

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

163

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE MUTACIONES EN EL EXON 3 DEL GEN DE LA COLAGENA TIPO X (COL10A1) COMO CANDIDATO DE LA DISPLASIA METAFISIAL EN LAS RAZAS DE PERROS BASSET HOUND Y DACHSHUND

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

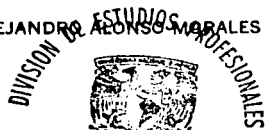
B I O L O G O

P R E S E N T A :

NOE REYES GUTIERREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES



2003 FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

I



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# PAGINACIÓN

# DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Evaluación de Mutaciones en el Exón 3 del Gen de la Colágena Tipo X (Col10A1) como Candidato de la Displasia Metafisial en las Razas de Perros Basset hound y Dachshund"

realizado por Noé Reyes Gutiérrez

con número de cuenta 9107950-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Propietario Dr. José Simón Martínez Castañeda

Propietario Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera

Suplente Biol. Beatriz Rodarte Murguía

Suplente M. en I.B.B. Claudia Andrea Segal Kischinevsky

~~TRUJILLO~~  
J. A. J. J. J. J.  
C. H. B. S.  
R. L. T.  
K. S.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

## DEDICATORIA

Ante todo quiero dedicar con mucho cariño este trabajo a mi familia: mi madre **Reynalda Gutiérrez Ortega**, mis queridos hermanos, **Rodrigo y Daniel** y a mis tíos y tías **Martín Gutiérrez, Soledad Gutiérrez, Luis Gutiérrez, Liborio Gutiérrez, Felipe Gutiérrez y Gloria Gutiérrez** quienes me han dado todo su apoyo para terminar esta empresa y por ayudar a formar la persona que soy ahora. El verdadero esfuerzo ha sido de ustedes, al darme su tiempo y dedicación. Por y para ustedes, es que tercamente he tratado de cumplir este objetivo, a pesar de los múltiples problemas que hemos pasado. Las palabras faltan, pero sólo busco la oportunidad de regresar, con lo que se, lo que he recibido. Abuelo **Felipe**, desafortunadamente no pudiste ver los resultados de lo que comenzaste a guiar en mí, pero esto también es para ti con mucho cariño. Con todos ellos tengo una deuda gigantesca que estoy gustoso de pagar.

A mis amigos Cirilos, **José Meléndez e Israel Sandoval** la hemos pasado muy bien: el bajo barato que conseguimos y que casi nos roban, el traje de la Zona Rosa, el CCH, las fotos... me he divertido mucho junto a ustedes.

Quiero hacer reverencias a todos mis amigos con los que compartí la carrera, especialmente a **Ariadna Álvarez, Ivette Reza, Rómel Hernández, José Romo, Verónica Becerra y Cristina García** (donde quiera que te encuentres), porque ustedes han sido quienes me han inspirado a seguir con todo esto y gracias a eso es que he logrado este acontecimiento.

También quiero dedicar con mucho cariño a todos mis amigos en el laboratorio, con quienes he pasado buenos momentos y quienes siempre me animaron a continuar: **Refugio Cortés, Belem Huerta, Simón Martínez, Raúl Ulloa, Silvia Reyes, Esperanza García, Claudia Alcazar, Adli Oropeza, Felicitas Vázquez, Dalila D'Ascencao, Mario Espinosa, Espiridión Ramos, Beatriz Salas, Verónica Ocampo, Simone Iwabe, Rebeca Acosta, Iván Leyva, Cristina López y Jesús Saldivar.**

Este es un saludo especial para **Daniela Polla**, todo lo que hemos platicado me ha ayudado mucho a mantenerme animado. Deseo que esta amistad dure mucho y crezca aún más.

A **Rosa María Acosta** por brindarme su sincera amistad y cariño. Es una lástima que muchas cosas no hayan tenido oportunidad de darse.

Y a mi padre, **Emiliano Reyes**, donde quiera que estés. A pesar de todo, te doy las gracias. Tal vez el haber padecido tu ausencia prematura me permitió tener una visión más objetiva del lugar donde estoy parado, quien soy y que quiero.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de aprender y crecer entre su generosos espacios; a la **Facultad de Ciencias** por que ahí encontré un lugar donde generar más preguntas y buscar caminos y al **Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** porque en esos dos lugares tuve la enorme fortuna de conocer gente muy valiosa y con gran capacidad de la cual aprendí mucho.

Al **Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales**, mi tutor, por permitirme participar en este proyecto de investigación y a la **Biól. Amanda Gayosso** por su ayuda técnica.

Agradecimientos especiales:

Al **Dr. Simón Martínez Castañeda**, parte medular de este trabajo, por su guía en el desarrollo de esta investigación, por la revisión y las notables observaciones que hizo al escrito.

A la **M. en C. Belem de Jesús Huerta**, por su apreciada y benéfica enseñanza en la parte de secuenciación.

A la **Dra. Refugio Cortés Fernández** por su generosa, valiosa y desinteresada ayuda en los problemas que se me presentaron en algún momento del trabajo y por estar ahí siempre.

A la **M. en C. Silvia Reyes Maya**, a la **M. V. Z. Dalila D'Ascencao** y a la **M. V. Z. Cristina López López** por haberme dado la oportunidad de serles útil; para mí significó mucho y yo aprendí mucho de eso y en general porque todos ellos me han enseñado lo que se, por su ayuda en la realización de mi trabajo, por ser mis amigos y permitirme compartir cosas que hacían más agradable mis estancia en el laboratorio y por el entusiasmo transmitido que me ha permitido continuar.

También quiero dar las gracias al **Biól. José Alfonso Vilchis Peluyera**, a la **Biól. Beatriz Rodarte Murguía** y a la **M. en I. B. B. Claudia Andrea Segal Kischinevsky** por aceptar ser parte del Jurado en este trabajo y por ayudarme en la revisión del manuscrito, al que le hicieron valiosas observaciones que mejoraron su contenido.

A la **Biól. Leonor Enciso** le agradezco su ayuda en la lectura de las secuencias y sus sugerencias en la realización de las reacciones de secuenciación.

A **DGAPA**, por el financiamiento de este proyecto mediante el programa **PAPIIT IN204799 UNAM** del cual fui becario.

A toda la gente que ha logrado dar una explicación objetiva y congruente del mundo que observo. Sin la ciencia, sin la gente pensante que emplea el conocimiento con prudencia, este mundo sería un caos más grande.

Finalmente, sin la música mi estancia aquí sería casi insoportable. Gracias a las bandas **Soda Stereo, Lucybell, Radiohead, U2, Beatles** por hacer más agradable cada momento; hay una lista gigantesca, que por falta de espacio no puedo reproducir. También gracias a toda la gente que labora en las estaciones de radio **Orbita FM, Radio Educación, 98.5, Track 1320 y Radio UNAM**, escuchar su música y sus comentarios es muy gratificante mientras se trabaja.

# ÍNDICE

	....Página
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	VIII
Índice de figuras.....	X
Índice de tablas.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Características de la colágena tipo X.....	5
II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	10
2.1. Justificación.....	10
2.2. Objetivos.....	10
2.2.1. Objetivos generales.....	10
2.2.2. Objetivos particulares.....	11
2.3. Hipótesis.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Razas estudiadas y extracción de DNA genómico de perros.....	12
3.2. Reacciones de PCR.....	12
3.3. Purificación de fragmentos.....	13
3.4. Clonación de los fragmentos de PCR.....	13
3.4.1. Ligación a pBS/EcoRV y transformación en células competentes DH10b.....	13
3.4.2. Selección y análisis de colonias recombinantes.....	14
3.5. Purificación de DNA de plásmidos recombinantes y reacción de secuenciación.....	14
3.6. Edición y alineamiento de secuencias.....	15



	Página
IV. RESULTADOS.....	16
4.1. Amplificación del exón 3 del gen COL10A1 que codifica para la colágena tipo X.....	16
4.2. Clonación.....	17
4.3. Purificación de DNA de plásmidos recombinantes.....	18
4.4. Análisis de secuencias obtenidas.....	19
4.4.1. Edición de secuencias.....	19
4.4.2. Secuencia consenso resultante y traducción a proteínas.....	20
4.4.3. Alineación de secuencias: similitudes y diferencias entre especies.....	22
4.4.3.1. Comparación de secuencias de DNA.....	22
4.4.3.2. Comparación de secuencias de aminoácidos.....	23
4.4.4. Alineación de secuencias: similitudes y diferencias entre razas....	24
4.4.4.1. Comparación de secuencias de DNA.....	24
4.4.4.2. Comparación de secuencias de aminoácidos.....	26
V. DISCUSIÓN.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37
APÉNDICE I. Purificación de DNA a partir de sangre.....	45
APÉNDICE II. Purificación de DNA a partir de tejido.....	46
APÉNDICE III. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa por sílica.....	47
APÉNDICE IV. Transformación de células competentes DH10b con el vector pBS/EcoRV.....	48
APÉNDICE V. Extracción de plásmidos de bacterias transformantes.....	49
APÉNDICE VI. Secuencia de nucleótidos y traducción teórica de la región codificante del exón 3 del gen col10a1.....	50
APÉNDICE VII. Alineación de las secuencias de nucleótidos del exón 3 del gen COL10A1 en vertebrados.....	52
APÉNDICE VIII. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la colágena tipo X codificadas por el exón 3 del gen COL10A1 de perros.....	57
APÉNDICE IX. Alineación de las secuencias de nucleótidos del exón 3 del gen COL10A1 en perros.....	59
APÉNDICE X. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la colágena tipo X codificadas por el exón 3 del gen COL10A1 de perros.....	63

## RESUMEN

En los seres humanos se han descrito más de 150 osteocondrodisplasias de las que en una tercera parte se ha determinado el gen responsable y los procesos involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Mediante análisis como el mapeo genético o estudios de asociación es posible determinar la participación de algunos genes en la anomalía desarrollada. La mayoría de las osteocondrodisplasias descritas tienen causa en mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para proteínas de la matriz cartilaginosa u ósea que componen el esqueleto. Los estudios de la relación entre los defectos en estas proteínas y la enfermedades con que se han relacionado se han hecho mediante modelos knock out para estas proteínas. El empleo de modelos que ocurren naturalmente también puede ayudar a mejorar el entendimiento del desarrollo esquelético y sus defectos. Mediante un estudio clínico, radiológico e histológico, se ha determinado que las razas de perros Basset hound y Dachshund presentan una osteocondrodisplasia metafisial, con ciertas diferencias entre las razas. Osteocondrodisplasias metafisiales han sido descritas en seres humanos, en especial la Condrosdisplasia Metafisial tipo Schmid, la cual tiene origen en mutaciones en regiones codificantes del gen COL10A1 que codifica para la proteína colágena tipo X, producida específicamente por los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento metafisial.

En este trabajo se intenta establecer si existe una relación entre colágena X y la osteocondrodisplasia en estos perros. Para ello, se determinó la secuencia de nucleótidos de una de las regiones codificantes del gen que codifica para la proteína colágena X con el objeto de detectar mutaciones en alguno de los dominios para los que codifica. Utilizando DNA genómico de individuos de las razas osteocondrodisplásicas Basset hound y Dachshund y de la raza Pastor alemán cuyo fenotipo es longilíneo y por ello se consideró como patrón de comparación, se amplificó mediante PCR el exón 3 del gen COL10A1. El fragmento fue clonado en plásmido, que fue posteriormente recuperado de células bacterianas y usado en reacciones de secuenciación automática por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos. El fragmento amplificado y secuenciado resultó ser de 1868 pb. La secuencia obtenida comienza dos nucleótidos después del reportado para este exón en humanos y termina en el codón de paro. Mediante comparación de la secuencia de nucleótidos se encontró que en el Basset hound existe la delección de un nucleótido C en la posición 112 (nt 7056; Thomas et al, 1991), en tanto en el Dachshund existe la delección de los nucleótidos A 448 y G 449 (nt 7392 y 7393, Thomas et al, 1991), ambas en la secuencia que codifica para la hélice de la proteína. La traducción teórica de las secuencias mutadas del exón 3 en estos

perros, indica que las proteínas serían anormales ya que esta mutación produce un cambio en el marco de lectura de los codones. Ambas proteínas se presume serían truncadas en la hélice colagénica. Aunque, prácticamente todas las mutaciones en el gen de colágena X han sido encontradas en la secuencia que codifica para el dominio carboxilo terminal, estas nuevas mutaciones dan pie para una mayor investigación en aspectos de histoquímica como el rastreo de la proteína para determinar su participación en este tipo de enfermedades.

La secuencia del Pastor Alemán también fue comparada con la secuencia reportada para otras especies como el humano, el bovino y el cerdo. La similitud que guarda con esas secuencias es en promedio del 85%. Entonces el grado de conservación indica la importancia de la proteína en el desarrollo del esqueleto de los vertebrados, en el cual participa.

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización esquemática del gen COL10A1.....	5
Figura 2. Posición relativa de los iniciadores usados para secuenciar la región codificante del exón 3 del gen COL10A1.....	15
Figura 3. Amplificación por PCR del exón 3 del gen COL10A1 de perros a partir de DNA genómico.....	16
Figura 4. Detección de las colonias recombinantes para el exón 3 del gen COL10A1 del Basset hound.....	17
Figura 5. Detección de las colonias recombinantes para el exón 3 del gen COL10A1 del Pastor Alemán y del Dachshund.....	18
Figura 6. Purificación de plásmidos de las clonas que contienen al exón 3 codificante de la colágena X de Basset hound (C157), Pastor Alemán (C261) y Dachshund (C344).....	19
Figuras 7a, 7b y 7c. Mapas de conexión de las secuencias realizadas del exón 3 en los perros Basset hound, Dachshund y Pastor Alemán.....	21
Figura 8. Nucleótidos extras en el dominio NC1 del exón 3 del gen COL10A1 en humano.....	23
Figura 9. Aminoácidos extras en el dominio NC1 de la colágena tipo X del humano.....	23
Figura 10. Delección de un nucleótido en la secuencia del exón 3 del gen COL10A1 del Basset hound.....	25
Figura 11. Delección de 2 nucleótidos en la secuencia del exón 3 del gen COL10A1 del Dachshund.....	25
Figura 12. Nucleótidos extras en el dominio NC2 del exón 3 del gen COL10A1 del perro.....	28
Figura 13. Alineación de aminoácidos altamente conservados en la región NC1 de la colágena tipo X de algunos vertebrados.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones de temperatura y tiempos de los iniciadores ColX2F y ColX4R, para la amplificación del exón 3 del Gen COL10A1 de perros.....	13
Tabla 2. Porcentajes de similitud de la secuencia de DNA del exón 3 de la colágena tipo X entre el Pastor Alemán y 3 especies de vertebrados.....	22
Tabla 3. Porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos del exón 3 de la colágena tipo X entre el Pastor Alemán y 3 especies de vertebrados.....	23
Tabla 4. Porcentaje de similitud de los distintos dominios codificados por el exón 3 entre <i>Canis familiaris</i> (raza Pastor Alemán) y otras especies.....	24
Tabla 5. Descripción de las mutaciones reportadas en la secuencia del gen que codifica para la colágena tipo X.....	32

## INTRODUCCIÓN

Los avances recientes en biología celular y genética molecular han permitido el esclarecimiento de la génesis de muchas displasias esqueléticas. Varias de estas enfermedades tienen un componente genético importante. Algunas siguen un patrón de herencia mendeliano (recesivo o dominante) que puede ser seguido por medio de análisis genéticos. Uno de estos análisis con un gran poder de resolución es el mapeo genético en el que se establece el patrón de herencia de un carácter definido y se compara con el patrón de herencia de regiones cromosómicas altamente variables (marcadores genéticos) en cruzas controladas en una población de organismos o bien aprovechando las variaciones del DNA existentes en pedigríes, en el caso de humanos. Así es posible relacionar regiones cromosómicas definidas (locus) con el fenotipo observado y en un estudio más preciso, con el uso de las herramientas de biología molecular como la clonación y secuenciación, identificar el o los genes presentes en el locus y tratarlos como candidatos responsables del rasgo de interés.

Otra aproximación para la determinación de genes candidatos se puede hacer mediante el estudio de aquellos genes que se ha identificado que participan en fenotipos similares de distintos sistemas biológicos. Un ejemplo lo constituye la relación entre la mutación de la proteína colágena tipo X y cierto tipo de displasia esquelética producida en ratones, relación que fue establecida en familias humanas con miembros afectados por un tipo de osteocondrodisplasia (Wallis *et al.*, 1994).

A la fecha se han encontrado un número relativamente pequeño de genes responsables de sólo algunas de las más de 170 osteocondrodisplasias descritas en seres humanos. Proteínas como las del Receptor 3 del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR 3), Colágena 1, la proteína Oligomérica del Cartilago (COMP), Colágena IX y Colágena II se han establecido como causantes de la Acondroplasia, Hipocondroplasia y Displasia Tanatofórica, de la Osteogénesis Imperfecta, de la Pseudoacondroplasia, la Osteoartritis prematura y Displasia Epifisial Múltiple y de Displasia Espondiloepifisial y de Displasia Kniest respectivamente. Tales enfermedades se deben a mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican a las proteínas antes mencionadas.

Dichos genes están involucrados en el desarrollo de estructuras óseas del esqueleto. Su participación es localizada principalmente en la conformación del cartilago que será reemplazado por tejido óseo en una cascada de eventos coordinados con precisión, en la que la sucesión de tipos celulares y expresión espacio-temporal de genes conduce finalmente a la formación y crecimiento de los

huesos. Estos genes son una muestra de todos los genes que se han propuesto como responsables de osteocondrodisplasias y cuya actividad ha sido resuelta.

Pero aún quedan muchos otros genes candidatos de los que aún no se ha dilucidado por completo su participación; por ejemplo existe evidencia de que la expresión del gen transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) está asociado con la diferenciación de condrocitos en la osificación, ya que la reducción en los niveles de este factor está asociada con la disminución de condrocitos hipertrofos en condrodisplasia en aves (Law *et al.*, 1996). Del mismo modo la proteína parathyroid hormone-related peptid (PTHrP), que se expresa en el pericondrio, se ha demostrado que actúa principalmente como un factor parácrino que promueve la elongación de hueso endocondral retardando el paso de condrocitos en desarrollo a diferenciación terminal en la placa de crecimiento (Lee *et al.*, 1996) y que su sobre-expresión está relacionada con la condrodisplasia tipo Jansen (Weir *et al.*, 1996). Sin embargo, aún no se ha establecido una relación específica entre alguna anomalía natural en estos genes (mutación o fallo en su expresión) y la disrupción del desarrollo de la placa de crecimiento metafisial.

Tales genes candidatos son sujetos factibles a análisis molecular para el esclarecimiento e incluso la diagnosis de osteocondrodisplasias, sin embargo, la baja disponibilidad de material biológico humano limita la obtención de información que ayude al entendimiento de la regulación del desarrollo esquelético. Con el uso de modelos biológicos alternativos es posible el estudio de tales patologías, con las debidas precauciones que se imponen por las diferencias en la macro-organización del esqueleto entre estos modelos animales y el ser humano.

El perro (*Canis familiaris*) podría constituirse como un modelo biológico de estudio del esqueleto debido a que esta especie es morfológicamente la más diversa entre los mamíferos y aún entre los vertebrados. Una gran cantidad de razas refleja la extensiva selección artificial que se ha hecho desde hace cerca de 135,000 años, en el que las variaciones en conformación de cráneo y de extremidades han permitido seleccionar ciertos rasgos que se han logrado perpetuar y que dan las características a cada raza.

