 Aug 5;3:13.

Teare, M.D.; Santibanez Koref, M.F. Linkage analysis and the study of Mendelian disease in the era of whole exome and genome sequencing. Brief. Funct. Genomics 2014, 13, 378– 383.

TICA: The International Cat Association. Munchkin. <u>http://tica.org/cat-breeds/item/236</u>. acceso el 11 de febrero,2022,

Todhunter RJ, Garrison SJ, Jordan J, Hunter L, Castelhano MG, Ash K, Meyers-Wallen V, Krotscheck U, Hayward JJ, Grenier J. Gene expression in hip soft tissues in incipient canine hip dysplasia and osteoarthritis. J Orthop Res. 2019 Feb;37(2):313-324.

Tsai KL, Clark LA, Murphy KE. Understanding hereditary diseases using the dog andhuman as companion model systems. Mammalian genome: official journal of theInternational Mammalian Genome Society. 2007;18(6-7):444-51.

Tzavlaki K, Moustakas A. TGF-β Signaling. Biomolecules. 2020 Mar 23;10(3):487.

van Meurs JB, Boer CG, Lopez-Delgado L, Riancho JA. Role of Epigenomics in Bone and Cartilage Disease. J Bone Miner Res. 2019 Feb;34(2):215-230.

Van Steenbeek, F. G., Hytonen, M. K., Leegwater, P. A., and Lohi, H. (2016). The canine era: the rise of a biomedical model. Anim. Genet. 47, 519–527.

Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California,

Davis. https://vgl.ucdavis.edu/

VetGen. https://www.vetgen.com/index.html/

Vink JM, Boomsma D. Gene finding strategies. Biol Psychol. 2002; 61: 53–71. Vahidnezhad H, Youssefian L, Jazayeri A, Uitto J. Research Techniques Made Simple: Genome-Wide Homozygosity/Autozygosity Mapping Is a Powerful Tool for Identifying Candidate Genes in Autosomal Recessive Genetic Diseases. J Invest Dermatol. 2018; 138: 1893–1900.

Wang, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature 456, 470–476 (2008).

Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. American journal of medical genetics. Part A. May; 2011 155A(5):943–968.

Westworth, D.R.; Sturges, B.K. Congenital spinal malformations in small animals. Vet. Clin. N. Am. Small Anim Pract. 2010, 40, 951–981.

Willet, C.E.; Makara, M.; Reppas, G.; Tsoukalas, G.; Malik, R.; Haase, B.; Wade, C.M. Canine disorder mirrors human disease: Exonic deletion in HES7 causes autosomal recessive spondylocostal dysostosis in Miniature Schnauzer Dogs. PLoS ONE 2015, 10, e0117055.

Williams, F.M., 2009. Biomarkers: in combination they may do better. Arthritis Research and Therapy 11, 130.

World Small Animal Veterinary Association. https://wsava.org/

Xu, X.; Sun, X.; Hu, X.-S.; Zhuang, Y.; Liu, Y.-C.; Meng, H.; Miao, L.; Yu, H.; Luo, S.-J. Whole Genome Sequencing Identifies a Missense Mutation in HES7 Associated with Short Tails in Asian Domestic Cats. Sci. Rep. 2016, 6, 31583.

Yamazaki A, Edamura K, Tomo Y, Seki M, Asano K. Variations in gene expression levels with severity of synovitis in dogs with naturally occurring stifle osteoarthritis. PLoS One. 2021 Jan 28;16(1):e0246188.

Young, A. and Bannasch, D. (2006) Morphological variation in the dog. In The Dog and Its Genome (Ostrander, E.A. et al., eds), pp. 47–65, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yuasa, K.; Uehara, S.; Nagahama, M.; Tsuji, A. Transcriptional regulation of cGMPdependent protein kinase II (cGK-II) in chondrocytes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010, 74, 44–49.

Zilberberg, L.; Todorovic, V.; Dabovic, B.; Horiguchi, M.; Couroussé, T.; Sakai, L.Y.; Rifkin, D.B. Specificity of latent TGF-β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: Role of fibrillins and fibronectin. J. Cell. Physiol. 2012, 227, 3828–3836.