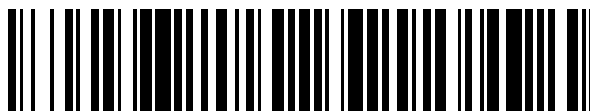


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 576**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011** **E 11175002 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2548886**

54 Título: **Prueba genética para la predisposición genética a la hemofilia A en bichones habaneros**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

73 Titular/es:
LABOKLIN GMBH & CO. KG (100.0%)
Steubenstrasse 4
97688 Bad Kissingen, DE

72 Inventor/es:
MÜLLER, ELISABETH DR.;
KÜHNLEIN, PETRA DR. y
KEHL, ALEXANDRA

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 647 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Prueba genética para la predisposición genética a la hemofilia A en bichones habaneros

La invención se refiere a una prueba genética para la predisposición genética a la hemofilia A en bichones habaneros, determinando el genotipo del gen del factor VIII canino.

5 **Introducción**

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico genético producido por una deficiencia del factor de coagulación VIII (FVIII) y se caracteriza por causar hemorragias espontáneas (en particular, en las articulaciones) y un sangrado en exceso tras un golpe o cirugía. La hemofilia A canina representa una coagulopatía hereditaria que se produce de manera natural y que presenta un intervalo en la gravedad de los signos clínicos y de la actividad de coagulación en diferentes tipos de raza. Se ha detectado en muchas razas (Antonarakis, 1995).

El gen humano se localiza en el cromosoma X (Xq28) y el gen abarca 186 kb a través de 26 exones, codificando un ARNm de ~9 kb. Más del 40 % de todos los casos de hemofilia A grave en los humanos son producidos por reordenamientos genéticos importantes de la secuencia del ADN que involucra el gen FVIII. Además, se han descrito la delección, inserción y varios cientos de sustituciones de única base/mutaciones puntuales de secuencias de las que, aproximadamente 100, derivan en la creación de codones de terminación o terminaciones preliminares de la cadena peptídica (Oldenburg and El-Maarri, 2006; <http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>; <http://hadb.org.uk/WebPages/Main/main.htm>).

El gen FVIII canino es un gen altamente conservado que codifica ARNm de ~7 kb (Cameron y col., 1998). Hasta ahora, se han descrito muy pocas mutaciones causantes en el gen FVIII canino, entre otras, hay un ARNm empalmado anómalo que termina con un elemento secuencial novedoso, lo que muestra una similitud sorprendente con la inversión del intrón 22 hallada en aproximadamente el 45 % de los pacientes gravemente afectados por la hemofilia A humana (Hough y col., 2002). Otra mutación se halló en la colonia Chapel Hill de perros deficitarios en FVIII. El transcrito de FVIII muestra una secuencia atípica que sigue los exones 1-22 en lugar de los exones 23-26, que lleva al primer codón de terminación después de 22 aminoácidos tras la Met 2116 del FVIII canino (Lozier y col., 2002). En experimentos recientes, se detectó una mutación puntual en el gen FVIII en un perro que padecía una deficiencia del FVIII grave (Mischke y col., sin publicar). El objeto del presente estudio era definir el acervo genético de la hemofilia A leve en bichones habaneros.

Sin ningún acervo genético, es difícil, especialmente, el diagnóstico de portadoras hembra del alelo defectuoso. A parte de los análisis en la misma camada, se basa principalmente en mediciones del factor. Se describe que, en condiciones menos óptimas (por ejemplo, envío de la muestra al laboratorio, prueba calibrada de manera menos óptima), la detección del portador basada en mediciones de la actividad del factor VIII suele ser poco fiable. El ensayo desarrollado específico para la mutación detectada es, por lo tanto, una herramienta valiosa para la detección fiable de portadores, que es esencial para llevar a cabo programas eficaces de higiene reproductiva.

La presente invención tiene como objeto proporcionar una prueba genética para un procedimiento de análisis de un genotipo de un bichón habanero al que se le atribuye hemofilia A.

Este objeto se consigue por las invenciones según se reivindican en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones ventajosas se describen en las reivindicaciones dependientes.

El problema se resuelve proporcionando un gen del factor VIII canino de un bichón habanero, que comprende un inserto SINE. Los SINE (elementos cortos intercalados) son secuencias de ADN cortas de entre 50 y 500 pares de bases, que se insertan en genes sobre varias ubicaciones. Estas secuencias se obtienen normalmente del ARNt.

Se ha hallado que un inserto en el gen del factor VIII canino deriva en una reducción fuerte de la actividad del factor y podría atribuirse a la hemofilia A del perro. A menudo, el inserto deriva en un truncamiento de la proteína debido a los codones de terminación presentes en el inserto.

El gen del factor VIII canino de los bichones habaneros es un gen del que se muestra la secuencia no modificada en la SEQ ID NO 1. El gen del factor VIII canino (no modificado) según la invención es una secuencia que muestra al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con la SEQ ID NO 1. En una realización preferida, el gen del factor VIII canino no modificado tiene la secuencia de la SEQ ID NO 1.

La "homología de secuencias" es una propiedad de las secuencias de nucleótidos que tienen un porcentaje de nucleótidos idéntico en posiciones correspondientes, que es mayor que en las alineaciones puramente aleatorias. Dos secuencias se consideran homólogas cuando muestran entre ellas un mínimo de homología (o de identidad de secuencias) definida como el porcentaje de nucleótidos idénticos hallado en cada posición, en comparación con el total de nucleótidos, después de que las secuencias se hayan alineado óptimamente teniendo en cuenta las adiciones o delecciones (como huecos) en una de las dos secuencias que se comparan.

En una realización preferida de la invención, el inserto comprende una secuencia que tiene al menos el 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con la SEQ ID NO 1.

99 % o 99,99 % de homología de secuencias con una de las SEQ ID NO 2 a 4. En una realización más preferida de la invención, el inserto comprende una secuencia según una de las SEQ ID NO 2 a 4.

En otra realización preferida de la invención, el inserto está localizado en el exón 14 del gen del factor VIII canino. Se localiza empezando desde la posición 2095 a 5562 del gen del factor VIII canino según la SEQ ID NO 1.

- 5 En una realización más preferida de la invención, el inserto está localizado tras la posición 580 del exón 14 del gen del factor VIII canino o de la posición 2675 de la SEQ ID NO 1.

- El gen del factor VIII canino comprende una secuencia que tiene al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con la SEQ ID NO 5. En una realización más preferida de la invención, el gen del factor VIII canino comprende una secuencia según la SEQ ID NO 5. Esta secuencia muestra una parte de la secuencia del exón 14, en la que el inserto SINE está localizado en el interior del exón. Esta secuencia es la misma secuencia que la que se muestra en la figura 3B.
- 10

Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para analizar, mediante una prueba genética que determina el genotipo de un bichón habanero al que se le atribuye hemofilia A, identificando al menos un inserto en el gen del factor VIII canino del genoma de un bichón habanero, en el que el inserto es un inserto SINE.

- 15 En una realización preferida, el inserto comprende una secuencia que tiene al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con una de las SEQ ID NO 2 a 4. En una realización más preferida de la invención, el inserto comprende una secuencia según una de las SEQ ID NO 2 a 4.

En una realización preferida, la prueba genética identifica el inserto en el interior del exón 14 del gen del factor VIII canino, preferentemente en la posición 580 del exón 14, o en la posición 2675 de la SEQ ID NO 1.

- 20 El gen del factor VIII se analiza para una secuencia que tiene al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con la SEQ ID NO 5. En una realización más preferida de la invención, el gen del factor VIII canino se analiza para una secuencia según la SEQ ID NO 5.

- El gen del factor VIII canino no modificado utilizado en esta prueba tiene preferentemente una secuencia que muestra al menos un 97 %, 98 %, 99 % o 99,99 % de homología de secuencias con la SEQ ID NO 1. En una realización preferida, el gen del factor VIII canino no modificado tiene la secuencia de la SEQ ID NO 1.
- 25

- El experto en la materia conoce los procedimientos para detectar un inserto en un genoma. Entre los posibles procedimientos se encuentra la secuenciación de la región del genoma en la que se localiza la mutación con cebadores específicos, y después la comparación de la secuencia con la secuencia del tipo silvestre o comparando el tamaño del producto de la PCR obtenido. La secuenciación puede realizarse directamente con el ADN, ARNm o ADNc genómico, incluyendo también la amplificación de la región seleccionada y después la secuenciación de la secuencia amplificada.
- 30

- Otros procedimientos posibles comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), espectrometría de masas (MALDI-TOF), SSCP, DGGE, pirosecuenciación, DHPLC, hibridación específica de alelo, balizas moleculares, micromatrices, endonucleasa flap (FEN), PCR a tiempo real (RT-PCR), PCR cuantitativa (QPCR), PCR específica de alelo o ensayo Taqman.
- 35

Por ejemplo, la PCR puede utilizarse para la amplificación de la región del inserto, preferentemente la región de la SEQ ID NO 1, que contiene al menos un inserto, tal y como se ha descrito anteriormente.