Las osteocondrodisplasias también afectan a los perros, pero los casos que se presentan son relativamente pocos, además los análisis muestran variaciones en las características patológicas por lo que los estudios realizados son mínimos y no existe una delimitación clara sobre cada caso; sin embargo, se han descrito características histopatológicas en humanos que en los pocos casos estudiados en perros muestran cierta similitud, por lo que es posible que genes que se encuentran involucrados en las alteraciones esqueléticas de los seres humanos, se encuentren también involucrados en estos perros. Aunque también cabe la posibilidad que otros genes aun no descritos, que regulan el desarrollo óseo en mamíferos, sean los responsables de las características esqueléticas de estas razas.

Por tal motivo, es importante investigar las bases genéticas y moleculares del desarrollo esquelético y la regulación del crecimiento en esta especie, esto podría facilitar el entendimiento de algunas de las diferentes osteocondrodisplasias del esqueleto que se presentan en los humanos.

Los esfuerzos en caracterizar de manera sistemática las patologías en perros comienzan a incrementarse, principalmente por que se ha comenzado a reconocer que el control de enfermedades hereditarias puede tener un impacto económico positivo para los criadores, como lo muestran los programas de eliminación de enanismo en el Alaska Malamute.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

Las osteocondrodisplasias en perros no han sido estudiadas sistemáticamente y debido a ello no existe una clasificación clara de estas enfermedades caninas como la que existe en los seres humanos. Sin embargo, una característica común en los perros afectados es un acortamiento y ensanchamiento diafisial de los huesos largos, y en ocasiones, alteraciones de las vértebras y del cráneo. Esto se manifiesta principalmente como enanismo desproporcionado, es decir, una disparidad entre el crecimiento de extremidades y el resto del cuerpo.

Existen pocos reportes de osteocondrodisplasias esporádicas en perros como el Poodle miniatura, Alaska Malamute, Elkhound Noruego, Gran Pirineos, Beagle, Cobrador de Labrador entre otros (Sande and Bingel, 1982; Everts *et al.*, 2000). En algunos casos estas osteocondrodisplasias caninas son similares a un tipo definido de displasia esquelética reportada en seres humanos, pero en otros casos se asemejan a más de una.

Por otro lado, en los perros existen algunas razas que debido a la selección de las que han sido objeto, mantienen una conformación del esqueleto con características que recuerda a las osteocondrodisplasias que existen entre los seres humanos. A estas razas se les denomina acondroplásicas (término que no define bien las características esqueléticas de estos perros) y en este grupo están situados el Bulldog, Basset hound, Dachshund y otras similares. Se considera por el común de criadores que los rasgos de estas razas de perros no son patológicos y debido a eso no existen estudios clínicos, bioquímicos ni genéticos profundos y por supuesto los genes que participan en el fenotipo no han sido identificados aún.



Los perros como el Basset hound y el Dachshund se caracterizan por tener las patas extremadamente cortas y el resto del cuerpo normal. Son pocos los estudios clínicos realizados en estas razas (Stigen and Christensen, 1993) pero no se ha definido claramente las características patológicas presentes. Recientemente Martínez (2002) realizó un estudio clínico en estas dos razas en el que los datos radiográficos y de histología indican una osteocondrodisplasia metafisial caracterizada por un enanismo tipo rizo-mesomélico, con alteraciones epimetafisiales en el Basset hound y espónkilometafisiales en el Dachshund. Estas razas tienen severo acortamiento proximal y medial de los huesos que forman a las extremidades. La examinación de la placa de crecimiento metafisial mostró una zona de condrocitos proliferantes irregular y separados por septos densos y abundantes de apariencia fibrilar en el Basset hound, en tanto en el Dachshund los condrocitos proliferantes se arreglan en grupos. La característica más sobresaliente en ambas razas es la escasa cantidad de condrocitos y cartilago hipertrófico y la ausencia de cartilago en degeneración. Estas razas de perros no muestran cambios significativos en la columna vertebral ni en el cráneo.

El tipo de osteocondrodisplasia que distingue a estos perros es semejante a un tipo de osteocondrodisplasia metafisial descrita en seres humanos, que se caracteriza por acortamiento de las extremidades, piernas curvadas, coxa vara (reducción en el ángulo entre el cuello femoral y el eje óseo), ensanchamiento de las metafisis de huesos largos y cuya ausencia de cartilago hipertrófico en la placa de crecimiento metafisial es notable.

Esta enfermedad está relacionada con numerosas mutaciones en el gen COL10A1 (que codifica para la colágena tipo X) y se presentan en el exón mayor, principalmente en una región codificante para el dominio carboxilo terminal (Warman *et al.*, 1993; McIntosh *et al.*, 1994; Dharmavaram *et al.*, 1994; Wallis *et al.*, 1994; Pokharel *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 1995; Bonaventure *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1995; Kwan *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1998; Ikegawa *et al.*, 1998; Sawai *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2000), aunque también se han descrito mutaciones en otras regiones del gen (Ikegawa *et al.*, 1997). Estas mutaciones producen defectos en la biosíntesis y organización molecular de la colágena tipo X que están involucrados en las osteocondrodisplasias que afectan a la placa de crecimiento primario.

Se ha producido evidencia directa para la asociación entre mutaciones en la colágena tipo X y las anomalías en la placa de crecimiento, por estudios de modelos de ratones transgénicos que muestran anomalías que guardan similitud con ciertos tipos de osteocondrodisplasias humanas. Para probar el papel de la colágena tipo X en la morfogénesis esquelética, Jacenko *et al.* (1993a, 1993b, 1996) generaron ratones transgénicos que expresan una variante deficiente de la colágena X que consistió en un cDNA aviar con deleciones en marco dentro del dominio helicoidal, tanto de 21 o 293 aminoácidos. Los productos

transgénicos fueron diseñados para crear un fenotipo de interferencia dominante para la colágena tipo X, de modo que la función de la proteína endógena pudiera ser anulada debido a la competencia por la trimerización de una variante invalidada.

La expresión de los productos en el cartílago hipertrófico del ratón resultó en defectos hematopoyéticos. Los elementos esqueléticos producidos por osificación endocondral, tal como los huesos largos, vértebras, cóndilos y mandíbula fueron afectados. Los fenotipos variaron de letal a enanismo variable. El grado de enanismo varió de severo (un tercio del tamaño y peso de un ratón normal) a levemente distinguible. Mediciones histológicas revelaron compresión de la placa de crecimiento, específicamente de la zona de cartílago hipertrófico (a -45%), donde los condrocitos hipertróficos fueron reducidos tanto en tamaño como en número; además de que la trabécula metafisial (compuesta de núcleos de cartílago hipertrófico con tejido óseo recién depositado) fue también significativamente disminuida. Las zonas de condrocitos en reposo y condrocitos proliferantes a menudo aparecen menos afectadas. Exámenes ultraestructurales revelaron anomalías en la distribución de componentes de la matriz (Jacenko *et al.*, 2001).

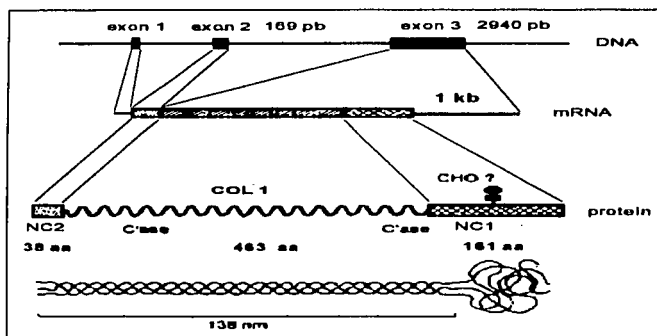
La relación entre la condrodisplasia metafisial y diversas mutaciones en el gen codificante para la colágena tipo X encontradas en pacientes afectados, y los diversos experimentos de mutación dirigida sobre esta proteína que producen osteocondrodisplasias metafisiales en modelos animales, permiten proponer que mutaciones en regiones del gen codificante de la colágena tipo X, pueden estar involucradas en el fenotipo osteocondrodisplásico de razas como el Basset hound y Dachshund.

El estudio de este gen puede ayudar a entender por una parte, las relaciones entre varias osteocondrodisplasias en humanos y algunas osteocondrodisplasias animales y proveer datos que ayuden en un diagnóstico exacto de estas enfermedades. Por otro lado, ayudarán a entender los procesos normales del desarrollo óseo en vertebrados, especialmente en mamíferos.

## **1.2. Características de la colágena tipo X**

El gen que codifica a la colágena tipo X (COL10A1) en todos los vertebrados estudiados (ave, bovino, humano y ratón) a diferencia de otros genes que codifican a otras colágenas, está compuesto por tres exones (LuValle *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1991; Reichenberger *et al.*, 1992; Apte and Olsen, 1993; Kong *et al.*, 1993), como se muestra en la figura 1. Los estudios en el ratón indican que el primer exón contiene una secuencia corta no traducida y tres posibles sitios de iniciación de transcripción los cuales aparentemente funcionan de manera

alternada, ya que en ensayos de transfección con genes reporteros se han encontrado tamaños de 63, 62 y 40 pb para el exón 1 (Kong *et al.*, 1993). Entre el exón 1 y el 2 se encuentra un intrón de aproximadamente 550 pb. El exón 2 de 169 pb se transcribe en 15 pb de secuencia no traducida, 51 pb que codifican para el péptido señal y la mayor parte (100 pb) del dominio amino terminal. El segundo intrón tiene un tamaño de entre 2.4 y 3.0 kb y separa al exón 3 que posee un tamaño de 2.9 kb. Este exón se transcribe en 14 pb que codifican para parte del dominio amino terminal, el dominio colagénico completo de 1389 pb, el dominio carboxilo terminal (NC1) de 483 pb (que incluye al codón de paro) y una región no traducida de 1054 pb en el humano y 965 pb en el ratón. Incluye también 2 sitios potenciales de poliadenilación.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Organización esquemática del gen COL10A1. Se muestran el mRNA transcrito y la proteína

La regulación del gen codificante de la colágena tipo X está dada por dos secuencias consenso TATA, aproximadamente en las posiciones -270 y -110 del primer codón ATG. Apparently, la caja TATA más próxima es preferentemente usada (Apte and Olsen, 1993). Además, cerca de la región control se han encontrado sitios potenciales de unión de múltiples reguladores (factores de transcripción y represores) como proteínas homeobox (MAT  $\alpha 2$ , NF-A2) y metabolitos (como el ácido retinoico) entre otros, que junto con elementos transcripcionales presentes aproximadamente 4 kb corriente arriba de la región control (Beier *et al.*, 1997), regulan y restringen la expresión del gen COL10A1 a condrocitos hipertróficos (LuValle *et al.*, 1989, LuValle *et al.*, 1993, Long *et al.*, 1998, Dourado and LuValle, 1998). La regulación de este gen es a nivel transcripcional (Luvalle *et al.*, 1989, Lissenmayer *et al.*, 1991) y la liberación del

péptido señal antes de la exportación de la proteína hacia la matriz es aparentemente la única modificación postraduccional.

El gen que codifica para la colágena tipo X produce una proteína no fibrilar de cadena corta, formadora de triples hélices compuestas por la misma unidad proteica (homotrímero) con un peso aproximado de 59 kDa (Schmid and Conrad, 1982a; Schmid and Lisenmayer, 1983; Quarto *et al.*, 1985). Los estudios bioquímicos (Schmid *et al.*, 1984b) y de secuenciación (Ninomiya *et al.*, 1986; LuValle *et al.*, 1988) indican que está conformada por un dominio de 38 aminoácidos en su dominio amino terminal (NC2), un dominio triple helicoidal de 463 aminoácidos y un dominio carboxilo terminal (NC1) de 161 aminoácidos en el ser humano y de 151 en el bovino.

La hélice de colágena tipo X, que es resistente a pepsina, comprende más de 2/3 del tamaño de la proteína y tiene 33% de sus residuos como glicina, 25% como iminoácidos y un alto nivel de hidroxiprolina e hidroxilisina en forma glicosilada. En bovino (Grant *et al.*, 1985), pero no en otras especies (aves y humanos), está estabilizada por puentes disulfuro formados por residuos de cisteína. Los altos niveles de hidroxilisina explican la alta estabilidad térmica (47°C) de la proteína (Schmid and Lisenmayer, 1984a; Wagner *et al.*, 2000).

El dominio NC1 es altamente hidrofóbico debido a la presencia de un grupo de residuos aromáticos (Dublet *et al.*, 1999; Quarto *et al.*, 1985); contiene todos los residuos triptófano, la mayor parte de residuos de tirosina, más de la mitad de fenilalanina y metionina y es rico en serina, treonina, valina, isoleucina y leucina. La mayoría de los aminoácidos en este dominio están altamente conservados; estructuralmente tiene una elevada similitud con los dominios de otras colágenas y otras proteínas fibrilares triplehelicoidales.

Este dominio es el responsable de la trimerización en la colágena tipo X (Zhang and Chen, 1999) e incluso de multimerización al hibridarlo con otros motivos proteinicos distintos (Frischholz *et al.*, 1998). NC1 le confiere a la colágena tipo X una alta estabilidad térmica, demostrada al tratarla bajo condiciones desnaturalizantes para otras proteínas (altas temperaturas o con agentes reductores) sin alterar su conformación nativa (Zhang and Chen, 1999). En experimentos *in vitro* con colágena tipo X purificada se forman "racimos" multiméricos vía NC1: se crean estructuras con un nódulo central de terminales carboxilo y las hélices radiando hacia fuera y en periodos mayores de incubación se crean mallas hexagonales por asociación lateral de los dominios helicoidales de "racimos" adyacentes (Kwan *et al.*, 1991), pero no hay evidencia de que esas estructuras se presenten *in vivo*.

La organización estructural de la colágena tipo X ocurre en dos formas dentro de la matriz. Una es formando *in vivo* finos filamentos pericelulares, asociados a las colágenas tipo II/IX/XI pre-existentes (Schmid and Lisenmayer,

1990), la otra *in vitro*, es ensamblada como una malla, asociación debida exclusivamente a su dominio COOH<sup>-</sup> terminal (Frischholz *et al.*, 1998). La colágena tipo X produce acumulación de proteoglicanos y aparentemente una fase estacionaria en la matriz en la que no hay difusión de moléculas grandes, por ejemplo nueva infiltración de colágena tipo X exógena (Chen *et al.*, 1992).

Esta proteína es formada de *novo* y de modo exclusivo (Kielty *et al.*, 1985; Schmid and Conrad, 1982b; Schmid and Lisenmayer, 1983; Long and Lisenmayer, 1995) por los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento metafisaria de los huesos que se desarrollan por osificación endocondral, (Kwan *et al.*, 1986; Ayad *et al.*, 1987; Summers *et al.*, 1988; Kirsch and von der Mark, 1990; Kirsch and von der Mark, 1991a; Marriot *et al.*, 1991), costillas y vértebras (Gibson and Flint, 1985) y en la reparación de fracturas tibiales (Grant *et al.*, 1987) y se ha encontrado presente también en la placa formadora de dientes.

La osificación endocondral es iniciada cuando los condrocitos en el centro del templado de cartilago son estimulados a proliferar y a diferenciarse a través de estados de maduración e hipertrofia. El proceso radia hacia fuera con la formación de la placa de crecimiento hacia las partes finales de los huesos largos que separa la epífisis cartilaginosa distal de la diáfisis medial. Los condrocitos dentro de la placa de crecimiento están organizados en columnas y la anchura de cada placa de crecimiento es mantenida por la proliferación en el margen epifisial balanceado por pérdida celular en el margen diafisial. En la región de hipertrofia celular, la matriz rodeante y el tejido vascular sufren calcificación. Los condrocitos hipertróficos permiten la invasión de osteoblastos y el cartilago es reemplazado por hueso (Bloom y Fawcett, 1987).

El crecimiento longitudinal de los huesos largos durante el periodo de desarrollo del individuo, tanto en la etapa fetal como en la infancia y hasta la adolescencia, es regulado por la presencia de esta placa de crecimiento. Esta porción de cartilago permanece entre la epífisis y la metáfisis durante la osificación de los huesos largos. El constante reemplazamiento de cartilago por hueso es el fundamento de este crecimiento longitudinal; el espesor de la placa de crecimiento se mantiene aproximadamente constante, puesto que la proliferación de las células cartilaginosas es equivalente a la eliminación de cartilago. Pero cuando se acerca el final del periodo de crecimiento, la proliferación cartilaginosa disminuye gradualmente y la placa de crecimiento es eliminada por la formación constante de hueso desde el extremo diafisario del cartilago hasta la parte epifisial. Este proceso que se denomina cierre de la epífisis, contribuye a que finalmente la diáfisis se una con la epífisis a lo largo de la línea epifisaria y por consecuencia, no es posible el posterior crecimiento longitudinal del hueso (Bloom y Fawcett, 1987).

Aunque no se conoce cuál es el papel de la colágena tipo X dentro de la osificación endocondral, se ha postulado que altera la matriz cartilaginosa

X tiene dos sitios de corte por colagenasa (Schmid *et al.*, 1986)- para posteriormente ser sustituida por tejido óseo. Vesículas de la matriz que rápidamente acumulan  $Ca^{2+}$  y que están involucradas en el proceso de mineralización (Kirschand von der Mark, 1991b) tienen alta afinidad transitoria a las colágenas tipo II y tipo X, principalmente a los dominios no helicoidales. La presencia de las colágenas tipo II y tipo X intactas es de particular importancia en la estimulación de las vesículas para acumular  $Ca^{2+}$ , pero una vez formado un complejo de las vesículas con otras proteínas, las colágenas no son ya necesarias (Kirsch and Wuthier, 1994).

El papel de la colágena tipo X en la osteocondrodisplasia metafisial aún no es completamente claro. Kwan *et al.*, (1997) sugiere que la colágena tipo X tiene un papel en la distribución normal de vesículas de la matriz y de proteoglicanos dentro de la placa de crecimiento. Existen reportes que evidencian la importancia de defectos (mutaciones) del exón 3, especialmente del dominio COOH-terminal, en la determinación del fenotipo osteocondrodisplásico en humanos. Se han estudiado la expresión de mRNA y de la proteína y se han encontrado sustituciones nucleotídicas que resultan en una terminación prematura del polipéptido (Chan *et al.*, 1998). En otros estudios (Chan *et al.*, 1996) se han introducido alteraciones en este dominio como en la cadena  $\alpha 1(X)$  en cDNA que incluyen sustituciones y deleciones, con el resultado de que estas proteínas fueron incapaces de ensamblarse en homotrimeros al ser expresadas *in vitro*. Resultados similares se han reportado cuando se co-expresan con cDNA normal. La co-expresión de moléculas mutantes con cDNA normal por transfección celular revela que la proteína puede no ser secretada de las células, pero tampoco pudo ser acumulada, sugiriendo la posibilidad de que fue rápidamente degradada (Wilson *et al.*, 2002). En experimentos con ratones trasgénicos que expresan colágena tipo X con una deleción en el dominio helicoidal, el fenotipo osteocondrodisplásico (anatómico e histológico) parece ser resultado de la condición heterocigótica provocada.

