

ISBN: 970-27-0770-6

PREVALENCIA DEL GEN DE LA PARÁLISIS PERIÓDICA HIPERCALÉMICA (HYPP) EQUINA EN EL ESTADO DE JALISCO

Ayala-Valdovinos Miguel Angel¹, Villagómez Zavala Daniel¹, Galindo-García Jorge¹, Sánchez-Chiprés David¹, Guerrero-Quiroz Luis Alfonso¹, Anguiano-Estrella Rubén², Anguiano-Estrella José², Topete-Uribe Ricardo², Plascencia-Botello Jorge², Anguiano-Islas José Fermin*, de la Peña-Topete J y Taylor-Preciado Juan de Jesús¹.

Resumen

A través del análisis molecular (PCR), fueron identificados los genotipos para gen de la Parálisis Periódica Hipercalémica Equina (HYPP) en caballos de la línea genética del semental “Impressive” de diferentes cuadras equinas del estado de Jalisco. El análisis de PCR fue desarrollado y verificado usando DNA genómico de animales de genotipo conocido (controles) y aplicado a caballos descendientes del caballo semental llamado “Impressive”. El producto de PCR-RFLP fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio permitiendo identificar los genotipos de los animales estudiados, homocigótico normal (N/N), heterocigótico (N/H), así como homocigótico mutante (H/H). El uso de esta metodología permitió obtener de manera rápida (aproximadamente 6 h), el diagnóstico de esta enfermedad hereditaria lo cual a su vez demuestra su gran importancia como medida de control genético del pie de cría.

Introducción

Han transcurrido 10 años desde la muerte del prominente caballo llamado **Impressive** (1969-1995), semental raza Cuarto de Milla campeón y padre de caballos campeones en conformación, a quien se le asocia con una enfermedad genética conocida como Parálisis Periódica Hipercalémica (HYPP; del inglés Equine Hyperkalemic Periodic Paralysis). En el año 1996, la Asociación Americana de Caballos Cuarto de Milla (AQHA; American Quarter Horse Association, por sus siglas en inglés) oficialmente reconoció a la HYPP como un defecto genético. Asimismo, en el mes de enero del año 1998, la AQHA exige revelar la condición genotípica de la HYPP (N/N; N/H o H/H) en los documentos de registro de todos los potros que descienden de alguna línea genética identificada como portadora del gen HYPP. Si un potro y sus progenitores no han sido probados para el gen HYPP, los documentos de registro deberán llevar la leyenda: *“Este caballo tiene un ancestro conocido como portador del gen HYPP, designado de a cuerdo a las reglas de la*

¹ Instituto de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, División de Ciencias Veterinarias, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km. 7.5 Carretera a San Isidro Mazatepec, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. ² Centro Equino Los Alamitos.

Tel y Fax: (33) 37-96-40-73. e-mail: manayala@cucba.udg.mx

AQHA como un defecto genético. La AQHA recomienda realizar el examen respectivo para confirmar la presencia o ausencia de este gen” (Crabbe, 1998).

De manera que una vez que un caballo ha sido probado para el gen HYPP y resulta negativo para la enfermedad, el documento de registro del animal llevará la designación de “N/N”, lo cual significa que no es portador del gen HYPP, en tanto que si el caballo resulta positivo, el registro llevará la designación de “N/H” (si tiene una copia del gen) o “H/H” (si tiene dos copias del gen). Con apareamientos selectivos entre caballos negativos (N/N), es posible reducir la incidencia de la enfermedad y eventualmente eliminarla, a la vez que se conservan los rasgos deseables de la línea del campeón semental Impressive (Crabbe, 1998).

La Parálisis Periódica Hipercalemica Equina (**HYPP**) es una enfermedad hereditaria codominante que se presenta en equinos descendientes del caballo semental “Impressive”, esta enfermedad afecta la función muscular debido a una mutación que altera una proteína en la subunidad alfa del canal de Na^+ en el músculo esquelético, dicha proteína es encargada de regular los niveles de Na^+ y K^+ (Fontaine *et al.*, 1990; Cummins *et al.*, 1993). Esta enfermedad es caracterizada por una amplia variación de síntomas clínicos, tales como rigidez muscular, ocasionalmente acompañada de ruidos respiratorios debido a la parálisis de las vías respiratorias superiores; temblor muscular; debilidad del tren posterior; prolapso del tercer párpado; postración y muerte por falla cardiaca o respiratoria (Bowling *et al.*, 1996)

El diagnóstico molecular de la HYPP en caballos de la línea genética del semental “Impressive” es importante como medida de control del germoplasma que ingresa a las cuadras de equinos, dado que la HYPP presenta un patrón hereditario en forma codominante, en donde una sola copia del gen (**alelo**) es requerida para que el padecimiento se presente, sin embargo, los animales homocigóticos para la mutación (H/H) son severamente más afectados que los heterocigóticos (N/H) (Naylor *et al.*, 1999). Es por esto que se deben de tener en cuenta las siguientes posibilidades de apareamiento:

- Un equino (♂ o ♀) heterocigótico para la mutación (N/H), tiene un 50% de probabilidad de procrear un potro con HYPP (50% N/H), cuando es apareado con un equino normal (N/N).
- Un equino (♂ o ♀) heterocigótico para la mutación (N/H), tiene un 75% de probabilidad de procrear un potro con HYPP (50% N/H; 25% H/H), cuando es apareado con otro equino también heterocigótico (N/H).
- Un equino (♂ o ♀) homocigótico para la mutación (H/H), tiene un 100% de probabilidad de procrear un potro con HYPP (100% N/H), cuando es apareado con un equino normal (N/N).