- La PCR puede basarse en el ADN, o el ADN, ARNm o ADNc genómicos del gen del factor VIII canino. Esto puede requerir otras etapas, como por ejemplo, la transcripción del ARNm de la muestra al ADNc, para después cuantificar la cantidad de ADNc que comprende el inserto en relación con otros genes constitutivos y/o con el gen del factor VIII canino.
- 40

Puede ser suficiente elegir pares de cebadores que consistan en un cebador que se una al gen del factor VIII canino regular y en un cebador que se una al inserto.

- Mediante este análisis es posible identificar a los perros no afectados, a los perros afectados y a los perros portadores. Estos son perros que son heterocigóticos con respecto a la mutación.
- 45

Otra realización de la invención es un procedimiento *in vitro* para la determinación de la predisposición genética a la hemofilia A de un bichón habanero, mediante el uso de un gen del factor VIII canino con al menos un inserto, tal y como ha descrito anteriormente.

- En otra realización de la invención, este procedimiento puede utilizarse para la selección de un bichón habanero para que críe.
- 50

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de la predisposición de un bichón habanero a la hemofilia A, que comprende medios para detectar un inserto SINE en el gen del factor VIII canino.

El kit comprende medios para realizar una reacción PCR para la detección del inserto en el factor VIII canino, preferentemente cebadores, polimerasas y tintes fluorescentes o sondas, por ejemplo, para un ensayo Taqman. Puede comprender además múltiples conjuntos para la reacción PCR para una cuantificación relativa. La cantidad total de ADNc puede determinarse, por ejemplo, a partir de la medición de los genes constitutivos caninos como la beta-actina y/o la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

El kit comprende un par de cebadores para el inserto, de los que al menos un cebador se une al inserto, un par de cebadores selectivos para el FVIII y al menos un par de cebadores para un gen constitutivo.

Los ejemplos de los pares de cebadores correspondientes se proporcionan en las SEQ ID NO 6 a 13. Las SEQ ID NO 6 y 7 son cebadores específicos del FVIII. Las SEQ ID NO 8 y 9 son cebadores para la secuencia exónica 5' y el inserto SINE. Las SEQ ID NO 10 y 11 son para la beta-actina y las SEQ ID NO 12 y 13 son para la GAPDH.

En una realización preferida, el inserto SINE que ha de detectarse es un inserto SINE, tal y como se ha descrito anteriormente para el gen del factor VIII canino con respecto a su secuencia y ubicación en el gen del factor VIII canino.

Aunque no se esbocen múltiples reivindicaciones referenciadas, han de desvelarse todas las combinaciones razonables de las características en las reivindicaciones.

Tabla 1 Análisis secuencial del ADN del FVIII canino para el inserto en el exón 14 en bichones habaneros con diferentes estados de la hemofilia A (N = normal, C = portador, A = afectado)

Figura 1 Estructura del gen del factor VIII canino. Se indican 26 exones con barras verticales;

Figura 2 Amplificación de la PCR del ADN genómico de un perro hemofílico (fila 1), un perro portador (fila 2) y un perro sano (fila 3). El marcador de tamaño de la fila 4 es una escalera de 100 pb;

Figura 3A Localización de la inserción del SINE en el exón 14.

Figura 3B Secuencia del inserto SINE. La secuencia de nucleótidos del SINE está representada en grandes letras en negro. Las letras pequeñas en negro corresponden a la secuencia del exón 14 del factor VIII. Los sitios de duplicación directa de 16 pb en el sitio de inserción y al final del inserto están subrayados. La secuencia de aminoácidos prevista se muestra debajo de los datos de la secuencia de ácidos nucleicos. Los codones de terminación están representados con barras oblicuas.

Figure 3C Comparación de la inserción de SINE hallada (línea inferior) con CanB (línea superior; Vassetzky 2002).

Figure 4 Nivel de expresión del ARNm del FVIII en perros sanos y afectados, medido mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de expresión del ARNm del FVIII (normales o con un inserto SINE en los perros afectados) se estimaron en relación con dos genes constitutivos caninos (β -actina y GAPDH). La barra blanca representa el ARNm para el gen del FVIII sin inserto. La barra negra muestra los resultados para el mismo ARNm sin el inserto SINE.

Figura 5 Disponibilidad del molde para el factor VIII tal y como se proporciona por Swissmodell: las barras inferiores destacan los moldes disponibles para el modelado por homología. Estas áreas también son las únicas dos partes en la secuencia de proteínas con una actividad de la proteasa prevista, como mostraron otros análisis de la secuencia en el área media con SwissModell y LOMETS.

Figura 6 Predicciones del sitio activo para el factor VIII mutado. Aquí se muestran dos vistas diferentes (A y B) en el extremo N de la proteína del FVIII, tal y como modeló SwissModell, pues solamente esta parte sigue expresada cuando está presente el inserto SINE. Las áreas de superficie accesibles de los bolsillos de unión de la actividad de la proteasa prevista para los sustratos (por 3D2Go) se muestran en color gris oscuro y gris claro. Los círculos indican el sitio activo del bolsillo de unión en ambas vistas. La cadena principal y la estructura secundaria se proporcionan en forma de lazo.

Descripción detallada de la invención

Materiales y procedimientos

2.1. Diseño del estudio

El estudio incluyó 2 perros macho afectados fenotípicamente, 3 portadores sospechosos y 29 bichones habaneros sanos. De todos los perros que padecían hemofilia A conocida o que se sospechaba de ello, se midió la actividad del factor VIII para verificar el estado de la hemofilia A. El ADN de todos estos perros se aisló de la sangre con EDTA y la región de codificación del factor VIII canino se amplificó y secuenció. La secuencia de ADN obtenida se comparó con el ADN del factor VIII canino de tipo silvestre (número de ingreso en el banco de genes: AF016234). Para demostrar la relevancia funcional del inserto detectado, la expresión del alelo defectuoso se investigó mediante estudios del ARNm y la secuencia del inserto se analizó por sus consecuencias en la traducción.

Para investigar si la mutación es únicamente un inserto SINE habitual no relacionado con la hemofilia A, la detección de la mutación del SINE se realizó en muestras de ADN de 18 bichones habaneros que no tenían un estado definido de la hemofilia A, y en muestras de otras cuatro razas de perro (Doberman Pinscher: n = 20; Pointer alemán de pelo duro: n = 25; Labrador: n = 25, Bichón maltés: n = 5).

2.2. Animales y material de muestra

Los bichones habaneros con un estado conocido de la hemofilia A se presentaron como pacientes o para el diagnóstico de la hemofilia en la clínica Small Animal Clinic, de la University of Veterinary Medicine Hannover (Escuela Superior de Veterinaria de Hannover). Los dos bichones habaneros macho afectados fenotípicamente presentaron todos una historia hemorrágica leve conocida y actividades del factor VIII moderadamente reducidas de aproximadamente un 10 % (tabla 1). Los signos clínicos incluyeron principalmente hemorragia grave tras cirugías y heridas menores, y ocasionalmente, hemorragia espontánea. Entre las dos hembras con un estado portador sospechoso debido a una actividad del factor VIII reducida (48-69 %), se confirmó su estado por perros de la misma camada afectados. Se encontró actividad del factor VIII en 29 bichones habaneros sanos dentro del intervalo de referencia, y no hubo rastro de hemorragia en exceso en su historia.

2.3. Recogida de muestras de sangre

La sangre citratada para la medición de la actividad del factor VIII se obtuvo de una vena cefálica o safena utilizando agujas desechables estériles (1,1 x 30 mm) y se utilizó una ligera presión para elevar la vena. La sangre citratada se recogió en tubos de plástico que contenían una parte (1 ml) 0,11 mol/l de solución de citrato de sodio y nueve partes (9 ml) de sangre, e inmediatamente se mezcló balanceándola cuidadosamente. El plasma citratado pobre en plaquetas para las mediciones del factor VIII se obtuvo mediante centrifugación, dos veces, durante 10 minutos, a 2000 x g. Después, se recogió el sobrenadante final y se almacenó en partes alícuotas a -70 °C. Así mismo, se recogieron 5 ml de sangre con EDTA para las pruebas genéticas.