## II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. Justificación

El presente estudio intenta explorar el papel del exón 3 del gen de la colágena tipo X en el fenotipo osteocondrodisplásico en razas definidas de perros (*Canis familiaris*) como el Basset hound y el Dachshund. En este proyecto se ha propuesto al gen que codifica para la colágena tipo X (COL10A1) como un gen candidato responsable de osteocondrodisplasias metafisiales debido a las características clínicas e histológicas encontradas en estas razas de perros, las cuales guardan similitudes con ciertas osteocondrodisplasias metafisiales que se presentan en humanos.

La elección del gen codificante de la colágena tipo X se debe a los numerosos reportes de mutaciones en la secuencia del gen en pacientes con osteocondrodisplasia metafisial y a los diversos experimentos en los que mutaciones creadas en la molécula producen alteraciones en el desarrollo óseo de animales modelo que asemejan osteocondrodisplasias metafisiales.

Así, se desea determinar si existen diferencias en la secuencia de bases de las regiones codificantes del gen de la colágena tipo X (exón 3) en las razas de perros con fenotipo osteocondrodisplásico Basset hound y Dachshund al compararlas con la raza Pastor Alemán cuyo fenotipo es longilíneo, y con ello generar información que permita delinear metodologías de estudio que ayuden a entender las causas de displasias óseas que afectan a estas razas de perros.

La presencia de mutaciones en este gen permitirá desarrollar ensayos funcionales de la molécula para definir su participación en el acortamiento de los huesos largos en las razas de perros como el Basset hound y el Dachshund.

### 2.2. Objetivos

#### 2.2.1. Objetivo general

Obtener la secuencia de nucleótidos de una región codificante del gen de la colágena tipo X (COL10A1) en perros de razas Basset hound, Dachshund y Pastor Alemán.

### **2.2.2. Objetivos particulares**

Amplificar y clonar el exón 3 del gen que codifica para la colágena tipo X en las razas osteocondrodisplásicas Basset hound y Dachshund y en la raza con fenotipo longilíneo Pastor Alemán.

Determinar la secuencia de nucleótidos mediante el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos de los fragmentos obtenidos por PCR.

Establecer mediante alineación de las secuencias obtenidas para cada raza, si existen diferencias en la secuencia de nucleótidos del exón 3 del gen que codifica para la colágena tipo X.

Establecer la homología y el grado de similitud de la secuencia nucleotídica de la región codificante del exón 3 de colágena tipo X entre el perro y otros vertebrados.

### **2.3. Hipótesis**

Existen mutaciones en el gen que codifica para la colágena tipo X (COL10A1) en las razas de perros con fenotipo osteocondrodisplásico (Basset hound y Dachshund) que no existen en razas de perros con fenotipo longilíneo (Pastor Alemán).



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Razas estudiadas y extracción de DNA genómico de perros

Para el estudio se obtuvo DNA a partir de sangre o tejido hepático de 1 individuo de tres razas distintas de perros: Pastor Alemán, Dachshund y Basset hound. La primera raza considerada con fenotipo longillíneo y las últimas dos razas son consideradas osteocondrodisplásicas, de acuerdo a las características clínicas descritas en estas razas (Martínez, 2002).

Para la extracción de DNA de linfocitos (Apéndice I), se emplearon de 0.5 a 2 ml de sangre periférica preservada en EDTA. También se extrajo DNA a partir de 5 gr de tejido (Apéndice II), esto utilizando principalmente hígado de perros sacrificados de las razas antes descritas. El DNA se cuantificó por fluorometría usando el colorante 33258 de Hoechst, en un fluorómetro DyNA Quant 200, Hoefer.

#### 3.2. Reacciones de PCR

El exón 3 del gen COL10A1 (1868 pb en el humano) fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction) que codifica para una parte del dominio amino terminal, los dominios helicoidal y carboxilo terminal de la proteína colágena tipo X. El exón contiene una región 3' no traducida, la cual no fue amplificada.

En la amplificación se usaron un par de iniciadores degenerados diseñados a partir de secuencias reportadas para el gen del humano y del bovino (Thomas *et al.*, 1991). Estos son: el iniciador ColX2F 5' TAK CAS TRA GAG GAG AGC AA 3', que se asienta al inicio de la región 3' del exón que codifica para la hélice colagénica; y el iniciador ColX4R 5' TCA CAT TGG AGC CAC YAR GAA 3', que se asienta en la región 3' codificadora del dominio carboxilo terminal y que termina en el codón de paro. Como molde se usó el DNA de un individuo de las tres razas de perros: Basset hound, Dachshund y Pastor Alemán.

La PCR se realizó en 20  $\mu$ l conteniendo amortiguador (10 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl, 10  $\mu$ g/ml de gelatina), 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.15 mg/ml BSA, 1% Triton X-100, 0.2 mM DNTP's, iniciadores a 1  $\mu$ M cada uno, 0.5 U de DNA Taq Polimerasa y 100 ng de DNA. Las reacciones se realizaron en un termociclador Techne mod. FTGENE2D. Las condiciones para la amplificación fueron estandarizadas para lograr producir los fragmentos deseados con la mayor fidelidad, con las temperaturas descritas en la tabla 1. Con el objeto de clonar, se adicionó una

"cola" de adeninas al extremo 3' de los fragmentos amplificados mediante una extensión final de 15 min. en las PCR' s.

**Tabla 1. Condiciones de temperatura y tiempos para los iniciadores ColX2F y ColX4R para la amplificación del exón 3 del gen COL10A1 de perros.**

Desnaturalización inicial	94° C durante 3 min.	30 ciclos
Desnaturalización	94° C durante 30 seg	
Hibridación	59° C durante 30 seg	
Extensión	72° C durante 1 min. 30 seg	
Extensión final	72° C durante 3 min.	

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### 3.3. Purificación de fragmentos

Los fragmentos amplificados por PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TBE (0.44 M Tris, 0.44 M ácido bórico, 0.01 M EDTA), con un voltaje de 10 volts/cm; las muestras de PCR se mezclaron con buffer de carga (25% Ficoll, 0.2 M EDTA, 0.1% azul de bromofenol). Se usó DNA de Lambda digerido con *BstEII* como marcador de tamaño molecular. El DNA se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP mod. White/UV TMW-20 Transiluminator, con una tinción previa en una solución (5 ug/ml) de bromuro de etidio durante 5 min, seguido de un lavado en agua por 5 min.

Los fragmentos producidos se purificaron a partir del gel de agarosa mediante el método de Boyle y Lew (1995) (Apéndice III).

### 3.4. Clonación de los fragmentos de PCR

#### 3.4.1. Ligación a pBS/EcoRV y transformación de células competentes DH10B

Se usó 50 ng del plásmido de clonación pBS (digerido con la enzima *EcoRV*, y con una "cola" de Timina en los extremos 5') y 100 a 150 ng del fragmento de PCR. La ligación se realizó en 20 ul de reacción con buffer de ligación para extremos romos (25mM Tris-HCl pH 7.8; 10mM MgCl<sub>4</sub>, 4mM ATP, 15% Ficoll 400), 2.5 % Polietilenglicol y 10U de T4 DNA Ligasa. La mezcla se incubó a 4 °C por 12 hr.

Para la transformación se utilizaron 100 µl de células competentes *E.coli* DH10B y se mezclaron con 20 ng del producto de ligación. La transformación se

realizó mediante choque térmico (Apéndice IV). Todas las células fueron esputuladas en cajas petri con LB-agar, 100 ug/ml Xgal; 100 µg/ml ampicilina, 100 mM IPTG y llevadas a incubación por toda la noche a 37° C.

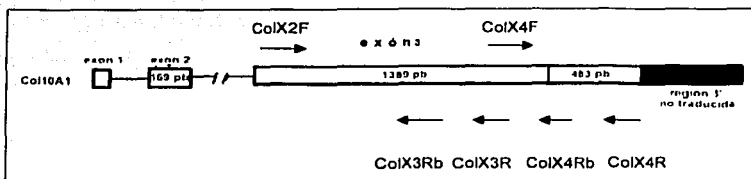
### **3.4.2. Selección y análisis de colonias transformantes**

La selección de las colonias transformadas toma ventaja del sistema de selección de color blanco/azul en el que las células blancas son recombinantes. Una metodología rápida, sencilla y precisa consiste en realizar un PCR directo de las colonias presuntamente positivas. Brevemente: parte de la colonia se tomó y sembró en medio LB agar-ampicilina, el resto fue resuspendido en 100 µl de H<sub>2</sub>O dd estéril y lisada a 94 °C por 10 min. De este lisado se tomaron 1 a 2 µl para realizar un PCR con los iniciadores específicos para el fragmento ligado, bajo las condiciones óptimas (ver "Reacciones de PCR") o bien con los iniciadores que amplifican el sitio de clonación. Un PCR con esta característica utiliza los iniciadores M13 F y M13 R a 1 µM cada uno, las condiciones de amplificación son 94 °C 3 min. , 30 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min. 30 seg. y una extensión final a 72 °C por 3 min. Aquellas colonias confirmadas como recombinantes se crecieron en placas de medio LB ampicilina toda la noche a 37° C y después en caldo LB-agar-ampicilina con agitación constante para la extracción del plásmido recombinante así como para su preservación, que se realizó a -80 °C en LB-glicerol al 15%.

### **3.5. Purificación de DNA de plásmidos recombinantes y reacción de secuenciación**

Para la purificación se usó el método de Silhavy *et al.*, (1984) con modificaciones (Apéndice V). Se utilizaron 3 ml de cultivo en LB ampicilina (100 ug/ml) de toda la noche a 37 °C con agitación constante. La extracción se verificó por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó.

En la reacción de secuenciación del exón 3 se emplearon los iniciadores usados en la PCR (ColX2F y ColX4R), e iniciadores adicionales cuyas secuencias son: ColX3R: 5' TAT GCC AGC TGG GCC AGG AGG 3'; ColX3Rb: 5' CTT TTG GTC CTT GGG GTC CC 3'; ColX4F: 5' CCA GGC ATT CCA GGA TTC CCT 3' y ColX4Rb: 5' GAT GAC AGT GAA CGC AGA CA 3' .Los iniciadores se asientan como se muestra en la figura 2.



**Figura 2. Posición relativa de los iniciadores usados para secuenciar la región codificante del exón 3 del gen COI10A1.**

Para secuenciar se usó el método terminación de la cadena por dideoxinucleótidos, utilizando para ello el kit de secuencia BigDye™ Terminator Cycle Sequencing de PE Applied Biosystem según recomienda el fabricante, con la modificación de usar la mitad del buffer de reacción recomendado.

La reacción se realizó en volúmenes finales de 20 µl con 150 ng de los plásmidos purificados y 3.2 pM de iniciadores. Las reacciones se realizaron en un termociclador Techne con las siguientes condiciones: 25 ciclos a 96 °C por 10 seg., 50 °C por 5 seg., 60 °C por 4 min. Terminada la reacción las muestras se pasaron por una columna de Sephadex G50 o precipitaron con etanol en presencia de 20 µg de glicógeno, se lavaron con etanol al 70% y se secaron al vacío en un Speed-vac mod. VR1. Las muestras se resuspendieron en 20 µl de formamida desionizada para su lectura en un secuenciador automático ABI PRISM 377 con un corrimiento en un gel de acrilamida desnaturalizante al 4.75 % por 10 hrs a 2400 V, 200 watts y 50 mAmp, y a una temperatura de 51 °C.

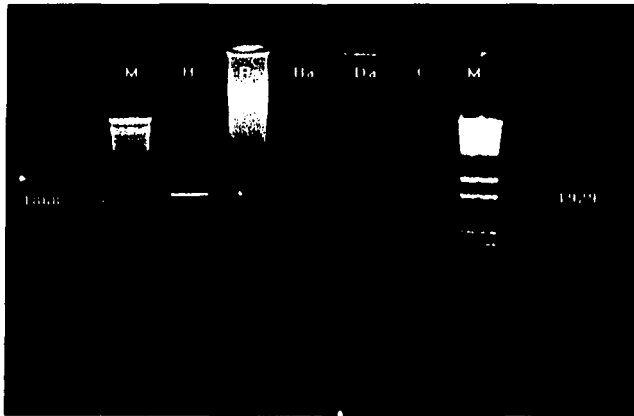
### 3.6. Edición y alineamiento de secuencias

La edición y análisis de las secuencias se realizaron con los programas Chromas 1.62, Technelysium Pty Ltd; Aling (Scientific & Educational Software; PA USA); DNA and Protein Sequence Analysis System (DNASIS 2.6 for Windows) Hitachi Software Engineering Co. LTD, y Multialin: Multiple Sequence Alignment (Corpet, 1988) <http://prodes.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>, con parámetros fijados para reducir el número de gaps en el alineamiento. Las secuencias de DNA de colágena tipo X que sirvieron de comparación fueron las reportadas para el ser humano: *Homo sapiens* (acceso: X98568), el cerdo: *Sus scrofa* (acceso: AF222861.1) y el bovino: *Bos taurus* (acceso: X53556.1) y se obtuvieron del Gene Bank (National Center for Biotechnology Information, NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Amplificación del exón 3 del gen COL10A1 que codifica para la colágena tipo x

A partir del DNA genómico se logró amplificar el fragmento homólogo al exón 3 del gen codificante de la colágena tipo X (COL10A1) en un individuo de cada una de las tres razas de perros estudiadas. Como control de amplificación se usó DNA genómico de humano, cuyo fragmento amplificado (1886 pb) permite verificar que el sistema trabaja bien. Los fragmentos de DNA amplificados se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en buffer TBE 1X. El fragmento amplificado del exón 3 del DNA control humano migra conforme al tamaño predicho. El fragmento producido a partir del DNA de cada uno de los perros migra en la misma posición que lo hace el control (Figura 3), indicando que tal fragmento corresponde al esperado del exón 3.



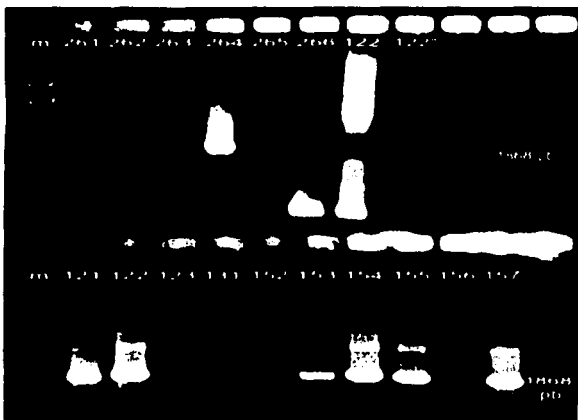
El tamaño del fragmento deseado es de 1868 pb; el fragmento de 1929 pb corresponde a una de las bandas del marcador de peso molecular:  $\lambda$ / BstEII. M:  $\lambda$ / BstEII; H: humano; Pa: Pastor Alemán; BA: Basset hound; Da: Dachshund; C-: control negativo

Figura 3. Amplificación por PCR del exón 3 del gen COL10A1 de perros a partir de DNA genómico.

Para poder obtener una cantidad suficiente de fragmento amplificado, se realizaron de 3 a 4 reacciones de PCR en volúmenes de 20  $\mu$ l cada uno para cada individuo. La recuperación de las bandas amplificadas se hizo por purificación a partir de geles de agarosa y se verificó por electroforesis en agarosa.

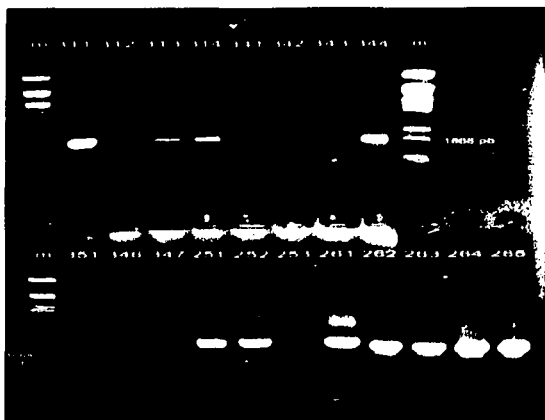
## 4.2. Clonación

Dado que en la reacción de PCR se amplifican los dos alelos del exón, la secuenciación daría información de ambos alelos a la vez. Con el objeto de secuenciar sólo uno de los alelos, se realizó la clonación del fragmento. Los fragmentos obtenidos fueron sujetos a reacciones de ligación con el vector plasmídico pBS/EcoRV + polIT, para después utilizar parte de la ligación en la transformación de bacterias competentes de *E. coli* de la cepa DH10B. Las clonas recombinantes se verificaron por PCR usando los iniciadores específicos amplificando un fragmento de 1.8 kb (Figuras 4 y 5). Tales colonias fueron resembradas individualmente en placas de LB-agar-ampicilina, para después tomar una colonia por placa y crecerla en 10 ml de caldo LB-ampicilina durante toda la noche a 37 °C con el objeto de purificar el DNA plasmídico.



En las colonias no recombinantes no hay amplificación. El tamaño asignado a los fragmentos es de 1868 pb.

Figura 4. Detección por PCR de las colonias recombinantes para el exón 3 gen COL10A1 del Basset hound (carriles 121-157).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

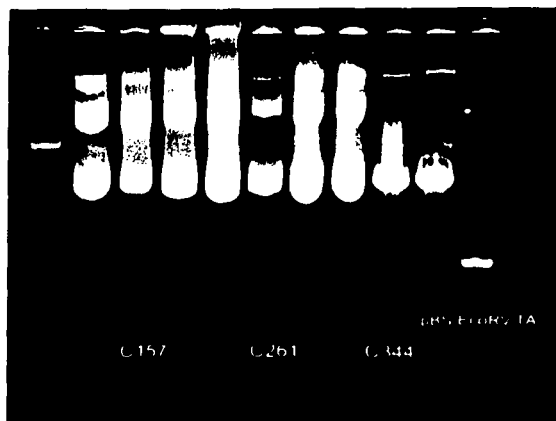
En las colonias no recombinantes no hay amplificación. El tamaño asignado a los fragmentos es de 1868 pb.

**Figura 5. Detección de las colonias recombinantes para el exón 3 del gen COL10A1 del Pastor Alemán (carriles: 251 al 265) y del Dachshund (carriles: 311 al 347).**

### **4.3. Purificación de DNA de Plásmidos Recombinantes y Secuenciación de Nucleótidos**

Para cada perro se usó sólo una clona para purificar el plásmido que contiene al exón 3: C157 para Basset hound, C261 para Pastor Alemán y C344 para Dachshund. La figura 6 muestra los resultados de la purificación donde se señala la identidad de los plásmidos usados para la secuenciación. El tamaño del DNA plasmídico recombinante es de 3.9 kb. El rendimiento de la purificación del DNA de los plásmidos obtenido a partir de 3 ml varió entre 1.25 mg a 2.5 mg.

El DNA de los plásmidos recombinantes fue usado como molde para realizar las reacciones de secuenciación de nucleótidos mediante el kit comercial Big Dye, usando 150 ng de DNA y las cantidades establecidas por el fabricante para cada reactivo. Para todas las reacciones se emplearon las condiciones referidas en "Material y Métodos". Con el secuenciador automático ABI Prism 377 se logró la determinación de 550 a 600 bases de lectura confiable.



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

La banda identificada como pBS/EcoRV/TA es el plásmido linearizado

**Figura 6.** Purificación de plásmidos de las clonas que contienen al exón 3 codificante de la colágena X de Basset hound (C157), Pastor Alemán (C261) y Dachshund (C344).

