

# **FARMACOGENÉTICA APLICADA AL ANÁLISIS DEL CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO**

**Laura Andrea Caicedo Gutiérrez de Piñeres**



Universidad de Caldas

Maestría en Ciencias Biomédicas

2022

# **FARMACOGENÉTICA APLICADA AL ANÁLISIS DEL CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO**

**Laura Andrea Caicedo Gutiérrez de Piñeres**

Proyecto de Investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ciencias Biomédicas

Juan Manuel Pérez Agudelo

Maestría en Ciencias Biomédicas - Farmacología

Especialista en Epidemiología y Análisis de Datos en Ciencias de la Salud

Maestría en Bioinformática y Biología Computacional

Docente Investigador - Universidad de Caldas



Universidad de Caldas

Maestría en ciencias biomédicas

2022

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>Resumen.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>18</b>
2.1 Metabolismo de fármacos en equinos.....	19
2.2 Citocromos e importancia en el metabolismo de xenobióticos en equinos...	20
2.2.1 Definición y tipos de citocromos.....	20
2.2.2 Importancia de las enzimas del tipo citocromo en el metabolismo de equinos.....	21
2.2.3 Genética de los citocromos en equinos.....	24
2.2.4 Caracterización de los citocromos P450 equinos.....	27
2.3 Identificación de los sitios de reconocimiento de sustratos de las citocromo.....	29
2.4 Bioinformática: Utilidad e importancia.....	35
2.5 Antecedentes.....	36
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivo general.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
<b>4. Materiales y métodos.....</b>	<b>43</b>
4.1 Tipo y diseño de investigación.....	44
4.2 Muestra del estudio.....	44
4.3 Marco metodológico.....	46
4.4 Consideraciones éticas.....	54
<b>5. Resultados.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>72</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Recomendaciones.....</b>	<b>82</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>84</b>

## **DEDICATORIA**

**A mi madre, mis estudiantes y los caballos, que me inspiran para ser mejor cada día.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A todos los que participaron de diversas formas haciendo este proyecto posible y a Dios por darme la fuerza necesaria.**

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resumen de los citocromos de la familia 3A reportados en equinos.....	25
Tabla 2. Criterios de inclusión/selección.....	44
Tabla 3. Datos de calidad y cantidad de las extracciones de DNA.....	46
Tabla 4. Secuencias seleccionadas para comparar con el <i>CYP3A89</i> .....	47
Tabla 5. Secuencias de nucleótidos de los sitios de reconocimiento de sustratos SRS y ubicación en el gen.....	49
Tabla 6. Características de los cebadores diseñados para la investigación.....	51
Tabla 7. Set de cebadores, secuencia, tamaño de banda esperada y temperatura de hibridación.....	52
Tabla 8. Comparación entre las secuencias de nucleótidos de las isoformas de la subfamilia CYP3A.....	57
Tabla 9. Resultados de la secuenciación.....	61
Tabla 10. Matriz de identidad entre las muestras, en el sentido de izquierda a derecha.....	70
Tabla 11. Matriz de identidad entre las muestras, en el sentido de derecha a izquierda .....	71

**LISTA DE FIGURAS**

	Pág.
Figura 1. Resultados del proceso de estandarización a distintas temperaturas en la PCR .....	53
Figura 2. Árbol filogenético.....	58
Figura 3. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 1 con todas las muestras de ADN. ....	59
Figura 4. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 2 con todas las muestras de ADN. ....	59
Figura 5. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 3 con todas las muestras de ADN.....	59
Figura 6. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 4 con todas las muestras de ADN. ....	60
Figura 7. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 5 con todas las muestras de ADN. ....	60
Figura 8. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 6 con todas las muestras de ADN. ....	60

## **RESUMEN**



El caballo más representativo para Colombia es criollo, un animal que se ha adaptado ambiental y culturalmente al país y que ha sido sometido a un proceso de selección por años de interacción con el hombre, participando con un papel protagónico en labores de recreación, deporte y trabajo. Sin embargo, desde la medicina veterinaria, la farmacología en esta población de equinos se entiende de manera incompleta, debido al desconocimiento de los genes que codifican para los citocromos, enzimas que son responsables del metabolismo de una proporción importante de fármacos en equinos. Consecuentes con la responsabilidad de promover el bienestar animal desde la perspectiva de la intervención con fármacos, así que es importante conocer hasta donde sea posible las características de los grupos de individuos.

Dentro de los genes responsables del metabolismo de fármacos en equinos se consideró la familia de genes codificantes para citocromos P450.

En esta investigación se ha hecho un recuento de estudios en diferentes razas de equinos y se han aplicado técnicas de bioinformática y de biología molecular para confrontar la información publicada, con una muestra de 5 caballos y 5 yeguas criollos del suroeste de Antioquia, en Colombia. Con el objetivo de describir algunas características del gen *CYP3A89* en equinos criollos colombianos y su potencial impacto en la actividad metabólica del citocromo; comparando así mismo, los hallazgos con los reportes de otras líneas genéticas.

Con el gen *CYP3A89* seleccionado, se hizo un ejercicio de análisis hasta determinar las regiones de interés y se decidió amplificar y secuenciar seis regiones dentro del gen, correspondientes a los sitios de reconocimiento de sustratos, sitios que son determinantes para el reconocimiento y unión de sustratos. Proceso que requirió iniciar por diseñar los juegos de cebadores específicos con la información del genoma equino disponible y una herramienta de PCR *in silico*, posteriormente con los productos de la PCR de punto final, se hizo el proceso de secuenciación de las seis regiones, en un subgrupo de tres animales. Los resultados de la secuenciación muestran que las regiones específicas que codifican para los sitios de

reconocimiento de sustratos se han conservado y en la muestra revisada no hubo sustituciones, inserciones o deleciones que puedan alterar la forma o la función de la proteína. Demostrando que son regiones altamente conservadas y que, aunque es muy probable las variaciones interespecie, probablemente por la limitación de la muestra, no se evidenciaron. Esto genera un precedente pues es una población con la que antes no se ha hecho investigación en la rama de la farmacogenética.

Así que este tipo de estudios servirán para el análisis de variantes genéticas con fines clínicos, que posteriormente permitirán predecir los fenotipos de los pacientes en medicina veterinaria, hasta lograr hacer un abordaje individualizado.

# **ABSTRACT**

The most representative horse for Colombia is creole, an animal that has adapted environmentally and culturally to the country and has undergone a selection process for years of interaction with man, participating with a leading role in recreation, sports and work. However, from veterinary medicine, the pharmacology in this population of equines is incompletely understood, due to the lack of knowledge about the genes that code for cytochromes, enzymes that are responsible for the metabolism of a significant proportion of drugs in equines. Consistent with the responsibility of promoting animal welfare from the perspective of drug intervention, we consider it important to seek to know as far as possible the characteristics of groups of individuals.

In this research, a recount of studies in different equine breeds has been made and bioinformatics and molecular biology techniques have been applied to confront the published information, with a sample of five creole horses and five creole mares from the southwest of Antioquia, in Colombia. With the aim of describing some characteristics of the *CYP3A89* gene in Colombian Creole equines and its potential impact on cytochrome metabolic activity, comparing the findings with reports of other genetic lines.

With the *CYP3A89* gene selected, an analysis exercise was carried out until the regions of interest were determined and six regions within the gene were amplified and sequenced, corresponding to the substrate recognition sites, sites that are decisive for the recognition and binding of substrates. This process required starting by designing the specific primer sets using the equine genome information available and an *in silico* PCR tool, afterwards with the endpoint PCR products, the sequencing process of the six regions was carried out, in a subgroup of three animals. The sequencing results show that the specific regions encoding the substrate recognition sites have been conserved and there were no substitutions, insertions or deletions in the reviewed sample that could alter the protein shape or function. Demonstrating that they are highly conserved regions and that, although interspecies variations are very likely, probably due to the limitation of the sample, they were not evidenced. This creates a precedent because it's a population with which no research has been done before in the field of pharmacogenetics.

So this type of study will continue to analyze genetic variants for clinical purposes, which will later allow predicting the phenotypes of patients in veterinary medicine, until an individualized approach is achieved.

CAPÍTULO 1

# **INTRODUCCIÓN**

La especie equina participa en la vida de muchas poblaciones, tanto para la recreación, el deporte y el trabajo, y en países como Colombia, es importante para las comunidades rurales en la labor de carga en los cultivos o las fincas ganaderas (1). El caballo predominante para Colombia es criollo, un animal que se ha adaptado ambiental y culturalmente al país y que ha sido sometido a un proceso de selección por ciertas cualidades deseables (2). Pero desde el aspecto médico faltan estudios específicos para las especies del género *Equus*, animales que presentan variaciones fisiológicas respecto al equilibrio de fluidos y al metabolismo de sustancias (3); condiciones que dependen fundamentalmente de una base genética.

Aunque existe similitud entre las razas de equinos, no se les puede considerar iguales (4, 5). Sus diferencias tienen trascendencia en el plan de manejo y la atención en caso de alteración física o enfermedad; y a su vez, los propietarios de los animales cada día exigen tratamientos más efectivos; sin embargo, el médico veterinario dedicado a las especies de equinos no puede acceder a terapias farmacológicas específicas porque hay falta de información sobre características genotípicas y fenotípicas del metabolismo efectuado por CYP450 en las diferentes razas, sin evidencias de la capacidad metabólica para los fármacos que se usan en las distintas poblaciones.

Cada fármaco debería ser investigado especie por especie, incluso raza por raza, para garantizar la eficacia y seguridad en su uso (6). En Colombia, específicamente para las razas criollas, no se ha ampliado la caracterización de particularidades en relación con la farmacoterapia y básicamente, se aplica los tratamientos con los fármacos que han sido reportados para otras razas.

Uno de factores importantes que explican las diferencias de las especies en la cinética de los fármacos, es la biotransformación dependiente de los citocromos P450 (CYP450), que representa una gran superfamilia de oxigenasas. Las enzimas CYP450 se consideran las enzimas biotransformadoras más importantes para los xenobióticos (7–11). Y si bien, en las diferentes especies pueden existir genes CYP similares (ortólogos) en términos de secuencia de aminoácidos; las especificidades

de sustrato suelen ser muy diferentes y hay que considerar que un fármaco administrado, puede metabolizarse *in vivo* por dos o más enzimas CYP. Lo anterior, hace que la extrapolación en las especies de la especificidad CYP450 sea muy difícil. Incluso, algunos CYP están sujetos a una variabilidad considerable dentro de la especie como resultado de factores ambientales y genéticos (12).

Los individuos de la misma especie tienen la misma dotación genética, lo que los hace diferentes son los polimorfismos de nucleótidos sencillos y que, desde un punto de vista farmacodinámico y farmacocinético, les proporcionará un comportamiento único (13). Adicionalmente, desde la perspectiva de la seguridad del paciente animal en veterinaria, los estudios del metabolismo comparativo ayudan a explicar las principales diferencias entre especies y dentro de la especie, ante los efectos de los fármacos, especialmente cuando existe la necesidad de la administración de más de un fármaco (14); y, en consecuencia, pueden ocurrir interacciones resultado de inhibición competitiva o no competitiva por el sitio activo del CYP (9) o resultado de la inducción enzimática que afecta la biotransformación, modificando la tasa y velocidad de metabolización de otros fármacos, con posibilidad de impactar en la meta terapéutica.

Específicamente para los equinos, el avance en el conocimiento de su capacidad de metabolizar fármacos por la fase 1, es limitado. El primer CYP equino que se descubrió fue encontrado por Komori et al. en 1993 (15) y a partir de allí se han empezado a caracterizar.

De las isoformas del citocromo descritas en equinos hasta la fecha, se seleccionó para la investigación a la *CYP3A89*, por ser estructuralmente, la más semejante al *CYP3A4*, que a su vez es la más importante de todas las enzimas metabolizadoras de fármacos, con alta variabilidad interindividual en los niveles de expresión en humanos; y también porque el citocromo *CYP3A89* mostró expresión en hígado, vías aéreas y riñón, en investigaciones previas hechas en equinos (16–18). Un aspecto de este citocromo es que las variaciones entre caballos individuales fueron altas en el estudio adelantado por Knych et al. (41) y ha mostrado polimorfismos en otras investigaciones (15, 16, 17).



Una vez estudiada la información disponible del gen codificante para el *CYP3A89*, se buscaron los sitios de reconocimiento de sustratos dentro del mismo, para ser secuenciados. Así poder establecer las características de estas regiones en la muestra de equinos criollos e identificar si se han presentado cambios estructurales que puedan representar una diferencia en el metabolismo de fármacos.

Se investigo, por lo tanto, regiones de la estructura específica de CYP, que ninguna investigación previa había desarrollado con caballos de razas criollas; animales que por años han sido sometidos a procesos de presión de selección por características distintas a la capacidad metabólica o la adaptabilidad; siendo una población donde pudieran presentarse expresiones diferenciales y nuevas formas cromosómicas.

Pero esto solo ha sido un paso para conocer los detalles del metabolismo de fármacos y se evidencia, que es necesario caracterizar los perfiles de metabolitos de los medicamentos para su uso seguro y no desde la perspectiva de algoritmos predictivos como típicamente ocurre en la medicina veterinaria, sino de acuerdo con los perfiles genéticos propios de la especie.

CAPÍTULO 2

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 METABOLISMO DE FÁRMACOS EN EQUINOS

Las principales especies dentro de la familia de los équidos conocidas como equinos incluyen caballares, asnales y aquellas especies híbridas obtenidas por cruces. A su vez, para cada especie existen un número variable de razas con cierta variabilidad fenotípica y por supuesto, genética entre ellas (4, 5, 19, 20).

Tal variabilidad podría esperarse que aplicase también para los aspectos del metabolismo de las diferentes sustancias a las que está expuesto el animal en el transcurso de su vida. La forma singular en la que los equinos son capaces de metabolizar compuestos extraños para el organismo y poderlos eliminar, aún no está totalmente dilucidada. Igual que en los humanos y otros animales, el equino está en contacto con diferentes compuestos en su alimentación, en el ambiente o cualquier producto que se le suministre, incluyendo los fármacos (21). El resultado final del contacto con estos compuestos, en cualquier caso, debería ser, la biotransformación en forma de metabolitos fácilmente eliminables y menos tóxicos, proceso que se considera, ocurre en diferentes órganos, pero mayormente en el hígado (7, 8, 10, 21–23).

Esta variabilidad en las características fenotípicas y fisiológicas en la especie; es resultado de los diferentes sistemas de manejo a los que se han sometido los equinos a lo largo del tiempo y es una estrategia de adaptación a las condiciones propias del entorno (2, 12). Así que, aunque se entienden aplicables los principios básicos del metabolismo en los mamíferos, no se puede asegurar que para todas las poblaciones de equinos los procesos ocurren de la misma forma.

Se considera que el proceso de biotransformación de sustancias se divide en dos fases.

La fase 1 mayormente ocurre por acción de las enzimas de la fracción microsomal presentes principalmente en los hepatocitos; y la fase 2 ocurre por acción de las

enzimas presentes en la fracción citosólica celular. Ambos procesos facilitan la eliminación al modificar la hidrofobicidad de los compuestos, pero para algunos casos solo se requieren las reacciones de la fase 1 o solo las de la fase 2. Las reacciones de fase 1 catalizadas por las enzimas de la fracción microsomal, presentan una actividad monoxigenasa haciendo uso del oxígeno molecular, de donde utilizan uno de los átomos para oxigenar el compuesto extraño, o xenobiótico, y a su vez el otro átomo se reduce a H<sub>2</sub>O (11, 17, 24).

En tal sentido, un grupo de enzimas que juegan un papel importante en la oxidación de los xenobióticos son las enzimas del citocromo P450 (CYP) (10, 25,26). Mismas que son codificadas por genes denominados CYP y se constituyen una familia relativamente extensa e importante para el metabolismo de la gran mayoría de fármacos, aunque su estudio aún es limitado en las especies de interés zootécnico (10, 14). La pregunta de si dichos genes podrían presentar variaciones, en una población específica dentro de las especies de equinos, resultado de la influencia de factores ambientales y genéticos particulares; fue el aspecto que motivo esta revisión.

## **2.2 CITOCROMOS E IMPORTANCIA EN EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS EN EQUINOS**

### **2.2.1 DEFINICIÓN Y TIPOS DE CITOCROMOS**

Las enzimas denominadas citocromos, son un grupo de proteínas rojas o pardas que tienen unos espectros de luz visible característicos; que se identificaron inicialmente como un pigmento celular unido a la membrana, con un pico de absorción a 450 nm (27) y actualmente se ha establecido que son hemoproteínas (28).

Varios citocromos identificables se encuentran en la cadena respiratoria, como los citocromos b, c y citocromo oxidasa, ó se encuentran en otras ubicaciones; por

ejemplo, el retículo endoplásmico como los citocromos b5 y P450 (29). En todos los seres vivos existen dos grandes familias de oxigenasas en el hígado, las dependientes de citocromo p450 denominadas CYP450 y las dependientes de flavín monoxigenasas (26). Para este estudio se hizo énfasis en el grupo de enzimas CYP450, una gran superfamilia de hemoproteínas implicadas en el metabolismo de fase I de sustancias endógenas y exógenas.

Se enfatizaron porque son enzimas que están presentes en casi todas las formas de vida y se han estudiado ampliamente, particularmente en relación con la medicina humana y porque muchas de sus isoformas aún no se han caracterizado por completo o incluso identificado (7, 10). Aunque todas las sustancias químicas existentes y por desarrollar, podrían ser sustratos potenciales para el citocromo P450.

### **2.2.2 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS DEL TIPO CITOCROMO EN EL METABOLISMO EN LOS EQUINOS**

Las enzimas del tipo citocromo, metabolizadoras de xenobióticos, son la primera línea de defensa y un fenómeno resultado de la coevolución entre las plantas y herbívoros. Razón por la cual, tienen unas características importantes como la especificidad de sustrato, que implica que cada citocromo es capaz de metabolizar muchos xenobióticos y a su vez el mismo xenobiótico puede ser metabolizado por varios citocromos, aún con una ruta metabólica distinta (7, 8, 21, 21). Además, los citocromos son enzimas inducibles o inhibibles por los propios xenobióticos que, de hecho, pueden competir entre sí por la misma enzima (8).

Sin embargo, tal y como se analiza más adelante, existe un alto grado de polimorfismo genético en muchas de estas enzimas, que a su vez dan origen a distintos fenotipos, así que un individuo puede presentar una actividad enzimática eficiente, cuando otros no, incluso algunos individuos pueden tener mutaciones o varias copias funcionales de un gen. Esta característica resulta importante para

la supervivencia de la especie ya que les permite a los individuos adaptarse a los cambios en su entorno químico de manera que si una población se expone a un tóxico sobrevivirán los individuos portadores de las variantes genéticas que les confieran resistencia a esos tóxicos (13). Así mismo, ocurre con la exposición a fármacos usados con una intencionalidad terapéutica. Claramente, determinado fenotipo de metabolizador puede verse afectado por la toxicidad de un fármaco.

Si bien la capacidad metabólica depende de un conjunto de elementos, desde el punto de la farmacogenética; para un determinado tejido la posibilidad de que se formen metabolitos está ligada a la expresión de las enzimas, que a su vez dependen de la conformación genética del individuo. Y si bien, las enzimas metabolizadoras de fármacos se expresan predominantemente en el hígado, también hay expresión en otros tejidos extrahepáticos (25).

La razón por la cual las enzimas del tipo citocromo se expresan principalmente en el hígado es que se requiere una expresión cuantitativamente suficiente para catalizar la reacción. La diferencia en la expresión de las enzimas condiciona la mayor o menor formación de los metabolitos y, por lo tanto, la posible sensibilización y respuesta de hipersensibilidad, o la falta de eliminación, con la consecuente toxicidad frente a un fármaco (10).

La expresión de los genes del citocromo P450 en el hígado depende en gran medida de factores de transcripción hepáticos y factores de transcripción activables por ligandos xenobióticos, denominados *Liver-enriched transcription factors (LETF)*, que se expresan abundantemente en el hígado, y se ha determinado que son varios los LETF que participan en la regulación de genes hepáticos y a su vez, tanto la expresión de los LETF como la de los genes CYP está estrechamente asociada al estado diferenciado del hepatocito (8).