2.4. Mediciones de la actividad del factor VIII

Se midieron automáticamente las actividades del factor VIII de coagulación utilizando pruebas coagulométricas basadas en plasma deficiente humano comercial en un analizador de coagulación AMAX Destiny (procedimiento de coagulómetro de bola; Trinity Biotech). Se incubó una mezcla de 20 µl de plasma citratado diluido (1:40 diluido con tampón de imidazol, Siemens Healthcare Diagnostics), 20 µl de plasma deficiente del factor VIII (Siemens Healthcare Diagnostics), 20 µl de reactivo de activación (reactivo PTT, Diagnostica Stago) y exactamente 3 minutos después, se añadieron 20 µl de una solución de CaCl₂ a 25 mmol/L (Diagnostica Stago) como reactivo de inicio. Se preparó una curva de calibración con diferentes diluciones de un plasma canino combinado que correspondían al 200, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10, 5 y 1 % (% en volumen). El plasma canino combinado se preparó mezclando partes alícuotas de plasma citratado de manera idéntica de 100 perros clínicamente sanos con un perfil bioquímico y hematológico normal, y su actividad del factor VIII se definió como 100 %. Todos los resultados son valores medios de mediciones realizadas dos veces. El intervalo de referencia de esta prueba es de 75-140 %.

2.5. Aislamiento del ADN

El ADN genómico se extrajo de 200 µl de sangre total con EDTA utilizando un kit disponible en el mercado, denominado "Kit sanguíneo de ADN Biosprint 15" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6. Aislamiento del ARNm y síntesis del ADNc

Se extrajo ARN total de 200 µl de sangre total con EDTA utilizando un mini kit, denominado "Mini kit sanguíneo de ARN QIAamp" (Qiagen), incluyendo la digestión de la desoxirribonucleasa con un "Kit desoxirribonucleasa sin ribonucleasa" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras de ARN se transcribieron a ADNc utilizando el "Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad" (Applied Biosystems).

2.7. Amplificación del ADN

La secuencia del ADNc del factor VIII canino se utilizó para buscar en la base de datos de genomas de perro de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog>) y se determinaron los 26 exones del gen del factor VIII canino. Se utilizaron 40 pares de cebadores de oligonucleótidos (secuencias y condiciones de la PCR disponibles por encargo) para amplificar la región de codificación y los límites exón-intrón del gen del factor VIII canino utilizando el ADN genómico de los perros. Las secuencias diana se amplificaron en mezclas de reacción de 50 µl bajo condiciones de reacción normales, que contenían aproximadamente 50 ng de ADN genómico y 0,2 µmol L⁻¹ de cada cebador. La figura 1 muestra los diferentes exones del gen.

2.8. Secuenciación del ADN

Los productos de la PCR se purificaron antes de la secuenciación utilizando el "Kit de purificación por PCR con elución mínima" (Qiagen). La secuenciación se realizó mediante secuenciación en ciclo utilizando terminadores DyeDeoxy (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La comparación de las secuencias se realizó con diferentes grupos de bichones habaneros con un estado definido de la hemofilia A, utilizando la alineación BLAD ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.9. Análisis del patrón del ARNm del exón 14

Para determinar el efecto del inserto en la transcripción del exón 14, se analizó el patrón de ARNm del exón 14 de perros hemofílicos, perros portadores sospechosos y perros sanos. La secuencia diana se amplificó en mezclas de reacción de 50 µl bajo condiciones de reacción normales que contenían ADNc y 0,2 µmol L⁻¹ de cada cebador flanqueante a la región del inserto. Los productos de la PCR se analizaron con electroforesis en gel y se secuenciaron.

2.10. Análisis del inserto

La secuencia del inserto se detectó para los codones de terminación y el cambio del marco de lectura. Por otro lado, se investigaron las homologías con insertos conocidos, tales como Alu.

2.11. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión del ARNm

La RT-PCR (QPCR) cuantitativa en tiempo real se utilizó para estimar los niveles de expresión de los genes relativos al FVIII en diferentes animales (Klein 2002). Los cebadores específicos del FVIII se diseñaron para el exón 14 del gen (directo: CAACATGATGGTATGGAAGCTTATG (SEQ ID NO 6), inverso: CAAAGCTAACTACGTCCATGTCAGA (SEQ ID NO 7)). Adicionalmente, se desarrolló un segundo ensayo QPCR para la cuantificación del ARNm que contenía el inserto, en el que se emplea un cebador inverso que se dirige a la inserción del SINE, así como un cebador directo que se une a la secuencia exónica 5' (directo: GAGAATTTACTCCTGAGCCAGAACT (SEQ ID NO 8), inverso: CCAGGGATCCCGAACTAGAAAT (SEQ ID NO 9)). La eficacia de la reacción de ambos ensayos se determinó tal y como se ha descrito anteriormente (Klein y col., 1999). El análisis QPCR se realizó en un sistema de PCR a tiempo real 7500, utilizando el aparato Power SYBR Green Master Mix (ambos de Applied Biosystems). Las mezclas de reacción de la QPCR de 20 µl incluían 300 nM de cada cebador y 2 µl de molde de ADNc. El perfil de PCR comenzó con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos que consistían en 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto, seguidos de un aumento continuo de la temperatura desde 60 °C hasta 95 °C para el análisis de la curva de fusión. Las cantidades totales de ADNc de las muestras se cuantificaron mediante la amplificación de la QPCR de dos genes constitutivos caninos (Jais y col., 2011): beta-actina (directo: TCGCTGACAGGATGCAGAAG (SEQ ID NO 10), inverso: GTGGACAGTGAGGCCAGGAT (SEQ ID NO 11)) y GAPDH (directo: TCCACCCACGGCAAATTC (SEQ ID NO 12), inverso: GCATCACCCCATTTGATGTTG (SEQ ID NO 13)) utilizando las mismas condiciones de reacción. Los valores de Ct obtenidos para el FVIII y el ARNm del FVIII que contenía el inserto se normalizaron posteriormente con respecto a los valores medios de ambos genes de referencia, y los números de expresión relativos se calcularon según el enfoque analítico $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

2.12. Modelado de proteínas

El análisis de la secuencia de ADN en el inserto SINE incorporado mostró la existencia de un codón de terminación en la posición 2835 (174 ácidos nucleicos aguas arriba tras el comienzo del inserto SINE). Para obtener terceros modelos de proteínas para el análisis adicional de los efectos de este codón de terminación, se aplicó el modelado por homología a través de SwissModell (Arnol, 2006; Kiefer, 2009; Schwede, 2003; Guex, 1997 y Peitsch, 1995). SwissModell proporciona modelado de alta calidad y también proporciona alineaciones de secuencias proteínicas, así como RMSD residual. El modelo calculado mostró solo una desviación de 3,7 Å con respecto a las estructuras del molde (2r7eA y 2r7eB).

3. Resultados

3.1. Identificación de la mutación

Tras la amplificación de una parte del exón 14, se observaron diferencias en la longitud de los productos de la PCR: cuando se utilizó el ADN de un perro sano, se creó un producto con la longitud esperada de 250 pb, mientras que cuando se utilizó el ADN de un perro clínicamente afectado, derivó en un producto de PCR con la longitud de 450 pb. Ambos productos podrían amplificarse a partir de ADN de portadores sospechosos (figura 2).

Se segregaron estos amplicones con el fenotipo hemofílico de entre los perros anteriormente mencionados: todos los perros afectados eran homocigóticos para la mutación detectada en el exón 14. Se halló que dos perros, que eran portadores sospechosos o demostrados, eran heterocigóticos para la mutación del inserto, y ninguno de los bichones habaneros sanos se vio afectado por la mutación. No pudieron observarse más alteraciones en las secuencias entre los perros afectados y el grupo de referencia sano.

La detección de este inserto mediante la PCR y la electroforesis con gel no reveló la presencia del inserto en el exón 14 del ADN del factor VIII canino en 25 bichones habaneros más que presentaban un estado de la hemofilia A sin definir, y en otros 75 animales de otras cuatro razas de perro.

3.2. Caracterización de la inserción

El análisis de las secuencias del exón 14 mostraron la longitud exacta del inserto, siendo esta 218 pb (figura 3A). La

mutación se produce tras el nucleótido 2675 del ADNc del factor VIII y en el nucleótido 580 del exón 14, respectivamente. El inserto está flanqueado por una duplicación del sitio diana de 16 pb (figura 3B). El OFR del inserto contiene 58 aminoácidos tras la serina del factor VIII canino antes del primero de los tres codones de terminación (figura 3B). El inserto se caracterizó como un SINE obtenido de ARNt, altamente similar a los SINE caninos singulares descritos por Minnick y col., 1991 y al CanB descrito por Vassetzky y col., 2002 (figura 3C).