#### 4.4. Análisis de las Secuencias Obtenidas

##### 4.4.1. Edición de Secuencias

Para poder trabajar con las secuencias fue necesario realizar ediciones preliminares. Puesto que la mayoría de las secuencias contenían bases sin identificar, se tuvo que corregir asignando el tipo de nucleótido de acuerdo a su señal emitida. Este trabajo de edición se realizó en el programa Chromas, que permite observar el electroferograma registrado en el secuenciador y leerlo en cualquier computadora. Las secuencias editadas se almacenaron como archivos electrónicos en formato de texto.

Para determinar su identidad se utilizó el programa de búsqueda Entrez del GeneBank, el cual permitió confirmar que las secuencias obtenidas pertenecen al gen codificante de la colágena tipo X ya que en los resultados de búsqueda las secuencias con la mayor similitud tuvieron valores de  $E = 0$ .



Una vez obtenidas las secuencias editadas de cada individuo, se empalmaron para obtener un contiguo de secuencias que integra las diferentes lecturas generando una secuencia consenso. Esto se obtuvo con la aplicación "CONTIG MANAGER" de DNASIS 2.6 for Windows. El mapa de conexión muestra las secuencias para cada raza. Tal mapa es una figura que registra cada una de las secuencias como una línea, en un orden tal que se puede ver su sentido (normal o complementario), tamaño y posición a lo largo del segmento secuenciado, además de mostrar la secuencia consenso. Para cada grupo de secuencias por individuo se obtuvo el mapa de conexión. Todos correspondieron con el orden esperado, como lo muestran las figuras 7a a 7c.

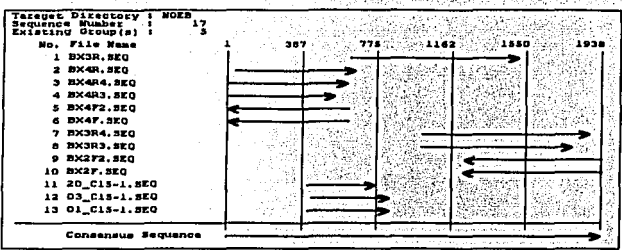
#### **4.4.2. Secuencia consenso resultante y traducción a proteínas**

El resultado de alineaciones de las secuencias de cada grupo logradas con la conexión es congruente con los mapas correspondientes. Las secuencias consenso obtenidas fueron recortadas en sus partes inicial y final de acuerdo a la secuencia de los iniciadores usados en la amplificación, con el objeto de no tener secuencias extras, por ejemplo la del vector de clonación.

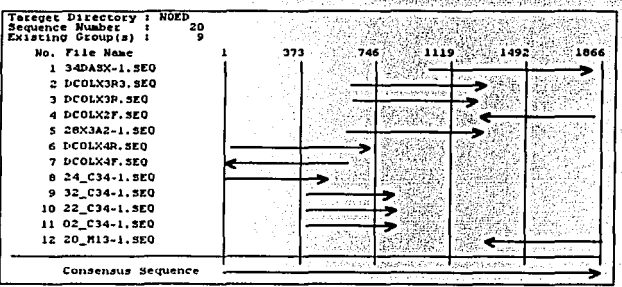
La secuencia consenso resultante del perro, tomando como referencia la secuencia del Pastor Alemán, es de 1868 pb, que debido al diseño de los iniciadores, comienza tres bases después de lo que se ha reportado para este exón y termina en el codón de paro. Estos resultados fueron obtenidos para las tres razas de perros estudiados.

El análisis de traducción a proteínas de las secuencias obtenidas para cada perro fue realizado en la aplicación "Open Reading Frame Search" del programa DNASIS 2.6. En este se mostraron tres marcos de lectura. Tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos de la colágena tipo X para *Homo sapiens*, deducida a partir de la secuencia de DNA por Thomas *et al.*, (1991), se decidió que el marco de lectura iniciado a partir de la tercera base era el adecuado para la secuencia de DNA que obtuvimos en el perro. El exón 3 del gen COL10A1 canino codifica 3 codones más dos bases (11pb) del dominio no colagénico amino terminal (NC2), el dominio helicoidal completo de 463 aminoácidos (1389 pb) y el dominio carboxilo terminal (NC1) de 155 aminoácidos (465 pb). (Apéndice 6).

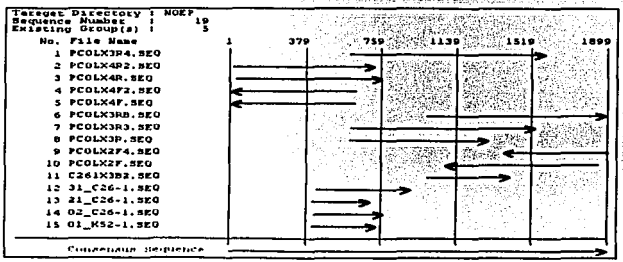
TESIS CCN  
FALLA DE ORIGEN



7a)



7b)



7c)

Las flechas indican el sentido, el tamaño y posición de las secuencias de cada grupo.

Figuras 7a, 7b y 7c. Mapas de conexión de las secuencias realizadas del exón 3 de los perros Basset hound, Dachshund y Pastor Alemán.

#### 4.4.3. Alineación de secuencias: similitudes y diferencias entre especies

##### 4.4.3.1. Comparación de secuencias de DNA

Las secuencias obtenidas del perro fueron comparadas con las de otras especies obtenidas del GeneBank mediante los programas Aling o DNASIS 2.6 for Windows, tanto al nivel de nucleótidos como de aminoácidos.

Se ha reportado la secuencia nucleotídica del gen codificante de la colágena tipo X de varias especies, algunas de las cuales son parciales. Para efectos de comparación fueron elegidas las de cDNA que contuvieran las mismas regiones del exón 3 del gen de la colágena tipo X del perro. En este caso sólo se trabajó con la secuencia del Pastor Alemán y se alineó con las secuencias pertenecientes al hombre (*Homo sapiens*, acceso: X98568), cerdo (*Sus scrofa*, acceso: AF222861.1) y bovino (*Bos taurus*, acceso: X53556.1) para obtener el porcentaje de similitudes. El resultado de la alineación se incluye en el Apéndice VI. Se puede ver en la tabla 2 que el parecido de la secuencia nucleotídica en el exón 3 del Pastor Alemán respecto a las demás especies es mayor al 80%.

Tabla 2. Porcentajes de similitud de la secuencia de DNA del exón 3 de la colágena tipo X entre el Pastor Alemán y 3 especies de vertebrados.

Especie	Total de bases confrontadas	Bases apareadas	% de similitud respecto al Pastor
<i>Homo sapiens</i>	1889	1610	86.14
<i>Bos taurus</i>	1871	1604	85.82
<i>Sus scrofa</i>	1871	1618	86.57

En general, de la mayoría de cambios respecto de la secuencia de *Homo sapiens*, 37% de ellos son compartidos con otras especies y cerca del 16% de los cambios son únicos para el perro. Algo que cabe destacar es que la secuencia de nucleótidos que obtuvimos del exón 3 que codifica para la colágena tipo X de *Canis familiaris* posee 18 bases menos que la reportada para *Homo sapiens*. Esto mismo sucede para las secuencias de *Bos taurus* y *Sus scrofa* y se da en la misma región (figura 8).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

	1420	1430	1440	1450	1460	1470
<i>Homo sapiens</i>	TTATAAAGGCAGGCCAAAGGCCAGTCTTTCTGGGACCCCTCTTGTAGTGCCA	*	*	*	*	*
<i>Bos taurus</i>	..G.....	..GT.....	.....	.....	.....	.....
<i>Sus scrofa</i>	..G.....A...A..G.....	.....	.....	.....G..T.....	.....	.....
<i>Canis familiaris</i>	..C.....CA.....	.....	.....	.....T..C.....C...C	.....	.....

En el Exón 3 del gen que codifica para la colágena tipo X del humano existen 18 nucleótidos que no se presentan en otros vertebrados hasta ahora estudiados.

Figura 8. Nucleótidos extras en el dominio NC1 del exón 3 del gen COL10A1 del humano.

#### 4.4.3.2. Comparación de secuencias de proteínas

Para el caso de la traducción a proteína, la similitud en la secuencia del polipéptido entre especies es mayor al 85% (tabla 3). En general los cambios de aminoácidos respecto a los del ser humano se dan en ciertas regiones y cerca del 40% de estos son en los mismos sitios que en las demás especies (Apéndice VII).

Tabla 3. Porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos del exón 3 de la colágena tipo X entre el Pastor Alemán y 3 especies de vertebrados.

Especie	Total aa confrontados	aa similares	% de similitud respecto al Pastor
Homo	622	547	87.94
<i>Bos taurus</i>	622	541	86.98
<i>Sus scrofa</i>	622	546	87.78

El gap detectado en el perro tiene el mismo efecto que el gap en las otras dos especies: la falta de seis aminoácidos en la misma región (figura 9). Este gap es entonces conservado en el resto de los vertebrados.

	460	470	480	490	500
<i>Homo sapiens</i>	PPGPPGQAVMPEGFIKAGQRPSLSGTPLVSNQGVITGMPVSA	*	*	*	*
<i>Bos taurus</i>	.....VAL..D.V.....	.....	.....	.....F.....	.....
<i>Sus scrofa</i>	.....P.....V.E.....	.....	.....	.....AF.....	.....
<i>Canis familiaris</i>	.....ASS.....Q.....	.....	.....	.....F...H.....M..	.....

Figura 9. Aminoácidos extras en el dominio NC1 de la colágena X del humano.

Analizando por separado cada uno de los 2 dominios codificados por el exón 3, en promedio el porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los dos dominios se mantiene por arriba del 85% (Tabla 4). No existe una marcada diferencia entre un dominio y otro, siendo la máxima similitud del dominio helicoidal entre el perro y el cerdo (89.03%).

**Tabla 4. Porcentaje de similitud de los distintos dominios codificados por el exón 3 entre *Canis familiaris* (raza Pastor Alemán) y otras especies.**

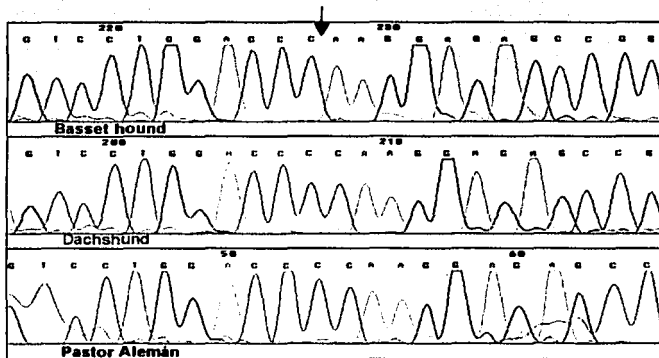
<b>Especie</b>	<b>% de similitud hélice</b>	<b>% de similitud NC1</b>
<i>Homo sapiens,</i>	87.9	84.2
<i>Bos taurus</i>	87.1	85.5
<i>Sus scrofa,</i>	89.0	82.7

#### 4.4.4. Alineación de secuencias: similitudes y diferencias entre razas

##### 4.4.4.1. Comparación de secuencias de DNA

Para la comparación de la secuencia de nucleótidos del exón 3 de la colágena tipo X entre razas caninas se utilizaron los mismos programas arriba mencionados. La secuencia que sirve como referencia es la de Pastor Alemán. La alineación de los consensos se muestra en el Apéndice VIII. Lo relevante en este trabajo es el hallazgo de deleciones en las secuencias de nucleótidos de las dos razas: en el Basset hound hay una deleción de una citosina en la posición 112 (nt 7056; Tomas *et al.*, 1991) (figura 10), en tanto en el Dachshund hay dos deleciones de purinas: los nucleótidos 448 y 449 (nt 7392 y 7393; Thomas *et al.*, 1991), guanina y adenina respectivamente (figura 11). Se espera que esas deleciones cambien por completo el marco de lectura de la secuencia al traducirla a proteína.

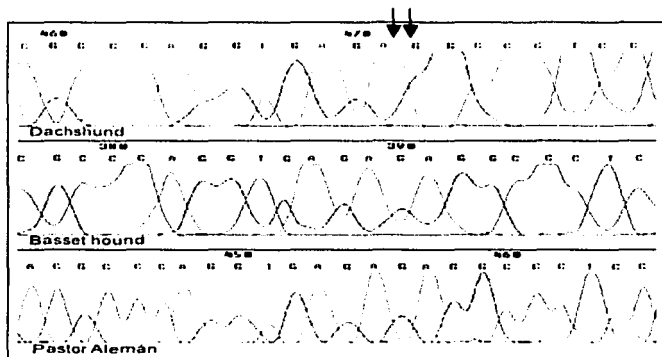
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Electroferogramas de la secuencia de colágeno tipo X en los que se muestra la delección de una citosina 112 (nt 7056; Thomas *et al.*, 1991) en el Basset hound. La delección se presenta en la región que codifica para el dominio helicoidal de la colágeno tipo X.

**Figura 10. Delección de un nucleótido en la secuencia del exón 3 del gen COL10A1 del Basset hound.**



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

La delección se encuentra en la región codificante para el dominio helicoidal de la colágeno tipo X y corresponde a los nucleótidos 448 y 449 (nt 7392 y 7393; Thomas *et al.*, 1991).

**Figura 11. Delección de 2 nucleótidos en la secuencia del exón 3 del gen COL10A1 del Dachshund.**

#### **4.4.4.2. Comparación de secuencias de aminoácidos**

Se razonaron las consecuencias en la traducción a proteína de las distintas deleciones encontradas en las secuencias nucleotídicas consenso de cada perro, con la aplicación "Open Reading Frame Search" del programa DNASIS 2.6 usando el marco que comienza en el tercer nucleótido de las secuencias obtenidas.

La traducción de la secuencia del exón 3 en el Pastor Alemán produce una proteína de 621 aminoácidos. En las razas Basset hound y Dachshund, las deleciones encontradas en el exón 3 alteran drásticamente, al menos de modo teórico, la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida (Apéndice IX). La proteína derivada de la secuencia de DNA del Basset hound es de 235 aminoácidos; excepto dos aa, los primeros 39 son idénticos a la del Pastor Alemán; la deleción provoca un cambio en la lectura, ya que partir del aa 40, el resto de los aminoácidos son por completo distintos. En el Dachshund la deleción de las dos bases provocan que el polipéptido termine prematuramente con 169 aa, de los cuales, 149 son idénticos a los aa del Pastor Alemán. Ambas proteínas terminan prematuramente a partir del dominio helicoidal, algo poco visto en los reportes de mutaciones de colágena tipo X.

## V. DISCUSIÓN

La elección del exón 3 del gen que codifica para la colágena tipo X, COL10A1, como candidato responsable del fenotipo osteocondrodisplásico de ciertas razas caninas, se hizo sobre la base de: 1) las similitudes anatómicas e histológicas que presentan estas razas con osteocondrodisplasias metafisiales, cuyo origen reside en mutaciones en el gen arriba mencionado (en el exón 3, principalmente en la región que codifica para el dominio carboxilo terminal de la proteína homotrimérica); y 2) los resultados experimentales en los que la introducción de mutaciones en regiones codificantes de este gen en ratones producen osteocondrodisplasias metafisiales.

Usando como referencia la secuencia del gen que codifica para la colágena tipo X humana y bovina reportada por Thomas *et al.*, (1991), se diseñaron iniciadores que amplificaran el exón 3 del gen COL10A1 a partir de DNA genómico. Considerando la secuencia del gen de colágena tipo X humana, teóricamente el fragmento amplificado con estos iniciadores sería de 1886 pb. La amplificación del exón 3 del perro produjo un fragmento de 1868 pb que debido al diseño de los iniciadores, carece de las tres primeras bases del exón 3 y por ende de un codón menos del dominio amino terminal (de acuerdo a la secuencia para el humano) y termina en el codón de paro, además, carece de la secuencia 3' no traducida. La secuencia obtenida codifica para 2 nucleótidos de un codón, más 3 aminoácidos del dominio amino terminal (11 pb), 463 aminoácidos (1389 pb) de la región helicoidal y 155 aminoácidos (174 pb) del dominio carboxilo terminal. Al igual que sus contrapartes en bovino y cerdo, tiene 18 pb menos que la secuencia nucleotídica del humano (1886 pb) que se traduce en 6 residuos menos que la colágena tipo X reportada de 161 aminoácidos de humano (Apte and Olsen, 1993) pero es igual al obtenido para bovino (Thomas *et al.*, 1991) y para cerdo y esa reducción se da en la secuencia codificante del dominio carboxilo terminal.

Previo a este trabajo se ha determinado la secuencia nucleotídica del homólogo canino de la secuencia traducida del exón 2 humano, el cual es de 161 pb (Martínez, 2002). Este fragmento no posee la secuencia 5' no traducida, que en el humano es de 15 pb, pero sí contiene la región codificante: 54 pb del péptido señal (18 aa) y 106 pb más un nucleótido de un codón de la región amino terminal (35 aa). Algo que cabe destacar es que la secuencia del perro posee en la región amino terminal 2 codones más (CCA CCC) que las demás especies de vertebrados con las que se comparó (figura 12), lo que se traduce en 2 prolinas extras. De hecho en las razas de perros estudiadas existe un polimorfismo que consiste en que puede no presentarse ningún codón o haber sólo un codón más, en esa zona.



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

	80	90	100	110	120
Homo sapiens	AGCCCCACAGGCATAAAAAGGCCACTACCC-----AACACCAAGACA				
	S P T G I K G P L P - - N T K T				
Bos taurus	ACA..T.....C.T.C-----				
	T . . . . . P S - . . . . .				
Canis familiaris	ACA..T..G.....C...ACCACCC.....				
	T P T G I I G P P P P P A T I T				

En la secuencia el exón 2 del perro hay 6 nucleótidos en que no existen en la secuencia de otras especies de vertebrados.

**Figura 12. Nucleótidos extras en el dominio NC2 del exón 3 del gen COL10A1 del perro.**

El porcentaje de similitud de la secuencia de DNA del exón 2 del humano y bovino respecto del perro es de 89.8% y 86.3% respectivamente, mientras que el porcentaje de similitud para el exón 3 es cercano al 85%. Tanto Thomas *et al.*, (1991) como Apte y Olsen (1993) encontraron resultados similares en la similitud de la secuencia entre humano y bovino, y humano y ratón respectivamente. La similitud en las secuencias codificantes es alta entre las especies comparadas, como podría esperarse para una proteína involucrada en un proceso biológico común a todos los vertebrados, especialmente entre los mamíferos y que está sujeta a presión de selección.

Parte del trabajo inicial en la caracterización al nivel de gen y al nivel de bioquímica de colágena tipo X se ha hecho en aves. El porcentaje de similitud que guarda la colágena tipo X de aves con su homóloga de humano y ratón es apenas cercano al 70%, no obstante que el proceso de osificación endocondral sigue el mismo patrón de organización de grupos celulares en el cual la colágena tipo X es una pieza clave, como lo ha sugerido un estudio en aves raquíticas (Kwan *et al.*, 1989).

Cuando se comparan los tres dominios de la colágena a nivel de la secuencia de aminoácidos entre varias especies de vertebrados, se puede observar que cada uno de los dominios guarda un cierto grado de conservación, que puede reflejar su importancia en la funcionalidad de la proteína. El dominio amino terminal (NC2) es el que tiene el menor porcentaje de similitud, con un rango menor al 80% entre el humano, el bovino y el ratón, sin embargo, la similitud de la secuencia aminoacídica de este dominio entre estas especies y la obtenida del perro (Martínez, 2002) se eleva en promedio al 82%.