Esto determina que en los seres vivos exista gran variabilidad interindividual en la actividad y la cantidad de enzimas metabolizadoras y parte de esa variabilidad es

debida a la existencia de genes para los que existen distintas variables que codifican para isoformas con especificidad metabólica diferente, lo que se conoce como genes polimórficos. O en otros casos, las diferencias fenotípicas derivan de la capacidad de expresión de tales genes (30).

A pesar del conocimiento de la importancia de la familia de citocromos y sus genes codificantes para el metabolismo de fármacos en todos los seres vivos, para la especie equina los estudios que se relacionan al metabolismo han sido muy limitados. Aunque la comprensión de la enzimología desde su base genética ayudaría a analizar los datos obtenidos luego de un tratamiento farmacológico, no ha sido el objetivo principal de los estudios, no obstante, en los últimos años ha empezado aparecer un interés creciente sobre las áreas relacionadas incluyendo la farmacogenética.

En tal sentido, se ha detectado actividad indicadora de las enzimas metabólicas en sangre de caballos, y la actividad de las posibles subfamilias CYP presentes en los caballos se ha empezado a inferir utilizando las especificidades de sustrato características de los CYP conocidos. Sin embargo, esto solo puede actuar como una guía y es necesaria una mayor caracterización de las enzimas del caballo para validar los hallazgos (31).

El primer CYP equino que se descubrió fue encontrado por Komori et al. (1993) y a partir de allí la mayoría de los estudios incluyen microsomas y aunque los estudios *in vitro* no necesariamente brindan información específica sobre P450, son buenos puntos de partida para la hipótesis de cómo los P450s operan en una especie (32). Los estudios que existen hasta la fecha son comparativos entre varias especies y el equino, pero también hay algunos estudios específicos en el caballo, Lakritz et al. (2000) intentaron determinar la actividad de varios P450 en caballos de diferentes edades. Esto implicó usar sustratos humanos conocidos para diferentes isoformas P450; particularmente se encontró que el metabolismo

pulmonar de xenobióticos fue significativamente menor en caballos jóvenes que adultos mientras que el metabolismo hepático no varió significativamente. Un estudio posterior de Nebbia et al. (2004) corroboró este hallazgo. Lo que implica que además de la gran variabilidad expuesta, la edad también podría ser un factor determinante (33).

En el mismo orden de ideas, vale recordar que, al igual que en otras especies, la actividad de las enzimas del citocromo P450 en el equino depende de la enzima NADPH P450 oxidorreductasa y su importancia se comprobó por Dettwiler et al. (2014), los resultados mostraron que el CYP3A94 equino es metabólicamente activo y su actividad puede aumentar significativamente mediante la coexpresión de la enzima NADPH P450 oxidorreductasa (34). Dicha enzima, es una flavoproteína unida a la membrana en el retículo endoplásmico (RE), que interactúa con CYP, otras oxigenasas y enzimas para la biosíntesis de esteroides. Se ha demostrado que la enzima NADPH P450 oxidorreductasa mejora la actividad catalítica de los CYP al suministrar electrones al ciclo catalítico del CYP (35). A este hallazgo debemos sumar que, a partir de los estudios comparativos, parece que las enzimas equinas muestran generalmente menos actividad que sus ortólogos en humanos (36).

### **2.2.3 GENÉTICA DE LAS CITOCROMOS EN EQUINOS**

En los estudios adelantados con equinos se han identificado variantes genéticas de los citocromos. Dichas variantes genéticas permiten desentrañar las características estructurales de los CYP equinos y correlacionarlas con cambios en la actividad de CYP. Aunque no se ha determinado el genoma equino cuántos genes CYP puede contener en total, se han reportado 14 genes: *CYP3A89*, *CYP3A93*, *CYP3A94*, *CYP3A95*, *CYP3A96*, *CYP3A97*, *CYP2C92*, *CYP2D50*, *CYP2B6*, *CYP2A13*, *CYP2E1*, *CYP19A1*, *CYP11A1* y *CYP27B1*(11 ). adicionalmente, se ha identificado la expresión de las algunas isoformas en equinos, pero en muchos casos no se conoce la función específica. En la



investigación de Orr (11) se identificaron 46 secuencias de P450 de longitud completa y se determinó la expresión de los *CYP1A1*, *CYP2A13*, *CYP2C92* y *CYP2D50*. Avance que dio lugar a ampliar la investigación y se llegó a establecer que *CYP2C92* está implicado en el metabolismo de antiinflamatorios no esteroideos (11); y el *CYP2D50* está implicado en el metabolismo de tramadol (41). Así mismo en otros estudios con microsomas, se ha determinado la expresión de genes de la subfamilia CYP3A en los equinos (32, 37–40).

De acuerdo con la revisión de literatura, se encontró que hay disponible más información para esta subfamilia de citocromos.

Tabla 1. Resumen de los citocromos de la familia 3A reportados en equinos.

<b>Citocromo</b>	<b>Principal órgano de expresión</b>	<b>Sustratos conocidos</b>
<i>CYP3A89</i>	Hígado(17) Vías respiratorias(37)	Diazepam(42)
<i>CYP3A93</i>	Intestino(18) Vías respiratorias(37)	
<i>CYP3A94</i>	Hígado(18, 38) Vías respiratorias(37)	Diazepam(42) Ketamina(38)
<i>CYP3A95</i>	Vías respiratorias(37)	Ketamina(38)
<i>CYP3A96</i>	Intestino (17) Vías respiratorias(37)	Diazepam(42)
<i>CYP3A97</i>	Hígado(17, 18, 38) Vías respiratorias(37)	Ketamina(38)
<i>CYP3A129</i>	Vías respiratoria(37)	

Fuente: Elaboración propia.

El grupo completo de genes de la subfamilia CYP3A ha sido definido recientemente y consta de siete genes: *CYP3A89*, *CYP3A93*, *CYP3A94*, *CYP3A95*, *CYP3A96*, *CYP3A97* y *CYP3A129* (36). La expresión y actividad de los siete genes de la subfamilia CYP3A en equinos se presenta en la tabla 1. En contraste con los estudios en otras especies, en el caballo no se ha demostrado

que haya isoformas de CYP3A dominantes sobre otras isoformas, en el hígado (17).

Además de los anteriores, los estudios han reportado isoformas P450 que se detectaron en el hígado equino, pero que no se expresan en otras especies de animales *CYP2R1* y *CYP1B1* así como *CYP2D14* y *CYP2C26* y por supuesto, se requerirá de futuras investigaciones para establecer su función (11). De hecho, actualmente la investigación en torno a la farmacogenética ha presentado los primeros hallazgos en medicina veterinaria equina. Algunos investigadores han demostrado la capacidad del caballo para metabolizar sustratos del citocromo CYP3A expresado en el hígado y el intestino; y se ha comparado el CYP3A humano con el CYP3A del caballo; el más reciente análisis comparativo de la región del cromosoma humano que contiene el grupo de genes CYP3A y la correspondiente región equina, fue realizado en el año 2010 y muestra que el genoma de los caballos contiene seis genes CYP3A muy similares y dos posibles pseudogenes, en contraste con el genoma humano, que tiene sólo cuatro genes CYP3A funcionales y dos pseudogenes (36).

En el estudio la secuencia de nucleótidos del *CYP3A89* de equinos fue homóloga en un 86,4% con el *CYP3A4* humano y compartiendo en el 81,3% de la secuencia de aminoácidos; seguido por el *CYP3A96* que fue homólogo en el 84,3% de los nucleótidos y en el 79,1% de los aminoácidos bases con el *CYP3A4* humano . Los otros citocromos mostraron porcentajes de identidad menores, razón por la que para este proyecto se seleccionó el *CYP3A89*, que además de resultar el más semejante en su secuencia al *CYP3A4* de humanos en la investigación publicada por Schmitz (13); también es expresado en hígado, en las vías respiratorias y en riñones. Así pues, dentro de las características de *CYP3A89* hay varias condiciones que hacen interesante su exploración en una población equina expuesta a factores ambientales y genéticos especiales. Un aspecto de este citocromo es que las variaciones entre caballos individuales fueron altas en el

estudio adelantado por Knych et al. (43) y ha mostrado polimorfismos en otras investigaciones (11, 37, 42) .

#### **2.2.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS CITOCROMOS P450 EQUINOS**

En el equino, actualmente se sabe poco sobre el metabolismo de fármacos específicos de CYP, revistiendo esto, gran importancia para el bienestar animal, sin embargo, ya hay algunos avances que fueron de importancia para esta revisión. Recientemente, se produjeron los primeros CYP equinos recombinantes, lo que permitió recopilar por primera vez datos específicos sobre la actividad del P450 equino (37).

A partir de los estudios realizados por Orr et al. en 2016, el *rCYP2C92* pareció metabolizar los cuatro antiinflamatorios no esteroideos AINE probados (flunixinina, ketoprofeno, fenilbutazona y diclofenaco), sin embargo, no se pudo confirmar la presencia de los metabolitos hidroxilados de diclofenaco y fenilbutazona (4-hidroxiciclofenaco y oxifenbutazona, respectivamente). A pesar de la aparente actividad mostrada por *rCYP2C92* frente a los cuatro AINE, no se han establecido conclusiones sobre el papel de esta enzima en el metabolismo de los AINE, debido a la falta de producción de los metabolitos hidroxilados conocidos (11). Uno de los pocos estudios donde ya se relaciona un citocromo con un grupo farmacológico.

Por otra parte, se debe destacar como avance el conocimiento de los citocromos en los equinos, que la actividad de *CYP3A94* se estudió, depende de un nivel adecuado de la enzima NADPH P450 oxidorreductasa (34), la *CYP3A94* participa en la desmetilación de la ketamina, junto con *CYP3A95* y *CYP3A97* ; y las tres isoformas pueden ser inhibidas con ketoconazol, de acuerdo con evidencias de estudios de expresión heteróloga en células de insectos (40).

Ahora bien, evidentemente, son innumerables los sustratos farmacológicos y no farmacológicos pendientes por descubrir además de los órganos de metabolismo

de cada uno. Pues no todos los órganos expresan los citocromos, y cada órgano lo hace en proporciones diferentes, como ya se sabe para los miembros de la subfamilia CYP3A, que se han encontrado en el hígado, el intestino y vía aérea de equinos, pero no se expresa en las mismas proporciones en cada uno de ellos (17, 42).

Los citocromos en equinos adicionalmente, presentan un comportamiento interesante como se mostró en la investigación in vitro desarrolladas por Nebbia y cols en 2004, con microsomas de hígado obtenidos de 50 yeguas que eran categorizadas por edad, encontraron que el contenido total de CYP450 en las yeguas jóvenes fue inferior a la de otras especies de herbívoros. Con la edad, estos niveles aumentaron, pero no alcanzaron los rangos de otras especies (33).

Como se ha mostrado en esta revisión hay poco avance en el conocimiento sobre el metabolismo de fármacos específicos por CYP en equinos y cabe complementar que ninguna de estas investigaciones se ha desarrollado con caballos de razas criollas; animales que por años han sido sometidos a procesos de presión de selección por características distintas a la capacidad metabólica o la adaptabilidad. En Suramérica luego de más de 400 años de evolución y adaptación a las regiones que habitan (20), con procesos ambiental y culturalmente distintos a las poblaciones de las cuales hay referencia por las investigaciones previas que se han presentado; se consideró aplicar el objeto de esta investigación a la raza de caballos criollos de Colombia, donde pudieran presentarse expresiones diferenciales y nuevas formas cromosómicas.

De tal manera, y debido a los avances actuales, se evidencia que es necesario caracterizar los perfiles de metabolitos de los medicamentos para su uso seguro y no desde la perspectiva de algoritmos predictivos como típicamente ocurre en la medicina veterinaria, sino de acuerdo con los perfiles genéticos propios de la especie y de las especies híbridas derivadas. Pero eso requiere adelantar investigaciones, que si bien es cierto se pueden desarrollar in vitro deberán derivar

en estudios in vivo donde se pueda comparar la conformación genética de los individuos con la transformación y eliminación de metabolitos medidos en diferentes tejidos corporales.

### **2.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO DE SUSTRATOS DE LOS CITOCROMO**

Cada enzima contiene una superficie de unión denominada sitio activo. Los sustratos se unen al sitio activo de las enzimas, que en general es una pequeña hendidura o grieta en una molécula proteínica grande. La forma y la distribución de la carga del sitio activo de una enzima, limita los movimientos y las conformaciones permitidas del sustrato, por esta razón, la estructura del sitio activo se utiliza para orientar de forma óptima al sustrato. Aunque la actividad catalítica de algunas enzimas sólo depende de las interacciones entre los aminoácidos del sitio activo, algunas enzimas requieren de un grupo prostético como cofactor. Para el caso de los citocromos, en el sitio activo el hierro del grupo hemo está enlazado a la proteína por medio del tiolato de un residuo de cisteína y a una molécula de agua (7).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los sustratos de los CYP, se quedan inmersos en la membrana del retículo endoplásmico. Después, estos sustratos ingresan al sitio activo de los CYP, el cual se encuentra en el ectodominio de la proteína. Este proceso es posible gracias a las particularidades de la estructura secundaria de los citocromos, que consiste en hélices  $\alpha$  combinadas con varias láminas  $\beta$ , altamente conservadas, en contacto directo con el grupo hemo (44). Si bien en la anatomía de la estructura secundaria de la familia de los citocromos, se siguen descubriendo elementos, el sitio activo de los citocromos se localiza en la parte superior del sitio distal del hemo, donde también se une el oxígeno(45).

En los citocromos existen seis regiones denominadas SRSs (sitio de reconocimiento de sustratos), involucradas en el reconocimiento y unión de sustratos. Estos sitios muestran alta variación en su secuencia de aminoácidos, siendo esta la razón de la capacidad de los diferentes citocromos P450 para unir sustratos diversos. Se han descubierto multiplicidad de mecanismos de enlace debido a la habilidad de la enzima de acomodarse estructuralmente resultado de las sustituciones, inserciones y deleciones que conforman las secuencias de los distintos miembros de la familia (46).

Los seis sitios de reconocimiento de sustratos que hoy en día se han identificado en la familia CYP3 fueron publicados a partir de las investigaciones de Gotoh en 1992 (44), donde por alineación manual de residuos de aminoácidos en citocromos de mamíferos, con residuos de un complejo sustrato de citocromo P450 bacteriano se logró una primera identificación de las diferencias entre aminoácidos que son los principales responsables de las características diferencias funcionales entre enzimas estrechamente relacionadas; y así se pudo reconocer la posición de estas regiones. Posteriormente, se encontró relación estadísticamente significativa entre sitios bajo evolución adaptativa en el CYP2C, CYP2D y CYP3A; y los SRS publicados por Gotoh. Lo que sugiere un papel importante de la adaptación en la evolución de los citocromos por especificidades de sustratos (12).

Estudios de diferentes citocromos, han permitido investigar sus características para usar esa información con el objetivo de predecir las posiciones en las cuales se podría llevar a cabo el metabolismo de los sustratos. Y así mismo, se ha podido identificar que la actividad catalítica de la enzima disminuye cuando hay modificaciones en estos sitios, pues los sustratos no podrían ser fácilmente reconocidos dentro del bolsillo del sitio activo. La comparación de las estructuras de CYP disponibles muestra un plegado altamente conservado con una gran diversidad en la forma y el tamaño de los sitios de unión de sustratos, siendo estas características claves para definir la especificidad por el sustrato y de la reacción

(47). Esta característica permite hacer suposiciones sobre la integridad funcional de una enzima cuando se conoce la secuencia del exoma; ya que las sustituciones de un solo aminoácido pueden afectar la unión del hemo, el acceso y la unión del sustrato. En este sentido, se han publicado otros estudios experimentales que han identificado aminoácidos concretos en las regiones de la familia CYP3, que son críticos para la especificidad del sustrato y que se encuentran en o cerca de los SRS (48, 49).

La identificación de residuos diferentes en una población no estudiada permitiría reevaluar y ampliar el mapa original de SRS reportados. Los SRS en la subfamilia 3A, que en la actualidad se consideran válidos son: SRS1 A y B (ISLS- PFGPF) en la Hélice B' en el bucle B-C, SRS2 (LFSFD) en el extremo C-terminal de la hélice F, SRS3 (LFPFLNAV) en el extremo N-terminal de la hélice G, SRS4 (AQSIIFIFA) en la parte media de la hélice I, SRS5 (LFPIAVRLERVC) en el bucle entre la hélice K y la hebra 3 de la lámina  $\beta$  1 y SRS6 (QGLLQPQ) en el giro en la lámina  $\beta$  4 (11, 49). Si bien esta estructura es general para todos los miembros, las enzimas de la subfamilia CYP3A, aunque exhiben superposición en las especificidades del sustrato, también existen algunas diferencias funcionales. En animales se han estudiado algunas de estas diferencias, por ejemplo, las isoformas de los citocromos caninos P450 3A12 y 3A26, que difieren en 22 de 503 aminoácidos, de los cuales se consideran críticos tres, le confieren a *CYP3A12* la capacidad de catalizar tasas mucho más altas de hidroxilación de esteroides que *CYP3A26*, de acuerdo con resultados de estudios por enzimas quiméricas y mutagénesis dirigida al sitio (50).

En equinos se han obtenido variantes genéticas de la subfamilia CYP3A por secuenciación de genomas de caballos de diferentes razas y comparación con sus respectivas secuencias de referencia, posteriormente se hizo modelado CYP 3D, para analizar las diferencias estructurales entre las variantes genéticas seleccionadas, para predecir variantes genéticas que posiblemente afecten la

actividad enzimática, entre la testosterona con los *CYP3A94*, *CYP3A95* y *CYP3A97* (35).

A partir de esta investigación se obtuvieron diferencias intraespecie, se encontró un total de veinte variantes genéticas, incluidas cinco variantes sin sentido, *CYP3A94* en D217 y *CYP3A95* en D214, fueron dos de las cinco variantes equinas investigadas, y se localizaron en una estructura que se ha estudiado previamente en *CYP3A4*, en una región que se describe como un sitio de contacto con la membrana y se cree que es necesaria para el acceso del sustrato al sitio activo del CYP, mientras que las variaciones de *CYP3A95* en S392 y *CYP3A97* en I119 se propuso que pueden alterar la estructura o afectar la tasa de acceso/egreso de metabolitos al sitio activo, mientras que la variación de *CYP3A97* en M500 no pareció representar posibles modificaciones de la estructura y actividad del sitio activo (40).

Así mismo un estudio hecho en 2019 en toros de la raza Piedemonte, también encontró diferencia intraespecie al comparar las isoformas *CYP3A28*, *CYP3A38* y *CYP3A48* con otras publicaciones y donde ellos encontraron trece variantes de un solo nucleótido de las que cinco representaban cambios en el aminoácido y mostraron que significaban una actividad catalítica alterada, *CYP3A28* en G197, A289, I338; y *CYP3A3* en E374 y V351. De estos, la variación de G197 proporcionó una clara evidencia de un impacto funcional en la capacidad metabólica (51). De tal manera, las investigaciones presentadas muestran que residuos de aminoácidos concretos pueden determinar grandes diferencias funcionales entre cada una de las isoformas, y reconocer las variantes genéticas servirá de base para identificar cuáles de estas variantes pueden conducir a una biotransformación más lenta o rápida de fármacos, para realizar ajustes de dosis en medicina veterinaria, tal y como ya se hace en medicina humana.

Igualmente, se ha identificado que las enzimas del citocromo CYP presentan modulación alostérica, que puede conducir a cambios funcionales. El tipo de



modulación alostérica observada en las enzimas CYP depende del ligando y de la isoforma; y puede implicar la unión simultánea de múltiples ligandos, la existencia de conformaciones distintas de una sola isoforma, y ligandos que actúan como efectores uniéndose en un sitio distante del hemo y afectando la afinidad de un segundo ligando (sustrato) por el sitio activo (52).

En un estudio publicado por Hlavica en 2016 reportó que el 88% del número total de residuos clave que se relacionan con el alosterismo, residen cerca de la cara hemo distal dentro de los seis SRS conocidos (53). Algunos ejemplos reportados en el *CYP3A4* de residuos de aminoácidos clave para los procesos alostéricos y todos los residuos de aminoácidos críticos que se vayan descubriendo, son útiles para evitar interacciones farmacológicas no deseadas y evidencian la importancia de la evaluación de los SRS en las especies y razas que no se han hecho. Sin embargo, el 12 % del número total de aminoácidos funcionales están fuera de los SRS (53, 54).