Material y Métodos

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología Animal del Departamento de Producción Animal de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Se analizaron 60 caballos procedentes de diferentes cuadras del estado de Jalisco, los cuales se eligieron con base a su registro genealógico teniendo como antecedente proceder de la línea

genética del caballo semental “Impressive”. Se obtuvo DNA genómico a partir de muestras de sangre completa siguiendo protocolos estándares. La muestra de sangre (5 ml) se tomó en tubos vacutainer conteniendo EDTA, posteriormente en el laboratorio 100 μ l de sangre fueron tratados con 900 μ l de buffer A (sacarosa, 0.32 M; Tris HCl, 10 mM; Mg Cl₂, 5 mM; Triton X-100, 1%), hasta lograr un botón celular blanco. A continuación se incubó la muestra por una hora a 50°C en una solución de Proteinasa K (8 mg/ml) en buffer D (KCl, 50mM; Tris HCl, 10 mM; MgCl₂, 2.5mM; NP-40, 0.455 Tween 20, 0.45%). La enzima se inactivó incubando la muestra a 94°C durante 10 minutos (Ayala-Valdovinos *et al.*, 2003).

De acuerdo a los datos de secuencia del DNA para el gen HYPP, se seleccionaron dos oligonucleótidos iniciadores para seguir un protocolo estándar donde 100ng de DNA fueron amplificados en una reacción de 100 μ l, conteniendo 100 pmol de cada iniciador, 200 M de dNTPs, y 2.5 U de taq polimerasa. Los ciclos de amplificación se realizaron en un termociclador, con 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 1 minuto y polimerización a 72°C por 1 minuto (Ayala-Valdovinos *et al.*, 2003).

Resultados y Discusión

El análisis molecular (PCR-RFLP) permitió la amplificación de fragmentos de DNA genómico correspondiente al gen de la HYPP de los equinos control y estudio. Del producto de PCR se obtuvieron los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) donde se observaron patrones de bandedo específico para equinos normales (N/N), heterocigóticos (N/H) y homocigóticos para la mutación (H/H).

De los 60 equinos descendientes de la línea genética del semental “Impressive”, analizados hasta el momento (**Cuadro 1**), 24 (40%) fueron normales (N/N); en tanto que 36 (60%) caballos fueron positivos para la HYPP, 33 (55%) heterocigóticos (N/H) y tres (5%) homocigóticos mutantes (H/H). Con base en los resultados encontrados en este estudio cabe resaltar la importancia de la genotipificación para el gen HYPP en caballos procedentes principalmente de los Estados Unidos de América, así como la difusión del problema latente para propietarios de ganadería caballar de México que desconocen del riesgo inherente al introducir nuevo germoplasma en sus cuadras.

Cuadro 1. Genotipos para el gen HYPP encontrados en caballos de la línea genética del semental “Impressive” en cuadras equinas del estado de Jalisco (n = 60).

Genotipo N/N (normales)		Genotipo N/H (Positivos Heterocigóticos)		Genotipo H/H (Positivos Heterocigóticos)	
(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
24	40	33	55	3	5

Conclusiones

1. La técnica molecular PCR-RFLP permitió diagnosticar el genotipo para el gen de la HYPP en caballos de procedentes de diferentes cuadras equinas a partir de una muestra total de 60 animales de la línea genética del garañón “Impressive”,

2. El presente trabajo establece la utilidad del análisis molecular para el diagnóstico preciso y oportuno de la Parálisis Periódica Hipercalemica Equina (HYPP), haciendo énfasis en la importancia del diagnóstico molecular (PCR) como una medida de control genético del pie de cría.

Bibliografía

1. Ayala-Valdovinos MA, Villagómez, DAF, Galindo-García J, y Sánchez-Chiprés DR. 2003. Diagnóstico molecular (PCR-RFL) de parálisis periódica hipercaliémica equina. XXV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos, A. C. Octubre 8-11:141-144. México.
2. Bowling AT, Byrns G, Spier S. 1996. Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Anim Genet.* 27:279-81.
3. Crabbe B. 1998. Living with HYPP. *Horse & Rider.* 37:38-42.
4. Cummins TR, Zhou J, Sigworth FJ, Ukomadu C, Stephan M, Ptacek LJ, Agnew WS. 1993. Functional consequences of a Na⁺ channel mutation causing hyperkalemic periodic paralysis. *Neuron.* 10:667-78.
5. Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GA, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM, et al. 1990. Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science.* 250:1000-2.
6. Naylor JM, Nickel DD, Trimino G, Card C, Lightfoot K, Adams G. 1999. Hyperkalaemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co-dominant genetic condition. *Equine Vet J.* 31:153-9.