Para el caso del dominio helicoidal se conserva el grado de similitud, pero cuando se comparan las similitudes en la región del dominio carboxilo terminal

(NC1), se observa que el porcentaje de similitud del perro con las otras especies (85%) es ligeramente menor al que reporta Thomas *et al.*, (1991) para el caso entre humano y bovino (88.2%). En nuestro caso el mayor parecido se da con el dominio NC1 del bovino. En la alineación de las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se puede ver que los cambios presentes entre las diversas especies se dan mayoritariamente en los mismos sitios, incluyendo el gap de 18 nucleótidos. Esto debe estar reflejando un alto grado de conservación en la conformación final de la proteína, lo cual es esencial para su función.

Al respecto, se ha demostrado que el dominio carboxilo tiene un papel sumamente importante en la conformación de la colágena tipo X. Brass *et al.*, (1992) lo analizaron al nivel de secuencia de nucleótidos y encontraron en el dominio NC1 de la colágena tipo X una región homóloga con la colágena tipo VIII, colágenas fibrilares (a1 I, a2 I, a1 II, a1 III y a2V), y el dominio C1q del complemento. La región presenta una región de aminoácidos aromáticos muy conservada, aún cuando la secuencia no es la misma. Esto le da una característica hidrofóbica que se hipotetiza es lo que dirige el plegamiento de la proteína.

Esta región del perro se comparó en este estudio con diversas especies y se encontró que los residuos señalados por Brass están también presentes (Figura 13), incluso aquellos que no cambian en todas las secuencias que él analizó, salvo por un cambio encontrado en el perro que sustituye un aminoácido hidrofóbico (Ile) por un hidrofílico (Thr) en la posición 577 debido a la presencia de una citocina en lugar de una timina en la segunda posición del codón.

Análisis histoquímicos también han contribuido a resolver el papel de NC1. En sistemas *in vitro*, Chen *et al.*, (1992) demostraron un efecto diferencial de colágena tipo X y su dominio carboxilo terminal en la acumulación de proteoglicanos recientemente sintetizados. Ciertos tipos de proteoglicanos son acumulados masivamente, en tanto otros tipos son inhibidos. Este efecto es producto del extremo COOH, pero no se sabe si tal fenómeno es debido a un papel regulatorio de la colágena tipo X sobre la síntesis o degradación de estas moléculas de la matriz.

El dominio carboxilo terminal se ha caracterizado por ensayos de síntesis con proteínas de fusión y se ha observado que dirige el ensamblaje de trímeros y de multímeros, incluso en proteínas no helicoidales, y le confiere una alta estabilidad a la asociación, la cual sólo puede ser desorganizada con agentes reductores y con altas temperaturas (100 °C); además, posee alta resistencia a tripsina (Frizchholz *et al.*, 1998; Zhang and Chen, 1999).

La colágena tipo X está relacionada con algunas osteocondrod displasia metafisiales. Diversas mutaciones como deleciones, sustituciones y mutaciones sin sentido, han sido encontradas en la secuencia de DNA de este gen en

personas afectadas (Warman *et al.*, 1993; Ikegawa *et al.*, 1997; Ikegawa *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1997).

Homo sapiens	VMPEGFIKAGQRPSLSGTPLVSANQGVGTGMPVSAFTVILSKAYPAIG
Bos taurus	AL..D.V.....F.....
Sus scrofa	.P...V.E.....AF.....
Canis familiaris	ASS.....Q-----F...H.....M.....V.
	* * * * *
Homo sapiens	TPIPFDKILYNRQHQHYDPRGTGIFTCQIPGIYYVSYHVHVKGTHTVWVG
Bos taurus	.....K.....K.....I.....A..
Sus scrofa	A.....G.....K.....R.....I.....A..
Canis familiaris	I.....K.....T.....S.....
	+ ° + ° + ° + ° + ° + °
	h
Homo sapiens	LYKNGTPEVMYTYDEYTKGYLDQASGSALIDLTDNDQVWLQLPNAESN
Bos taurus	.....I.....V.....G..
Sus scrofa	.....V.....L...D.....G..
Canis familiaris	.....VLE.....TG..
Homo sapiens	GLYSSEYVHSSFSGFLVAPM*
Bos taurus	.....P.....*
Sus scrofa	.....*
Canis familiaris	.....Q.....*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Los aa con asterisco indican aminoácidos aromáticos altamente conservados; + son residuos hidrofóbicos conservados; ° son residuos hidrofílicos conservados; h es un cambio de una Isoleucina (hidrofóbica) por una Treonina (hidrofílica) en la secuencia del perro.

**Figura 13. Alineación de aminoácidos altamente conservados en la región NC1 de la colágena tipo X de algunos vertebrados.**

En este estudio de secuenciación de nucleótidos del exón 3 del gen codificante de la colágena tipo X, encontramos que en los perros con fenotipo osteocondrodisplásico (Basset hound y Dachshund) existen deleciones localizadas en la región codificante para el dominio helicoidal. En el Basset hound se encontró una deleción del nucleótido C en la posición 112 (nt 7056: Thomas *et al.*, 1991), en tanto en el Dachshund se encontró la deleción de dos nucleótidos (GA) en las posiciones 448 y 449 (nt 7392 y 7393: Thomas *et al.*, 1991). Ambas deleciones provocan una terminación prematura de la proteína. La predicción de la traducción indica que la proteína resultante en el Basset hound sería de 289 aminoácidos, mientras que la del Dachshund sería de 223 aminoácidos, y ninguna poseería el dominio carboxilo terminal. La secuencia del Pastor Alemán (aquí considerado como control ya que no posee el fenotipo de las otras dos razas) es aparentemente normal, respecto de la secuencia de otros vertebrados.

Contrastando con este trabajo, prácticamente todas las delecciones, sustituciones y mutaciones sin sentido que han sido reportadas en la secuencia del gen que codifica para la colágena tipo X se encuentran dentro del dominio carboxilo (tabla 5) y han sido delimitadas en una zona de tres sub-dominios (Bonaventure *et al.*, 1995), uno de los cuales corresponde con la zona conservada de residuos aromáticos. A la fecha, se han encontrado 25 mutaciones en el dominio carboxilo terminal que aparentemente están delimitadas en estas regiones, de las cuales dos se han predicho que retienen la capacidad de organizar la trimerización de la molécula (Marks *et al.*, 1999). Los efectos de esas mutaciones se han observado en ensayos de mutagénesis dirigida, traducción *in vitro* y transfección de este dominio (Chan *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2002; Dublet *et al.*, 1999). Cuando se producen cambios en la secuencia de aminoácidos (manipulando la secuencia de nucleótidos) la formación de trímeros de la colágena tipo X se ve alterada. Las moléculas alteradas no son capaces de dirigir la trimerización o son poco eficaces para asociarse con moléculas normales (McLaughlin, 1999). La mayoría de estas moléculas anormales es encontrada en baja proporción, debido a que aparentemente son degradadas intracelularmente (Wilson, 2002). Sin embargo, una pequeña porción de estas puede ser secretada (Chan, 1999).

Una característica que se ha observado en estudios de individuos afectados, es que la mayoría de las mutaciones son heterocigóticas, es decir, sólo una de las dos dosis del gen es alterada. Esto produce un pool de moléculas normales y de moléculas mutantes que interaccionan y tal vez esto sea la causa inicial del fenotipo. Se hipotetiza que las moléculas mutantes capaces de trimerizar con moléculas nativas ejercen un efecto negativo dominante. Esto quizá es debido a que tales asociaciones (heterotrimeros) son inestables (Marks *et al.*, 1999) y tienden a disminuir, p. ej. en ensayos *in vitro* (Chan *et al.*, 1995) o a alterar el material de la matriz (Jacenko *et al.*, 2001) y tal vez exista un mecanismo celular capaz de detectarlos y lograr su degradación. Otra posibilidad es que se formen heterotrimeros que cumplan ciertas relaciones estequiométricas y que las moléculas mutantes provoquen la disminución de cadenas normales disponibles para interaccionar con las otras moléculas de la matriz extracelular en el cartílago.

Evidencias que apoyan esta teoría se encuentran en: 1) la eliminación de la región conservada de residuos aromáticos de NC1 la cual evita totalmente una asociación *in vitro* entre moléculas mutantes y normales y no interfiere con la trimerización de las proteínas normales (Chan *et al.*, 1999), confirmando a la vez que esta zona es la que dirige la trimerización y que las mutaciones presentes en los subdominios de NC1 no provocan la abolición de todos "los broches" que permiten la asociación entre moléculas alteradas; y 2) en el hecho de que ratones Knock out para la colágena tipo X no muestran alteraciones esqueléticas (Rosati *et al.*, 1994).

**Tabla 5. - Descripción de las mutaciones reportadas en la secuencia del gen que codifica para la colágena tipo X que han sido asociadas con osteocondrodisplasias esqueléticas en humanos y algunos animales.**

Autor	Mutación	Dominio	Fenotipo
Jacenko <i>et al.</i> , 1993b Dirigidas en ratón	Del 700 pb Del 1600pb	Helicoidal	SD
Warman <i>et al.</i> , 1993	Del 13 pb	Carboxilo	SMC
McIntosh <i>et al.</i> , 1994	T→C 1771 (Cys591Arg) Del C 1856 Del CT 1992, 1993	Carboxilo	SMC
Dharmavaram <i>et al.</i> , 1994	Del 10 pb 1867-1876	Carboxilo	SMC
Wallis <i>et al.</i> , 1994	T→G 1888 (Tyr598Asn) T→C 1937 (Leu614Pro)	Carboxilo	SMC
Pokharel <i>et al.</i> , 1995	T→C 1951 (Trp651Arg)	Carboxilo	
McIntosh <i>et al.</i> , 1995	C→G 1884 (Tyr628X) Del CC 1957, 1858	Carboxilo	SMC
Bonaventure <i>et al.</i> , 1995	G→A 1784 (Gly595Gln) Del T 1908 A→G 1943 (Asp648Gly) T→C 1790 (Tyr597His) T→A 1851 (Asn617Lys) T→G 1932 (Arg644Leu)	Carboxilo	SMC
Chan <i>et al.</i> , 1995	G→T 1949 (Gly618Val)	Carboxilo	SMC
Stratakis <i>et al.</i> , 1996	T→C 2011 (S671P)	Carboxilo	SMC
Kwan <i>et al.</i> , 1997	Inserción de Cassette de Neomicina en el exón 3	Carboxilo	Ratones con SMC
Ikegawa <i>et al.</i> , 1997	G→A 52 (Gly18Arg) G→A 53 (Gly18Ac Glu) Del T 1711	Sitio de corte del péptido señal Carboxilo	SD
Chan <i>et al.</i> , 1998	C→A 1896 (Tyr 632X)	Carboxilo	SMC
Ikegawa <i>et al.</i> , 1998	G→A 1784 (Gly595E)	Carboxilo	SMC
Sawai <i>et al.</i> , 1998	A→G 1790 (Tyr597Cys)	Carboxilo	SMC
Matsui <i>et al.</i> , 2000	G→A 1783 (Gly595Arg)	Carboxilo	SMC
Nielsen <i>et al.</i> , 2000	G→C (Gly590Arg)	Carboxilo	Cerdo con SMC
Chan <i>et al.</i> , 2001	G→A 52 (Gly18Arg) G→A 53 (Gly18Ac. Glu) Del T 1711	Amino Amino Carboxilo	SMC

SMC: Schmid Metaphyseal Chondrodysplasia; SD: Spondilometaphyseal Dysplasia

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Sin embargo, algunos otros descubrimientos predicen que la enfermedad es producida por haploinsuficiencia (por eliminación de una de las dos dosis del gen, lo que reduce teóricamente la proteína al 50%). En estudios con pacientes con Displasia Metafisial tipo Schmid, que poseían mutación nula heterocigótica dentro de NC1 (Chan *et al.*, 1998) no se encontró RNAm, ni la proteína mutante dentro de la placa de crecimiento.

Las mutaciones de la colágena tipo X se extienden a otros dominios, aunque no han sido tan extensamente caracterizados como NC1. Las deleciones en la región codificante para el dominio helicoidal (Jacenko *et al.*, 1993), dos cambios en el sitio de ruptura del péptido señal (Ikegawa *et al.*, 1997); y tres mutaciones sin sentido en el dominio NC2 (Chan *et al.*, 2001) también han sido correlacionados con osteocondrodisplasias metafisiales. Debido a los datos encontrados, se hipotetiza que las mutaciones encontradas en el exón 3 del gen COL10A1 de los perros Basset hound y Dachshund pueden ser las responsables del fenotipo osteocondrodisplásico que manifiestan. Una mutación en la región helicoidal de la colágena tipo X también ha sido reportada en cerdos que padecen un tipo de osteocondrodisplasia metafisial (Nielsen *et al.*, 2000).

Existen otras moléculas que pudieran estar implicadas en las anomalías del desarrollo óseo en vertebrados, especialmente regulando de manera indirecta el desarrollo de ciertos tipos celulares o la expresión de la colágena tipo X y que también pudieran ser sujetas a análisis moleculares. Por ejemplo el Factor de Crecimiento beta Transformante 3 (TGF- $\beta$ ) se ha evidenciado como parte de los factores de diferenciación de condrocitos en la osificación endocondral y una anomalía en la proteína está asociada con la ausencia de hipertrofia de condrocitos en aves osteocondrodisplásicas (Law *et al.*, 1996). Se ha demostrado también que proteínas morfogénicas promueven tanto la hipertrofia de condrocitos como la expresión de colágena tipo X (Volk *et al.*, 1998).

En aves y ratones se ha experimentado con las proteínas Indian hedgehog (Ihh) y parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) cuya expresión está involucrada en el desarrollo de la placa de crecimiento metafisial (Vortkamp *et al.*, 1996; Weir *et al.*, 1996). En este estudio los resultados muestran ya sea la ausencia de la colágena tipo X o su expresión desfasada cuando no existen estas proteínas. La sincronización de la expresión de Ihh y PTHrP regula, mediante retroalimentación negativa, la diferenciación de condrocitos proliferantes a condrocitos hipertróficos y en general el crecimiento de algunas estructuras óseas de los vertebrados.

Los datos que aquí se reportan son preliminares y un examen de secuencias de otros individuos de las mismas razas en las regiones donde se encontraron las mutaciones, nos ayudará a verificar si estas se encuentran establecidas en las razas o se trata sólo de polimorfismos. Una metodología que se quiso implementar para la detección de tales cambios es la realización de digestiones con enzimas

de restricción. Sin embargo, el análisis teórico de restricción (no mostrado) no muestra pérdida o ganancia de sitios de restricción, únicamente la reducción en una o dos bases, según el caso, en ciertos fragmentos producto de la digestión. Un análisis que daría evidencia de la correlación de estas mutaciones es mediante la cruce de individuos afectados e individuos normales y seguirlos en su segregación a través de la progenie: si la mutación co-segrega con el fenotipo, la responsabilidad de defectos de la colágena tipo X en la enfermedad puede ser asertiva, además de dar respuesta a la condición mendeliana de este gen en las razas de perros estudiadas.

## VI. CONCLUSIONES

Por medio de la técnica de PCR se logró amplificar el exón 3 del gen de la colágena tipo X (COL10A1) a partir de DNA genómico de tres individuos de tres razas distintas de perro (*Canis familiaris*) dos osteocondrodisplásicas (Basset hound y Dachshund) y una con fenotipo longilíneo (Pastor Alemán).

El exón 3 de los tres perros se clonó en el plásmido pBS. La secuencia del exón 3 se completó con el diseño de 3 iniciadores extras a partir de las secuencias resultantes.

La secuencia del exón 3 del gen COL10A1 en el perro que no presenta osteocondrodisplasia metafisial (Pastor Alemán) es de 1868 pb y codifica 3 codones más dos bases (11pb) del dominio no colagénico amino terminal (NC2), el dominio helicoidal completo de 463 aminoácidos (1389 pb) y el dominio carboxilo terminal (NC1) de 155 aminoácidos (465 pb). La secuencia no posee la región 3' no traducida de aproximadamente 1 Kb.

La secuencia en la región codificante del exón 3 del gen COL10A1 en el perro tiene 18 pb menos respecto a la del exón 3 humano y esto produce la ausencia de 6 aminoácidos en el dominio NC1 de la colágena tipo X; sin embargo, la similitud que guarda esta secuencia con sus contrapartes en humano, bovino y cerdo es cercana al 85%.

Se encontró la delección de una citosina en la posición 112 (nt 7056; Thomas *et al.*, 1991) de la secuencia del exón 3 del individuo de la raza Basset hound, en tanto en la secuencia del individuo de la raza Dachshund se encontraron delecciones de una adenina y una guanina en las posiciones 448 y 449 (nt 7392 y 7393; Thomas *et al.*, 1991). En ambas razas caninas, el análisis de la traducción teórica predice un cambio en el marco de lectura del gen. El resultado es que en el gen mutado, a partir de la delección, los aminoácidos que se incorporen a la proteína serán distintos a los de la proteína normal, además de que un poco más adelante, el marco de lectura producido contiene un codón de paro que resulta en la terminación prematura de la proteína.