De los aminoácidos funcionales fuera de los SRS, cabe destacar el residuo de C98 en el *CYP3A4*, que es importante para la integridad conformacional y la actividad catalítica, pero además podría estar involucrado en una interacción con la reductasa P450, que coordina la transferencia de electrones desde el NADPH hacia los citocromos P450, el citocromo b5 y la hemooxigenasa (55). Al evaluar las secuencias reportadas de equinos y al rastrear los residuos antes mencionados en *CYP3A4* de humanos, es importante señalar que únicamente difieren en las posiciones L210, F211, F219 y L220 (47, 56, 57).

Cabe también mencionar, hasta este punto, que, la modulación alostérica no es la única determinante de funcionalidad, la flexibilidad conformacional y un mecanismo de ajuste inducido por la unión del sustrato, requiere de ciertos residuos de aminoácidos, sin los cuales la velocidad de asociación de sustrato sería significativamente menor o el reconocimiento no ocurriría (58). En citocromos de humanos, se han identificado residuos clave en setenta posiciones determinantes

de especificidad, pero solo cuatro de ellas pertenecen al sitio activo de CYP y son discriminantes de la subfamilia 3A: P110 (que se encuentra en el SRS 1), L216 (que se encuentra entre el SRS 2 y el SRS 3), I223 (que se encuentra en el SRS 3) y R372 (que se encuentra en el SRS 5) en posiciones estrictamente fijas (59). Al evaluar las secuencias reportadas de equinos y al rastrear los residuos antes mencionados, todos los anteriores coinciden. A la fecha no se sabe si esas posiciones concretas también se presentan en caballos criollos colombianos.

Es relevante entonces, al caracterizar los citocromos retomar la revisión de las regiones de interés, de hecho, en una investigación hecha por Zawaira et al. en 2021 se reportó dos nuevas regiones SRS antes de SRS1; y propuso que SRS2 y SRS3 estén unidos en una sola región grande, dando como resultado que la zona de SRS cubra el 33 % de la secuencia CYP450 en mamíferos, a diferencia del 16% que se encuentra en el mapa de Gotoh (56) que se usa actualmente.

De acuerdo con el análisis, se identificaron varios residuos de aminoácidos clave para la actividad de los citocromos, muchos por confirmar en cuanto a su importancia para la unión del hemo, el acceso, la unión del sustrato o la estabilidad; y así mismo, evidentemente hay muchos por descubrir. El caracterizar la estructura de regiones de interés en la secuencia de los citocromos, haciendo énfasis en los aminoácidos clave, permite hacer predicciones sobre el metabolismo de CYP empleando técnicas de modelado molecular; con base en la comparación, en las secuencias ortólogas ya publicadas, y analizando bajo la premisa de que la divergencia puede influir profundamente en la función, con las consiguientes alteraciones en la disposición de fármacos y los efectos clínicos/tóxicos que esto represente (44, 53–55, 59, 60).

## 2.4 BIOINFORMÁTICA: UTILIDAD E IMPORTANCIA

La bioinformática, a través de la Genética Molecular, cuya aplicación en estudios con enfoques integrados ha dado origen a la Genómica. La cual, a su vez, tanto en sus aspectos estructurales (organización del genoma) como funcionales (expresión del genoma, disciplina también conocida como Postgenómica) se ha aplicado al mejoramiento genético animal y vegetal. En ellos, el uso de estas técnicas facilita el proceso de prospección, evaluación, selección y usufructo de la variabilidad genética disponible en una especie de interés para el desarrollo científico (61).

De esta manera, se reducen significativamente los costos, tiempos y espacios requeridos por los programas de mejoramiento, y se minimiza la incertidumbre inherente a las técnicas convencionales. En la actualidad, en la que la generación de datos de variados tipos constituye una actividad rutinaria y lleva a la construcción de bases de alta dimensionalidad, la aplicación de herramientas bioinformáticas se torna indispensable para el abordaje preciso de cualquier proceso biológico (61, 62).

A este tenor, puede considerarse que en sus inicios la bioinformática se limitó al entendimiento de la función y estructura de genes o proteínas individuales. Sin embargo, la masificación de la secuenciación en proyectos de genoma llevó el alcance de la bioinformática a otra escala al permitir el análisis, ya no de genes individuales, sino de un abordaje más holístico de los organismos. Entonces, a partir de las bases de datos primarias, se crearon bases de datos secundarias de conocimiento biológico acumulado como familias de proteínas, dominios funcionales de proteínas, estructuras tridimensionales, vías de señalización, así como vocabulario controlado o unificado para referirse a cada elemento del genoma de acuerdo con sus propiedades funcionales(61, 63, 64).

Así pues, estas tecnologías permiten evaluar los niveles relativos de expresión de diversidad de genes en diferentes condiciones experimentales o patológicas, lo que

arroja nuevas luces sobre los mecanismos de regulación de la expresión genética. La comparación genómica de otras especies con el genoma humano permite ahora la identificación de regiones no codificantes y que se encuentran conservadas en diversas especies, lo cual sugiere una conservación funcional (64).

La bioinformática actual es uno de los pilares del estudio de los sistemas vivos desde el punto de vista sistémico y se conoce también como “biología de sistemas” (61, 64). En las ciencias de la salud comienza a revelarse su utilidad de forma paulatina. Existen en las bases de datos públicas una gran cantidad de secuencias de individuos y patógenos que pueden utilizar los investigadores en su tarea de dilucidar mecanismos moleculares de enfermedad.

De igual modo, se ha observado un gran avance en la caracterización de la variabilidad genética en seres humanos y en la forma en que esta variabilidad se vincula con determinados riesgos inherentes a patologías (64, 65). La Bioinformática es entonces, una disciplina científica emergente que utiliza tecnologías de la información para distribuir, organizar y analizar información biológica. Involucra la solución de problemas biológicos complejos usando herramientas de sistemas y computación (61).

En medicina veterinaria se ha empezado a implementar como una herramienta de apoyo a la investigación genómica, puede ayudar dramáticamente a mejorar la condición y calidad de vida de los animales (65).

## **2.5 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN**

Diferentes estudios sustentan la presente investigación. Se sintetizan a continuación los más importantes:

El primero de ellos fue el de Löfgren, M. en 2010 (17), titulado: "Isoenzimas del citocromo P450 3A en hígado e intestino equino". Cuyo objetivo fue, el de aumentar el conocimiento sobre las enzimas del citocromo P450 equino en el tracto gastrointestinal y el hígado. La expresión génica de las isoformas *CYP3A89*, *CYP3A96* y *CYP3A97* descubiertas recientemente en el hígado y en segmentos seleccionados del intestino se estudió mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa. Las tres isoformas se expresaron aproximadamente al mismo nivel en el hígado.

Se observó un patrón diferente en el intestino, donde *CYP3A96* era la isoforma dominante que representaba el 99,9 % de la expresión total de las tres isoformas de CYP3A. Hubo una disminución en la expresión génica de la parte anterior del intestino a la parte distal para todas las isoformas. Se realizó la preparación de microsomas a partir de segmentos hepáticos e intestinales. Se registró un espectro de diferencia de ditionito y se usó para calcular la cantidad total de enzimas CYP y citocromo b5 en los microsomas. El contenido total de enzimas CYP fue mayor en el hígado que en el intestino y hubo una disminución a lo largo del intestino desde el duodeno hasta el íleon.

El contenido de citocromo b5 también estaba disminuyendo desde el duodeno hasta el íleon, pero el nivel en el hígado era aproximadamente el mismo que en el intestino. La actividad de la enzima CYP3A en los microsomas se midió usando un ensayo para *CYP3A4* humano donde el sustrato era Luciferin-IPA. La actividad fue diez veces mayor en el hígado que en el intestino. La mayor actividad entre los segmentos intestinales se midió en el yeyuno. Dado que se utilizó un ensayo para *CYP3A4* humano, no está claro cuál de las isoformas equinas mediaba la actividad.

En los datos concluyentes de este estudio citado, se halló que, comparaciones de la expresión génica entre el caballo y otras especies muestran que el caballo se diferencia de los demás en que una isoforma expresada en el hígado se expresa al

mismo nivel en el intestino. Es importante tener en cuenta las diferencias entre las especies cuando se emplean medicamentos para el tratamiento en animales. Un mayor conocimiento sobre las isoformas equinas conducirá a una mayor capacidad para predecir los efectos de varios fármacos.

Posteriormente, en el estudio titulado análisis filogenético del citocromo P450 (CYP450) secuencias de nucleótidos del caballo y CYP450 del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) y otras especies de mamíferos, publicado por Leiberich et al. en 2018 (66). El propósito fue el de evaluar el grado de similitud de las secuencias del genoma de CYP entre las diferentes especies, utilizando BLAT (herramienta de alineación similar a BLAST) para la alineación de las secuencias de nucleótidos del CYP450 equino con secuencias de nucleótidos homólogas potenciales de la base de datos publicada. de rinocerontes blancos y otras especies de mamíferos (vaca, cerdo, perro, oveja, elefante, ratón y humano).

Entre los hallazgos, se obtuvo, que las secuencias de nucleótidos del rinoceronte blanco eran 90,74% idénticas a las secuencias equinas. Esto fue más alto que el grado de similitud entre cualquiera de las otras secuencias de especies evaluadas. Si bien no se encontró que ninguna familia CYP específica fuera deficiente en el genoma del rinoceronte publicado, el genoma del caballo contenía una secuencia genética adicional para una mayor cantidad de isoenzimas que no estaban presentes en el rinoceronte.

En la comparación con el caballo y otras especies de mamíferos se encontró que todos los genes CYP descritos necesarios para el metabolismo están presentes en el genoma del rinoceronte. Estos resultados mostrarán diferencias funcionales en la actividad enzimática y la falta de isoenzimas como la razón probable de la restricción en la administración de fármacos.

En tercer lugar, se tomó como base el estudio de Schmitz et al. del 2010 (36) titulado: Análisis comparativo de la secuencia humano-caballo del grupo de genes de subfamilia CYP3A. Donde se presentó la organización genómica del grupo de genes CYP3A equino, así como un análisis comparativo con el grupo de genes CYP3A humano. Se encontraron siete genes CYP3A equinos potenciales estrechamente relacionados, en contraste con solo cuatro genes en el genoma humano.

El ARN se aisló de una muestra de hígado equino y la secuencia codificante de aproximadamente 1,5 kb de seis genes CYP3A pudo amplificarse mediante RT-PCR. La secuenciación de los productos de RT-PCR reveló numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) hasta ahora desconocidos en estos seis genes CYP3A y una deleción de 6 pb en comparación con la secuencia de referencia (EquCab2.0). La presencia de las variantes se confirmó en una muestra de ADN genómico del mismo caballo. Concluyendo que, existen genes ortólogos para la familia CYP3A en caballos, pero su número difiere de los de la familia de genes CYP3A humanos. Los genes CYP450 de la misma familia muestran una alta identidad dentro y entre especies de mamíferos, pero pueden ser muy polimórficos.

Finalmente se revisó con el trabajo Orr (11), titulado: Caracterización de los citocromos P450 equinos (como tesis presentada a la Universidad de Nottingham en 2015, para obtener el título de doctor en fisiología). El objetivo de este fue la identificación de 46 secuencias completas de P450 a partir del genoma equino. Inicialmente, se llevó a cabo un análisis de RT-PCR en hígado equino para detectar la expresión hepática de P450 en varias familias. Después de esto, se utilizaron células de *E. coli* de inducción en frío (pCold) para la producción de proteínas P450 recombinantes para las pruebas funcionales posteriores. Se expresaron con éxito cuatro P450 equinos recombinantes (*CYP1A1*, *CYP2A13*, *CYP2C92* y *CYP2D50*). Debido a que son las isoformas que tienen más probabilidades de participar en el metabolismo de los fármacos, se seleccionaron *rCYP2D50* y *rCYP2C92* para examinarlos frente a diez de los fármacos para caballos más utilizados, para

identificar posibles sustratos. Pero, se observaron diferencias significativas entre las formas recombinantes y los sistemas microsomales de equinos, razón por la que se concluyó la necesidad de que en el futuro se hagan más estudios utilizando inhibidores de varias isoformas P450. Con los resultados de este estudio, el autor enfatiza la importancia de investigar las diferencias entre especies en cuanto al metabolismo de fármacos y los peligros de extrapolar datos entre especies.



CAPÍTULO 3

**OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Describir el gen *CYP3A89* en equinos criollos colombianos y el potencial impacto en su actividad metabólica.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar la secuencia *CYP3A89* en equinos criollos colombianos a partir de secuencias obtenidas de las muestras mediante el uso de herramientas de bioinformática.
- Describir las secuencias de los sitios de reconocimiento de sustratos del gen *CYP3A89* en equinos criollos colombianos y validar la relación con otras líneas genéticas de equinos.
- Analizar información funcional y evolutiva de las secuencias del gen *CYP3A89*, en el equino criollo colombiano y su relación con fármacos metabolizados por citocromos.
- Identificar la utilidad de las herramientas de bioinformática en estudios de farmacogenética en medicina veterinaria como alternativa para mejorar el abordaje de la farmacoterapia.

CAPÍTULO 4

**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se trata de un estudio de tipo exploratorio, con un diseño observacional, bajo el paradigma cuantitativo.

## 4.2 MUESTRA DEL ESTUDIO

### 4.2.1 Selección de la especie animal

En aras del objeto del proyecto, se incluyeron equinos criollos criados en el Suroeste de Antioquia, Colombia; por voluntad de los propietarios y firma del consentimiento.

La técnica de muestreo fue de tipo no probabilístico asociado a criterios, donde los individuos se seleccionan por estar disponibles en la zona, porque los propietarios de los animales accedieron (previa revisión y firma del consentimiento informado (Anexo 2) y por cumplir los criterios de inclusión.

Tabla 2. Criterios de inclusión/ exclusión.

Características de la especie animal del proyecto	
Especie	<i>E. caballus</i>
Raza	Criollo Colombiano
Sexo	Hembras y machos
Edad	Entre 3 y 12 años
Procedencia	Suroeste Antioqueño
Condición corporal	Moderada

Criterio de exclusión	Individuos con alteraciones clínicas, o algún tipo de farmacoterapia.
	Individuos emparentados.

Fuente: Elaboración propia.

Las muestras de tejido sanguíneo fueron colectadas de individuos definidos dentro del grupo taxonómico, cinco caballos y cinco yeguas (*Equus caballus*). - La zona de muestreo abarcó los municipios del Suroeste en el departamento de Antioquia, Colombia.

Se revisó la información genealógica (registros) para evitar algún grado de consanguinidad de los ejemplares ubicados dentro de la zona geográfica de muestreo. Se buscó mantener diversidad genética intragrupo taxonómico.

Una vez identificados los individuos que participan en la investigación se programó una jornada para el muestreo en sus lugares de procedencia. Se realizó la colecta de las muestras, siguiendo los protocolos de bioseguridad para el paciente y el operario. Las muestras colectadas se almacenaron por un año en congelación como respaldo de las pruebas.

Los pacientes se ubicaron en espacios que garantizaban la seguridad en la colecta de la muestra, se realizó la asepsia en la zona de la vena yugular y se usaron tubos con presión negativa (Vacutainer) con EDTA 7.5%. Se realizó la extracción de acuerdo con lo reportado por Lahiri y Nurnberger en 1991 (67).

Las muestras rotuladas con ubicación de posicionamiento global (GPS), nombre del ejemplar, número único de la muestra y fecha, se transportaron hasta el laboratorio para su procesamiento, durante este proceso se mantuvo la cadena de refrigeración a 4°C.

### 4.3 MARCO METODOLÓGICO

Se realizó extracción y purificación de ADN como fue descrito por Lahiri y Nurnberger en 1991 con kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit-Thermo scientific. Los datos de calidad y cantidad de las extracciones de ADN fueron verificados por Nanodrop y se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de calidad y cantidad de las extracciones de ADN.

Muestra	260/280	ng/ $\mu$ L
240 CYP 1	1,7	37,493
240 CYP 2	1,6	31,359
240 CYP 3	1,6	35,498
240 CYP 4	1,6	41,068
240 CYP 5	1,7	54,125
240 CYP 6	1,5	27,697
240 CYP 7	1,5	28,569
240 CYP 8	1,7	43,69
240 CYP 9	1,7	54,762
240 CYP 10	1,7	63,389

Fuente: Elaboración propia.

Obtención de secuencias guía:

Se obtuvo la secuencia del gen *CYP3A89* (NC\_009156.3) del genoma *Equus caballus* (caballo doméstico), utilizando la base de datos National Center for Biotechnology (NCBI).

Se obtuvo la secuencia de la proteína (CBJ94507.1) que posteriormente, se utilizó con la herramienta BLAST (68) para buscar la identidad de las secuencias de la subfamilia CYP3A del equino con respecto a otras especies, se incluyó en el

alineamiento las regiones codificadoras (CDS) para identificar regiones conservadas y los sitios de reconocimiento de sustratos.

Una vez obtenida la secuencia de interés, *CYP3A89* se comparó con genes relacionados de la misma especie y otras especies taxonómicas distantes. Para dicha comparación se seleccionaron nueve secuencias y diferentes especies:

Tabla 4. Secuencias seleccionadas para comparar con *CYP3A89* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CYP3A89>)

<b>Especie</b>	<b>Código</b>
Humano	CYP3A4 NM_017460.6 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_017460.6">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_017460.6</a> )
Asno	CYP3A12 XM_014831812.2 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM_014831812.2">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM_014831812.2</a> )
Caballo	CYP3A93 NM_001190938 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190938">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190938</a> )
Caballo	CYP3A94 NM_001190939.1 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190939.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190939.1</a> )
Caballo	CYP3A95 NM_001190940.1 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190940.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001190940.1</a> )
Caballo	CYP3A96 FJ755695.1 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=FJ755695.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=FJ755695.1</a> )
Caballo	CYP3A97 NM_001146164.3 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001146164.3">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001146164.3</a> )
Ratón	CYP3A11 NM_007818.3 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_007818.3">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_007818.3</a> )
Cerdo	CYP3A46 NM_001134824.1 ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001134824.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NM_001134824.1</a> )

(43,44)

Fuente: elaboración propia

Inicialmente se diseñó un árbol filogenético para determinar la relación evolutiva entre las especies a comparar.

Posteriormente, se hizo el proceso de identificación de los sitios de reconocimiento de sustratos utilizando la herramienta de traducción de secuencia de nucleótidos de ExPASy para hacer el reconocimiento del Marco de lectura abierto (ORF, sigla en inglés) a partir del gen *CYP3A89* y posteriormente, se utilizó el NCBI para rastrear los exones que contienen las cadenas de nucleótidos codificantes de esos sitios específicos.

Ya que en general, las secuencias de nucleótidos pueden sufrir mutaciones generando un posible cambio en la función de la proteína, a no ser que exista presión de selección para que esto no ocurra (69), se hizo una recopilación de esta información, observando si es conservada. Los dominios conservados que reporta el NCBI son 23, se analizaron uno por uno empleando la base de datos CDD (Conserved Domains Database).

Diseño de cebadores y amplificación:

Reconociendo la importancia de identificar regiones clave y dominios conservados se diseñaron los cebadores con enfoque en pequeñas regiones únicas dentro de la secuencia del gen, por contener los sitios de reconocimiento de sustratos.

Una vez realizada la identificación de los sitios de reconocimiento de sustratos se utilizó la herramienta de traducción de secuencia de nucleótidos de ExPASy para hacer el reconocimiento del Marco de lectura abierto (ORF, sigla en inglés) a partir del gen *CYP3A89* y posteriormente, se utilizó el NCBI para rastrear los exones que contienen las cadenas de nucleótidos codificantes de los sitios de reconocimiento de sustratos (SRS); encontrándose SRS1 A y B en el exón 5, SRS2 en el exón 7; SRS3 fue ubicado en el intrón 7 ; SRS4 en el exón 10; SRS5 en el exón 11, SRS6 en el exón 13. Estas zonas fueron ubicadas en el cromosoma 13 de equinos para ser usadas para el diseño de cebadores. Las secuencias objetivo se resumen en la tabla 5.



Tabla 5. Secuencias de nucleótidos de los sitios de reconocimiento de sustratos SRS y ubicación en el gen.