3.3. Análisis del patrón de transcripción del exón 14

Para investigar los efectos del inserto SINE hallado en la transcripción y traducción del gen del factor VIII, el exón 14 se amplificó por QPCR, utilizando la región de en frente del SINE y el SINE en sí como dianas de cebador, respectivamente, y el ARN de las muestras de sangre con EDTA de un perro sano y un perro afectado como moldes. Se aplicó cuantificación relativa para determinar el nivel de expresión del ARNm del FVIII comparando perros sanos y afectados. En las muestras de los perros sanos, solo es detectable el ARNm normal. No puede hallarse ADNc con SINE en estas muestras. En las muestras de los perros afectados, se produce menos ARNm del exón 14, y la cantidad total del ARNm del exón 14 contiene el inserto (figura 4).

Modelado de proteínas

Tal y como se mostró con los enfoques de modelado, el ADN podía traducirse en una proteína totalmente funcional si el inserto SINE no estaba presente. Cuando estuvo presente, solo se tradujo una parte de la proteína. Se proporciona un resumen de las áreas que codificaban las estructuras funcionales de la proteína en la figura 5. Se puede ver también que la parte media, en la que está localizado el inserto SINE, no parece tener una función particular directamente asociada con la subunidad A o B del factor VIII. El modelado adicional desde el principio con LOMETS (un meta-servidor local de enhebrado, Zhang, 2007) mostró que esta parte forma una estructura circular, y así, podría funcionar como un conector entre las dos partes funcionales.

El análisis de la subunidad A del factor VIII con 3D2Go (parte del paquete Phyre, Kelley, 2009) mostró que la subunidad A (aguas arriba del inserto) muestra dos áreas con sitios probablemente activos.

Así, se predice que incluso con el inserto SINE presente, no se pierde toda la funcionalidad de la proteína y debería medirse cierta actividad residual incluso en individuos afectados.

4. Discusión

La comparación de toda la región de codificación de la secuencia del ADN del factor VIII canino y de las uniones exón-intrón de dos perros hemofílicos con deficiencia grave del factor VIII, con el ADN del factor VIII canino del tipo silvestre, revelaron una inserción en el nucleótido 2675 en el exón 14 del gen del factor VIII hemofílico.

La presencia de la mutación se confirmó en 5 perros (2 afectados, 3 portadores) con un estado definido de la hemofilia A. Además, una cohorte de muestras de diferentes razas no mostró la mutación observada. Los últimos resultados sugieren enormemente que la mutación detectada no puede ser una mutación habitual y poco importante.

Los SINE se describen como una fuente potencial de enfermedades en los humanos, así como en los perros. En los seres humanos, las inserciones Alu asociadas a una enfermedad suelen hallarse en secuencias de codificación o cerca de los límites exón-intrón, afectando a los patrones de empalme (Druker, 2004). De forma similar, se ha informado de que las inserciones SINE son una mutación causante en los perros. Un SINE en el exón 2 del gen PTPLA genera patrones de empalme anómalos asociados a la miopatía hereditaria en los Labradores Retriever (Pele, 2005). La narcolepsia en los Doberman se segrega con una inserción del SINE en la región intrónica flanqueante 5' del exón 4 de HCRTR2. Esta inserción desplaza una secuencia puntual de ramificación de lazo putativa necesaria para el empalme adecuado (Lin, 1999). En los perros merlé, se halló una inserción de SINE en el límite intrón 10-exón 11 en el gen SILV (Clark, 2006).

El SINE hallado en los bichones habaneros hemofílicos se encuentra en la secuencia de codificación del gen del factor VIII. Tal y como se muestra en la figura 3, el gen del FVIII se transcribe junto con el SINE en los perros afectados. La secuencia de aminoácidos se verá alterada debido a la diferente secuencia de nucleótidos. Adicionalmente, el SINE contiene varios codones de terminación (figura 3B).

Durante la traducción, este ARNm anormal conducirá, lo más probablemente, a una proteína truncada, sin embargo, se predice que hay presente cierta actividad residual ya que el extremo N está intacto (figura 6).

Las inserciones en el gen del factor VIII también se describen como la causa de la hemofilia A en humanos. En la base de datos oficial, se enumeran los dos LINE en el exón 14 y una inserción de repetición Alu en el exón 14 (<http://hadb.org.uk/>). Adicionalmente, se describe una inserción con una longitud de 280 pb en el exón 14 en la base de datos del Institut für Humangenetik Uni Würzburg (comunicación personal con el Dr. Hasenmüller).

Los resultados del presente estudio revelan con suficiente certeza la inserción del SINE detectada en el exón 14, como una mutación responsable de la hemofilia A en bichones habaneros.

A pesar del hecho de que ninguno de los 25 bichones habaneros no seleccionados dio positivo en la mutación, parece que la investigación en un número mayor de perros de esta raza es útil para definir la prevalencia real de la enfermedad.

- 5 Las realizaciones descritas son consideradas en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas. El ámbito de la invención se indica, por lo tanto, en las reivindicaciones adjuntas, y no en la descripción anterior. Todos los cambios que pueden incluirse en el significado e intervalo de equivalencia de las reivindicaciones han de aceptarse dentro de su ámbito.

Referencias citadas

- 10 Antonarakis, S.E., 1995. *Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A*. Thromb. Haemost. 74, 322-328.
- Cameron C., Notley C., Hoyle S., McGlynn L., Hough C., Kamisue S., Giles A. y Lillicrap D.; 1998: *The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence*; Thromb Haemost 79(2): 317-322
- Clark L.A., Wahl J.M., Rees C.A. y Murphy K.E.; 2006: *Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog*; PNAS 103(5): 1376-1381
- 15 Druker R. y Whitelaw E.; 2004: *Retrotransposon-derived elements in the mammalian genome: a potential source of disease*; J Inherit Metab Dis 27: 319-330
- Hough, C., Kamisue, S., Cameron, C., Notley, C., Tinlin, S., Giles, A., Lillicrap, D., 2002. *Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A: similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia*. Thromb. Haemost. 87, 659-65.
- 20 Jais, A., Klein, D., Wolfesberger, B., Walter, I. (2011). *Gene expression profile of vascular endothelial growth factor and its receptors in various cell types of the canine lymph node (using laser capture microdissection)*. Veterinary Immunology and Immunopathology 140 (3-4): 207 - 214
- Klein, D., Janda, P., Steinborn, R., Muller, M., Salmons, B., Gunzburg, W.H. (1999). *Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: Influence of mismatches on quantification*. Electrophoresis 20: 291-299
- 25 Klein, D. (2002). *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*. Trends in Molecular Medicine 8 (6): 257-260
- Lin L., Faraci L., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P.J., Nishino S. y Mignot E.; 1999: *The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene*; Cell 98(3): 365-376
- 30 Livak K.J., y Schmittgen T.D.; Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. Methods 25: 402-408.
- Lozier J.N., Dutra A., Pak E., Zhou N., Zheng Z., Nichols T.C., Bellinger D.A., Read M. y Morgan R.A.; 2002: *The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion*; PNAS 99(20): 12991-12996
- 35 Minnick M.F., Stillwell L.C., Heineman J.M. y Stiegler G.L.; 1991: *A highly repetitive DNA sequence possibly unique to canids*; Gene 110: 235-238
- Naylor J.A., Buck D., Green P., Williamson H., Bentley D. y Gianelli F.; 1995: *Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions*; Hum Mol Genet 4(7): 1217-1224
- 40 Oldenburg, J., El-Maarri, O., 2006. *New insight into the molecular basis of hemophilia A*. Int. J. Hematol. 83, 96-102.
- Pele M., Tired L., Kessler J.L., Blot S. y Panthier J.J.; 2005: *SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs*; Hum Mol Genet 14(11): 1417-1427
- Vassetzky N.S. y Kramerow D.A.; 2002: *CAN - a pan-carnivore SINE family*; Mamm Genome 13: 50-57
- 45 Bentolila S., Bach J., Kessler J., Bordelais I., Cruaud C., Weissenbach J. y Panthier J.; 1999: *Analysis of major repetitive DNA sequences in the dog (Canis familiaris) genome*; Mamm Genome 10: 699-705
- Bicocchi, M.P., Pasino, M., Lanza, T., Bottini, F., Boeri, E., Mori, P.G., Molinari, A.C., Rosano, C., Aquila, M., 2003. *Analysis of 18 novel mutations in the factor VIII gene*. Br. J. Haematol. 122, 810-817.
- Bowen D.J., 2002: *Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights Review*; J Clin Pathol 55: 127-144

Bowen D.J.; 2003: *Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A*; Thromb Haemost 89:201-202

Dunning M.D., Averis G.F., Pattinson H., Targett M., Cade S. y Herrtage M.E.; 2009: *Haemophilia A (factor VIII deficiency) in a litter of Weimaraners*; J Sm Anim Prac 50: 357-359

5 Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2004. *Nonsense-mediated decay approaches the clinic*. Nat. Genet. 36, 801-808.