Las delecciones en la secuencia del gen codificante de la colágena tipo X de los individuos de ambas razas no tienen su correspondiente en las mutaciones que se han descrito en seres humanos y en otros animales como el ratón y el cerdo, y que están relacionadas con osteocondrodisplasias metafisiales. Sería importante una mayor investigación en la secuencia de otros individuos de las mismas razas de perros para corroborar estos resultados, saber si existe heterogeneidad y el origen de estas mutaciones. Por otro lado, otro estudio al nivel de inmunohistoquímica daría luz para entender el destino histológico de los



**productos anormales de COL10A1 y su participación en los defectos en el desarrollo del esqueleto.**

**Aunque la conformación esquelética de estos perros osteocondrodisplásicos es algo similar a un tipo de osteocondrodisplasia metafisial humana, está por definirse si tal conformación es actualmente comparable en la mayoría de sus características y si es originada por el mismo mecanismo molecular y las mismas mutaciones genéticas.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Apte, S.S. and B.R. Olsen. 1993. Characterization of the mouse type X collagen gene. *Matrix*. 13: 165–179
- Ayad, S., A.P.L. Kwan and M.E. Grant. 1987. Partial characterization of type X collagen from bovine growth plate cartilage. *FEBS Lett*. 220: 181–186
- Beier, F., S. Vornehm, E. Pöschl, K. Von Der Mark, and M. J. Lammi. 1997. Localization of silencer and enhancer elements in the human type x collagen gene. *J. Cell Biochem*. 66: 210–218
- Bloom, W., y D. Fawcett. 1987. Tratado de Histología. McGraw-Hill, Madrid, España. 11° edición.
- Bonaventure, J., F. Chaminade and P. Maroteaux. 1995. Mutations in three subdomains of the carboxyl-terminal region of collagen type X account for most of the Schmid metaphyseal dysplasias. *Hum. Genet*. 96: 58–64
- Boyle, J.S. and A.M. Lew. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics*. 11: 8
- Brass, A., K.E. Kadler, J.T. Thomas, M.E. Grant and R.P. Boot-Handford. 1992. The fibrillar collagens, collagen VIII, collagen X and the C1q complement proteins share a similar domain in their c-terminal non-collagenous regions. *FEBS Lett*. 303: 126–128
- Chan, D., W.G. Cole, J.G. Rogers and J.F. Bateman. 1995. Type X collagen multimer assembly in vitro is prevented by a gly 618 to val mutation in the  $\alpha 1(X)$  nc1 domain resulting in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J. Biol. Chem*. 270(9): 4558–4562
- Chan, D., S. Freddi, Y.M. Weng and J.F. Bateman. 1999. Interaction of collagen  $\alpha 1(x)$  containing engineered nc1 mutations with normal  $\alpha 1(x)$  in vitro: implications for the molecular basis of Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J. Biol. Chem*. 274: 13091–13097
- Chan, D., M.S.P. Ho and K.S.E. Cheah. 2001. Aberrant signal peptide cleavage of collagen X in Schmid metaphyseal chondrodysplasia: implications for the molecular basis of the disease. *J. Biol. Chem*. 276: 7992–7997

Chan, D., Y.M. Weng, H.K. Graham, D.O. Sillence and J.F. Bateman. 1998. A nonsense mutation in the carboxyl-terminal domain of type X collagen causes haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J. Clin. Invest.* 101: 1490-1499

Chan, D., Y.M. Weng, A.M. Hocking, S. Golub, D.J. McQuillan and J.F. Bateman. 1996. Site-directed mutagenesis of human type X collagen: expression of  $\alpha 1(X)$  nc1, nc2 and helical mutations *in vitro* and in transfected cells *J. Biol. Chem.* 271: 13566-13572

Chen, Q., C. Linsenmayer, H. Gu, T.M. Schmid and T.F. Linsenmayer. 1992. Domains of type X collagen: alteration of cartilage matrix by fibril association and proteoglycan accumulation. *J. Cell Biol.* 117: 687-694

Chung, K.S., O. Jacenko, P. Boyle, B.R. Olsen and I. Nishimura. 1997. Craniofacial abnormalities in mice carrying a dominant interference mutation in type x collagen. *Developmental Dynamics.* 208: 544-552

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16: 10881-10890

Dharmavaram, R.M., M.A. Elbersson, M. Peng, L.A. Kirson, T.E. Kelley and S.A. Jimenez. 1994. Identification of a mutation in type X collagen in a family with Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 3: 507-509

Dublet, B., T. Vernet and M. van der Rest. 1999. Schmid's metaphyseal chondrodysplasia mutations interfere with folding of the c-terminal domain of human collagen X expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 18909-18915

Dourado, G. and P. LuValle. 1998. Proximal DNA elements mediate repressor activity conferred by the distal portion of the chicken collagen X promoter. *J. Cell. Biochem.* 70: 507-516

Everts, R.E, H.A.W. Hazewinkel, J. Rothuizen and B.A. van Oost. 2000. Bone disorders in the dog: a review of modern genetic strategies to find the underlying causes. *Vet. Quart.* 22: 63-70

Frischholz, S., F. Beier, I. Girkontaite, K. Wagner, E. Pöschl, J. Turnay, U. Mayer and K. von der Mark. 1998. Characterization of human type X procollagen and its nc-1 domain expressed as recombinant proteins in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 273: 4547-4555

Gibson, G.J. and M.H. Flint. 1985. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J. Cell Biol.* 101: 277-284

Grant, W. T., M. D. Sussman and G. Balian. 1985. A disulfide-bonded short chain collagen synthesized by degenerative and calcifying zones of bovine growth plate cartilage. *J. Biol. Chem.* 260: 3798–3803

Ikegawa, S., K. Nakamura, A. Nagano, N. Haga and Y. Nakamura. 1997. Mutations in the n-terminal globular domain of the type X collagen gene (COL10A1) in patients with Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Human Mutation.* 9: 131-135

Ikegawa, S., G. Nishimura, T. Nagai, T. Hasegawa, H. Ohashi and Y. Nakamura. 1998. Mutation of the type X collagen gene (COL10A1) causes spondylometaphyseal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1659–1662

Jacenko, O., P.A. LuValle and B. R. Olsen. 1993a. Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature.* 365: 56–61

Jacenko, O., P. LuValle, K. Solum and B.R Olsen. 1993b. A dominant negative mutation in the col (X) collagen gene produces spondylometaphyseal defects in mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383B: 427-436

Jacenko, O., S. Ito and B.R. Olsen. 1996. Skeletal and hematopoietic defects in mice transgenic for collagen X. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 785: 278-280

Jacenko, O., D. Chan, A. Franklin, S. Ito, C.B. Underhill, J.F. Bateman and M.R. Campbell. 2001. A dominant interference collagen X mutation disrupts hypertrophic chondrocyte pericellular matrix and glycosaminoglycan and proteoglycan distribution in transgenic mice. *Am. J. Pathology.* 159: 2257-2269

Kielty, C.M., A.P.L. Kwan, D.F. Holmes, S.L. Schor, and M.E. Grant. 1985. Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem. J.* 227: 545–554

Kirsch, T. and K. von der Mark. 1990. Isolation of bovine type X collagen and immunolocalization in growth-plate cartilage. *Biochem. J.* 265: 453–459

Kirsch, T. and K. von der Mark. 1991a. Isolation of human type X collagen and immunolocalization in fetal human cartilage. *Eur. J. Biochem.* 196: 575–580

Kirsch, T. and K. von der Mark. 1991b. Ca<sup>2+</sup> binding properties of type X collagen. *FEBS Lett.* 294: 149–152

Kirsch, T. and R.E. Wuthier. 1994. Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J. Biol. Chem.* 269: 11462–11469

Kong, R.Y.C., K.M. Kwan, E.T. Lau, J.T. Thomas, R.P. Boot-Handford, M.E. Grant and K.S.E. Cheah. 1993. Intron-exon structure, alternative use of promoter and expression of the collagen X gene, COL10A-1. *Eur. J. Biochem.* 213: 99-111

Kwan, A.P.L., A.J. Freemont and M.E. Grant. 1986. Immunoperoxidase localization of type X collagen in chick tibiae. *Biosci. Rep.* 6: 155-162

Kwan, A.P.L., I.R. Dickson, A.J. Freemont and M.E. Grant. 1989. Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* 109: 1849-1856

Kwan, A.P.L., C.E. Cummings, J.A. Chapman, and M.E. Grant. 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J. Cell Biol.* 114: 597-604

Kwan, K.M., M.K.M. Pang, S. Zhou, S. K. Cowan, R.Y.C. Kong, T. Pfordte, B.R. Olsen, D.O. Silience, P.P.L. Tam and K.S.E. Cheah. 1997. Abnormal compartmentation of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J. Cell Biol.* 136: 459-471

Law, A.S., D.W. Burt, I. Alexander, and B.H. Thorp. 1996. Expression of the gene for transforming growth factor-beta in avian dyschondroplasia. *Res. Vet. Sci.* 61: 120-124

Lee, K., B. Lanske, A.C. Karaplis, J.D. Deeds, H. Kohno, R.A. Nissenson, H.M. Kronenberg and G.V. Segre. 1996. Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology* 137: 5109-5118

Long, F., G.E. Sonenshein and T.F. Linsenmayer. 1998. Multiple transcriptional elements in the avian type X collagen gene: identification of Sp1 family proteins as regulators for high level expression in hypertrophic chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 6542-6549

Long, F. and T.F. Linsenmayer. 1995. Tissue-specific regulation of the type X collagen gene: analyses by *in vivo* footprinting and transfection with a proximal promoter region. *J. Biol. Chem.* 270: 31310-31314

LuValle, P., Y. Ninomiya, N.D. Rosenblum and B.R. Olsen. 1988. The type X collagen gene: intron sequences split the 5' untranslated region and separate the coding regions for the non-collagenous amino-terminal and triple-helical domains. *J. Biol. Chem.* 263: 18378-18385

- LuValle, P., M. Hayashi and B.R. Olsen. 1989. Transcriptional regulation of type X collagen during chondrocyte maturation. *Dev. Biol.* 133: 613-616
- LuValle, P., M. Iwamoto, P. Fanning, M. Pacifici and B.R. Olsen. 1993. Multiple negative elements in a gene that codes for an extracellular matrix protein, collagen X, restrict expression to hypertrophic chondrocytes. *J. Cell. Biol.* 121: 1173-1179
- Marks, D.S., C.A. Gregory, G.A. Wallis, A. Brass, K. E. Kadler and R.P. Boot-Handford. 1999. Metaphyseal chondrodysplasia type Schmid mutations are predicted to occur in two distinct three-dimensional clusters within type X collagen nc1 domains that retain the ability to trimerize. *J. Biol. Chem.* 274: 3632-3641
- Marriott, A., S. Ayad and M. E. Grant. 1991. The synthesis of type X collagen by bovine and human growth-plate chondrocytes. *J. Cell Sci.* 99: 641-649
- Martínez, J.S. 2002. Caracterización clínica, patológica y molecular de razas de perros osteocondrodistróficas. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, IPN. México.
- Matsui, Y., N. Yasui, H. Kawabata, K. Ozono, T. Nakata, N. Tsumaki, E. Kataoka, Y. Fujita and T. Ochi. 2000. A novel type X collagen gene mutation (G595R9) associated with Schmid-type metaphyseal chondrodysplasia. *J. Hum. Genet.* 45: 105-108
- McLaughlin, S.H., S.N. Conn and N.J. Bulleid. 1999. Folding and assembly of type X collagen mutants that cause metaphyseal chondrodysplasia-type Schmid: evidence for co-assembly of the mutant and wild-type chains and binding to molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 274: 7570-7575
- McIntosh, I., M.H. Abbott, M.L. Warman, B.R. Olsen and C. A. Francomano. 1994. Additional mutations of type X collagen confirm COL10A1 as the Schmid metaphyseal chondrodysplasia locus. *Hum. Mol. Genet.* 3: 303-307
- McIntosh, I., M.H. Abbott and C.A. Francomano. 1995. Concentrations of mutations causing Schmid metaphyseal chondrodysplasia in the c-terminal noncollagenous domain of type X collagen. *Hum. Mutat.* 5: 121-125
- Nielsen, V. H., C. Bendixen, J. Arnbjerg, C.M. Sørensen, H. E. Jensen, N. M. Shukri and B. Thomsen. 2000. Abnormal growth plate function in pigs carrying a dominant mutation in type X collagen. *Mammalian Genome.* 11: 1087-1092
- Ninomiya, Y., M. Gordon, M. van der Rest, T. Schmid, T. Linsenmayer and B.R. Olsen. 1986. The developmentally regulated type X collagen gene contains a long open reading frame without introns. *J. Biol. Chem.* 261: 5041-5050

Pokharel, R.K., H. Alimsardjono, K. Uno, S. Fujii, R. Shiba and M. Matsuo. 1995. A novel mutation substituting tryptophan with arginine in the carboxyl-terminal, non-collagenous domain of collagen X in a case of Schmid metaphyseal chondrodysplasia *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 217: 1157-1162

Quarto, N., R. Cancedda and F. Descalzi-Cancedda. 1985. Purification and characterization of the low-molecular-mass (type X) collagen from chick-embryo tibial cartilage. *Eur. J. Biochem.* 147: 397-400

Reichenberger, E., F. Beier, P. LuValle, B.R. Olsen, K. von der Mark and W.M. Bertling. 1992 Genomic organization and full-length cDNA sequence of human collagen X. *FEBS Lett.* 311: 305-310

Rosati, R., G.S.B. Horan, G.J. Pinero, S. Garofalo, D.R. Keene, W.A. Horton, B. De Crombrughe and R.R. Behringer. 1994. Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nature Genet.* 8: 129-135

Sande, R.D. and A. Bingel. 1982. Animal models of dwarfism. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice.* 13: 72-87

Sawai, H., A. Ida, N. Nakata and K. Koyama. 1998. Novel missense mutation resulting in the substitution of tyrosine by cysteine at codon 597 of the type X collagen gene associated with Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J. Hum. Genet.* 43: 259-261

Schmid, T.M. and H. E. Conrad. A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes. 1982a. *J. Biol. Chem.* 257: 12444-12450

Schmid, T.M. and H. E. Conrad. 1982b. Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of the chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.* 257: 12451-12457

Schmid, T.M. and T.F. Linsenmayer. 1983. A short chain (pro) collagen from aged endochondral chondrocytes: biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 9504-9509

Schmid, T.M. and T.F. Linsenmayer. 1984a. Denaturation-renaturation properties of two molecular forms of short-chain cartilage collagen. *Biochemistry* 23: 553-558

Schmid, T.M., R. Mayne, R.R. Bruns and T.F. Linsenmayer. 1984b. Molecular structure of short-chain (sc) cartilage collagen by electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.* 86: 186-191

Schmid, T.M., R. Mayne, J.J. Jeffrey and T.F. Linsenmayer. 1986. Type X collagen contains two cleavage sites for a vertebrate collagenase. *J. Biol. Chem.* 261: 4184-4189

Schmid, T.M. and T.F. Linsenmayer. 1990. Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev. Biol.* 138: 53-62

Silhavy, T.J., M. L. Berman and L. W. Enquist. 1984: Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory.

Stigen, O., Christensen, K. 1993. Calcification of intervertebral discs in the Dachshund: an estimation of heritability. *Acta Vet. Scand.* 34: 357-361

Summers, T.A., M.H. Irwin, R. Mayne and G. Balian. 1988. Monoclonal antibodies to type X collagen: biosynthetic studies using an antibody to the amino terminal domain. *J. Biol. Chem.* 263: 581-587

Stratakis, C.A., Z. Orban, A.L. Burns, A. Vottero, C.S. Mitsiades, S.J. Marx, V. Abbassi and G.P. Chrousos. 1996. Dideoxyfingerprinting (DDF) analysis of the type X collagen gene (COL10A1) and identification of a novel mutation (s671p) in a kindred with Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Biochem. Mol. Med.* 59: 112-117

Thomas, J.T., C.J. Cresswell, B. Rash, H. Nicolai, T. Jones, E. Solomon, M.E. Grant and R.P. Boot-Handford. 1991. The human collagen X gene: complete primary sequence and chromosomal localization. *Biochem. J.* 280: 617-623

Volk, S.W., P. LuValle, T. Leask and P.S. Leboy. 1998. A bmp responsive transcriptional region in the chicken type X collagen gene. *J. Bone. Miner. Res.* 10: 152-1529

Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G.V. Serge, M. Kronerberg and C.J. Tabin. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and pth-related protein. *Science.* 273: 613-622

Wagner, K., E. PöSchl, J. Turnay, J. Baik, T. Pihlajaniemi, S. Frischholz and K. von der Mark. 2000. Coexpression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of prolyl-4-hydroxylase stabilizes the triple helix of recombinant human type X collagen. *Biochem. J.* 352: 907-911

Wallis, G.A., B. Rash, W.A. Sweetman, J.T. Thomas, M. Super, G. Evans, M.E. Grant and R.P. Boot-Handford. 1994. Amino acid substitutions of conserved residues in the carboxyl-terminal domain of the  $\alpha$ (X) chain of type X collagen occur



in two unrelated families with metaphyseal chondrodysplasia type Schmid. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 169-178

Warman, M.L., M. Abbott, S.S. Apte, T. Hefferon, I. McIntosh, D.H. Cohn, J.T. Hecht, B.R. Olsen and C.A. Francomano. 1993. A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nature Genet.* 5: 79-82

Weir, E.C., W.M. Philbrick, M. Amling, L.A. Neff, R. Baron and A.E. Broadus. 1996. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10240-10245

Wilson, R., S. Freddi and J. F. Bateman. 2002. Collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia nc1 domain mutations are selectively retained and degraded in stably transfected cells. *J. Biol. Chem.* 277: 12516-12524

Zhang, Y. and Q. Chen. 1999. The noncollagenous domain 1 of type X collagen: a novel motif for trimer and higher order multimer formation without a triple helix. *J. Biol. Chem.* 274: 22409-22413

## **APÉNDICE I: PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE**

Mezclar 200-500 ul de sangre con 400-1000 ul de H<sub>2</sub>O dd estéril.

Centrifugar 12,000 rpm / 5-7 min a 4 °C. Repetir 2 veces ambos pasos.

Resuspender la pastilla en 500 ul de solución de lisis.

Agregar RNAsa (10- 20 ug/ml final) e incubar a 37 °C durante 1 hr.

Adicionar Proteinasa K (50-100 ug/ml final) e incubar a 50 °C durante 2 hr (55 °C toda la noche) y a 65 °C durante 1 hr.

Poner 250 ul de 5MNaCl (2M final), agitar 15 seg y centrifugar 13,500 rpm / 10 min.

Recuperar el sobrenadante y agregar un volumen de isopropanol o 2 de etanol frío o mantener a -20 °C durante 2 hr o a 4 °C toda la noche.

Centrifugar a 10,000 rpm / 10 min a 4 °C.

Lavar con etanol 70 % 2 veces, centrifugando a 12,000 rpm / 10 min a 4 °C.

Secar la pastilla y resuspender en H<sub>2</sub>O dd estéril, volumen mínimo. Cuantificar.

Si el DNA se encuentra sucio se puede repurificar agregando un vol. de 6M Clorhidrato de Guanidina 0.1M Acetato de sodio pH 5.2. Se incuba 1 hr a 37 °C y se precipita con 2 vol. de etanol y se lava 2 veces con etanol 70 %.

Solución de Lisis: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 400mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5 % SDS.

## **APÉNDICE II: PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR TEJIDO**

El DNA debe ser rápidamente purificado de acuerdo al siguiente protocolo:

Se cortan de 2 a 5 gr de tejido (hígado) en pedazos muy pequeños.

Congelar en nitrógeno líquido y pulverizar finamente en un mortero.

Agregar 10 volúmenes de solución de lisis (tomando como equivalencia 1 gr  $\equiv$  1 ml) y pipetear rápidamente para disgregar los grumos.

Digerir el lisado con RNAsa (10-20 ug/ml final) a 37 °C durante 1 hr.

Adicionar Proteinasa K (100 ug/ ml final) e incubar durante 2 hr a 55°C (o a 55 °C durante toda la noche) y 1 hr a 65 °C.

Agregar 5M NaCl (2M final) y agitar 15 seg. Centrifugar a 4500 rpm durante 10-15 min.

Recuperar el sobrenadante y precipitar con 2 volúmenes de etanol o 1 de isopropanol. Centrifugar a 4,500 rpm durante 15 min a 4 °C.

Secar la pastilla y resuspender en solución de lisis (volumen mínimo). Para volver a homogenizar sin pipetear mucho, se incuba a 37 °C durante 15 min.

Realizar una extracción fenólica poniendo un volumen de fenol saturado en Tris-HCl, se agita 10 seg y centrifugar a 4,000 rpm por 10 min. Recuperar fase acuosa.

Hacer dos extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, adicionando un volumen y agitando 10 seg. Centrifugar a 4,000 rpm durante 10 min.

Recuperar la fase acuosa y agregar 2 vol de etanol.

Empastillar el DNA centrifugando a 4,500 rpm durante 20 a 30 min, secar y realizar dos lavados con etanol al 70%.

Secar y resuspender en H<sub>2</sub>O dd estéril. Verificar en gel y cuantificar.

Solución de lisis: 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5 % Sarkosyl.

### **APÉNDICE III: PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA POR SÍLICA**

La técnica está basada en una matriz de sílica con capacidad de unión a DNA.

El procedimiento de recuperación de fragmento es similar al de GeneClean:

El fragmento es separado por electroforesis en un gel de agarosa a concentración adecuada y una vez visualizado en luz UV, se corta del gel y se coloca en tubos de 1.5 ml.