Sitio de reconocimiento de sustratos (SRS)	Secuencia objetivo	Traducción a la secuencia de nucleótidos
SRS1 A y B	CCTTTTGGTCCATTCG (7148642-7148657) ATCTCTCTGTCT (7148675-7148686)	PFGPF  ISLS
SRS2	CTCTTCAGTTTTGATTT (7150570-7150586)	LFSFD
SRS3	CTCTTTCCATTTCTTAATGC AGTTTT (7153698-7153824)	LFPFLNAV
SRS4	GCCCAATCTATTATCTTTAT TTTTGCTGG (7158151-7158179)	AQSIIFIFA
SRS5	TTATTCCCAATTGCTGTTAG ACTTGAGCGGGTCTGTA (7160810-7160846)	LFPIAVRLERVC
SRS6	CAAGGACTTCTTCAACCAC AA (7170471-7170491)	QGLLQPQ

Fuente: Elaboración propia.

Se hizo el diseño de los cebadores con la herramienta de IDT (Integrated DNA Technologies) disponible en <https://www.idtdna.com/pages> .

Antes de realizar el proceso de síntesis la calidad y especificidad de los cebadores fueron verificados se verificó que el contenido de guaninas-citosinas fuera entre el

40-60%, las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de 50-65 °C y se evitó la auto complementariedad, tal y como indica la literatura (44). Buscando especificidad, ya que hay muy alta identidad entre los miembros de la subfamilia CYP3A equina, se confrontó ante secuencias similares con la herramienta bioinformática de búsqueda de alineamiento local básico Blast de NCBI, donde cada uno de los cebadores se analizó en el genoma equino y se determinó la especificidad de los mismos. Adicionalmente con la herramienta AmplifiX, disponible en <https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr>; se realizó una valoración del desempeño de los cebadores mediante una PCR-in silico; una vez cargada la información, hubo amplificación concordante con los tamaños de banda predichos en el diseño, en las pruebas de cada uno de los seis juegos de cebadores.

Así mismo se realizó PCR *in silico* con las secuencias publicadas de Humano CYP3A4 (NM\_017460.6) y Asno CYP3A12 (XM\_014831812.1), proceso en el que no se obtuvo amplificación. Último paso que permitió la validación (45). Los cebadores sintetizados por Macrogen Inc., fueron llevados a una concentración final de 10 pmol y conservados a -20°C.

Tabla 6. Características de los cebadores diseñados para la investigación.

	<b>Sitio de reconocimiento 1</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	CCTGTCTCTTCCTTGGAGTAAC	22	57.80	50.00
<b>Reverse</b>	TGAGCTTTCCACTCGTGAAG	20	57.85	50.00
<b>Tamaño del producto</b>	399			
	<b>Sitio de reconocimiento 2</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	CTTGCTGCATGTGTTGGATAAG	22	58.23	45.45
<b>Reverse</b>	AGGAGAGATGGAAGGTGAGATAA	23	57.85	43.48
<b>Tamaño del producto</b>	298			

	<b>Sitio de reconocimiento 3</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	GGTGTCTTTTACTCTTGTGATCGG	24	59.61	45.83
<b>Reverse</b>	ACACTCATGTAAGCACCACCA	21	59.58	47.62
<b>Tamaño del producto</b>	252			
	<b>Sitio de reconocimiento 4</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	TCCTTTCCTCTTAGCTCTGTCT	22	57.95	45.45
<b>Reverse</b>	CCTCCCTCTCCAAGTATCTCAT	22	58.14	50.00
<b>Tamaño del producto</b>	205			
	<b>Sitio de reconocimiento 5</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	ATTATTCTTTTGTGCTCCTACCA	24	52	33
<b>Reverse</b>	TCACTCATTGTGCTTTATCCTAA	22	54	45
<b>Tamaño del producto</b>	418			
	<b>Sitio de reconocimiento 6</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>
<b>Forward</b>	GGCAATCAAGGACTTCTTCAAC	22	57.83	45.45
<b>Reverse</b>	ATCTCTAGGCATCCATCAAATACA	24	57.31	37.50
<b>Tamaño del producto</b>	215			

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, para la reacción en cadena de polimerasa PCR de punto final se usaron las concentraciones de reactivos que se resume en la tabla anexa, en un termociclador SimpliAmp Thermal Cyclers de Applied Biosystems; y con el siguiente perfil térmico: el ADN se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, el alineamiento de los cebadores se realizó a 58°C - 60°C por 30 segundos, después una elongación de a 72°C por 60 segundos de acuerdo con lo reportado en la literatura (70). La temperatura de alineamiento varió de acuerdo con las condiciones para cada uno de los cebadores.

### 1. Estandarización de las condiciones de amplificación fragmentos SRS

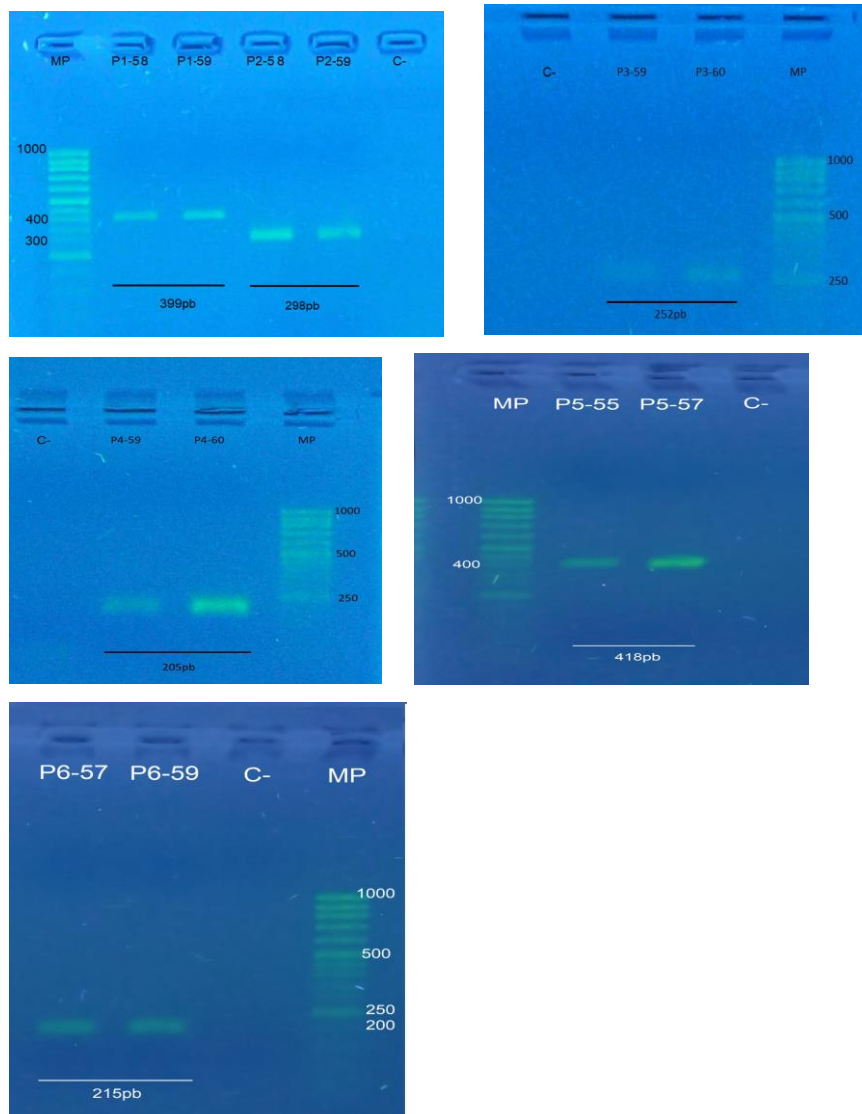
Las concentraciones de cada componente de la reacción fueron estandarizadas y se determinó el perfil térmico.

La temperatura óptima de hibridación de los cebadores se resume en la tabla 7; luego de pruebas con distintas temperaturas basadas en las recomendaciones del fabricante de los cebadores, con la reacción en cadena de polimerasa (PCR), usando un mix de DNA. Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación de los SSR se obtuvieron los resultados de la figura 1.

Tabla 7. Set de cebadores, secuencia y temperatura de hibridación estandarizada.

Identificación del cebador	Secuencia	Temperatura de hibridación (°C)
SRS1F	CCTGTCTCTTCCTTGGAGTAAC	59
SRS1R	TGAGCTTCCACTCGTGAAG	
SRS2F	CTTGCTGCATGTGTTGGATAAG	58
SRS2R	AGGAGAGATGGAAGGTGAGATAA	
SRS3F	GGTGTCTTTTACTCTTGTGATCG G	60
SRS3R	ACACTCATGTAAGCACCACCA	
SRS4F	TCCTTTCCTCTTAGCTCTGTCT	60
SRS4R	CCTCCCTCTCCAAGTATCTCAT	
SRS5F	ATTATTCTTTTGTGCTCCTACCA	57
SRS5R	TCACTCATTTGTCTTTATCCTAA	
SRS6F	GGCAATCAAGGACTTCTTCAAC	59
SRS6R	ATCTCTAGGCATCCATCAAATACA	

Figura 1. Resultados del proceso de estandarización a distintas temperaturas en la PCR



MP: Marcador de peso molecular de 50pb. P1-58: Set de cebadores 1 con temperatura de hibridación de 58°. P1-59: Set de cebadores 1 con temperatura de hibridación de 59°C. P2-58: Set de cebadores 2 con temperatura de hibridación de 58°C. P2-59: Set de cebadores 2 con temperatura de hibridación de 59°C . P3-59: Set de cebadores 3 con temperatura de hibridación de 59°C. P3-60: Set de cebadores 3 con temperatura de hibridación de 60°C. P4-59: Set de cebadores 4 con temperatura de hibridación de 59°C. P4-60: Set de cebadores 4 con temperatura de hibridación de 60°C. P5-55: Set de cebadores 5 con temperatura de hibridación de 55°C. P5-57: Set de cebadores 5 con temperatura de hibridación de 57°C. P6-57: Set de cebadores 6 con temperatura de hibridación de 57°C. P6-59: Set de cebadores 6 con temperatura de hibridación de 59°C. C-: control negativo.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%. Se utilizó 5 µl por muestra. El marcador de peso utilizado fue BrightMAX™ 50 – 1,000 bp DNA Ladder de CANVAX. Teñido con GelRed® (Biotium) y visualizado en un transiluminador de electroforesis ENDURO™ UV de Labnet International. El control de calidad del proceso de PCR se llevó a cabo aplicando el protocolo descrito con agua grado molecular como control negativo (70).

Finalmente, los productos de PCR al laboratorio BIONEER, KOREA para ser purificados y posteriormente secuenciados por la tecnología Sanger, en un secuenciador ABI 3730 xl.

#### **4.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este estudio recibió la aprobación del comité de Bioética de la Corporación Universitaria Uniremington (Anexo 1).

CAPÍTULO 5

**RESULTADOS**

## 1. Análisis de secuencias

Se obtuvo la secuencia del gen *CYP3A89* (NC\_009156.3) del genoma *Equus caballus* (caballo doméstico), de la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se encontró que el gen tiene 13 exones que conforman la región codificante de 1,512 nucleótidos, que resulta en una secuencia de 503 aminoácidos.

Luego, se obtuvo la secuencia de la proteína (CBJ94507.1) que posteriormente, se utilizó con la herramienta BLAST para buscar la identidad de las secuencias de la subfamilia CYP3A del equino con respecto a otras especies, se incluyó en el alineamiento las regiones codificantes (CDS) para identificar regiones conservadas y los SRS. Para esta revisión se inició con la secuencia de estudio *CYP3A89* y se seleccionaron nueve secuencias que incluían especies del género *Equus* y otras especies taxonómicas distantes, reportadas en la tabla 4.

Inicialmente, se utilizó el programa BioEdit (47) para identificar los porcentajes de identidad entre estas secuencias. La alineación de las secuencias homólogas de la subfamilia reveló una alta identidad entre las isoformas de la subfamilia CYP3A humana y equinas, hallazgo que confirmó lo que ya se había documentado en la investigación de Schmitz (13).

Pero también muy alta identidad en los miembros de la subfamilia CYP3A equina, entre los citocromos *CYP3A89*, *CYP3A93*, *CYP3A94*, *CYP3A95*, *CYP3A96* y *CYP3A97* procedentes de un mismo origen evolutivo, como se muestra en la tabla siguiente:



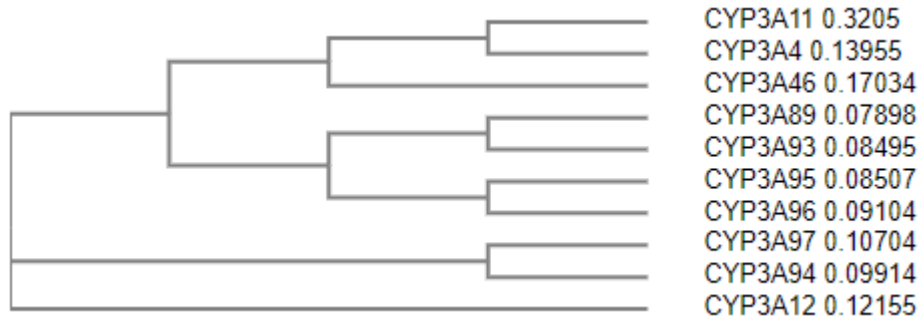
Tabla 8. Comparación entre las secuencias de nucleótidos de las isoformas de la subfamilia CYP3A.

	3A89 CABAL LO	3A4 HUMA NO	3A12 ASIN US	3A93 CABALLO	3A94 CABALLO	3A95 CABALLO	3A96 CABALLO	3A97 CABALLO	3A11 RATÓN	3A46 CERDO
3A89 CABAL LO		0,813	0,998	0,884	0,88	0,85	0,789	0,852	0,406	0,799
3A4 HUMA NO	0,813		0,811	0,795	0,801	0,791	0,725	0,755	0,41	0,767
3A12 ASNO	0,998	0,811		0,882	0,878	0,848	0,789	0,85	0,406	0,797
3A93 CABAL LO	0,884	0,795	0,882		0,864	0,833	0,767	0,84	0,412	0,803
3A94 CABAL LO	0,88	0,801	0,878	0,864		0,842	0,783	0,846	0,404	0,797
3A95 CABAL LO	0,85	0,791	0,848	0,833	0,842		0,775	0,813	0,41	0,801
3A96 CABAL LO	0,789	0,725	0,789	0,767	0,783	0,775		0,763	0,398	0,713
3A97 CABAL LO	0,852	0,755	0,85	0,84	0,846	0,813	0,763		0,392	0,763
3A11 RATÓN	0,406	0,41	0,406	0,412	0,404	0,41	0,398	0,392		0,396
3A46 CERDO	0,799	0,767	0,797	0,803	0,797	0,801	0,713	0,763	0,396	

Fuente: Elaboración propia.

Entre las especies se realizó un árbol filogenético Neighbour-joining sin correcciones de distancia para observar divergencia evolutiva. Se usó la herramienta Clustal Omega.

Figura 2. Árbol filogenético



Así mismo, se buscaron las similitudes de la secuencia *CYP3A89* del equino comparándolas con otras secuencias mencionada antes, pero se utilizó como guía la isoforma *CYP3A4* de humanos por ser una secuencia ampliamente estudiada y la cual fue utilizada en análisis similares por Orr (11) donde se evidenciaron los seis SRS de Gotoh (23).

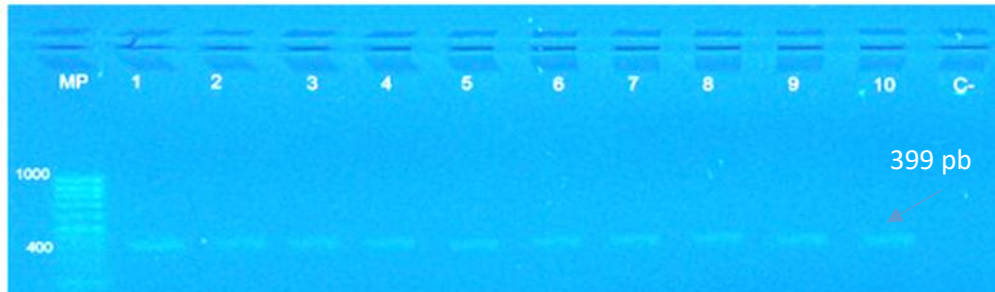
Una vez realizada la identificación de los sitios de SRS se utilizó la herramienta de traducción de secuencia de nucleótidos de ExPASy para hacer el reconocimiento del Marco de lectura abierto (ORF, sigla en inglés) a partir del gen *CYP3A89* y posteriormente, se utilizó el NCBI para rastrear los exones que contienen las cadenas de nucleótidos codificantes de esos sitios específicos; encontrándose que: SRS1 A y B en el exón 5 entre; SRS2 en el exón 7; SRS3 en el intrón 7 entre; SRS4 está en el exón 10; SRS5 en el exón 11 y el SRS6 en el exón 13. Estas zonas fueron ubicadas en el cromosoma 13 de equinos y se seleccionaron para ser usadas para el diseño de cebadores.

## 2. Amplificación SRS en muestras de equinos

Con el protocolo debidamente estandarizado, se procedió a la amplificación de las muestras de caballos criollos. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%. Utilizando 5ul por muestra. El marcador de peso utilizado fue BrightMAX™ 50 – 1,000 bp DNA Ladder de CANVAX. El intercalante utilizado fue

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain de Biotium. El gel fue revelado en un transiluminador para electroforesis ENDURO™ UV de Labnet International. Los resultados del proceso se muestran en las siguientes imágenes.

Figura 3. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 1 con todas las muestras de ADN.



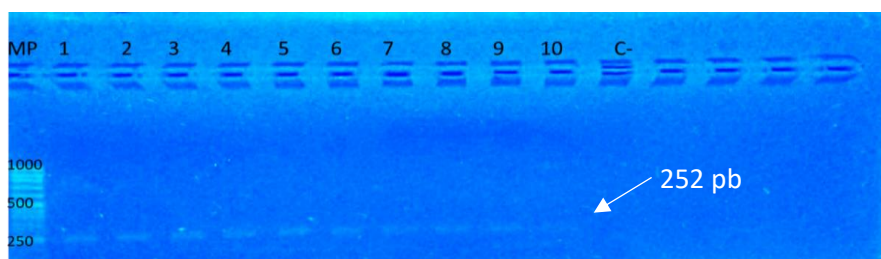
MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Figura 4. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 2 con todas las muestras de ADN.



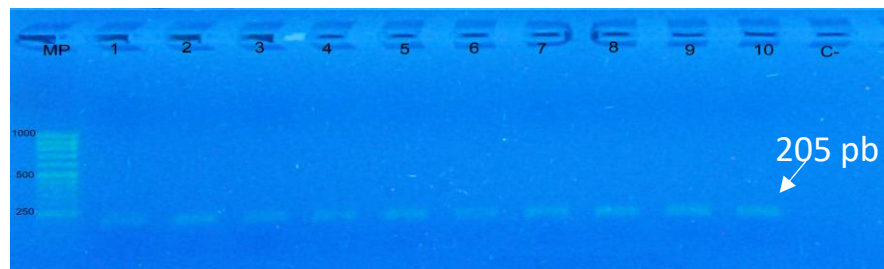
MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Figura 5. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 3 con todas las muestras de ADN.



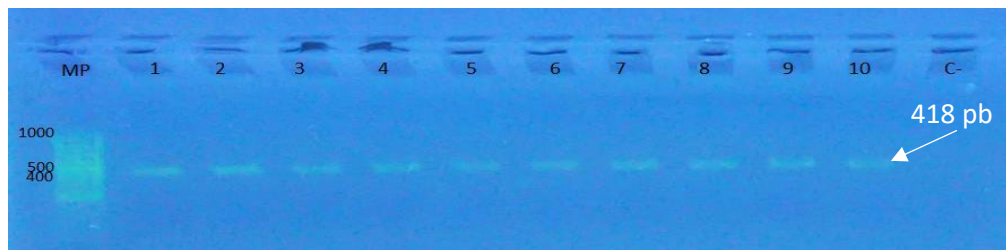
MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Figura 6. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 4 con todas las muestras de ADN.