Lakich D., Kazazian H.H., Stylianos E.A. y Gitschier J.; 1993: Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A; Nature Gen 5: 236-241

10 Oldenburg J., Schröder J., Graw J., Ivaskevicius V., Brackmann H.H., Schramm W., Muller C.R., Seifried E. y Schwaab E.; 2003: *Bedeutung der Mutationsdiagnostik bei Patienten mit Hamophilie A*; Hamosatseologie 23:6-12

Tuddenham E.G.D., Schwaab R., Seehafer J. y col.; 1994: *Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene*, segunda edición; Nuc Acids Res 22(22): 4851-4868

Tabla 1

N.º	Perro	Sexo (M/F)	Tiempo (años, meses)	Actividad del factor VIII (%)	Análisis secuencial o prueba de detección*
1	P 1887	M, afectado	1, 6	10	A
2	P 1947	M, afectado	3, 11	15	A
3	N 985	F, portador oculto	3, 4	80	C
4	A 7009	F, portador (demostrado)	desconocido	desconocido	C
5	N 984	F	1, 11	91	N
6	N 986	F	1, 11	109	N
7	N 997	M	0, 2	81	N
8	N 998	M	0, 2	86	N
9	N 999	W	0, 2	80	N
10	P 1889	W	1, 11	104	N
11	N 1023	M	0, 2	74	N
12	N 1024	M	0, 2	85	N
13	N 1025	M	0, 2	75	N
14	N 1026	M	0, 2	86	N
15	N 1027	M	0, 2	86	N
16	N 1028	W	0, 2	74	N
17	N 1029	M	1, 8	91	N
18	N 1030	W	6, 4	95	N
19	N 1032	M	0, 1	74	N
20	N 1033	M	0, 1	73	N
21	N 1034	W	0, 1	68	N
22	N 1035	W	0, 1	67	N
23	N 1036	M	0, 1	68	N
24	N 1037	M	0, 1	86	N
25	N 1038	F	0, 1	67	N
26	N 1039	F	0, 11	82	N
27	N 1040	F	4, 9	83	N
28	159838	M	1, 5	109	N
29	N1041	M	0, 11	90	N
30	N1042	M	1, 6	113	N
31	N1043	F	2, 4	130	N

*N = normal, C = portador, A = afectado

15 **Listado de secuencias**

<110> LABOKLIN GmbH & Co. KG

<120> Prueba genética para la predisposición genética a la hemofilia A en bichones habaneros

20 <160> 13

ES 2 647 576 T3

```

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1
<211> 7032
5 <212> ADN
   <213> Canis lupus familiaris

<220>
10 <221> > fuente
   <222> 1..7032
   <223> /mol_type="ADN" /nota="Banco de genes AF016234" /organismo="Canis lupus familiaris"

<400> 1
atgcaagtag agctctacac ctgctgcttt ctgtgccttt tgccttcag ccttagtgcc      60
accagaaaat actacctggg tgcagtggaa ctgtcctggg actatatgca aagtgacctg      120
ctcagtgcgc tgcacgggga cacaagcttt tcttcagggg tgcaggatc tttgccactc      180
accacgtcag tcacgtacag aaagactgtg tttgtagagt ttacagatga ctttttcaac      240
attgccaaag ccaggccacc gtggatgggc ctgctgggtc ctaccatcca ggctgagggt      300
tatgacacag tggtcattgt ccttaagaac atggcttctc atcctgtcag ctttcacgct      360
gttggtgtat cctattggaa agcttctgaa ggtgctgagt atgaggatca gaccagccaa      420
aaggagaagg aagatgataa tgtcattcct ggtgaaagcc atacctatgt ctggcagggt      480
ctgaaagaga atggcccaat ggctctgat ccaccatgtc tcacctactc atatttttca      540
cacgtggacc tggtgaaaga cctgaattca ggctcattg gagccctgct ggtttgcaaa      600
gaagggagtc tggccaaaga aaggacacag accttgcagg aatttgtcct actttttgct      660
gtatttgatg aagggaaaag ttggcactca gaaacaaatg cgtctttgac acaggctgag      720
gccagcatg agctgcacac catcaatggc tatgtaaaca ggtctctgcc aggtcttact      780
gtgtgtcaca agagatcagt ctattggcat gtgattggaa tgggcaccac ccccgaaagt      840
cactcaatth ttctgaagg tcacacatth ctgttgagga accaccgcca ggctccttg      900
gagatctcac caattactth ccttactgct cagacattcc tgatggacct tggccagttt      960
ctactgtttt gtcatatccc ttcccatcaa catgatggta tggaaagctta tgtcaaagta     1020
gatagctgcc cagaggaacc ccagctgcgc atgaaaaata atgaagataa agattatgat     1080
gatggctctt atgattctga catggacgta gttagctttg atgacgacag ctcttctccc     1140
tttatccaaa tccgctcagt tgccaagaag catcctaaaa ctgggtcca ctatattgct     1200
gctgaggagg aggactggga ctatgctccc tcaggcccca cccccaatga tagaagtcac     1260

```

ES 2 647 576 T3

aaaaatctgt atttgaacaa tggctctcag cggattggta agaagtacaa aaaagtccga	1320
tttgtggcat acacagatga gacattttaag actcgtgaag ctattcagta tgaatcagga	1380
atcctgggac ctttacttta tggagaagtt ggagacacac tgctgattat atttaagaat	1440
caagccagcc ggccatataa catctaccct catgggatca attatgtcac tectctgcac	1500
acagggagat tgccaaaagg tgtgaaacat ttgaaagata tgccaattct gccgggagag	1560
atattcaagt ataaatggac agtgaccgta gaagatggac caactaaatc agatcctcgg	1620
tgctgaccc gatattactc aagcttcatt aatctggaga gagatctagc ttcaggactc	1680
attggccctc ttctcatctg ctacaaagaa tctgtagatc aaagaggaaa ccagatgatg	1740
tcagacaaga gaaatgtcat cctgttttct gtattttagt agaatcgaag ctggtaacctc	1800
acagagaata tgcagcgctt cctccccaat gcagatgtag tgcagcccca tgaccagag	1860
ttccaactct ctaacatcat gcacagcatc aatggctatg tttttgacaa cttgcagctg	1920
tcagtttggt tgcattgaggt ggcgtactgg tacattctaa gtgttgagc acaaactgac	1980
ttctgtctg tcttctctc tggatatacc ttcaaacaca aaatggtcta tgaagacaca	2040
cttaccctct tccattctc aggagaaact gtcttcatgt caatggaaaa cccaggtctg	2100
tgggttctgg ggtgccacaa ctcagaactt cggaacagag gcatgacagc cttactgaag	2160
gtttctagtt gtaacaggaa cattgatgat tattatgagg acacatacga agatattcca	2220
actccctgc taaatgaaaa caatgtaatt aaacctagaa gcttctccca gaattcaagg	2280
caccctagca ctaaggaaaa gcaattgaaa gccaccacaa ctccagaaaa tgacatagag	2340
aagattgacc ttcaatctgg agaaagaaca cagctgatta aagcacaaag tgtctcctct	2400
agtgatttgt tgatgctgtt gggacagaat cctactccac gtggactgtt cttatctgat	2460
ctccgagagg ccacagatag agccgatgac cattcacgtg gagcaataga aagaaacaag	2520
ggccacctg aagtggcaag tctcagacca gagctccgtc acagtgagga cagagaatct	2580
actcctgagc cagaactgca gttaagatta aatgagaatt tggggacaaa tacaacagta	2640
gagttgaaga aacttgattt aaaaatttct agttcatcag acagtctaata gacttcacca	2700
acaattccat cagataagtt ggcagcagct actgaaaaga caggttcctt aggaccccca	2760
aatatgtcag ttcactttaa cagtcattta ggtaccattg tatttgcaa taattcatcc	2820
caecttatte agtctggtgt acctttggaa ttgagtgaag aagataatga ttccaagttg	2880
ttagaagcac ctttaatgaa tattcaagaa agttcactga gagaaaatgt attatcaatg	2940
gagagtaata ggttatttaa agaagaaaga attcgtggac ctgcttcatt aatcaaagat	3000
aatgctttat tcaaagttaa tatctcttcg gtaaagacaa acagggcacc agttaactta	3060
acaactaata gaaagactcg tggtgctatc ccaacattat taattgagaa cagtacctca	3120
gtctggcaag atattatggt agaaaggaat actgagttta aagaagtaac ttctttgatt	3180