Estimar el peso del gel.

Adicionar 3  $\mu$ l de 6M NaI por cada 100 mg de gel.

Incubar a 50-55 °C durante 5-10 min hasta disolver el gel.

Añadir 12  $\mu$ l de la suspensión de sílica o "perlas" (100 mg/ml) y mezclar.

Incubar en hielo de 30 a 60 min. Mezclar a intervalos de 20 min.

Centrifugar la mezcla a 12,000 rpm / 4 min.

Decantar y añadir a la pastilla 250  $\mu$ l de Buffer de Lavado. Vortex. Centrifugar a 12,000 rpm durante 3 min. Realizar este lavado 2 veces.

Secar la pastilla decantando e incubando a 50-55 °C.

Resuspender en 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O dd estéril e incubar a 55°C durante 5 min.

Se centrifuga a 12,000 rpm durante 4 min. Se recupera el sobrenadante (sin tomar la sílica) en un tubo limpio.

Verificar el fragmento en un gel apropiado.

Solución de Lavado.- 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5mM EDTA, 50% v/v etanol.

## **APÉNDICE IV: TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DH10B CON EL VECTOR PBS/ECORV**

Emplear 20 ng de vector a partir de la reacción de ligación.

Utilizar 100  $\mu$ l de células competentes DH10B y mezclar con 8  $\mu$ l de reacción de ligación en tubos de 1.5 ml.

Incubar de la mezcla en hielo durante 30 min.

Incubar a 42° C por 1 min 30 seg.

Incubar en hielo durante 1 min.

Añadir 900  $\mu$ l de medio LB.

Incubar a 37° durante 1 hr.

Plaquear las células, para ello concentrar centrifugando a 10,000 rpm durante 4 min, eliminar el sobrenadante excepto 100  $\mu$ l, en los cuales se resuspenden las células.

Sembrar en cajas petri con LBagar-100 ug/ml Xgal; 100  $\mu$ g/ml ampicilina, 100 mM IPTG, incubando a 37° C toda la noche.

## **APÉNDICE V: EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO DE BACTERIAS TRANSFORMANTES**

Modificación al método de Silhavy *et al.*

Cultivar la cepa en 3 ml de LB ampicilina (100ug/ml) durante toda la noche a 37 °C con agitación constante.

Centrifugar a 12,000rpm durante 6 min. Decantar.

Resuspender la pastilla perfectamente en 200 ul de solución de lisis. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

Adicionar lisozima (1.25 a 1.5 ug/ml final) e incubar 10 a 15 min a temperatura ambiente.

Hervir en baño maría 1 min.

Adicionar RNAsa A a 20 ug/ml final e incubar a 37 °C por 30 min.

Añadir Proteinasa K a 50 ug/ml final. Incubar a 55 °C durante 30 min.

Incubar a 95 °C 3 min.

Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min.

Recuperar el sobrenadante y colocar 2 volúmenes de etanol frío.

Empastillar el DNA centrifugando a 14,000 rpm por 5 min.

Lavar con etanol al 70 % dos veces. Secar y resuspender en 50 a 100 ul de H<sub>2</sub>O dd estéril.

Verificar en gel y cuantificar.

Solución de Lisis: 8% Sacarosa, 5% tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0

## APÉNDICE VI: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS Y TRADUCCIÓN TEÓRICA DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL EXÓN 3 DEL GEN COL10A1

Las cajas indican el dominio amino terminal (parte final) y el dominio carboxilo terminal completo.

1	TA TCA GTA AGA Ser Val Arg	GGA GAG CAA GGT ATT CCT GGT CCA CAA GGC CCC GCT GGA CCT CGA Gly Glu Gln Gly Ile Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ala Gly Pro Arg
58	GGG CAC CCA GGG CCA TCA GGA CCA CCA GGA AAA CCA GGC CAC GGA AGT CCT GGA CCC Gly His Pro Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly His Gly Ser Pro Gly Pro	
115	CAA GGA GAG CCG GGG TTG CCT GGC CCA CCG GGA CCA TCG GCC ACT GGG AAG CCA GGT Gln Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Pro Gly Pro Ser Ala Thr Gly Lys Pro Gly	
172	TTG CCA GGA CTG CCA GGA AAA CCA GGG TCG AAA GGA CCA TCT GGA CCA AAA GGA GAT Leu Pro Gly Leu Pro Gly Lys Pro Gly Ser Lys Gly Pro Ser Gly Pro Lys Gly Asp	
229	ATT GGA CCA GCT GGT TTA CCG GGA CCA CGG GGC CCA CCA GGG CCA CCC GGA AGC CCC Ile Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Pro Gly Pro Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ser Pro	
286	GGC CCA GCT GGA ATT ACT ATT CCA GGA AAA CCT GGA CAA CAG GGA CCT ATG GGA GCC Gly Pro Ala Gly Ile Thr Ile Pro Gly Lys Pro Gly Gln Gln Gly Pro Met Gly Ala	
343	CCA GGA CCC AGG GGA TTT CCA GGA GAA AAG GGG GCA CCA GGA GTC CCT GGT GTG CAT Pro Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Glu Lys Gly Ala Pro Gly Val Pro Gly Val His	
400	GGA CAG AAA GGG GAA ACA GGA TAT GGC GCT CCT GGA CGC CCA GGT GAG AGA GGC CCT Gly Gln Lys Gly Glu Thr Gly Tyr Gly Ala Pro Gly Arg Pro Gly Glu Arg Gly Pro	
457	CCT GGC CCT CAG GGT CCC CTG GGA CCC CCG GGC CCA CCT GGA GTG GGA AAA AGA GGT Pro Gly Pro Lys Gln Gly Pro Leu Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Val Gly Lys Arg Gly	
514	GAA ACT GGC TTT CCA GGA CAG CCA GGC ATC AAA GGT GAT CGG GGC TTT CCA GGA GAG Glu Thr Gly Phe Pro Gly Gln Pro Gly Ile Lys Gly Asp Arg Gly Phe Pro Gly Glu	
571	AGG GGA GCA GCT GGC CCA CCA GGC CCC CAA GGT CCT CCC GGG GAA CGA GGA CCA GAA Arg Gly Ala Ala Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Pro Glu	
628	GGC ACT GGG AAG CCA GGA GCC CCA GGA GCC CCA GGC CAG CCA GGG ATT CCT GGG ACA Gly Thr Gly Lys Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Gln Pro Gly Ile Pro Gly Thr	
685	AAA GGT CAC CCT GGC GCT CCC GGA ATA GCT GGG TCC CCA GGG GCT CCT GGC TTC GGG Lys Gly His Pro Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ser Pro Gly Ala Pro Gly Phe Gly	
742	AAA CCG GGG TTG CCA GGC CTA AAG GGA CAA AGA GGA CCC ATT GGC CTT CCA GGA AGT Lys Pro Gly Leu Pro Gly Leu Lys Gly Gln Arg Gly Pro Ile Gly Leu Pro Gly Ser	
779	CCA GGT GCT AAA GGG GAA CAA GGC CCG GCA GGT CAT CCC GGG GAA CCA GGT CTG ACT Pro Gly Ala Lys Gly Glu Gln Gly Pro Ala Gly His Pro Gly Glu Pro Gly Leu Thr	
856	GGA CCT CCC GGA AAT ATG GGA CCC CAA GGA CCA AAA GGC ATC CCA GGC AAC CAA GGG Gly Pro Pro Gly Asn Met Gly Pro Gln Gly Pro Lys Gly Ile Pro Gly Asn Gln Gly	

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

913 ATT CCA GGC CCT AAA GGT GAG ATG GGG CCA GTG GGG CCT GCA GGA CAC CCT GGG GCA  
 Ile Pro Gly Pro Lys Gly Glu Met Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly His Pro Gly Ala  
 970 AAG GGA GAA AGG GGT TCC TCT GGG TTA GAT GGA AAA CCG GGG TAC CCC GGA GAA CCA  
 Lys Gly Glu Arg Gly Ser Ser Gly Leu Asp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Gly Glu Pro  
 1027 GGC AGC AGT GGT CCT AAG GGA AAC TCA GGG TTA CCG GGC CCT AAA GGT GAT GCT GGA  
 Gly Ser Ser Gly Pro Lys Gly Asn Ser Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly  
 1084 CTC AGA GGG TGT CCT GGT CTT CCA GGC CCC GTG GGC CCG GCA GGC GCT AAG GGA ACG  
 Leu Arg Gly Ser Pro Gly Leu Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Ala Lys Gly Thr  
 1141 CCT GGA CAC AAT GGT GAG ACT GGT CCA AGA GGT GCT CCT GGA ATC CCA GGA ACC AGA  
 Pro Gly His Asn Gly Glu Thr Gly Pro Arg Gly Tlc Ala Pro Gly Ile Pro Gly Thr Arg  
 1998 GGC CCC ATT GGG CCG CCA GGC ATT CCC GGA TTC CCT GGA TCT AAA GGG GAT CCA GGA  
 Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Phe Pro Gly Ser Lys Gly Asp Pro Gly  
 1255 ATT CCA GGT CCC CCT GGC CCA GCT GGC GTG GCA ACT AAG GGG CTT AAT GGT CCC ACT  
 Ile Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Asn Gly Pro Thr  
 1312 GGG CCA CCA GGG CCT CCG GGT CCG AGA GGC CAC GCT GGA GAG CCT GGC CTC CCA GGT  
 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly His Ala Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly  
 1369 CCC CCA GGC CCC CCG GGC CCC CCG GGC CAA GCG GCC TCG TCT GAG GGC TTC ATA AAG  
 Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Gln Ala Ala Ser Ser Glu Gly Phe Ile Lys  
 1426 GCA GGC CAA CAG CCT TTC GTT AGC GCC CAC CAG GGA GTA ACA GGA ATG CCG ATG TCT  
 Ala Gly Gln Gln Pro Phe Val Ser Ala His Gln Gly Val Thr Gly Met Pro Met Ser  
 1483 GCG TTC ACT GTC ATC CTC TCC AAA GCT TAT CCG GCC GTG GGT ATT CCC ATC CCA TTT  
 Ala Phe Thr Val Ile Leu Ser Lys Ala Tyr Pro Ala Val Gly Ile Pro Ile Pro Phe  
 1540 GAT AAG ATC TTG TAT AAC AAG CAA CAG CAT TAT GAC CCA AGA ACT GGA ATC TTC ACC  
 Asp Lys Ile Leu Tyr Asn Lys Gln Gln His Tyr Asp Pro Arg Thr Gly Ile Phe Thr  
 1597 TGC CAG ATC CCA GGA ACA TAC TAT TTC TCC TAC CAC GTG CAT GTG AAA AGC ACC CAC  
 Cys Gln Ile Pro Gly Thr Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Val His Val Lys Ser Thr His  
 1654 GTT TGG GTG GGC CTC TAT AAG AAC GGC ACC CCT GTG ATG TAC ACC TAC GAC GAA TAC  
 Val Trp Val Gly Leu Tyr Lys Asn Gly Thr Tyr Val Met Tyr Thr Tyr Asp Gly Tyr  
 1711 ACC AAG GGC TAC CTG GAT CAG GCT TCG GGG AGC GCC GTG CTC GAG CTC ACG GAG AAC  
 Thr Lys Gly Tyr Leu Asp Gln Ala Ser Gly Ser Ala Val Leu Glu Leu Thr Glu Asn  
 1768 GAC CAG GTG TGG CTC CAG CTG CCC AAC ACG GGA TCG AAC GGG CTG TAC TCC TCC CAG  
 Asp Gln Val Trp Leu Gln Leu Pro Asn Thr Tyr Ser Asn Gly Leu Tyr Ser Ser Gln  
 1825 TAC GTC CAC TCC TCT TTC TCA GGG TTA GTG GCT CCA ATG TGA  
 Tyr Val His Ser Ser Phe Ser Gly Phe Leu Val Ala Pro Met ---

**TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN**



## APÉNDICE VII: ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL EXÓN 3 DEL GEN COL10A1 EN VERTEBRADOS

La secuencia del humano es el patrón de comparación. Se muestran sólo las diferencias, los puntos indican la misma base, las líneas indican ausencia de base.

	10	20	30	40	50	60
Homo sapiens	TAGCAGTAAAGAGGAGACCAAGGTACCCCTGGTCCACCAGGCCCTGTGGACCTCGAGGGC					
Bos taurus	..T..C.G.....C.T.....C.....					
Sus scrofa	.T..C.....TT..C.....C.....A.....					
Canis familiaris	.T.....TT.....A.....C.....					
	70	80	90	100	110	120
Homo sapiens	ACCCAGGTCCTTCTGGACCACCAGGAAACCCAGGCTACGGAACTCTGGACTCCAAGGAG					
Bos taurus	.....C..G..A.....G..C...AC.....G..C.....C.....					
Sus scrofa	.....A.....C.....T.....C.....C.....C.....					
Canis familiaris	.....G..A..A.....C.....C.....					
	130	140	150	160	170	180
Homo sapiens	AGCCAGGGTTGCCAGGACCACCGGGACCATCAGCTGTAGGAAACCAGGTGTGCCAGGAC					
Bos taurus	.....G.....CACT.....G.....T.....					
Sus scrofa	.....C.....A.....CACT.....G.....T.....					
Canis familiaris	...G.....T..C.....G..CACT.....G.....T.....					
	190	200	210	220	230	240
Homo sapiens	TCCCAGGAAAACCAGGAGAGAGGACCATATGGACCAAAGGAGATGTTGGACCAGCTG					
Bos taurus	.....A..G.....T.A.....A.....					
Sus scrofa	C..A.....G.....A.....A.G.....G.....					
Canis familiaris	.G.....GTC..A.....C.....A.....					
	250	260	270	280	290	300
Homo sapiens	GCCTACCAGGACCCCGGGGCCACCAGGACCACCTGGAATCCCTGGACCGGCTGGAATT					
Bos taurus	.TT.....A.....C.....C..C..A.....					
Sus scrofa	.TT.....A.....G.....T.....C..C.....					
Canis familiaris	.TT..G.....A.....G.....C.....G..C..C..A.....A.....					
	310	320	330	340	350	360
Homo sapiens	CTGTGCCAGGAAAACCTGGACAACAGGGACCCACAGGAGCCCAAGGACCCAGGACCCAGGGGCTTC					
Bos taurus	...T.....G..C..A...T.....AA...T.....					
Sus scrofa	...TA.....TG.....					
Canis familiaris	.A.T.....T.TG.....A.....					

LEER CON  
 FALLA DE ORIGEN

	370	380	390	400	410	420
Homo sapiens	CTGGAGAAAAGGGTGCACCAGGAGTCCCTGGTATGAATGGACAGAAAGGGGAAATGGGAT					
Bos taurus	.....A.GT.....G.....AC.....					GC
Sus scrofa	.....C.....					CA
Canis familiaris	A.....G.....G.C.....					CA
	430	440	450	460	470	480
Homo sapiens	ATGGTGCTCCTGGTCGTCCAGGTGAGAGGGGTCTCCAGGCCCTCAGGGTCCCACAGGAC					
Bos taurus	..T.A...T.C.C.....C.C...T.....G...					GC
Sus scrofa	.....C.C.....C.C.....C.....C.A.TG...					GC
Canis familiaris	.....C.....A.C.....A.C.C.T.....CTG...					GC
	490	500	510	520	530	540
Homo sapiens	CATCTGCCCTCCTGGAGTGGGAAAAGAGGTGAAATGGGGTTCAGGACAGCCAGCCA					
Bos taurus	..C.....G.....T.A.....C					GC
Sus scrofa	.....C.....G.....G.....T...C...A.....					GC
Canis familiaris	CC.G....A.....C.....CT.....					GC
	550	560	570	580	590	600
Homo sapiens	TCAAAGGTGATAGAGGTTTTCGGGAGAAATGGGACCAATTGGCCACAGGTCCTCCCAAG					
Bos taurus	.....CAG..G...A.G...G...GCC...T...C.T...					GC
Sus scrofa	.....C.G.C...A.....GT...GGC...T...C.....					GC
Canis familiaris	.....C.G.C...A...G.G...G..GC.....C.....					GC
	610	620	630	640	650	660
Homo sapiens	GCCCTCCTGGGAAACGAGGGCCAGAAGGCATGGAAAGCCAGGAGCTGCTGGAGCCCCAG					
Bos taurus	.....A.A.....CC...ATT.....					GC
Sus scrofa	.....T.....A..A.G.....C.....G...					GC
Canis familiaris	T...C.....A.....C..G.....CC.A.....					GC
	670	680	690	700	710	720
Homo sapiens	GCCAGCCAGGGATTCCAGGAACAAAAGGTCTCCCTGGGGCTCCAGGAATAGCTGGGCCCC					
Bos taurus	.....C.....G.TG...AG.A.....C...T..					GC
Sus scrofa	.....C.....G.....A..C.....G.....T..					GC
Canis familiaris	.....T.G.....A.....C...C.....T.....					GC
	730	740	750	760	770	780
Homo sapiens	CAGGGCCTCCTGGCTTTGGGAAACCAGGCTTGCAGGCCCTGAAGGGAGAAAGAGGACCTG					
Bos taurus	..G..G..C.....G.....C...G.....					GC
Sus scrofa	.....G.....G.....A.....C.....T...A					GC
Canis familiaris	.....G.....C.....G.G.....A.....C.....CA					GC
	790	800	810	820	830	840
Homo sapiens	CTGGCCTCCTGGGGTCCAGGTGCCAAAGGGGAAACAAGGGCCAGCAGGTCTTCTGGGA					
Bos taurus	TG.....A..A.....C.....A.....G					GC
Sus scrofa	TA.....A..C.....C.....G.....A.....G					GC
Canis familiaris	T.....A..AA.....T.....C..G.....A...C...G					GC

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

	850	860	870	880	890	900
Homo sapiens	AGCCAGGTC	TGACTGGACCCCCTGGGAATATGGGACCCCAAGGACCAAAGGCATCCCGG				
Bos taurus	.AG.....C.C.....T.A.....					.T.A.
Sus scrofa	.A.....		.A.G..G.....			.A.
Canis familiaris	.A.....	T.C.A.....				.A.
	910	920	930	940	950	960
Homo sapiens	GTAGCCATGGTCTCCAGGCCCTAAAGGTGAGACAGGGCCAGCTGGGCCTGCAGGATACC					
Bos taurus	.C.A..CC..G.....			TG.....TG.....		.A.
Sus scrofa	.C.ATA.C..GG.....		G.....T.....TG.....			.T.
Canis familiaris	.C.A...A.GA.T.....			TG.....TG.....		.C..
	970	980	990	1000	1010	1020
Homo sapiens	CTGGGGCTAAGGTTAAAGGGTTCCCTCGGTCAGATGGAAAACCAGGGTACCCAGGAA					
Bos taurus	.....G.....A.....C..T.....C.T.....					.G
Sus scrofa	.....A.....		CC..T.C.....T.....			.G
Canis familiaris	.....A.....A.....		T.....T.....		G.....	C..G
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Homo sapiens	AACCAGGTC	TCGATGGTCTCAAGGGTAACCCAGGGTTACCAGGTCCAAAGGTGATCCGT				
Bos taurus	.....A.....A.....C.....			G.....C.....C.....		.C..
Sus scrofa	.....A.....A.....C.....			C..C.....C.....		.G..
Canis familiaris	.....CAG.AG.....		A..T.....	G..C..T.....		.C..
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Homo sapiens	GAGTTGGAGGACTCCTGGTCTCCAGGCCCTGTGGGCCAGCAGGAGCAAAGGGAATGC					
Bos taurus	.A..C...T.C.....			C...T.....T.....		.G..
Sus scrofa	.A.....			T.....T.....		.G..
Canis familiaris	.C.CA...GT.....		T.....C.....	G...C..T.....		.C..
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Homo sapiens	CCGGACACAAATGGAGAGGCTGGCCCAAGAGGTGCCCTCGGAATACCAGGTACTAGAGGCC					
Bos taurus	.T.....C.A.....G.C.....T.....					.T.
Sus scrofa	.T.....T.....G.....					.C..T.
Canis familiaris	.T.....T..A...T.....T.....			C...A..C.....		
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Homo sapiens	CTATTGGGCCACCAGGCATTCCAGGATTCCTGGGTCTAAAGGGGATCCAGGAAGTCCCG					
Bos taurus	.C.....			A..C...C..GTG...C..A.		.A.
Sus scrofa	.C..C.....			C.....T.....A..A.		
Canis familiaris	.C.....G.....C.....A.....			T.....T.....		.A.
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Homo sapiens	GTCCCTCGTGGCCAGCTGGCATAGCAACTAAGGGCCCTCAATGGACCCACCAGGGCCACCAG					
Bos taurus	.G.....T.....			GTC.....T.....T.....		.A..A.
Sus scrofa	.....T.....			T.....T.....		.T.
Canis familiaris	...C.....G.G.....G.T...T.....			T.....T.....		