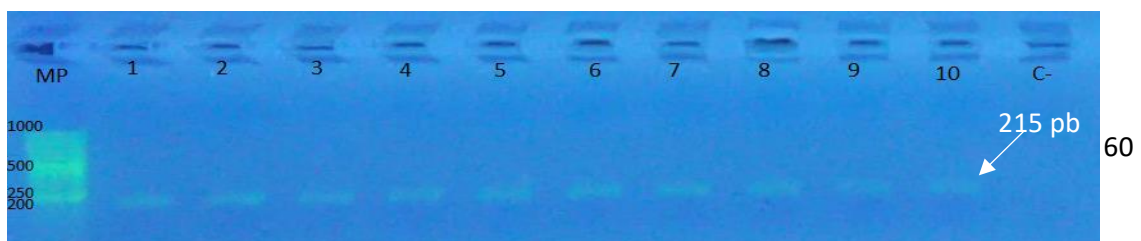
MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Figura 7. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 5 con todas las muestras de ADN.



MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Figura 8. Resultados de la PCR punto final para cebadores del juego 6 con todas las muestras de ADN.



MP: marcador de peso molecular de 50pb. Carril 1 a 10: muestras de DNA de los equinos. C-: control negativo.

Los cebadores expuestos a ADN de caballos criollos colombianos amplificaron en tamaños compatibles con los esperados tal y como fueron diseñados, y con los resultados de la PCR in silico. y no se evidenció amplificación cruzada. La amplificación de bandas de la longitud esperada indica que no hubo modificaciones por inserciones o deleciones.

### 3. Secuenciación de fragmentos SRS

Con los productos de la PCR se procedió a la secuenciación de las seis regiones donde se encuentran los sitios de reconocimiento de sustratos.

Los resultados de las secuenciaciones se examinaron, se organizaron e inicialmente se compararon en una alineación de secuencias por pares, donde uno a uno, fueron sometidos usando el software libre Clustal Omega, para determinar las correspondencias de identidad con las secuencias reportadas, tanto en el sentido de izquierda a derecha como con la secuencia complementaria.

La información de los porcentajes de identidad de las alineaciones se obtuvo enfrentando la secuencia reportada en la literatura como referencia y cada una de las secuencias obtenidas de equinos criollos, tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la secuenciación.

	EQUINO 1	EQUINO 2	EQUINO 3
	REGIÓN DEL SRS 1	REGIÓN DEL SRS 1	REGIÓN DEL SRS 1
secuencia reportada (fw)	47%	48%	43%
secuencia reportada (rv)	95%	96%	95%
	REGIÓN DEL SRS 2	REGIÓN DEL SRS 2	REGIÓN DEL SRS 2
secuencia reportada (fw)	91%	93%	90%
secuencia reportada (rv)	83%	87%	79%

	REGIÓN DEL SRS 3	REGIÓN DEL SRS 3	REGIÓN DEL SRS 3
secuencia reportada (fw)	91%	92%	93%
secuencia reportada (rv)	90%	92%	89%
	REGIÓN DEL SRS 4	REGIÓN DEL SRS 4	REGIÓN DEL SRS 4
secuencia reportada (fw)	93%	93%	92%
secuencia reportada (rv)	94%	94%	91%
	REGIÓN DEL SRS 5	REGIÓN DEL SRS 5	REGIÓN DEL SRS 5
secuencia reportada (fw)	95%	97%	97%
secuencia reportada (rv)	95%	97%	96%
	REGIÓN DEL SRS 6	REGIÓN DEL SRS 6	REGIÓN DEL SRS 6
secuencia reportada (fw)	95%	90%	95%
secuencia reportada (rv)	97%	96%	88%

Fuente: elaboración propia

Luego, se rastreó la ubicación de las secuencias que previamente se habían identificado como responsables de la codificación de los sitios de reconocimiento de sustratos usando como guía la secuencia de la región reportada (plantilla), en un proceso de alineación múltiple y ubicación de las regiones; y a su vez se diseñó las respectivas matrices para comparar las tres secuencias de las muestras de equinos criollos.

A continuación, los resultados de la identificación de las secuencias de interés:

### 5.3.1 Identificación del SRS1 A y B en las muestras de equinos criollos

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

plantilla	-----CCTGCTCTCTCTG-----GAGTAAACGCTT	27	plantilla	-----CCTGCTCTCTCTG-----GAGTAAACGCTT	27
equino1	-AGGTA--CAAAATGGCGTTCTCTCTTTGTCCTCAGACACAGAGTGGCACTT	56	equino1	-AGGTA--CAAAATGGCGTTCTCTCTTTGTCCTCAGACACAGAGTGGCACTT	56
equino2	-CG--GCCAGGTAGAGGTTCTCTTAAATGAACCTCAGACA-AGAGTGGCACTT	55	equino2	-CG--GCCAGGTAGAGGTTCTCTTAAATGAACCTCAGACA-AGAGTGGCACTT	55
equino3	GGGGAAATAATGGGGCAGAGACTGGACATTTCTCTCAGACAGAGAGTGGCACTT	60	equino3	GGGGAAATAATGGGGCAGAGACTGGACATTTCTCTCAGACAGAGAGTGGCACTT	60
plantilla	TC---CTACCGTATGGATCATTTTCAAATAAGGAGATAGAATACAAGGCTCAAAC	83	plantilla	TC---CTACCGTATGGATCATTTTCAAATAAGGAGATAGAATACAAGGCTCAAAC	83
equino1	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CATAGGCTCACACC	90	equino1	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CATAGGCTCACACC	90
equino2	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CATAGGCTCACACC	89	equino2	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CATAGGCTCACACC	89
equino3	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CAAATGCTACACTC	94	equino3	TTCAAATAATCGAAGTGGAC-----CAAATGCTACACTC	94
plantilla	TGCAACAGTGGCTGGATGTGCTCCACCTCA---T---AGGAACCTAGGCTGGGA-	136	plantilla	TGCAACAGTGGCTGGATGTGCTCCACCTCA---T---AGGAACCTAGGCTGGGA-	136
equino1	AAAAACCAGACATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	145	equino1	AAAAACCAGACATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	145
equino2	AAAAACCAGT---ATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	143	equino2	AAAAACCAGT---ATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	143
equino3	AAAAACAAAGACATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	149	equino3	AAAAACAAAGACATTT---GCCCT---ACCTGATTTTGGAGGCTCAACGATTTGGGA	149
plantilla	TAA--TATTTATGGACATGAT-----CATAGGCTGTC-TACTAAGTATA	180	plantilla	TAA--TATTTATGGACATGAT-----CATAGGCTGTC-TACTAAGTATA	180
equino1	AAATTTGATAAATGGGCATCATTTTCAACAATACTACCGACTGATATACTAGT-AG	204	equino1	AAATTTGATAAATGGGCATCATTTTCAACAATACTACCGACTGATATACTAGT-AG	204
equino2	AGATTTGATAAATGGGCATCATTTTCTTG-ATACTAGTGAATATA-----A	192	equino2	AGATTTGATAAATGGGCATCATTTTCTTG-ATACTAGTGAATATA-----A	192
equino3	ATATTTGATAAATGGGCATCAGTATTGACAAATCTTAGTACTGATATACTAGT-AG	208	equino3	ATATTTGATAAATGGGCATCAGTATTGACAAATCTTAGTACTGATATACTAGT-AG	208
plantilla	CAGTCACTAAGTAT-TTGTGAATAA-CTGATGCCAATTAACAATAATTTCCAC-AATGG	237	plantilla	CAGTCACTAAGTAT-TTGTGAATAA-CTGATGCCAATTAACAATAATTTCCAC-AATGG	237
equino1	CAGGCCATGATACATGCTAAATAAATTTATCCCATG---C-TAGGTTCTTTGAGGG	260	equino1	CAGGCCATGATACATGCTAAATAAATTTATCCCATG---C-TAGGTTCTTTGAGGG	260
equino2	CTT-CCCCAGATT---GATATGACCTTG---CT---AACGGATGTTGT	231	equino2	CTT-CCCCAGATT---GATATGACCTTG---CT---AACGGATGTTGT	231
equino3	CAGGCCATGATACATGCTCAATAAATTTATCCCATG---CTAGGTTCTTATGAGGG	265	equino3	CAGGCCATGATACATGCTCAATAAATTTATCCCATG---CTAGGTTCTTATGAGGG	265
plantilla	TTGAGACTCCAAACTCAGGTAGGGCAAATGTCTTTGTTTGGTCTAGCCTTTTG	297	plantilla	TTGAGACTCCAAACTCAGGTAGGGCAAATGTCTTTGTTTGGTCTAGCCTTTTG	297
equino1	TGAGAGAT-G-----ATCCAGC-----	276	equino1	TGAGAGAT-G-----ATCCAGC-----	276
equino2	CGGAGGCTCGGTTGCTCTG-----AACCCGCCCAAG	265	equino2	CGGAGGCTCGGTTGCTCTG-----AACCCGCCCAAG	265
equino3	TGAGGACAC-----ATCCAGC-----	282	equino3	TGAGGACAC-----ATCCAGC-----	282
plantilla	<b>GCCATTCG</b> GATTTATGAAAGTGC-ATCTCTGTCTGAGGATGAACAATG-----GA	351	plantilla	<b>GCCATTCG</b> GATTTATGAAAGTGC-ATCTCTGTCTGAGGATGAACAATG-----GA	351
equino1	-----CAACTGTGGAGT--TG-GGGCTCTTTGCTT---ACGCCATG-AAAAA	320	equino1	-----CAACTGTGGAGT--TG-GGGCTCTTTGCTT---ACGCCATG-AAAAA	320
equino2	TTGAG-GCCACAGTGGGAACACTGCCCTCGCAAGTAAACA---GCCCTTG--GATGA	318	equino2	TTGAG-GCCACAGTGGGAACACTGCCCTCGCAAGTAAACA---GCCCTTG--GATGA	318
equino3	-----CAACTGTGGAGT-TG-CCGCCCTGTATTCTAA---TCTCTTTTAAATGA	329	equino3	-----CAACTGTGGAGT-TG-CCGCCCTGTATTCTAA---TCTCTTTTAAATGA	329
plantilla	AGAGAATACGAACATTTGCTCTCCAACTTCCACGAGTGGAAA-GCTCA-----	399	plantilla	AGAGAATACGAACATTTGCTCTCCAACTTCCACGAGTGGAAA-GCTCA-----	399
equino1	AGAAGATCCCAACGGTTTGGAAACCTGTCATCACGAGAA-----	359	equino1	AGAAGATCCCAACGGTTTGGAAACCTGTCATCACGAGAA-----	359
equino2	AGGAATACATACGATGATGAAATACACACGAGTGAAGAAATCGAATGCTTGTGA	378	equino2	AGGAATACATACGATGATGAAATACACACGAGTGAAGAAATCGAATGCTTGTGA	378
equino3	AAATGATCCATACGGTAGGAAGCTGTACTCCAAAGAA-----	372	equino3	AAATGATCCATACGGTAGGAAGCTGTACTCCAAAGAA-----	372
plantilla	-----399	plantilla	-----399		
equino1	-----359	equino1	-----359		
equino2	GTTATCAAGAACAACCTCAG	equino2	GTTATCAAGAACAACCTCAG		
equino3	-----CAGGAAA-----379	equino3	-----CAGGAAA-----379		

En este alineamiento en las secuencias que codifican los SRS1 A y B (resaltados) en el sentido de izquierda a derecha no se observa la presencia de los SRS en las muestras de equinos.

plantilla	TGAGCTTCCACTCGTGAAGTGGAGACAGCAATGCTGATCTCTCTCATTTGTCAT	60	plantilla	TGAGCTTCCACTCGTGAAGTGGAGACAGCAATGCTGATCTCTCTCATTTGTCAT	60
equino1	-----GCCATTAACAGCTGCTGATCTCTCTCATTTGTCAT	36	equino1	-----GCCATTAACAGCTGCTGATCTCTCTCATTTGTCAT	36
equino2	-----GCCGGTCTCTTATTCAGTATCTCGTTCATTTGTCAT	38	equino2	-----GCCGGTCTCTTATTCAGTATCTCGTTCATTTGTCAT	38
equino3	-----CTCCGACTCATGTCAGTACTGCTCATTTGTCAT	38	equino3	-----CTCCGACTCATGTCAGTACTGCTCATTTGTCAT	38
plantilla	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	120	plantilla	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	120
equino1	ACTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	96	equino1	ACTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	96
equino2	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	98	equino2	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	98
equino3	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	98	equino3	CCTCAGACAGAGAGTGGCACTTTTCAAATCGAATGGACCAAAGGCTAGACTCAA	98
plantilla	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	180	plantilla	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	180
equino1	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	156	equino1	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	156
equino2	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	158	equino2	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	158
equino3	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	158	equino3	AACAAAAGACATTTGGCCCTACCTGAGTTTGGAGGCTCAACAATTTGGAAAATTTGT	158
plantilla	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	240	plantilla	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	240
equino1	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	216	equino1	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	216
equino2	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	218	equino2	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	218
equino3	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	218	equino3	TAAATGGGCATCAGTATTCAACAATACTTAGTACTGATATACTAGTAGAGGCCCTA	218
plantilla	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	300	plantilla	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	300
equino1	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	276	equino1	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	276
equino2	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	278	equino2	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	278
equino3	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	278	equino3	TGATACATGCTCAATAAATATTATCCCATGCTAGGTTCTCATGAGGCTGGAGACACAT	278
plantilla	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	360	plantilla	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	360
equino1	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	336	equino1	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	336
equino2	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	338	equino2	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	338
equino3	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	338	equino3	CCAGCCAACTGTTGAGTTGGAGCTGTTATTCTAACTCCCTTTAAATGAAATGATC	338
plantilla	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---399	plantilla	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---399		
equino1	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---378	equino1	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---378		
equino2	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---379	equino2	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---379		
equino3	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---378	equino3	CATACGGTAGGAAGCTGTTACTCCAAGGAAGACAGGAA---378		

En este alineamiento de los nucleótidos que codifican los SRS1 A y B (resaltados) en el sentido de derecha a izquierda fueron 100% idénticos.



### 5.3.2 Identificación del SRS2 en las muestras de equinos criollos

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

plantilla      CTTGCTGCATGTTGGATAAGGAGAGTAAAGAGGTGCTGATTTAATTTTCATGCTT      68
equino1        -----GGCTCAGTGCATGAT-TTTAATTTTCATGCTT      38
equino2        -----CTCTCAGTGCATGATTTAATTTTCATGCTT      31
equino3        -----GCCTCAGTGCATGATTTAATTTTCATGCTT      31
                * * **** *****

plantilla      TCTTTTCTACTCAGCATCTTGGGGCTACAGCATGGATGTGATTACTAGCACATCATT      128
equino1        TCTTTTCTACTCAGCATCTTGGGGCTACAGCATGGATGTGATTACTAGCACATCATT      98
equino2        TCTTTTCTACTCAGCATCTTGGGGCTACAGCATGGATGTGATTACTAGCACATCATT      91
equino3        TCTTTTCTACTCAGCATCTTGGGGCTACAGCATGGATGTGATTACTAGCACATCATT      91
                *****

plantilla      TGGAGTGAACATCGACTCCCTCAACAATCCACAAGATCCCTTTGGGAAAATACCAAGAA      188
equino1        TGGAGTGAACATCGACTCCCTCAACAATCCACAAGATCCCTTTGGGAAAATACCAAGAA      158
equino2        TGGAGTGAACATCGACTCCCTCAACAATCCACAAGATCCCTTTGGGAAAATACCAAGAA      151
equino3        TGGAGTGAACATCGACTCCCTCAACAATCCACAAGATCCCTTTGGGAAAATACCAAGAA      151
                *****

plantilla      GCTCTTCAGTTTGGATTCCCTTGATCCATTACTTCTCTCAATAAGTATGGGACTATTAT      248
equino1        GCTCTTCAGTTTGGATTCCCTTGATCCATTACTTCTCTCAATAAGTATGGGACTAATAT      218
equino2        GCTCTTCAGTTTGGATTCCCTTGATCCATTACTTCTCTCAATAAGTATGGGACTATTAT      211
equino3        GCTCTTCAGTTTGGATTCCCTTGATCCATTACTTCTCTCAATAAGTATGGGACTATTAT      211
                *****

plantilla      TTTTCTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTATCTCACCTTCCATCTCTCT--      298
equino1        TTTTCTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTATCTCACCTTTCCTTCAGATTTC      278
equino2        TTTTCTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTATCTCACCTTTCCTTCAGATTTC      271
equino3        TTTTCTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTATCTCACCTTTCCTTCCTTCCTTCAGATA-      278
                *****

plantilla      -----                298
equino1        -----                278
equino2        GATCTCAGATAA          283
equino3        -----                278

```

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS2 (resaltado) fueron 100% idénticos en el sentido de izquierda a derecha.



plantilla	AGGAGAGATGGAAGGTGAGATAAGGAAGGAAAGGAAGGAAGGAAAAGAAAAA	68
equino1	-----CCCGAAGGTAGGTAGGAGGAGATAGATGAT	32
equino2	-----CCCGAAGGTAGGTAGGAGGAGATAGATGAT	38
equino3	-----CCCGGAGAGCAGTAGGAGGAGAT	24
	* * * *	
plantilla	AATAGTCCACATACT-TATTGAGAGAAGTAATGGATCAAGG <b>AATCAAAACTGAAGAGCT</b>	119
equino1	AATACTCCACATACT-TATTGA-TATAATACTGGATCAAGG <b>AATCAAAACTGAAGAGCT</b>	98
equino2	GATAGTCCACATACT-TATTGAGAGAAGTAATGGATCAAGGAAAGCATAAACGGAAGAGCT	89
equino3	AATAGTCTACTTACTTATATGCGAGAAGGAGAAAGCAAGGAATTCAGGACTGAAGAGCT	84
	* *	
plantilla	TCTTGGTATTTTCCACAAAGGGATCTTGGATTGTTGAGGGAGTCGATGTTCACTCCAA	179
equino1	TCTTGGTATTTTCCACAAAGGGATCTTGGATTGTTGAGGGAGTCGATGTTCACTCCAA	158
equino2	TCTTGGTATTTTCCACAAAGGTTCTTGGATTGTTGAGGGAGTCGATGTTCACTCCAA	149
equino3	TCTTGGTATTTTGACATTTGGGATCTTGGATTGTTGAGGGAGTCGATGTTCCCTCGTT	144
	* *	
plantilla	ATGATGTGCTAGTAATCACATCCATGCTGATGGCCCCAAAGATGCTGAGTAGAAAAAGAA	239
equino1	ATGATGTGCTATTAATCACATCCATGCTGATGCCCTCACATGCTGAATGAACAAAAA	218
equino2	ATGATGTGCTAGTAATCGCGTCCATGCTGATGGCCCCAAAGATGCTGAGTAGAAAAAGAA	289
equino3	CTGACGTCTAATGTTTACATCCTTGCTGCCGGCCCCAAAGATGCTGAGAAGAAGAAGAA	284
	* *	
plantilla	AGACATGAAAAATTAATAATCAGCACCTCTTACTCTCCTTATCCAACACATGCAGCAAG-	298
equino1	ATATTTGAAAAATTAATAATCCTTCCTCTTACTCTCCTTATCCCACTTCTGCTAAGA	278
equino2	AGACATGAAAAATTAATAATCAGCACCTCTTACTCTCCTTATCCCACTCTGCTCAAGA	269
equino3	AAACATAAAAAATTAATAATCTTCACTCTTACTCTCTTCTCCCCACATGCAGAAAGA	264
	* *	
plantilla	----- 298	
equino1	TAC----- 273	
equino2	TATGCAGCAAGATA 283	
equino3	CAGCAAGATA---- 274	

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS2 (resaltado) en la muestra 1 fueron 100% idénticos, pero no los de la muestra 2 y 3, a la comparación en el sentido de derecha a izquierda.

### 5.3.3 Identificación del SRS3 en muestras de equinos criollos

plantilla	GGTGTCTTTTACTCTTGATCGGTAGAGAAAAATATAGTTGTTACAGGTAATAATTGCA	68
equino1	-----CCCATTAAGGTAGTTGTTACAGGATAAATTGCA	33
equino2	-----CACGTTAAGGAAGGTAGTTACTGTATAAATTGCA	34
equino3	-----CCCGGATTAAGGTGCTTACTGGATAAATTGCA	34
	* *	
plantilla	TTTTCATTGCTTTCTTTTTCTTTTCTTACAGCA <b>CTCTTTCCATTCTTAATGCAGT</b>	128
equino1	TTTTCATTGCTTTCTTTTTCTTTTCTTACAGCA <b>CTCTTTCCATTCTTAATGCAGT</b>	93
equino2	TTTTCATTGCTTTCTTTTTCTTTTCTTACAGCA <b>CTCTTTCCATTCTTAATGCAGT</b>	94
equino3	TTTTCATTGCTTTCTTTTTCTTTTCTTACAGCA <b>CTCTTTCCATTCTTAATGCAGT</b>	94
	* *	
plantilla	TTTTGAAGTATTAATGCTTTTGTGTTTCCAAAAAGTGTTACTGATTTTTTCAATAAAC	188
equino1	TTTTGAAGTATTAATGCTTTTGTGTTTCCAAAAAGTGTTACTGATTTTTTCAATAAAC	153
equino2	TTTTGAAGTATTAATGCTTTTGTGTTTCCAAAAAGTGTTACTGATTTTTTCAATAAAC	154
equino3	TTTTGAAGTATTAATGCTTTTGTGTTTCCAAAAAGTGTTACTGATTTTTTCAATAAAC	154
	* *	
plantilla	TGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCAAAGATAAGAAAAAGTTAAAAATATGGTGGTGC	248
equino1	TGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCAAAGATAAGAAAAAGTTAAAAATATGGTGGTGC	213
equino2	TGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCAAAGATAAGAAAAAGTTAAAAATATGGTGGTGC	214
equino3	TGTAAAAAGGATGAAAGAAAGTCGCCTCAAAGATAAGAAAAAGTTAAAAATATGGTGGTGC	214
	* *	
plantilla	TTACATGAGTGT--- 252	
equino1	TTACATGAGTGTAAC 228	
equino2	TTACATGAGTGTA-- 227	
equino3	TTACATGAGTGTA-- 227	
	* *	

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS3 (resaltado) fueron 100% idénticos en el sentido de izquierda a derecha.

```

plantilla      ACACCTCATGTAAGCACCACCATATTTTACCTTTTCTTTATCTTTGAGGCGACTTTCCTTTC      60
equino1        -----CCCGATTTTTCATATCTCCACAAGCGACTTTCCTTTC      36
equino2        -----GGCAGAGCAATTAGTAGAAAAACAGGAGACTTTCCTTTC      39
equino3        -----CGGCAGGAAGGCAAGATCTATACAAGAGACTTTCCTTTC      39
                * * *****

plantilla      ATCCTTTTACAGATTTTATGAAAAATCAGTAACACTTTTTGGAAACACAAGACATTT      120
equino1        ATCCTTTTACAGATTTTATGAAAAATCAGTAACACTTTTTGGAAACACAAGACATTT      96
equino2        ATCCTTTTACAGATTTTATGAAAAATCAGTAACACTTTTTGGAAACACAAGACATTT      99
equino3        ATCCTTTTACAGATTTTATGAAAAATCAGTAACACTTTTTGGAAACACAAGACATTT      99
                *****

plantilla      AATACTTCAAAAACCTGCATTAAAGAAATGGAAAGAGTGCTGTAGGAAAAAGAAAAAGAAA      180
equino1        AATACTTCAAAAACCTGCATTAAAGAAATGGAAAGAGTGCTGTAGGAAAAAGAAAAAGAAA      156
equino2        AATACTTCAAAAACCTGCATTAAAGAAATGGAAAGAGTGCTGTAGGAAAAAGAAAAAGAAA      159
equino3        AATACTTCAAAAACCTGCATTAAAGAAATGGAAAGAGTGCTGTAGGAAAAAGAAAAAGAAA      159
                *****

plantilla      GCACAATGAAAATGCAAAATTTTACCTGTAACAACATAATTTTCTCTACCGATCACAAGA      240
equino1        GCACAATGAAAATGCAAAATTTTACCTGTAACAACATAATTTTCTCTACCGATCACAAGA      216
equino2        GCACAATGAAAATGCAAAATTTTACCTGTAACAACATAATTTTCTCTACCGATCACAAGA      219
equino3        GCACAATGAAAATGCAAAATTTTACCTGTAACAACATAATTTTCTCTACCGATCACAAGA      219
                *****

plantilla      GTAAAAGACACC--- 252
equino1        GAAAAGACACCCAA- 238
equino2        GTAAAAGACACCCCTA 234
equino3        GAAAAGACACCCAA 234
                * *** **

```

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS3 (resaltado) fueron 100% idénticos en el sentido de derecha a izquierda.

#### 5.3.4 Identificación del SRS4 en las muestras de equinos criollos

```

plantilla      TCCTTCTCTAGCTCTGTCTGATCTGGAGCTCGTGGCCAATCTATTATCTTTATTTT      60
equino1        -----GGGCAAGACTGTGTCATCTATTATCTTTATTTT      33
equino2        -----TGGCTTTACTGTGACATCTATTATCTTTATTTT      33
equino3        -----GGCCTTGGTCTGTGCCATCTATTATCTTTATTTT      34
                * *****

plantilla      TGCTGGCTATGAGACCACTAGCAGTTCTCTTTCCCTTCTATGTATTTTGGCCACTCA      120
equino1        TGCTGGCTATGAGACCACTAGCAGTTCTCTTTCCCTTCTATGTATTTTGGCCACTCA      93
equino2        TGCTGGCTATGAGACCACTAGCAGTTCTCTTTCCCTTCTATGTATTTTGGCCACTCA      93
equino3        TGCTGGCTATGAGACCACTAGCAGTTCTCTTTCCCTTCTATGTATTTTGGCCACTCA      94
                *****

plantilla      CCCTGATGTCCAGCAGAAGCTGCAGGAGGAGATTGATGCGACTTCCCAATAAGGTGAG      180
equino1        CCCTGATGTCCAGCAGAAGCTGCAGGAGGAGATTGATGCGACTTCCCAATAAGGTGAG      153
equino2        CCCTGATGTCCAGCAGAAGCTGCAGGAGGAGATTGATGCGACTTCCCAATAAGGTGAG      153
equino3        CCCTGATGTCCAGCAGAAGCTGCAGGAGGAGATTGATGCGACTTCCCAATAAGGTGAG      154
                *****

plantilla      TGGATGAGATACTGGAGAGGGAGG-      205
equino1        TGGATGAGATACTGGAGAGGGAGGA      179
equino2        TGGATGAGATACTGGAGAGGGAGGA      179
equino3        TGGATGAGATACTGGAGAGGGAGGA      180
                *****

```

En este alineamiento hay alta identidad de los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS4 (resaltado), en el sentido de izquierda a derecha.

```

plantilla      CCTCCCTCTCCAAGTATCTCATCCACTCACCTTATTGGGGAAAGTCACATCAATCTCCTC      68
equino1      -----CCATATAATT--GGGGAG-TCGCATCAATCTCCTC      32
equino2      -----AAATTTTATTGGGGGAAGTCGCATCAATCTCCTC      35
equino3      -----GAATTTTATTGGGGGAGTCAGCATCAATCTCCTC      36
              . : :::* ***.*. ..*****

plantilla      CTGCAGCTTCTGCTGGACATCAGGGTGAGTGGCCAAAAAATACATAAGGAAGGAAAGAGA      128
equino1      CTGCAGCTTCTGCTGGACATCAGGGTGAGTGGCCAAAAAATACATAAGGAAGGAAAGAGA      92
equino2      CTGCAGCTTCTGCTGGACATCAGGGTGAGTGGCCAAAAAATACATAAGGAAGGAAAGAGA      95
equino3      CTGCAGCTTCTGCTGGACATCAGGGTGAGTGGCCAAAAAATACATAAGGAAGGAAAGAGA      96
              *****

plantilla      ACTGCTAGTGGTCTCATAGCCAGCAAAAATAAAGATAATAGATTGGCCACAGAGCTCCAG      188
equino1      ACTGCTAGTGGTCTCATAGCCAGCAAAAATAAAGATAATAGATTGGCCACAGAGCTCCAG      152
equino2      ACTGCTAGTGGTCTCATAGCCAGCAAAAATAAAGATAATAGATTGGCCACAGAGCTCCAG      155
equino3      ACTGCTAGTGGTCTCATAGCCAGCAAAAATAAAGATAATAGATTGGCCACAGAGCTCCAG      156
              *****

plantilla      ATCAGACAGAGCTAAGAGGAAAGGA-      285
equino1      ATCAGACAGAGCTAAGAGGAAAGGAA      178
equino2      ATCAGACAGAGCTAAGAGGAAAGGAA      181
equino3      ATCAGACAGAGCTAAGAGGAAAGGA-      181
              *****
    
```

En este alineamiento hay alta identidad en los tres animales de la muestra, de los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS4 (resaltado), en el sentido de derecha a izquierda.

### 5.3.5 Identificación del SRS5 en muestras de equinos criollos

```

plantilla      ATTATCTTTTGTGCTCTACCATTTCAATAGTACTGCAGAGATTGAGTGGAAAGTTGAT      68
equino1      -----TATGGACTGCAGAGATTGAGTGGAAAGTTGAT      31
equino2      -----AAATGCTGCAGAGA-TTGAAGTGGAAAGTTGAT      31
equino3      -----TATGGGTCTGCAGAGA-TTGAAGTGGAAAGTTGAT      32
              * * *

plantilla      CCCAAATCTCAGTTTATCAAAACCTCTTTCTTCTCCAGGCTCCTCCACCTATGATG      128
equino1      CCCAAATCTCAGTTTATCAAAACCTCTTTCTTCTCCAGGCTCCTCCACCTATGATG      91
equino2      CCCAAATCTCAGTTTATCAAAACCTCTTTCTTCTCCAGGCTCCTCCACCTATGATG      91
equino3      CCCAAATCTCAGTTTATCAAAACCTCTTTCTTCTCCAGGCTCCTCCACCTATGATG      92
              *****

plantilla      CCCTGGTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGTGAATGAATCCCTCAGATTATCCCAA      188
equino1      CCCTGGTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGTGAATGAATCCCTCAGATTATCCCAA      151
equino2      CCCTGGTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGTGAATGAATCCCTCAGATTATCCCAA      151
equino3      CCCTGGTACAGATGGAGTATCTTGACATGGTGTGAATGAATCCCTCAGATTATCCCAA      152
              *****

plantilla      TTGCTGTTAGACTTGAGCGGCTGTAGAAAGATGTGGAATCAATGGGGTGTTCATTC      240
equino1      TTGCTGTTAGACTTGAGCGGCTGTAGAAAGATGTGGAATCAATGGGGTGTTCATTC      211
equino2      TTGCTGTTAGACTTGAGCGGCTGTAGAAAGATGTGGAATCAATGGGGTGTTCATTC      211
equino3      TTGCTGTTAGACTTGAGCGGCTGTAGAAAGATGTGGAATCAATGGGGTGTTCATTC      212
              *****

plantilla      CTAAGGGACAGTGGTGTGGCCAACTTTGCTCTTCAACAACCCAGAGTTCTGGC      308
equino1      CTAAGGGACAGTGGTGTGGCCAACTTTGCTCTTCAACAACCCAGAGTTCTGGC      271
equino2      CTAAGGGACAGTGGTGTGGCCAACTTTGCTCTTCAACAACCCAGAGTTCTGGC      271
equino3      CTAAGGGACAGTGGTGTGGCCAACTTTGCTCTTCAACAACCCAGAGTTCTGGC      272
              *****

plantilla      CAGAGCCTGAGGAGTTCGGTCTGAAAGGTACAGGGCCCTGGGAAAGGAACTCACCTT      368
equino1      CAGAGCCTGAGGAGTTCGGTCTGAAAGGTACAGGGCCCTGGGAAAGGAACTCACCTT      331
equino2      CAGAGCCTGAGGAGTTCGGTCTGAAAGGTACAGGGCCCTGGGAAAGGAACTCACCTT      331
equino3      CAGAGCCTGAGGAGTTCGGTCTGAAAGGTACAGGGCCCTGGGAAAGGAACTCACCTT      332
              *****

plantilla      TATCTAGGTTGGTTAGAGCATATCATGACATCTCTAGGATAAAGGAAAGTGA--      418
equino1      TATCTAGGTTGGTTAGAGCATATCATGACATCTCTAGGATAAAGGAAAGTGAATG      391
equino2      TATCTAGGTTGGTTAGAGCATATCATGACATCTCTAGGATAAAGGAAAGTGAAGAA      391
equino3      TATCTAGGTTGGTTAGAGCATATCATGACATCTCTAGGATAAAGGAAAGTGAAGAA      391
              *****

plantilla      ---      418
equino1      AAA      394
equino2      A--      392
equino3      ---      391
    
```

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS5 (resaltado) fueron 100% idénticos en el sentido de izquierda a derecha.

```

plantilla      TCACTCATTGTCCCTTATCCTAAGAGATGTCATGATGCTCTAACCAACCTAGATAAA 60
equino1        -----GGGTTCTTGATTGCTCTACCAACCTAGATAAA 33
equino2        -----GGGATCTGAATGCTCTACCAACCTAGATAAA 31
equino3        -----GAGGGATCTGATTGCTCTACCAACCTAGATAAA 33
                * * *****

plantilla      GGTGAGTTCCTTTCCAGGGGCCCTGTACCTTTGAGGACGGAACCTCTCAGGCTCTGGC 120
equino1        GGTGAGTTCCTTTCCAGGGGCCCTGTACCTTTGAGGACGGAACCTCTCAGGCTCTGGC 93
equino2        GGTGAGTTCCTTTCCAGGGGCCCTGTACCTTTGAGGACGGAACCTCTCAGGCTCTGGC 91
equino3        GGTGAGTTCCTTTCCAGGGGCCCTGTACCTTTGAGGACGGAACCTCTCAGGCTCTGGC 93
                *****

plantilla      CAGAACTCTGGGTGTTTGTGAAGAGCAAAGTTGGCACCATCACCACCTGTCCCTTTAGGA 180
equino1        CAGAACTCTGGGTGTTTGTGAAGAGCAAAGTTGGCACCATCACCACCTGTCCCTTTAGGA 153
equino2        CAGAACTCTGGGTGTTTGTGAAGAGCAAAGTTGGCACCATCACCACCTGTCCCTTTAGGA 151
equino3        CAGAACTCTGGGTGTTTGTGAAGAGCAAAGTTGGCACCATCACCACCTGTCCCTTTAGGA 153
                *****

plantilla      ATGAACACCCCATTTGATTTCCACATCTTTCTTACAGACCCCGCTCAAGTCTAACAGCAATT 240
equino1        ATGAACACCCCATTTGATTTCCACATCTTTCTTACAGACCCCGCTCAAGTCTAACAGCAATT 213
equino2        ATGAACACCCCATTTGATTTCCACATCTTTCTTACAGACCCCGCTCAAGTCTAACAGCAATT 211
equino3        ATGAACACCCCATTTGATTTCCACATCTTTCTTACAGACCCCGCTCAAGTCTAACAGCAATT 213
                *****

plantilla      GGGAAATACTGAGGGATTCAATCAACACCATGTCAAGATACTCCATCTGTACACGGGCA 300
equino1        GGGAAATACTGAGGGATTCAATCAACACCATGTCAAGATACTCCATCTGTACACGGGCA 273
equino2        GGGAAATACTGAGGGATTCAATCAACACCATGTCAAGATACTCCATCTGTACACGGGCA 271
equino3        GGGAAATACTGAGGGATTCAATCAACACCATGTCAAGATACTCCATCTGTACACGGGCA 273
                *****

plantilla      TCATAGGTGGGAGGACCTGGGAAGAAAGAAAGAGGTTTTGATAAACTGAGATTTGGGAT 360
equino1        TCATAGGTGGGAGGACCTGGGAAGAAAGAAAGAGGTTTTGATAAACTGAGATTTGGGAT 333
equino2        TCATAGGTGGGAGGACCTGGGAAGAAAGAAAGAGGTTTTGATAAACTGAGATTTGGGAT 331
equino3        TCATAGGTGGGAGGACCTGGGAAGAAAGAAAGAGGTTTTGATAAACTGAGATTTGGGAT 333
                *****

plantilla      CAACTTCCACTCAATCTCTGCAGTACTATTGAAATGGTAGGAGCACAAAAGAATAAT-- 418
equino1        CAACTTCCACTCAATCTCTGCAGTACTATTGAAATGGTAGGAGCACAAAATAATA 393
equino2        CAACTTCCACTCAATCTCTGCAGTACTATTGAAATGGTAGGAGCACAAAAGAATAATTA 391
equino3        CAACTTCCACTCAATCTCTGCAGTACTATTGAAATGGTAGGAGCACAAAATAATA 393
                ***** ** *

plantilla      -- 418
equino1        A- 394
equino2        AA 393
equino3        -- 393

```

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS5 (resaltado) fueron 100% idénticos en el sentido de derecha a izquierda.

### 5.3.6 Identificación del SRS6 en muestras de equinos criollos

```

plantilla      GGCAATCAAGGACTTCTTCAACCACAAAAACCATTGTTCTAAAGGTTGAGTCCAGAGAT 68
equino1        -----CACCATTGTTCTAAGGTTGAGTCCAGAGAT 38
equino2        -----TAACAATTTGTTCTAAGGTTGAGTCCAGAGAT 32
equino3        -TGAATCTAGCCCATCTTCTTC-----CGGGTTTTATTATAAAG 39
                **** * * * *

plantilla      GGGACAGTGAGTGGAGCCTGACTTCCACAAGGACTTCTGTTTTGTTCTTCAAGGAAGTT 128
equino1        GGGACAGTGAGTGGAGCCTGACTTCCACAAGGACTTCTGTTTTGTTCTTCAAGGAAGTT 98
equino2        GGGACAGTGAGTGGAGCCTGACTTCCACAAGGACTTCTGTTTTGTTCTTCAAGGAAGTT 92
equino3        --TAAATTG--AGGTCTCTGATG-TTCTGAGATACTACTTCTTGAACATCAAAACAGAA 94
                * * * * * * * * * * * * * * * *

plantilla      GTATCTCAGAACATCAGAGACC-TCA----ATTTACTTTATGAATAAAACCCGGAATGAA 175
equino1        GTATCTCAGAACATCAGAGACC-TCA----ATTTACTTTATGAATAAAACCCGGAATGAA 145
equino2        GTATCTCAGAACATCAGAGACC-TCA----ATTTACTTTATGAATAAAACCCGGAATGAA 147
equino3        GTCCTTGTAAGAAAGTCAAGATCCACTCTCTGTTCCATCTCTGGACTCAACCTT-TAGAAC 153
                ** * * * * * * * * * * * * * *

plantilla      GATGGGCTTAACCTACTGTATTTGATGGATGCCATAGAGAT-- 215
equino1        GATGGGCTTAACCTACTGTATTTGATGGAGGCTAGAGATGA 187
equino2        GATGGGCTTAACCTACTGTATTTGATGGTGCCTAGAGATTGA 189
equino3        AATGGGTT-TTTGGTTGAAAAGGTCCTTGATTGCCAA--- 191
                ***** * * * * *

```

En este alineamiento no se puede confirmar la presencia de nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS6 (resaltado) en el sentido de izquierda a derecha, pues la región de interés está en un extremo, donde es poco probable obtener información fiable.

```

plantilla      ATCTTAGGCATCCATCAAAATACAGTAGGTTAAGCCCATCTTCATTCCGGGTTTTATTCA 68
equino1        -----GGAGTAGCCATCTTCATTCCGGGTTTTATTCA 32
equino2        -----GGGAGGTAGCCATCTTCATTCCGGGTTTTATTCA 34
equino3        -----TGAATCTAGCCCATCTTCATTCCGGGTTTTATTCA 34
                ** * *****

plantilla      TAAAGTAAATTGAGGTCTCTGATGTTCTGAGATACAACCTCCTTGAAGAACAAAACAGAA 128
equino1        TAAAGTAAATTGAGGTCTCTGATGTTCTGAGATACAACCTCCTTGAAGAACAAAACAGAA 92
equino2        TAAAGTAAATTGAGGTCTCTGATGTTCTGAGATACAACCTCCTTGAAGAACAAAACAGAA 94
equino3        TAAAGTAAATTGAGGTCTCTGATGTTCTGAGATACTACTTCTTGAACATCAAAACAGAA 94
                ***** * *****

plantilla      GTCCTTGTAAGAAAGTCAAGATCCACTCTCTGTTCCATCTCTGGACTCAACCTTTAGAACA 188
equino1        GTCCTTGTAAGAAAGTCAAGATCCACTCTCTGTTCCATCTCTGGACTCAACCTTTAGAACA 152
equino2        GTCCTTGTAAGAAAGTCAAGATCCACTCTCTGTTCCATCTCTGGACTCAACCTTTAGAACA 154
equino3        GTCCTTGTAAGAAAGTCAAGATCCACTCTCTGTTCCATCTCTGGACTCAACCTTTAGAACA 154
                ***** * *****

plantilla      ATGGGTTTGTGGTTGAAGAAGTCTTGATTGCC--- 215
equino1        ATGGGTTTGTGGTTGAAGAAGTCTTGATTGCCGTT 198
equino2        ATGGGTTTGTGGTTGAAGAAGTCTTGATTGCC--- 189
equino3        ATGGGTTTTGTGGTTGAAAAGGTCCTTGATTGCCAA- 191
                ***** * *****

```

En este alineamiento todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS6 (resaltado) fueron 100% idénticos en las muestras del equino 1 y 2 para el sentido de derecha a izquierda.

Una vez identificados los sitios de reconocimiento de sustratos en las seis regiones secuenciadas, se agrupó la información para hacer un análisis de la identidad

general entre las muestras, información que se presenta en una matriz de identidad realizada con el software Clustal Omega. Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Matriz de identidad entre las muestras, en el sentido de izquierda a derecha.

región 1	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	58.24	78.27
equino2	58.24	100.00	57.34
equino3	78.27	57.34	100.00
región 2	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	95.56	91.45
equino2	95.56	100.00	92.96
equino3	91.45	92.96	100.00
región 3	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	95.13	94.69
equino2	95.13	100.00	96.48
equino3	94.69	96.48	100.00
región 4	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	97.21	96.09
equino2	97.21	100.00	95.53
equino3	96.09	95.53	100.00
región 5	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	96.68	96.92
equino2	96.68	100.00	99.23
equino3	96.92	99.23	100.00
región 6	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	92.51	47.43
equino2	92.51	100.00	45.76
equino3	47.43	45.76	100.00

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Matriz de identidad entre las muestras, en el sentido de derecha a izquierda.

región 1	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	93.63	93.88
equino2	93.63	100.00	96.30
equino3	93.88	96.30	100.00
región 2	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	81.18	70.94
equino2	81.18	100.00	75.00
equino3	70.94	75.00	100.00
región 3	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	88.70	92.17
equino2	88.70	100.00	92.31
equino3	92.17	92.31	100.00
región 4	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	95.51	92.09
equino2	95.51	100.00	95.56
equino3	92.09	95.56	100.00
región 5	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	97.45	98.47
equino2	97.45	100.00	98.72
equino3	98.47	98.72	100.00
región 6	equino 1	equino 2	equino 3
equino1	100.00	98.93	88.36
equino2	98.93	100.00	89.42
equino3	88.36	89.42	100.00

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO 6

**DISCUSIÓN**



La descripción de las secuencias que se desarrolló en este estudio, en caballos criollos colombianos representa un avance para el diseño de nuevas propuestas investigativas enfocadas en razas criollas que deriva de los estudios previos donde se reporta que algunos CYP pueden estar sujetos a una variabilidad considerable dentro de la especie, como resultado de factores ambientales y genéticos (60). Aunque estos tipos de polimorfismos pueden existir en todas las especies animales, aún no se han investigado en detalle, y no hay precedentes en investigaciones de farmacogenética en la raza de equinos criollos de Colombia.

Con los resultados de este estudio se confirmó muy alta identidad entre los miembros de la subfamilia CYP3A equina y a otras especies de mamíferos, cuando se comparó con las secuencias reportadas de humanos, asnos, cerdos y ratones. Dentro de los miembros de esa familia se definió el citocromo a analizar, el *CYP3A89*, por ser el más semejante al *CYP3A4*, que a su vez es la más importante de todas las enzimas metabolizadoras de fármacos, con alta variabilidad interindividual en los niveles de expresión en humanos (36); y con importante expresión en hígado, vías aéreas y riñón en equinos, de acuerdo con los reportes en investigaciones previas (17, 37).

Para ese citocromo se dirigió la investigación en la identificación de los sitios de reconocimiento de sustratos, involucrados en el reconocimiento y unión de sustratos, mismos que tienen multiplicidad de mecanismos de enlace debido a la habilidad de la enzima de acomodarse estructuralmente resultado de las sustituciones, inserciones y deleciones que conformen las secuencias de los distintos miembros de la familia (71). Considerando que con los resultados de esta investigación se lograría cierto grado de identificación de variaciones en una población no estudiada, lo que a su vez permitiría reevaluar y ampliar el mapa original de SRS reportados en equinos, y permitiría reconocer una parte importante de las características estructurales de esta enzima en una muestra de la población de caballos criollos del Suroeste de Antioquia.

Los SRS en la subfamilia 3A que se han reportado y que se enfatizaron en esta investigación son: SRS1 A y B, SRS2, SRS3, SRS4, SRS5 y SRS6 (11, 49). Una

vez definidas estas regiones de interés, se procedió al diseño de cebadores orientados a los SRS dentro del gen.

Con el diseño de cebadores para las seis regiones específicas dentro del gen *CYP3A89*, se consiguió obtener productos que cumplieran el criterio de especificidad, debido a que los genes CYP450 de la misma familia muestran una alta identidad; pero teniendo como objetivo la amplificación de los sitios de reconocimiento de sustratos que, en cambio, son sitios que muestran alta variación en su secuencia de nucleótidos. Estas regiones se enfatizaron considerando que los cambios individuales en los nucleótidos en estas muestras podrían significar alteraciones geométricas en las regiones de unión al sustrato, lo que determina su capacidad unir diversos sustratos (49, 60).

En la aplicación de técnicas moleculares, los cebadores expuestos a ADN de caballos criollos colombianos amplificaron en tamaños compatibles con los esperados para el diseño, con los resultados de la PCR *in silico*; y sin amplificaciones cruzadas.

De las muestras amplificadas se seleccionó una submuestra de 3 individuos, de los que se secuenció los productos de PCR, y con la información obtenida se buscó representar y comparar los resultados entre los individuos de la muestra y comparando con la información disponible en las bases de datos. Se hizo una alineación por pares entre la secuencia reportada y cada una de las secuencias obtenidas de las muestras, después se hizo un proceso de alineamiento múltiple involucrando las tres muestras secuenciadas de cada animal y usando como plantilla la secuencia reportada, y finalmente, se hizo una matriz de identidad entre las secuencias de las tres muestras para cada una de las seis regiones.

Se discutirá los hallazgos de cada región para contrastarlos al final del capítulo con la evidencia disponible.

Para la primera región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 46% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras

que hubo un 95% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Por lo tanto, los resultados de las muestras en el sentido de izquierda a derecha no son los suficientemente contundentes para poder ser analizados adecuadamente, y así mismo hubo pocos nucleótidos idénticos o con sustituciones conservativas. Se puede comprender que estos resultados se relacionan con algún fallo en el proceso de secuenciación o pérdida de calidad de la muestra. Al analizar las secuencias de las muestras en el sentido de derecha a izquierda se encuentra unas identidades mayores en la alineación por pares y se pudo identificar el alineamiento de los nucleótidos que codifican los SRS1 A y B con identidad del 100% en las tres muestras.

Para la segunda región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 91% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras que hubo un 83% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Y todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS2 fueron idénticos en el sentido de izquierda a derecha, pero en el sentido de derecha a izquierda únicamente hubo identidad completa en la muestra 1, cuando en la muestra 2 y 3 se presentó sustituciones. Estos cambios fueron rastreados con ayuda de la herramienta Expasy y se encontró que en el marco de lectura 1 podrían ocasionar un cambio en los residuos 212, 213 y 214 de la proteína del sitio de reconocimiento de sustratos 2. Se ha estudiado en humanos que el residuo en la posición 212 puede estar relacionado con la orientación del sitio activo, y los residuos en las posiciones 212 y 213 se les considera dominios conservados (45, 72). Sin embargo, considerando que no hubo los mismos hallazgos en el sentido de izquierda a derecha, será interesante poder determinar si se trató de una falla en alguno de los procesos, que no se evidenció. Por lo pronto no se pudo considerar relevante.

Para la tercera región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 92% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras que hubo un 90% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Todos los

nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS3 fueron 100% idénticos en ambos sentidos.

Para la cuarta región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 93% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras que hubo un 93% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS4 fueron 100% idénticos en ambos sentidos.

Para la quinta región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 96% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras que hubo un 96% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Todos los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS5 fueron 100% idénticos en ambos sentidos.

Para la sexta región, en la alineación por pares entre la secuencia reportada con las secuencias obtenidas de las muestras, se encontró que hubo identidad de un 93% en promedio para las muestras en el sentido de izquierda a derecha, mientras que hubo un 94% de identidad en el sentido de derecha a izquierda. Los nucleótidos en las secuencias que codifican los SRS6 en el sentido de izquierda a derecha no pueden ser analizados pues la región de interés está en un extremo, se solapa con el primer, donde es poco probable obtener información fiable, pero los nucleótidos en las secuencias en el sentido de derecha a izquierda fueron 100% idénticos.

Así que, se puede señalar de los resultados obtenidos de las secuenciaciones que hay una alta identidad entre las secuencias que han encontrado otros autores y que se encuentran en NCBI, en relación con las muestras obtenidas en caballos criollos de Colombia; y una identidad del 100% en las secuencias codificantes de los sitios de reconocimiento de sustratos en las regiones 1 (de derecha a izquierda), 2 (de izquierda a derecha), 3 (de derecha a izquierda) y (de izquierda a derecha), 4 (de derecha a izquierda) y (de izquierda a derecha), 5 (de derecha a izquierda) y (de izquierda a derecha) y 6 (de derecha a izquierda). Lo que indica que, a pesar de

tratarse de una población sometida a una presión de selección considerable, las regiones relacionadas con la unión y reconocimiento de fármacos y varios xenobióticos, se han conservado. Con respecto a las regiones 1 (de izquierda a derecha), 2 (de derecha a izquierda) y 6 (de izquierda a derecha) se deduce que los bajos promedio de identidad en las regiones y en los SRS específicos se debe a fallos en la secuenciación, producto de variables que desconocemos pero que probablemente se puedan corresponder con sitios secundarios de unión del cebador que diera lugar a picos adicionales o inespecificidades desde la PCR; situaciones altamente probables pues como se ha descrito, los citocromos presentan muy alta identidad entre los miembros de las subfamilias (32, 73, 74).

Con los últimos resultados obtenidos con las secuencias, se diseñaron matrices de identidad entre los animales de la muestra, para el sentido de derecha a izquierda y de izquierda a derecha, con esta información podemos encontrar como en el sentido de izquierda a derecha hubo identidad entre todas las muestras de las regiones 2, 3, 4 y 5 mayores de 90%; mientras que entre las muestras de las regiones 1 y 6 las identidades fueron menores. En el sentido de derecha a izquierda, los resultados son mayores del 70% en todas las muestras y todas las regiones, aunque hay que resaltar que en las regiones 4 y 5 las identidades entre muestras fueron mayor del 95%. A ser animales del mismo tipo, se podría esperar este resultado. Sin embargo, hay algunas diferencias en regiones entre SRS, mismas que eventualmente podrían generar algún tipo de cambio en la estructura final.

Si bien, en los resultados de este estudio no hubo sustituciones, inserciones y deleciones obvias, el poder saber si existen variaciones en la secuencia del *CYP3A89*, en equinos criollos, permitirá ser soporte para una mejor asistencia médica veterinaria en Colombia. Cabe mencionar que el tamaño de la muestra y no obtener la información del gen completo limitó esta investigación; y que probablemente con un tamaño mayor de muestra y ampliando la secuenciación al gen completo se puede llegar a obtener una gran cantidad de información relevante.

Finalmente, con los resultados obtenidos se podrían hacer predicciones de la estructura de la proteína en una futura investigación. Por lo pronto, se puede confirmar que, para estudios de farmacogenética en medicina veterinaria, con la ayuda del tipo de herramientas que se emplearon para este caso, se puede abordar un análisis comparativo de regiones cromosómicas que contienen diversos grupos de genes.

CAPÍTULO 7

**CONCLUSIONES**

Con el análisis comparativo de las regiones cromosómicas que contienen el grupo de genes CYP3A en equinos y comparados con otras especies, se concluye que la estructura de la subfamilia CYP3A es muy similar. Si bien se sabe que en los seres vivos existe gran variabilidad interindividual en la actividad y la cantidad de enzimas del metabolismo, gran parte de esa variabilidad es debida a la existencia de genes para los que existen distintas variables que codifican por isoformas con especificidad metabólica diferente. Las isoformas a su vez pueden presentar diferencias intraespecie al ser comparadas, y si estas diferencias representan variaciones en residuos de aminoácidos concretos, pueden determinar grandes diferencias funcionales. En este estudio se usó herramientas de PCR *in silico* y técnicas moleculares, se evidenció que son herramientas que pueden ser de gran utilidad para identificar tales diferencias intraespecie, en el área de la farmacogenética en la medicina veterinaria.

Para el objetivo de esta investigación, se enfatizó en los nucleótidos en los seis sitios de reconocimiento de sustratos del CYP3A89 por ser determinantes de la selectividad del sustrato y la afinidad de la unión; y se aplicó a caballos del tipo criollo colombiano. Regiones que fueron amplificadas con PCR y secuenciadas. Y se encontró que, aunque los equinos criollos de Colombia han sido sometidos a condiciones ambiental y culturalmente distintas a las poblaciones de las cuales hay referencia, en la muestra de este estudio las regiones de los SRS del CYP3A89 se han conservado sin sustituciones, inserciones ni deleciones. Además, se pudo evidenciar que los sitios de reconocimiento de sustratos en la muestra de equinos criollos, se corresponden con la información obtenida de equinos de otras líneas y que se encuentra disponible en las bases de datos públicas. Aun así, la muestra es insuficiente para determinar un patrón para la población.

Queda por determinar la identidad de las regiones 1, 2 y 6 en ambos sentidos. Pues en este caso hubo interferencias o fallos que impidieron tener resultados lo suficientemente confiables de los productos de la secuenciación y solo se obtuvo la información pertinente de uno de los sentidos. Así que, con esta investigación se



presenta un primer abordaje a una población que se ha caracterizado poco en su composición genética, pero se debe continuar en la búsqueda información funcional y evolutiva de las secuencias de los genes codificantes para citocromos CYP en el equino criollo colombiano.

Con los resultados de esta investigación se puede concluir que el conocimiento de la estructura de los citocromos de la especie equina requiere de futuras investigaciones que pueden proporcionar información importante sobre la selectividad del sustrato y la afinidad de unión; para así, predecir las relaciones entre estructura y la actividad. La incorporación de los resultados de estudios funcionales, servirán para el análisis de variantes farmacogenéticas con fines médicos que posteriormente permitirán predecir los fenotipos de los pacientes en medicina veterinaria y acceder al uso de estas herramientas como apoyo para la toma de decisiones clínicas.

CAPÍTULO 8

**RECOMENDACIONES**

- Se debe extender la búsqueda de datos que permitan analizar información funcional y evolutiva de las secuencias del gen CYP en el equino criollo colombiano, pues es una población que ha sido sometida a condiciones específicas de selección, y esta información puede ayudar a establecer la relación entre las características de conformación genética y la respuesta a fármacos metabolizados por citocromos.
- Las comparaciones de las características genéticas entre distintas líneas pueden ayudar a comprender el fenotipo distinto entre miembros de una misma población, específicamente en cuanto a su respuesta ante la farmacoterapia. Esta puede ser la estrategia para implementar, en un futuro, la atención veterinaria individualizada.
- Dentro de las regiones de interés de un gen que codifica para una enzima, se recomienda enfatizar en los sitios reconocimiento y unión a los sustratos. Regiones que pueden aportar información estructural y funcional de la proteína.
- Será conveniente poder seguir haciendo este tipo de investigaciones con poblaciones más grandes para poder determinar la relevancia de las divergencias que se presentan alrededor de los SRS.
- Por la relevancia actual de la farmacogenética, es importante promover el desarrollo de la línea y de áreas afines.

CAPÍTULO 9

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Uribe Trujillo C. Los equinos de trabajo para las fincas ganaderas. [Internet]. Fundación CIPAV; 2008 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/19111>.
2. Naranjo E. Evaluación Citogenética del Caballo Criollo Colombiano [Internet]. 2012 [cited 2020 Feb 28]. Available from: [https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10938?locale-attribute=pt\\_BR](https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10938?locale-attribute=pt_BR).
3. McLean AK. Comparing the Physiological & Biochemical Parameters of Mules & Hinnies to Horses & Donkeys. American Mule Association [Internet]. [cited 2017 Feb 22]. Available from: <https://www.americanmuleassociation.org/comparing-the-physiological/>.
4. Behling S. Razas de caballos. Editorial HISPANO EUROPEA; 2011.
5. Cara DF de A. Pura raza española de caballos: comparación con otras razas mediante sus polimorfismos enzimáticos sanguíneos [http://purl.org/dc/dcmitype/Text], [Internet]. Universidad de Córdoba (ESP); 1983 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=72002>.
6. Larrea MDSA, Larrea MI de SA. Todos los animales son iguales..., pero algunos son más iguales que otros. Panor Actual Medicam. 2016; 40(394):607–15.
7. Rodríguez-González J, Rodeiro I. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. Rev Cuba Farm. 2014; 48:495–507.
8. Atienza RJ. Control génico de la expresión del citocromo P-450 en el hígado. Monogr Real Acad Nac Farm [Internet]. 2004 [cited 2018 Jan 23]; 0(0). Available from: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/520>.
9. Juárez Giménez JC. Interacciones farmacológicas mediadas por el citocromo P-450 en un grupo de pacientes VIH positivos. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa) [Ph.D. Thesis], [Internet]. Universitat de Barcelona; 2010 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <http://www.tdx.cat/handle/10803/1622>.
10. Fink-Gremmels J. Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. Eur J Pharmacol. 2008; 585(2–3):502–9.
11. Orr C. Characterisation of equine cytochrome P450s [Internet]. University of Nottingham; 2016 [cited 2020 May 3]. Available from: <http://eprints.nottingham.ac.uk/33315/>.
12. Dumas VG. Decodificando la diversidad catalítica de los citocromos p450 bacterianos mediante métodos bioinformáticos. 2016.

13. Arribas I. A. farmacogenética y variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos [Internet]. ACADEMIA DE FARMACIA “REINO DE ARAGÓN”; 2010. Available from: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/documentos/documento21.pdf>.
14. Paxton JW. The allometric approach for interspecies scaling of pharmacokinetics and toxicity of anti-cancer drugs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; 22(11):851–4.
15. Komori M, Higami A, Imai Y, Imaoka S, Funae Y. Purification and characterization of a form of P450 from horse liver microsomes. *J Biochem (Tokyo)*. 1993; 114(3):445–8.
16. Löfgren M, Larsson P, Lindberg R, Hörnaeus K, Tydén E. Expression of xenobiotic metabolising enzymes in lungs of horses with or without histological evidence of lower airway inflammation. *Vet Med Sci*. 2021; 7(1):16–24.
17. Löfgren M. Cytochrome P450 3A isoenzymes in equine liver and intestine. Biology Education Centre, Uppsala University [Internet]. 2010 [cited 2017 Feb 23]. Available from: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Mvmtvwr4oqYJ:www.ibg.uu.se/digitalAssets/176/c\\_176295-l\\_3-k\\_lofgren-maria-report.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Mvmtvwr4oqYJ:www.ibg.uu.se/digitalAssets/176/c_176295-l_3-k_lofgren-maria-report.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co).
18. Tydén E, Löfgren M, Pegolo S, Capolongo F, Tjälve H, Larsson P. Differential gene expression of CYP3A isoforms in equine liver and intestines. *J Vet Pharmacol Ther*. 2012; 35(6):588–95.
19. Yepes W, Pardo Pérez E, Causil Vargas LA. Diversidad Genética del Caballo Criollo (*Equus caballus*) mediante Genes Asociados al Pelaje en Valencia, Colombia. *Rev Investig Vet Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*; 2017; 28(3):562–70.
20. Gómez Tarazona A, Ariza Botero F, Jiménez Robayo L. Caracterización genética de seis microsatélites en equinos colombianos *Equus caballus* (*Equidae*) y su uso en pruebas de filiación. Genetic characterization of six microsatellites in colombian horses *equus caballus* (*equidae*) and its use for parentage testing [Internet]. Bogotá : Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2007; 2007 [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/574>.
21. Scarth JP, Teale P, Kuuranne T. Drug metabolism in the horse: a review. *Drug Test Anal*. 2011; 3(1):19–53.
22. Geiszler V. *Pharmacology and Toxicology: Animal Sciences Series*. Scitus Academics LLC; 2017.

23. Cunningham F, Elliott J, Lees P. Comparative and Veterinary Pharmacology. ilustrada ed. Springer Science & Business Media; 2010.
24. Mosher CM, Court MH. Comparative and Veterinary Pharmacogenomics. In: Cunningham F, Elliott J, Lees P, editors. Comparative and Veterinary Pharmacology [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2017 Jul 9]; p. 50–70. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-10324-7\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-10324-7_3).
25. Parkinson A, Ogilvie BW, Buckley D. Biotransformation of Xenobiotics | Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8e | AccessPharmacy | McGraw Hill Medical [Internet]. [cited 2022 Jun 30]. Available from: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=958&sectionId=53483726>.
26. Castell J. (2006, julio 6). El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. Recuperado de [https://www.uv.es/jcastell/Metabolismo\\_de\\_farmacos.pdf](https://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf). [date unknown].
27. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 1958; 75(2):376–86.
28. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. J Biol Chem. 1964; 239(7):2370–8.
29. Rodwell VW. SECCIÓN II Bioenergética y el metabolismo de carbohidratos y lípidos. In: Harper: bioquímica ilustrada. McGraw-Hill Intereamericana; 2018; p. 100–2.
30. Castell J. EL METABOLISMO DE FÁRMACOS, GENERACIÓN DE METABOLITOS REACTIVOS Y SU PAPEL EN EL ORIGEN DE LAS REACCIONES INMUNOLÓGICAS A FÁRMACOS [Internet]. 2006. Available from: [https://www.uv.es/jcastell/Metabolismo\\_de\\_farmacos.pdf](https://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf).
31. Scarth JP, Teale P, Kuuranne T. Drug metabolism in the horse: a review. Drug Test Anal. 2011; 3(1):19–53.
32. Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hayami A, Mizukawa H, Darwish WS, Watanabe KP, et al. Characterization of equine cytochrome P450: role of CYP3A in the metabolism of diazepam. J Vet Pharmacol Ther. 2016; 39(5):478–87.
33. Nebbia C, Dacasto M, Carletti M. Postnatal development of hepatic oxidative, hydrolytic and conjugative drug-metabolizing enzymes in female horses. Life Sci. 2004; 74(13):1605–19.

34. Dettwiler R, Schmitz AL, Plattet P, Zielinski J, Mevissen M. Heterologous Expression of Equine CYP3A94 and Investigation of a Tunable System to Regulate Co-Expressed NADPH P450 Oxidoreductase Levels. *PLoS ONE*. 2014; 9(11):e113540.
35. Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng Y-F, Guengerich FP, Shimada T. Roles of Cytochrome b5 in the Oxidation of Testosterone and Nifedipine by Recombinant Cytochrome P450 3A4 and by Human Liver Microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 325(2):174–82.
36. Schmitz A, Demmel S, Peters LM, Leeb T, Mevissen M, Haase B. Comparative human-horse sequence analysis of the CYP3A subfamily gene cluster: Comparative human-horse sequence analysis. *Anim Genet*. 2010; 41:72–9.
37. Tydén E, Löfgren M, Hakhverdyan M, Tjälve H, Larsson P. The genes of all seven CYP3A isoenzymes identified in the equine genome are expressed in the airways of horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2013; 36(4):370–5.
38. Sandbaumhüter FA, Vimercati S, Thormann W, Mevissen M. Role of the equine CYP3A94, CYP3A95 and CYP3A97 in ketamine metabolism in presence of medetomidine, diazepam and methadone studied by enantioselective capillary electrophoresis. *Toxicol In Vitro*. 2018; 50:242–8.
39. Tappenbeck K, Hoppe S, Geburek F, Feige K, Huber K. Impact of tetrodotoxin application and lidocaine supplementation on equine jejunal smooth muscle contractility and activity of the enteric nervous system in vitro. *Vet J*. 2014; 201(3):423–6.
40. Vimercati S, Elli S, Jagannathan V, Pandey AV, Peduto N, Leeb T, et al. In silico and in vitro analysis of genetic variants of the equine CYP3A94, CYP3A95 and CYP3A97 isoenzymes. *Toxicol In Vitro*. 2019; 60:116–24.
41. Corado CR, McKemie DS, Young A, Knych HK. Evidence for polymorphism in the cytochrome P450 2D50 gene in horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2016; 39(3):245–54.
42. Hayami A, Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishizuka M. In vitro diazepam metabolism in horses. *Jpn J Vet Res*. 2013; 61 Suppl:S82-84.
43. Knych HKD, McKemie DS, Stanley SD. Molecular Cloning, Expression, and Initial Characterization of Members of the CYP3A Family in Horses. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38(10):1820–7.
44. Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem*. 1992; 267(1):83–90.



45. Hsu M-H, Johnson EF. Active-site differences between substrate-free and ritonavir-bound cytochrome P450 (CYP) 3A5 reveal plasticity differences between CYP3A5 and CYP3A4. *J Biol Chem*. 2019; 294(20):8015–22.
46. Roussel F, Khan KK, Halpert JR. The Importance of SRS-1 Residues in Catalytic Specificity of Human Cytochrome P450 3A4. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 374(2):269–78.
47. Xue L, Wang HF, Wang Q, Szklarz GD, Domanski TL, Halpert JR, et al. Influence of P450 3A4 SRS-2 residues on cooperativity and/or regioselectivity of aflatoxin B(1) oxidation. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14(5):483–91.
48. Zawaira A, Matimba A, Masimirembwa C. Prediction of sites under adaptive evolution in cytochrome P450 sequences and their relationship to substrate recognition sites. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 18(6):467–76.
49. Dong D, Wu B. Substrate selectivity of drug-metabolizing cytochrome P450s predicted from crystal structures and in silico modeling. *Drug Metab Rev*. Taylor & Francis; 2012; 44(1):1–17.
50. He Y-Q, Roussel F, Halpert JR. Importance of Amino Acid Residue 474 for Substrate Specificity of Canine and Human Cytochrome P450 3A Enzymes. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 389(2):264–70.
51. Giantin M, Rahnasto-Rilla M, Tolosi R, Lucatello L, Pauletto M, Guerra G, et al. Functional impact of cytochrome P450 3A (CYP3A) missense variants in cattle. *Sci Rep*. 2019; 9(1):19672.
52. Childers WK, Harrelson JP. Allosteric Modulation of Substrate Motion in Cytochrome P450 3A4-Mediated Xylene Oxidation. *Biochemistry*. 2014; 53(6):1018–28.
53. Hlavica P. Challenges in assignment of allosteric effects in cytochrome P450-catalyzed substrate oxidations to structural dynamics in the hemoprotein architecture. *J Inorg Biochem*. 2016; 167.
54. Domanski TL, Halpert JR. Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis. *Curr Drug Metab*. 2001; 2(2):117–37.
55. Wen B, Lampe JN, Roberts AG, Atkins WM, David Rodrigues A, Nelson SD. Cysteine 98 in CYP3A4 contributes to conformational integrity required for P450 interaction with CYP reductase. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 454(1):42–54.
56. Baylon JL, Lenov IL, Sligar SG, Tajkhorshid E. Characterizing the Membrane-Bound State of Cytochrome P450 3A4: Structure, Depth of Insertion, and Orientation. *J Am Chem Soc*. 2013; 135(23):8542–51.

57. Denisov IG, Grinkova YV, Baylon JL, Tajkhorshid E, Sligar SG. Mechanism of Drug-Drug Interactions Mediated by Human Cytochrome P450 CYP3A4 Monomer. *Biochemistry*. 2015; 54(13):2227–39.
58. Ahalawat N, Mondal J. Mapping the Substrate Recognition Pathway in Cytochrome P450. *J Am Chem Soc. American Chemical Society*; 2018; 140(50):17743–52.
59. Zharkova MS, Sobolev BN, Yu Oparina N, Veselovsky AV, Archakov AI. Prediction of amino acid residues participated in substrate recognition by cytochrome P450 subfamilies with broad substrate specificity. *J Mol Recognit JMR*. 2013; 26(2):86–91.
60. Zawaira A, Ching LY, Coulson L, Blackburn J, Wei YC. An expanded, unified substrate recognition site map for mammalian cytochrome P450s: analysis of molecular interactions between 15 mammalian CYP450 isoforms and 868 substrates. *Curr Drug Metab*. 2011; 12(7):684–700.
61. Pratta GR. Genética molecular, bioinformática y genómica. *BAG J Basic Appl Genet. Sociedad Argentina de Genética*; 2018; 29:61–5.
62. Fernández-Santander Ana, Tejerina Gómez Antonio, Tejerina Bernal Armando. ASPECTOS FARMACOGENÉTICOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA CON TAMOXIFENO. ADEMAS Comunicación Gráfica, s.l. 2007.
63. Franco ML, Cediell JF, Payán C. Breve historia de la bioinformática. *Colomb Médica. Universidad del Valle*; 2008; 39(1):117–20.
64. Barnetche JM. La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana. *Salud Pública México. Instituto Nacional de Salud Pública*; 2007; 49:64–6.
65. Quiceno VHA. Bio-informática un Campo por conocer. *REDVET Rev Electrónica Vet. Veterinaria Organización*; 2006; VII(11):1–9.
66. Leiberich M, Marais HJ, Naidoo V. Phylogenetic analysis of the cytochrome P450 (CYP450) nucleotide sequences of the horse and predicted CYP450s of the white rhinoceros ( *Ceratotherium simum* ) and other mammalian species. *PeerJ*. 2018; 6:e5718.
67. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(19):5444.
68. NCBI Blast:ref|NM\_001101651.1| [Internet]. [cited 2020 May 3]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

69. Chong Aguirre PA. Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico y convencional [Internet]. Espol; 2017 [cited 2022 Jul 4]. Available from: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/39795>.
70. Castro P de, María A. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) [Internet]. Universitat Politècnica de València; 2011 [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://riunet.upv.es/handle/10251/10700>.
71. Seifert A, Pleiss J. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2009; 74(4):1028–35.
72. NCBI Conserved Domain Search [Internet]. [cited 2022 Feb 6]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=CBJ94507.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=CBJ94507.1).
73. He YA, Roussel F, Halpert JR. Analysis of homotropic and heterotropic cooperativity of diazepam oxidation by CYP3A4 using site-directed mutagenesis and kinetic modeling. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 409(1):92–101.
74. Schmitz A, Demmel S, Peters LM, Leeb T, Mevissen M, Haase B. Comparative human-horse sequence analysis of the CYP3A subfamily gene cluster. *Anim Genet*. 2010; 41 Suppl 2:72–9.

## Anexo 1



[www.uniremington.edu.co](http://www.uniremington.edu.co)

**Medellín, 20 de enero de 2022**

**Señor(a):**

Laura Andrea Caicedo Gutiérrez de Piñeres  
Docente/Investigador

**Asunto:** Aval proyecto

**Nombre completo del proyecto** "Farmacogenética aplicada al análisis del citocromo CYP3A89 en equinos criollos colombianos del suroeste antioqueño".

**Investigadores:** Laura Andrea Caicedo Gutiérrez de Piñeres

**Fecha en que fue sometido a consideración del comité:** 01 de diciembre de 2021. Acta 06-2021.

El Comité de Bioética para la Investigación con Animales- CIBA de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Corporación Universitaria Remington certifica que: fueron presentadas y aceptadas las correcciones y recomendaciones sugeridas en el acta 06 de 2021. Por lo tanto, se ratifica el Aval otorgado al proyecto "Farmacogenética aplicada al análisis del citocromo CYP3A89 en equinos criollos colombianos del suroeste antioqueño".

1. **Sus miembros revisaron los siguientes documentos:**
  - (  ) Formato para presentación de proyectos ante el CIBA
  - (  ) Formato de Consentimiento Informado
  - (  ) Compromiso de buen manejo de los animales
  - (  ) Acuerdo de protección de datos
  - (  ) Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
2. El Comité informa que el presente estudio tiene una clasificación de riesgo:
  - (  ) Sin riesgo
  - (  ) Riesgo mínimo
  - (  ) Riesgo mayor al mínimo
3. **El Comité informa que la propuesta fue:**
  - (  ) Aprobada
  - (  ) No aprobada
  - (  ) Rechazada con posibilidad de nueva evaluación una vez realice la ampliación, aclaración o complemento de aspectos de fondo que el Comité considere necesarios corregir.



[www.uniremington.edu.co](http://www.uniremington.edu.co)

Atentamente,

---

Martha Cecilia Ocampo  
Presidenta  
CIBA  
Corporación Universitaria Remington

---

Daisy Alejandra Gómez Ruiz  
Secretaría  
CIBA  
Corporación Universitaria Remington

## Anexo 2



Universidad de Caldas – Facultad de Ciencias para la Salud  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

<b>Título del Estudio</b>	<b>FARMACOGENÉTICA APLICADA AL ANÁLISIS DEL CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO</b>
<b>Investigador Responsable</b>	<b>Laura Calcedo Gutiérrez de Piñeres</b>
<b>Lugar en que se realizará el estudio</b>	<b>Caldas (Antioquia) y Manizales (Caldas)</b>
<b>Afiliación Institucional del investigador</b>	<b>Estudiante de posgrado.</b>
<b>Contacto</b>	<b>Universidad de Caldas Calle 65 No 26 - 10 / Tel +57 6 8781500. Correo: lacaicedo43@misena.edu.co Tel 3105775273</b>

Como propietario, ha sido invitado a participar en un trabajo investigativo a través de sus animales en un estudio de investigación. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le solicitará que firme esta forma de consentimiento, del cual recibirá una copia firmada y fechada.

Los veterinarios que asisten caballos, mulas y burros en el mundo están interesados en encontrar los medicamentos más efectivos y seguros, pero actualmente la farmacología en equinos se enfrenta a la falta de estudios específicos de cada especie del género, que presentan variaciones fisiológicas. Y no hay forma de saber si los tratamientos que funcionan con otros equinos resultarán igual en los equinos criollos de Colombia, donde luego de 400 años de evolución, se desconoce si existe algún grado de variabilidad genética que sea importante conocer para la aplicación técnica veterinaria.

La investigación busca la caracterización un gen que se sabe, es en parte responsable del metabolismo de fármacos en caballos del mundo; pero no se sabe si en los caballos criollos de Colombia dichos genes difieren en cuanto al nivel de expresión de enzimas individuales y su especificidad de sustrato, a causa de las características de crianza, selección y manejo a las que han sido sometidos los equinos durante muchos años.

**OBJETIVO DEL ESTUDIO:** A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo evaluar el gen del CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO.

Participarán 10 caballares de entre 3 y 12 años, sanos, procedentes del Suroeste antioqueño.

**PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:** Se tomará una muestra de sangre de la vena yugular, se obtendrá ADN a partir de la muestra de sangre y finalmente, se buscará el gen de interés.

**BENEFICIOS DEL ESTUDIO:** Los resultados del proyecto podrían mejorar la asistencia técnica veterinaria impactando económica y productivamente a la actividad agropecuaria en la crianza de equinos. No habrá compensación de ningún tipo por permitir que sus animales participen del estudio, de igual manera la participación no tiene costo.

Como parte de los riesgos de la participación es que puede haber una leve inflamación en la zona de extracción de la sangre.

Se requiere una sola visita, el procedimiento con cada animal tiene una duración de aproximadamente 10 minutos para la toma de la muestra de sangre y la recolección de la información de cada animal.

**CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO INFORMACIÓN:** Los datos proporcionados se usarán para realizar una publicación académica y serán manejados confidencialmente.

**VOLUNTARIEDAD:** Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir participar o no en este proyecto, su decisión de participar o no en este proyecto no afectará la atención que puede seguir recibiendo usted o sus animales.







Universidad de Caldas – Facultad de Ciencias para la Salud  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

<b>Título del Estudio</b>	<b>FARMACOGENÉTICA APLICADA AL ANÁLISIS DEL CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO</b>
<b>Investigador Responsable</b>	<b>Laura Caicedo Gutiérrez de Piñeres</b>
<b>Lugar en que se realizará el estudio</b>	<b>Caldas (Antioquia) y Manizales (Caldas)</b>
<b>Afiliación Institucional del investigador</b>	<b>Estudiante de posgrado.</b>
<b>Contacto</b>	<b>Universidad de Caldas Calle 65 No 26 - 10 / Tel +57 6 8781500. Correo: lacaicedo43@misena.edu.co Tel 3105775273</b>

Como propietario, ha sido invitado a participar en un trabajo investigativo a través de sus animales en un estudio de investigación. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le solicitará que firme esta forma de consentimiento, del cual recibirá una copia firmada y fechada.

Los veterinarios que asisten caballos, mulas y burros en el mundo están interesados en encontrar los medicamentos más efectivos y seguros, pero actualmente la farmacología en equinos se enfrenta a la falta de estudios específicos de cada especie del género, que presentan variaciones fisiológicas. Y no hay forma de saber si los tratamientos que funcionan con otros equinos resultarán igual en los equinos criollos de Colombia, donde luego de 400 años de evolución, se desconoce si existe algún grado de variabilidad genética que sea importante conocer para la aplicación técnica veterinaria.

La investigación busca la caracterización un gen que se sabe, es en parte responsable del metabolismo de fármacos en caballos del mundo; pero no se sabe si en los caballos criollos de Colombia dichos genes difieren en cuanto al nivel de expresión de enzimas individuales y su especificidad de sustrato, a causa de las características de crianza, selección y manejo a las que han sido sometidos los equinos durante muchos años.

**OBJETIVO DEL ESTUDIO:** A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo evaluar el gen del CITOCROMO CYP3A89 EN EQUINOS CRIOLLOS COLOMBIANOS DEL SUROESTE ANTIOQUEÑO.

Participarán 10 caballos de entre 3 y 12 años, sanos, procedentes del Suroeste antioqueño.

**PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO:** Se tomará una muestra de sangre de la vena yugular, se obtendrá ADN a partir de la muestra de sangre y finalmente, se buscará el gen de interés.

**BENEFICIOS DEL ESTUDIO:** Los resultados del proyecto podrían mejorar la asistencia técnica veterinaria impactando económica y productivamente a la actividad agropecuaria en la crianza de equinos. No habrá compensación de ningún tipo por permitir que sus animales participen del estudio, de igual manera la participación no tiene costo.

Como parte de los riesgos de la participación es que puede haber una leve inflamación en la zona de extracción de la sangre.

Se requiere una sola visita, el procedimiento con cada animal tiene una duración de aproximadamente 10 minutos para la toma de la muestra de sangre y la recolección de la información de cada animal.

**CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO INFORMACIÓN:** Los datos proporcionados se usarán para realizar una publicación académica y serán manejados confidencialmente.

**VOLUNTARIEDAD:** Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir participar o no en este proyecto, su decisión de participar o no en este proyecto no afectará la atención que puede seguir recibiendo usted o sus animales.



**DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES:** He leído, comprendido y discutido la información anterior con el investigador responsable del estudio y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. Mi participación en este estudio es voluntaria, podré renunciar a participar en cualquier momento. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos y/o educativos. Acepto participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de este consentimiento.

Olivia Sanchez                                      24/02/2022  
 Firma del propietario                                      Fecha

**Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):**

He explicado al Sr(a) OLIVIA SANCHEZ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con animales y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

[Firma]    24-02-2022  
 Firma del investigador    Fecha

**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

Con la presente, retiro mi consentimiento para participar la investigación indicada.

Nombre del propietario

Fecha

Firma – Documento de Identificación

### Anexo 3

Condiciones de la reacción de la PCR.

Reactivo	Volumen
10X PCR Buffer	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3.0 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM cada uno)	0.6 $\mu$ l
Cebador Forward (10 pmol)	1.5 $\mu$ l
Cebador reverse (10pmol)	1.5 $\mu$ l
Taqpol (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA (100 ng)	3.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Hasta 30 $\mu$ l
Volumen final	30 $\mu$ l

Fuente: Elaboración propia.