ES 2 647 576 T3

cataatgaaa cgtttatgga cagaaatact acagctctgg ggctaaatca tgtgtcaaat	3240
aaaactactt tatcaaaaaa tgtggaaatg gccaccaaaa aaaaagaaga ccctgtgcca	3300
ctacgtgcag aaaatccaga tctatcatcc tccaagatac cgttcttgcc agattggata	3360
aagacccatg gcaagaactc cctaagctct gagcaaaggc ccagtccaaa acaattaaca	3420
tcttttaggat cagaaaaatc tgtgaaagat cagaactttt tgtcagagga gaaggtggta	3480
gtaggagagg atgaatttac gaaggacaca gaactccaag agatttttcc aaacaacaag	3540
agcatatttt ttgctaactt ggctaagtgc caagaaaatg atacatacaa tcaagaaaaa	3600
aatctccgg aagagataga aagaaaggaa aaattaacc aggagaatgt ggctttgcct	3660
caggcacata ctatgattgg cactaagaac ttctgaaga accttttctt actaagcact	3720
aagcaaatg tagcaggttt agaagagcag ccatatactc caatacttca agacaccagg	3780
tcattaaatg attcgccaca tagtgaaggg attcatatgg ccaatttctc aaaaataagg	3840
gaagaagcaa acttgaagg cttgggaaat caaacaacc aaatggtaga gaggtttcca	3900
agcactacga ggatgtcttc taatgcaagt cagcatgtta tcaactcaag tggtaagcgg	3960
agtttgaac aaccagact ctcaacaagg gaaataaagt ttgaaaggaa ggttattgca	4020
aatgacactt caaccagtg gtccaaaaac atgaactatt tggcccaggg aacctcaca	4080
cagatagagt ataatgagaa agaaaaagg gccattactc agtccccct atcagattgt	4140
tctatgagga atcatgtcac cattcaaagc aatgactctg cattaccctg tgcaaaggaa	4200
tcagcatctc catcagttag acatacagat ctgaccaaga tccatccca acacaactct	4260
tctcatcttc cagcatcagc ctgtaattat acctttagag agaggacttc tggagtccaa	4320
gaaggcagtc atttcttaca agaagccaaa agaaataacc tctctttagc ctttgaacc	4380
ttaggaataa ctgaaggga aggaaagttc agctccctgg ggaaaagtgc cacaaccaa	4440
cccatgtaca agaaacttga aaacactgtt ctcttgcaac caggcttgtc cgaaacatct	4500
gacaaagttg aattactttc tcaagttcat gttgatcaag aagactcttt cctacaaaa	4560
actagcaatg attctctgg ccacctggat ctcatgggaa agatcttctt tcagaaaaca	4620
cagggacctg ttaaaatgaa taaaacaaat agccctggaa aagtgccctt tctgaaatgg	4680
gcaacagaaa gctctgaaaa gattccctcc aagctgctgg gtgtccttgc ttgggataac	4740
caetatgata ccagatacc aagtgaagag tggaaatccc aaaaaaagtc acagaacgac	4800
acagctttta aaaggaaaga caccattttg cccctgggac cttgtgaaaa taatgattca	4860
acagcagcaa taaatgaagg acaagataag ccccaaagag aagctatgtg ggcaaagcaa	4920
ggagagcctg gaaggttgtg ctctcaaac ccaccagtct caaacacca tcaaagggaa	4980
ataaccgtta ctactcttca gccagaggaa gacaaatttg agtatgatga caccttctca	5040
attgaaatga agagagaaga ttttgacatc tacggcgact atgaaaatca gggcctccgc	5100

ES 2 647 576 T3

agctttcaaaa agaaaacacg acactatttc attgctgcag tggagcgtct ctgggattat	5160
gggatgagta gatctcccca tatactaaga aacagggctc aaagtgggga tgtccagcag	5220
ttcaagaagg tggttttcca ggaatttact gatggatcct ttactcagcc cttataccgt	5280
ggagaactga acgaacactt gggactcttg gggccatata taagagcaga agttgaagac	5340
aatatcgtgg taactttcaa aaaccaggcc tctcgtccct actccttcta ttctagtctt	5400
atttcttatg acgaagatga gggacaagga gcagaacct gaagaaagt tgtcaacct	5460
aatgaaacca aaatttactt ttggaaagtg cagcatcata tggcaccac taaagatgag	5520
tttgactgca aagcctgggc ttatttttct gatgttgatc tggagaaaaga tgtgactca	5580
ggcttgattg gacctttct gatctgcgc agtaacacac tgaacctgc tcatgggaga	5640
caagtgcag tgcaggagt tgccttggt ttcactatat tcgatgagac taagagctgg	5700
tacttactg aaaacctgga aaggaactgc agagctccct gcaatgtcca gaaggaggac	5760
cctactctaa aagaaaactt ccgcttccat gcaatcaacg gctatgtgaa ggatacactc	5820
cctggcttag taatggtca ggatcaaaag gtctgatggt atctgctcag catgggcagc	5880
aacgaaaaca ttcattccat tcaactcagt ggacatgtgt tcaactgtacg gaaaaagag	5940
gaatataaaa tggcagtcta caacctctat ccagggtgtt ttgagactgt ggaaatgcta	6000
ccatcccaag ttggaatctg gcgtagaaa tgccttatcg gcgagcacct gcaagccggg	6060
atgagcactc tgtttctggt gtacagcaag aagtgtcaga ctccactggg gatggcttcc	6120
ggacacatta gagattttca gattacagct tcaggacaat atggacagtg ggcccaaaag	6180
ctggccagac ttcattatc cggatcaatc aatgcctgga gcaccaagga tcccttttcc	6240
tggatcaagg tggatctctt ggcaccgatg attattcacg goatcatgac ccagggggcc	6300
cgcagaagt tctccagcct ctactgtct cagtttatca tcatgtacag tctggatggc	6360
aacaagtggc acagttaccg agggaattcc acggggacct taatggtctt ctttggcaac	6420
gtggattcat ctgggatcaa acacaatatt tttaaccctc cgattattgc tcagtacatc	6480
cgtttgcacc caaccatta cagcatccgc agcactcttc goatggagct cttgggctgt	6540
gaattcaaca gttgcagcat gccgctgggg atggagagta aagcaatata agatgctcag	6600
atcactgcct cgtctacct aagcagtatg cttgccactt ggtctccttc ccaagcccg	6660
ctgcacctgc agggcaggac taatgcctgg agaectcagg caaataaccc aaaagagtgg	6720
ctgcaagtgg acttccggaa gaccatgaaa gtcacaggaa taaccacca gggggtgaaa	6780
tctctctca tcaagcatgta tgtgaaggag ttctcatct ccagtagtca agatggccat	6840
aactggactc tgtttcttca gaatggcaaa gtcaaggtct tcagggaaa ccgggactcc	6900
tccacgcctg tgcggaaccg tctcgaacct ccgctggtgg ctgctacgt gcgcctgcac	6960
ccgcagagct gggcgacca catcgccctg aggctggagg tctgggctg cgacaccag	7020
cagccgcct ga	7032

5 <210> 2
 <211> 171
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus familiaris*
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..171
 <223> /mol_type="ADN" /organismo="*Canis lupus familiaris*"
 10 <400> 2
 gggatccctg ggtggcgcag cggtttggcg cctgcctttg gcccagggcg cgatcctgga 60
 gaccgcgggat cgaatccac atcgggctcc tggatcatgg agcctgcttc tctctctgcc 120
 tgtgtctctg cctctctctc tctctctgtc tgtgacttaa ataaataaat a 171
 15 <210> 3
 <211> 218
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus familiaris*
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..218
 <223> /mol_type="ADN" /organismo="*Canis lupus familiaris*"
 <400> 3
 gggatccctg ggtggcgcag cggtttggcg cctgcctttg gcccagggcg cgatcctgga 60
 gaccgcgggat cgaatccac atcgggctcc tggatcatgg agcctgcttc tctctctgcc 120
 tgtgtctctg cctctctctc tctctctgtc tgtgacttaa ataaataaat aataaataaa 180
 25 atatttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 218
 30 <210> 4
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus familiaris*
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..234
 35 <223> /mol_type="ADN" /organismo="*Canis lupus familiaris*"
 <400> 4
 gggatccctg ggtggcgcag cggtttggcg cctgcctttg gcccagggcg cgatcctgga 60
 gaccgcgggat cgaatccac atcgggctcc tggatcatgg agcctgcttc tctctctgcc 120
 tgtgtctctg cctctctctc tctctctgtc tgtgacttaa ataaataaat aataaataaa 180
 atatttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataa aaaatttcta gtgc 234
 40 <210> 5
 <211> 417
 <212> ADN

<213> *Canis lupus familiaris*

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..417
 <223> /mol_type="ADN" /organismo="*Canis lupus familiaris*"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 317-332
 <223> /nota="sitio de duplicación"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 83..98
 <223> /nota="sitio de duplicación"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 99..316
 <223> /nota="inserción del SINE con poli-A"

<400> 5

tttactcctg agccagaact gcagttaaga ttaaattgaga atttggggac aaatacaaca	60
gtagagttga agaaacttga tttaaaaatt tctagttcgg gatccctggg tggcgcagcg	120
gtttggcgcc tgcctttggc ccagggcgcg atcctggaga cccgggatcg aatcccacat	180
cgggctcctg gtgcatggag cctgcttctc tctctgctg tgtctctgcc tctctctctc	240
tctctgtctg tgacttaaatt aaataaataa taaataaaat atttaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa aaaaaataaa aattttctagt tcatcagaca gtctaatagac ttcaccaaca	360
attccatcag ataagttggc agcagctact gaaaagacag gttccttagg accccca	417

<210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador directo del FVIII" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 6

caacatgatg gtaggaagc ttatg	25
----------------------------	----

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador inverso del FVIII" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 7

	caaagctaac tacgtccatg tcaga	25
5	<210> 8 <211> 25 <212> ADN <213> secuencias artificiales	
10	<220> <221> fuente <222> 1..25 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador directo del SINE" /organismo="secuencias artificiales"	
15	gagaatttac tcctgagcca gaact	25
20	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> secuencias artificiales	
25	<220> <221> fuente <222> 1..22 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador inverso del SINE" /organismo="secuencias artificiales"	
30	ccagggatcc cgaactagaa at	22
35	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> secuencias artificiales	
40	<220> <221> fuente <222> 1..20 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador directo de la beta-actina" /organismo="secuencias artificiales"	
45	tcgctgacag gatgcagaag	20
50	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> secuencias artificiales	
55	<220> <221> fuente <222> 1..20 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador inverso de la beta-actina" /organismo="secuencias artificiales"	
60	gtggacagtg aggccaggat	20
65	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> secuencias artificiales	
	<220> <221> fuente <222> 1..18 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador directo de la GAPDH" /organismo="secuencias artificiales"	
	tccaccacag gcaaattc	18

ES 2 647 576 T3

5 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencias artificiales

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_type="ADN" /nota="cebador inverso de la GAPDH" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 13
gcatcacccc atttgatgtt g 21

REIVINDICACIONES

1. Un gen del factor VIII canino de un bichón habanero tal y como se muestra en la SEQ ID NO 1, en el que el gen del factor VIII canino se atribuye a la hemofilia A y comprende una secuencia que tiene al menos un 97 % de homología de secuencia con la SEQ ID NO 5.
- 5 2. Un procedimiento de análisis de un genotipo de un bichón habanero al que se le atribuye hemofilia A mediante una prueba genética para la identificación de al menos un inserto en el factor VIII canino, tal y como se muestra en la SEQ ID NO 1, del genoma del perro, en el que el gen del factor VIII canino se analiza para una secuencia que tiene al menos un 97 % de homología de secuencia con la SEQ ID NO 5.
- 10 3. El procedimiento de análisis según la reivindicación 2, en el que la PCR se utiliza para la amplificación de una región del ADN, ARNm o ADNc del gen del factor VIII canino, que contiene el inserto.
4. Un procedimiento *in vitro* de determinación de la predisposición genética a la hemofilia A de un bichón habanero, **caracterizado por** el uso del gen del factor VIII canino del perro según la reivindicación 1 y la detección de una secuencia que tiene al menos un 97 % de homología de secuencia con la SEQ ID NO 5.
- 15 5. Kit para la detección de la predisposición de un bichón habanero a la hemofilia A, que comprende medios para realizar una reacción PCR para la detección del inserto que tiene al menos una homología de secuencia del 97 % con la SEQ ID NO 5 en el gen del factor VIII canino según la reivindicación 1, en el que el kit comprende un par de cebadores para el inserto, de los que al menos un cebador se une al inserto, un par de cebadores selectivos para el factor VIII canino y al menos un par de cebadores para un gen constitutivo.

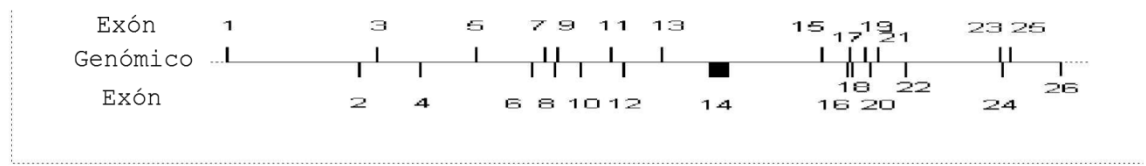


Figura 1

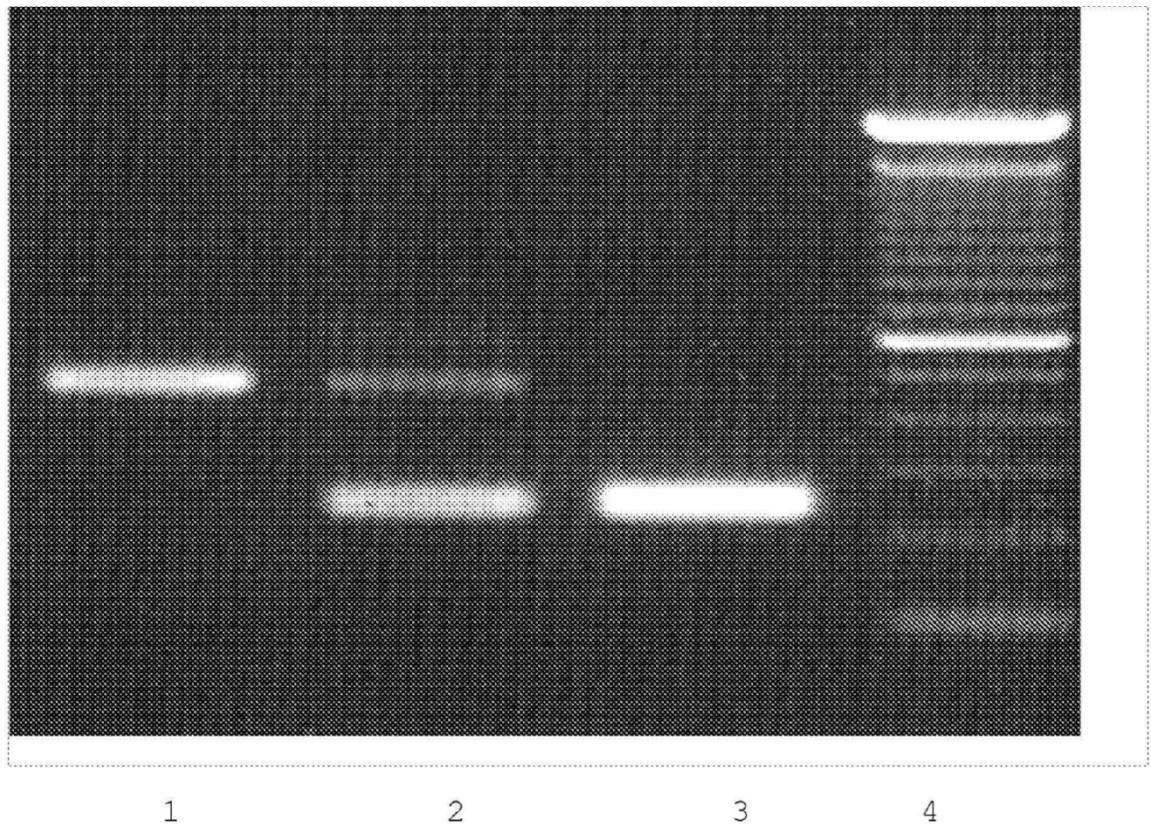


Figura 2

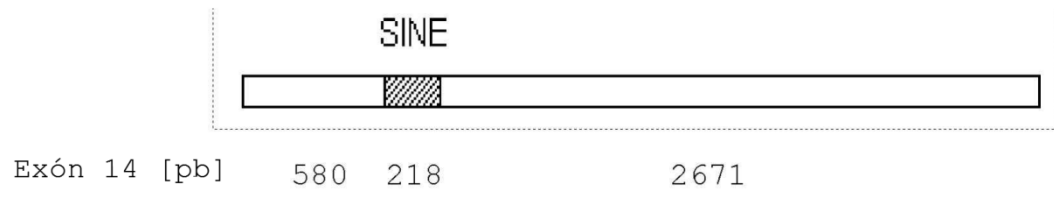


Figura 3A

ES 2 647 576 T3

tttactcctgagccagaactgcagttaagattaaatgagaatttggggacaaatacaacagtagagttg
F T P E P E L Q L R L N E N L G T N T T V E L

AagaaacttgatttaaaaatttctagttcGGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTGGCGCCTGCCTTTGG
K K L D L K I S S S G S L G G A A V W R L P L

CCCAGGGCGCGATCCTGGAGACCCGGGATCGAATCCACATCGGGCTCCTGGTGCATGGAGCCTGCTTCT
A Q G A I L E T R D R I P H R A P G A W S L L L

CTCTCTGCCTGTGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTGTCTGTGACTTAAATAAATAAATAATAATAAAAA
S L P V S L P L S L S L S V T / I N K / / I K

TATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAaaaaatttctagttccatcagacagtctaataga
Y L K K K K K K K K K I K I S S S S D S L M

Cttcaccaacaattccatcagataagttggcagcagctactgaaaagacagggttccttaggaccccca
T S P T I P S D K L A A A T E K T G S L G P P

Figura 3B

ES 2 647 576 T3

GGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTGGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCCTGGA
|
GGGATCCCTGGGTGGCGCAGCGGTTTGGCGCCTGCCTTTGGCCCAGGGCGCGATCCTGGA

GACCCGGGATCGAATCCACGTCGGGCTCCTGGTG CATGGAGCCTGCTtctccctctgcc
|
GACCCGGGATCGAATCCACATCGGGCTCCTGGTG CATGGAGCCTGCTTCTCTCTCTGCC

tgtgtctctgcctctctctctctctctctctctTT-ATCATAAATAAATAAAAA...poli-A
|
TGTGTCTCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTGTCTGTGA-CTTAAATAAATAAATA

Figura 3C

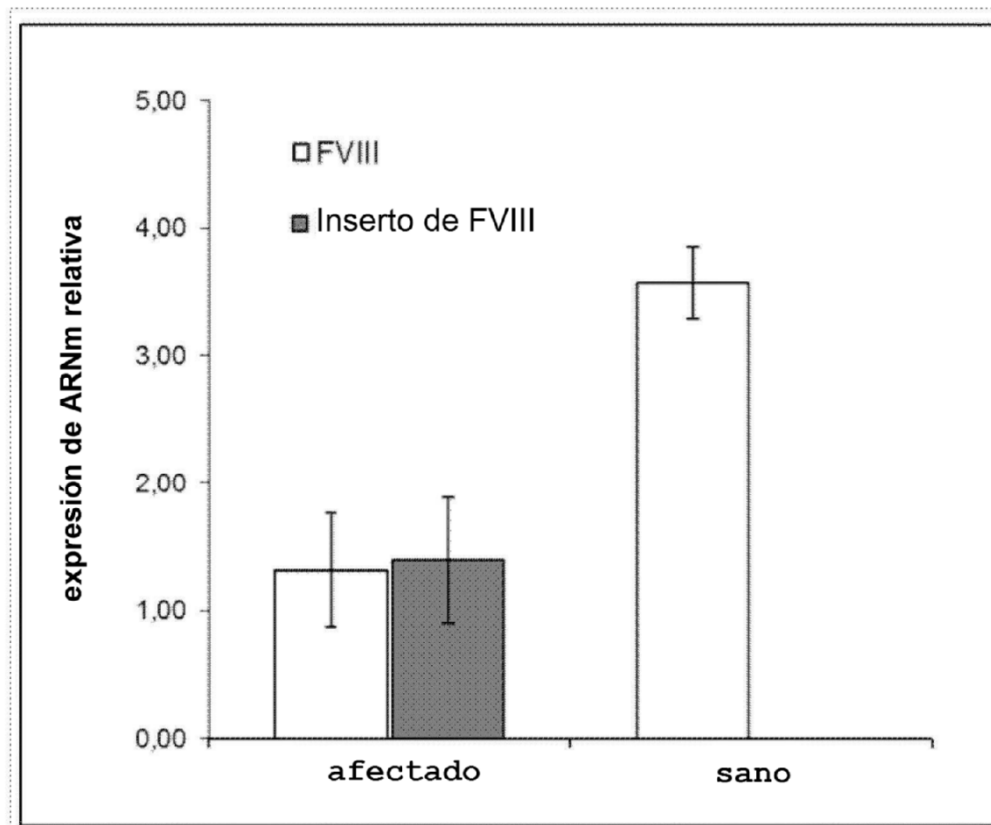
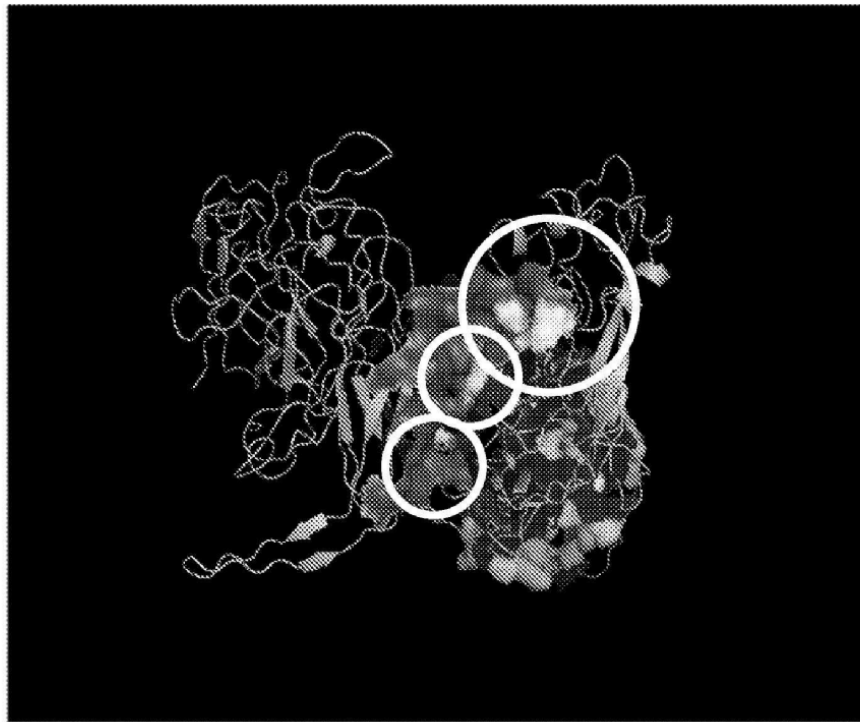


Figura 4



Figura 5

(A)



(B)

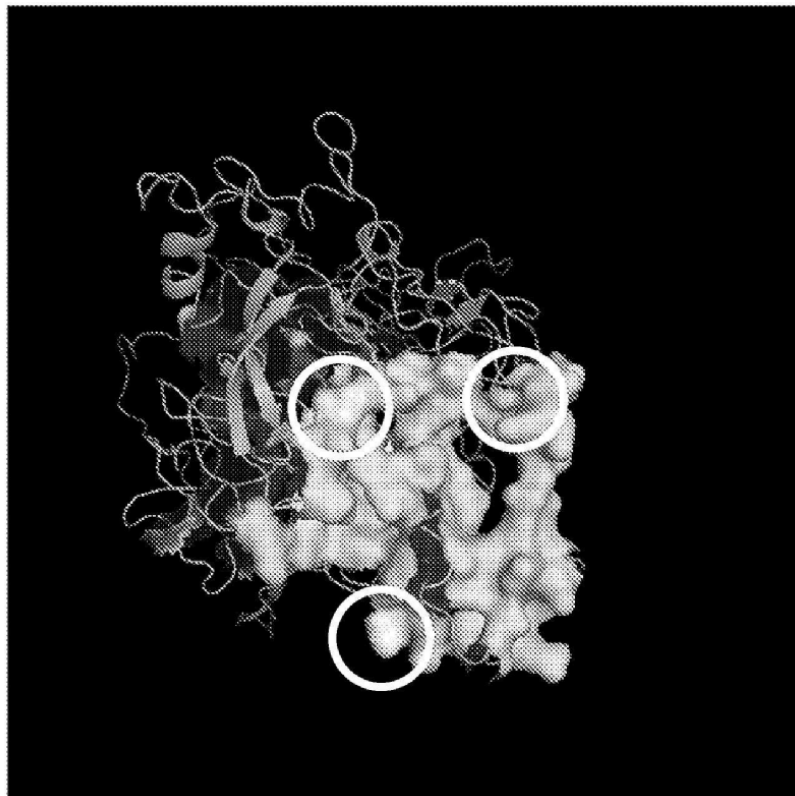


Figura 6