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Homo sapiens	GGCCTCCAGGTC	CCAAGAGGCCACT	CTGAGAGCCTGG	CTCTCCAGGCCCC	CTGGGCTC	
Bos taurus	.G.G.	.A.TG.	.G.	.C.C.	.A.	.C.
Sus scrofa	.A.	.A.T.TG.		.C.C.	.A.	.C.
Canis familiaris	.G.	.G.	.G.	.C.C.	.T.	.A.C.C.
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Homo sapiens	CAGGCCACCAGG	TCAGCAGTCAT	GCCTGAGGGT	TTTATAAAGG	CAGGCCAAAG	GGCCCA
Bos taurus	.T.	.C.	.T.C.C.	.C.	.AC.	.G.
Sus scrofa	.T.	.C.	.G.CCA.	.C.A.C.	.G.	.A.A.G.
Canis familiaris	.G.	.C.G.C.	.G.C.TC.T.	.C.C.		.CA.
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Homo sapiens	GTCTTTCTGGG	ACCCCTCTTG	TAGTGCCAACC	AGGGGTAAC	CAGGAATGC	CTGTGCTG
Bos taurus	-----	.GT.	.T.	.A.		
Sus scrofa	-----	.G.T.		.A.		.A.
Canis familiaris	-----	.T.C.	.C.C.	.A.		.GA.
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Homo sapiens	CTTTTACTGTT	TCTCTCCAA	AGCTTACC	CAGCAATAG	GAACTCCC	CATACCATT
Bos taurus	.C.	.C.		.T.	.T.	.T.C.C.
Sus scrofa	.C.C.	.G.		.T.	.TG.	.C.C.
Canis familiaris	.G.C.	.C.C.		.T.G.CG.G.	.T.T.	.C.
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Homo sapiens	AAATTTGTATA	AACAGGCAAC	GAGCATTAT	GACCCAAGG	ACTGGAA	TCTTTACTT
Bos taurus	.G.	.A.	.A.	.A.	.C.C.	.A.
Sus scrofa	.G.	.A.	.G.	.C.	.AA.	.C.CAG.
Canis familiaris	.G.C.	.A.		.A.		.C.C.C.
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Homo sapiens	TACCAGGAAT	AATACTATTT	TTCATACC	AGTGCA	TGTGAAAGG	ACTCATGTT
Bos taurus	.T.	.G.	.T.C.C.T.	.A.A.C.	.C.	.C.
Sus scrofa	.T.	.C.T.C.C.C.	.C.	.A.T.C.	.G.	.C.C.C.
Canis familiaris	.C.	.C.C.C.C.C.	.C.		.A.C.C.C.	.G.
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Homo sapiens	GCCTGTATAAG	AATGGCACCC	CTGTAATGT	ACCTATGAT	GAATACAC	CAAAGGCTACC
Bos taurus	.T.	.C.		.A.	.G.	.T.G.
Sus scrofa	.A.		.C.		.TGT.	
Canis familiaris	.C.	.C.	.G.	.C.C.		.G.
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Homo sapiens	TGGATCAGC	GTTCAGG	AGTGCCAT	CATCGAT	CTCACAGAA	AAATGACCAG
Bos taurus	.C.	.G.G.	.C.	.C.G.C.	.A.	
Sus scrofa			.C.T.	.T.	.A.	
Canis familiaris	.G.	.C.G.CC.	.G.	.G.G.C.		

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Homo sapiens	AGCTTCCAATGCCGAGTCAAATGGCCTATACTCCTCTGAGTATGTCCACTCCTCTTTCT					
Bos taurus	....G.....A.GC..G..C..G..G..T...C.....C.....					
Sus scrofa	....G.....C..T.G..G..C..G..G.....C.....					
Canis familiaris	....G.....CA.G.GA..G..C..G..G.....CC...C.....					
	1870	1880				
Homo sapiens	CAGGATTCCCTAGTGGCTCCAATGTGA					
Bos taurus	.....T.G.....					
Sus scrofa	.....					
Canis familiaris	....G...T.....					

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**APÉNDICE VIII: ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA COLÁGENA TIPO X CODIFICADAS POR EL EXÓN 3 DEL GEN COL10A1 EN VERTEBRADOS**

La secuencia del humano es el patrón de comparación. Se muestran sólo las diferencias; los puntos indican el mismo aa, las líneas indican ausencia de aa.

	10	20	30	40	50	60
Homo sapiens	AVRGEQQT	PGPPGAGPRGH	PGSPGPKFGYGS	PGLQGE	PGLPGPPGSA	AVGKPGV
Bos taurus	SL.....	I.....	.....	T...P.Q.....	.....	T...L...
Sus scrofa	SL.....	I.....	.....	F...P.Q.....	.....	T...L...P
Canis familiaris	S.....	I...Q.....	.....	H.....	.....	T...L...
	70	80	90	100	110	120
Homo sapiens	PGKPGERGPY	GPKGDVGPAGL	PGFRGPPGPPGIP	PGAGISV	PGKPGQOGPT	GAPGRGFP
Bos taurus	...Q....	LN....	I.....	.....	P.....	E.....
Sus scrofa	Q.....	.....	M.....	.....	T.....	A.....
Canis familiaris	...SK.S...	I.....	.....	S.....	TI.....	M.....
	130	140	150	160	170	180
Homo sapiens	GEKGAPGV	PGMNGKGM	GYGAFGR	PRGERGL	PGPQGT	GPSGPPGV
Bos taurus	...TS....	L....	HCT.C	.....	P.....	L...L
Sus scrofa	.....	I.....	T.....	D.....	M.P.....	F.....
Canis familiaris	.....	VH....	T.....	P.....	L.P.....	T.F.....
	190	200	210	220	230	240
Homo sapiens	KGDRGFP	GEMGPI	PPGQGP	PPGERG	PEGIGK	PGAAGAP
Bos taurus	...Q.V...R	AA.S...	.....	Q.....	P.I.....	M.Q...T.L
Sus scrofa	.....	S.A....	.....	Q.R...	P.A...	L...H...M...
Canis familiaris	.....	R.AA...	.....	T...P...	.....	H...S...
	250	260	270	280	290	300
Homo sapiens	GPPFGK	GPLPGLK	GERGPAGL	PGGPGAK	GEQGPAGL	PGKPLT
Bos taurus	.A.....	.....	Q.V...S	.....	H.EA.P.S	.....
Sus scrofa	.A.....	.....	Q.I...A	.....	H.E...SR	.....
Canis familiaris	.A.....	.....	Q.I...S	.....	H.E.....	.....
	310	320	330	340	350	360
Homo sapiens	SHLPGPK	GETG	FAGPAGY	PGA	KA	GERGSP
Bos taurus	NP.....	M.V...N	.....	S.L.....	E...N	.....
Sus scrofa	NN.V....	I.L...F	.....	PS.L...	E...N	.....
Canis familiaris	NQ.I....	M.V...H	.....	S.L.....	E.SS...S	.....

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

	370	380	390	400	410	420
Homo sapiens	VGGP	PLGPGV	PAGAKG	MPGHNGE	AGPRGAP	GIPT
Bos taurus	IA.S	.....V	.....V	.....V	.....V	.....T
Sus scrofa	I	.....V	.....V	.....V	.....V	.....N
Canis familiaris	LR.S	.....T	.....T	.....T	.....T	.....I

	430	440	450	460	470	480
Homo sapiens	PPGP	AGIATK	GLNG	PTGPPG	PPGRHSG	EGPLG
Bos taurus	.....V	.....V	.....NA	.....NA	.....VAL	.....D.V
Sus scrofa	.....V	.....K	.....A	.....K	.....P	.....V.E
Canis familiaris	.....V	.....A	.....A	.....A	.....ASS	.....Q

	490	500	510	520	530	540
Homo sapiens	LSGT	PLVSAN	QGV	TGMPVSA	FTVILSK	VAP
Bos taurus	----F	.....F	.....F	.....F	.....K	.....K
Sus scrofa	----AF	.....AF	.....AF	.....A	.....G	.....K
Canis familiaris	----F	.....H	.....M	.....V	.....I	.....K

	550	560	570	580	590	600
Homo sapiens	PGI	YFYSY	HVHV	KGT	HWVGLY	KNGT
Bos taurus	.....I	.....A	.....A	.....I	.....V	.....V
Sus scrofa	.....I	.....I	.....A	.....V	.....L	.....D
Canis familiaris	.....T	.....S	.....S	.....S	.....VLE	.....VLE

	610	620
Homo sapiens	LP	NAESNG
Bos taurus	....G	....P
Sus scrofa	....G	....P
Canis familiaris	....TG	....Q

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

# APÉNDICE IX: ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL EXÓN 3 DEL GEN COL10A1 EN PERROS

La secuencia del Pastor es el patrón de comparación. Se muestran sólo las diferencias. Los puntos indican la misma base, las líneas indican ausencia de base.

		10	20	30	40	50	60
Pastor Alemán	TATCAGTAAGAGGAGCAAGGTATTCCTGGTCCACAAGGCCCGCTGGACCTCGAGGGC						
Basset hound	..G..C.G.....						
Dachshund	..G..C.G.....						
		70	80	90	100	110	120
Pastor Alemán	ACCCAGGGCCATCAGGACCACCAGGAAAACCAGGCCACGGAAGTCTGGACCCCAAGGAG						
Basset hound	.....						
Dachshund	.....						
		130	140	150	160	170	180
Pastor Alemán	AGCCGGGGTTGCCTGGCCACCGGGACCATCGGCCACTGGGAAGCCAGGTTTGCCAGGAC						
Basset hound	.....						
Dachshund	.....						
		190	200	210	220	230	240
Pastor Alemán	TGCCAGGAAAACCAGGGTCTGAAAGGACCATCTGGACCAAAAGGAGATATTGGACCAGTGC						
Basset hound	.....A.....						
Dachshund	.....A.....						
		250	260	270	280	290	300
Pastor Alemán	GTTTACCGGGACCACGGGGCCACCAGGGCCACCCGGAAGCCCGGCCAGCTGGAATTA						
Basset hound	.....						
Dachshund	.....						
		310	320	330	340	350	360
Pastor Alemán	CTATTCCAGGAAAACCTGGACAACAGGGACCATATGGGAGCCCCAGGACCCAGGGGATTTC						
Basset hound	.....C.....						
Dachshund	.....C.....						
		370	380	390	400	410	420
Pastor Alemán	CAGGAGAAAAGGGGGCACCAGGAGTCCCTGGTGTGCATGGACAGAAAGGGGAACAGGAT						
Basset hound	.....						
Dachshund	.....						

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



	430	440	450	460	470	480
Pastor Alemán	ATGGCGCTCCTGGACGCCACGGT	GAGAGAGGCCCTCCTGGCCCTCAGGGT	CCCTCGGGGAC			
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	490	500	510	520	530	540
Pastor Alemán	CCCCGGGCCACCTGGAGTGGGAAAAGAGGTGAAACTGGCTTCCAGGACAGCCAGGCA					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	550	560	570	580	590	600
Pastor Alemán	TCAAAGGTGATCGGGGCTTCCAGGAGAGAGGGGAGCAGCTGGCCACCAGGCCCAAG					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	610	620	630	640	650	660
Pastor Alemán	GTCCCTCCGGGGAACGAGGACCAGAAGGCACTGGGAAGCCAGGAGCCCAAGGAGCCCAAG					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	670	680	690	700	710	720
Pastor Alemán	GCCAGCCAGGGATTCTCTGGGACAAAAGTCAACCCTGGCGCTCCCGGAATAGCTGGGTCCC					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	730	740	750	760	770	780
Pastor Alemán	CAGGGGCTCCTGGCTTCGGGAAACCGGGTTCAGGAGCTAAAGGGACAAAGAGGACCA					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	790	800	810	820	830	840
Pastor Alemán	TTGGCCTCCAGGAAGTCCAGGTGCTAAAGGGGAACAAGGCCCGGCAAGTTCATCCGGGG					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	850	860	870	880	890	900
Pastor Alemán	AACCAGTCTGACTGGACCTCCCGAAATATGGGACCCCAAGGACCAAAAGGCATCCCAAG					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	910	920	930	940	950	960
Pastor Alemán	GCAACCAAGGGATTCCAGGCCCTAAAGGTGAGATGGGGCCAGTGGGGCCTGCAGGACACC					
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	CTGGGGCAAAGGGAGAAAGGGTT	CCTCTGGGTTAGATGGAAA	ACCGGGGTACCCCGGAG			
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	AACCGAGCAGCTGGTCTAAGGGA	AACTCAGGGTTACCGGGCCCT	AAAGGTGATGCTG			
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	GACTCAGAGGCTCTCCTGGTCTT	CCAGGCCCGTGGGCCCGG	CAGGCCTAAGGGAACG			
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	CTGGACACAATGGTGA	GACTGGTCCAAGAGGTG	CTCCTGGAATCCCAGGA	AACAGAGGCC		
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	CCATTGGGCCCGCAGGC	ATTCCCGGATTCCCTGG	ATCTAAAGGGGATCC	AGGAATCCAG		
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	GTCCCCCTGGCCCAGCT	GGCGTGGCAACTAAG	GGGGCTTAATGGTCCC	ACTGGGCCAC	CAG	
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	GGCTCCGGTCCGAGAG	GCACCGCTGGAGAG	CGCTGGCTCC	CAGGTCCCC	AGGGCCCC	
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	CGGGCCCCCGGGCCA	AAGCGGCCTCGTCT	GAGGGCTCATAA	AGGCAGGCCA	ACAGCCTT	
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	TCGTTAGCGCCAC	CAGGGAGTAACAGGA	TGCCGATGTCG	GCTTCACTGTC	ATCCTCT	
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Pastor alemán	CCAAAGCTTATCCGGCCGTGGGTATTCCCATCCCATTGATAAGATCTTGATAACAAGC					
Basset hound	.....C.....					
Dachshund	.....C.....					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Pastor Alemán	AACAGCATTTATGACCCAAGAACTGGAATCTTCCACCTGCCAGATCCCAGGAACATACTATT					
Basset hound	.....					
Dachshund	.....					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Pastor Alemán	TCTCCTACCACGTGCATGTGAAAAGCACCCACGTTGGGTGGGCCTCTATAAGAACGGCA					
Basset hound	.....					
Dachshund	.....					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Pastor Alemán	CCCCTGTGATGTACACCTACGACGAATACACCAAGGGCTACCTGGATCAGGCTTCGGGGA					
Basset hound	.....					
Dachshund	.....					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Pastor Alemán	GCGCCGTGCTCGAGCTCACGGAGAACGACCAGGTGGCTCCAGCTGCCAACACGGGAT					
Basset hound	.....					
Dachshund	.....					
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Pastor Alemán	CGAAGCGGCTGTACTCCTCCAGTACGTCCACTCCTCTTTCTCAGGGTCTTAGTGGCTC					
Basset hound	.....G.....					
Dachshund	.....C.....					
Pastor Alemán	CAATGTGA					
Basset hound	.....					
Dachshund	.....					

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

# APÉNDICE X: ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA COLÁGENA TIPO X CODIFICADAS POR EL EXÓN 3 DEL GEN COL10A1 DE PERROS

La secuencia del Pastor es el patrón de comparación. Se muestran sólo las diferencias, los puntos indican el mismo aa, las líneas indican ausencia de aa.

	10	20	30	40	50	60
Pastor Alemán	SVRGEQGI	PGPQQG	PAGPRGH	PGPSGPP	GPKPHGS	SPGPQGE
Basset hound	AL.....	.....	.....	.....	KESR.	CLAHRD
Dachshund	AL.....	.....	.....	.....	.....	.....
	70	80	90	100	110	120
Pastor Alemán	PGKPGSK	PGSPKGD	IGPAGL	PGPRGPP	PGPPGSP	GAGIT I
Basset hound	QENO.Q.	DHLDQ.	EILDQL	VYRdHG	AHQGHPE	APAEQL
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	130	140	150	160	170	180
Pastor Alemán	GEKGAP	PGVHGQ	KGETGY	GAPGR	GERGPP	PGQGLP
Basset hound	EKRGHQ	ESLVCM	DRKQDM	ALLDAQ	VREALL	ALRVPD
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	190	200	210	220	230	240
Pastor Alemán	KGRGFP	GERGAAG	PPGQGP	GERGPE	GTGKPG	APGAPG
Basset hound	KVIGAF	QERQEQL	AHQAPK	VLPGNED	KALGSQ	EPQEPQ
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	250	260	270	280	290	300
Pastor Alemán	GAPFGK	PGLPGL	KQGRG	PIGLPG	SPGAKG	EQGPAG
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	310	320	330	340	350	360
Pastor Alemán	NQGI	PGPKGEM	PVGPAG	HPGAKG	ERSSGL	DGKPGY
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	370	380	390	400	410	420
Pastor Alemán	LRGSPGL	PGVPG	PAGAKGT	PGHNGET	GPRGAP	PIPTRG
Basset hound	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dachshund	.....	.....	.....	.....	.....	.....

TESIS CON FALLA LE ORIGEN

	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	PPGPAGVATKGLNGPTGPPGGPRGHAGEPGLPGPPGPPGPPGQAASSEGF1KAGQQPF					
Basset hound	-----					
Dachshund	-----					

	490	500	510	520	530	540
	*	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	VSAHQGV TGMPMSAFTVILSKAYPAVGIP1PFDKILYNKQOHYDPRTG1FTCQ1PGTYFF					
Basset hound	-----					
Dachshund	-----					

	550	560	570	580	590
	*	*	*	*	*
Pastor Alemán	SYHVHVKSTHVWVGLYKNGTPVMYTYDEYTKGYLDQ-ASGSAVLELTENDQVWLQ1PNTG				
Basset hound	-----				
Dachshund	-----				

	600	610	620
	*	*	*
Pastor Alemán	SNGLYSSQYVHSSFSGLVAPM		
Basset hound	-----		
Dachshund	-----		

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN