

ISBN 970-27-1045-6

**SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES
(DNA) PARA EL COLOR DEL PELAJE
CASTAÑO EN CABALLOS PURA RAZA ESPAÑOLA**

Ayala-Valdovinos Miguel Angel¹, Anguiano-Estrella Rubén³, Plascencia-Botello Jorge²,
Galindo-García Jorge¹, de la Peña-Topete Javier⁴, Villagómez-Zavala, Daniel¹,
Sánchez-Chiprés David¹, Schweminski-Benítez Sergio Luis¹,
Taylor-Preciado Juan de Jesús¹, Guerrero-Quiroz Luis Alfonso¹, Merlos-Barajas Miguel¹,
Topete-Uribe Ricardo³, Duifhuis-Rivera Theodor¹.

Resumen

Por medio del análisis molecular (PCR), utilizando oligonucleótidos iniciadores para el gen Agutí, fueron identificados los genotipos para este gen en caballos Pura Raza Española, (P.R.E.), los cuales fueron animales procedentes de España. El análisis de PCR fue desarrollado y verificado usando DNA genómico de animales de genotipo conocido (controles) y aplicado a nueve caballos P.R.E. color castaño. El producto de PCR-RFLP fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio permitiendo identificar los genotipos para este gen, homocigótico dominante (A/A), heterocigótico (A/a), así como homocigótico recesivo (a/a). El presente trabajo demuestra la utilidad del análisis molecular para identificar el genotipo del gen Agutí, haciendo énfasis en su aplicación práctica en la selección asistida con marcadores genéticos moleculares (DNA) para poder definir un adecuado sistema de cruzamiento en los criaderos especializados en la coloración del pelaje de los caballos.

Introducción

Si bien los diferentes tipos de herencia del “**rasgo coloración de la capa de los caballos**”, son conocidos desde hace mucho tiempo, el conocimiento de los genes responsables y su mecanismo de acción corresponden a la época moderna, en particular a la genética molecular (Trommershausen-Smith *et al.* 1976; Chowdhary y Bailey 2003). Los avances científicos en esta área no solamente han permitido la identificación de diferentes enfermedades hereditarias de los caballos, anteriormente desconocidas (HYPP, Parálisis Periódica Hipercalémica Equina; OLWS, Síndrome Overo Letal Blanco; SCID, Inmunodeficiencia Severa Combinada; etc.), si no que han permitido también trazar los orígenes evolutivos del caballo y a su vez se ha logrado la caracterización molecular de las

¹Instituto de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, ² Departamento de Medicina Veterinaria, División de Ciencias Veterinarias, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km. 7.5 Carretera a San Isidro Mazatepec, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. ³ Centro Equino Los Alamitos, ⁴ Clínica para Equinos Las Piedras.
Tel y Fax: (33) 37-96-40-73. e-mail: manayala@cucba.udg.mx

variantes alélicas de algunos genes responsables de la coloración de la capa de los caballos, lo cual hace posible identificar el genotipo que presenta cada animal para estos genes y esto a su vez nos permite una predicción de el (los) pelaje(s) esperado(s) que se presentarían en los potros descendientes de determinada cruce, e incluso poder dirigir la cría en una cuadra hacia la obtención de animales con un color de la capa predeterminado, es así como han surgido los ranchos equinos especializados en un particular color del pelaje, en esto consiste la selección asistida con marcadores genéticos moleculares aplicada al color de la capa de los caballos.

En general los genes que intervienen en la coloración del pelaje participan a través del desarrollo, diferenciación, proliferación o migración de las células pigmentarias (melanocitos) o bien participan a través de la síntesis del pigmento (melanina). La melanina es el pigmento más importante del color de la capa en los mamíferos. Este se sintetiza como gránulos de pigmento en los melanocitos, células que se originan en etapas tempranas del embrión en la crestas neural y migran para localizarse finalmente en los folículos del pelo, piel, iris y algunos tejidos internos (Robbins, 1993; Barsh, 1996; Sponenberg, 1996).

Los *loci* Extensión (E) y Agutí (A) son las principales regiones génicas que regulan el proceso de biosíntesis de melanina, estos *loci*, codifican para el receptor de melanocortina (**MC1R**; *del inglés melanocortin-1-receptor*) y para su antagonista, la proteína Agoutí (**ASIP**; *del inglés agouti-signaling-protein*), respectivamente (Lu *et al.*, 1994; Scholzen *et al.*, 1994). La ASIP actúa como un antagonista del receptor MC1R anulando la acción de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) resultando en la síntesis del pigmento rojo-amarillo (phaemelanina). Si hay pérdida de la función de la ASIP, la unión de la MSH al MC1R favorece la síntesis del pigmento negro (eumelanina) (Klungland *et al.*, 1995).

Así pues forma de afectar la activación del receptor de superficie MC1R consiste en bloquear a dicho receptor, lo cual conduce a una incapacidad del receptor para ser activado aunque éste sea normal y la MSH esté presente. Tal es el mecanismo de acción del *locus* Agutí, resultando en síntesis de phaeomelanina en aquellas áreas del cuerpo que se expresa la proteína agutí y en síntesis de eumelanina en otras áreas donde se carece de esta proteína.

En resumen, la presencia y función de las células pigmentarias determina la cantidad, tipo y naturaleza del pigmento (Sponenberg, 1996) y una vez que el pigmento es sintetizado, este se localiza dentro de pequeños paquetes llamados melanosomas, los cuales luego son removidos desde los melanocitos hasta circundar las células del pelo y la piel. El empaquetamiento y distribución de los melanosomas están sujetos a cambios, los cuales pueden resultar en diferentes aspectos del color final. Estos cambios están bajo control genético de otros *loci* diferentes al *locus* Extensión y Agutí (Rouzaud *et al.*, 2000).

El gen Extensión tiene dos formas alternativas (alelos), el alelo dominante **E** produce el pigmento negro en el pelaje, mientras que su alelo recesivo **e** produce el pigmento rojo (alazán). Así pues, un caballo que posee un pelaje negro puede presentar una de las siguientes combinaciones de alelos, llamadas **genotipos**: **E/E (homocigótico dominante)**, **E/e (heterocigótico)**. Sin embargo hay que considerar que en el pelaje castaño, tiene expresión el gen Agutí cuando esta presente el alelo dominante **A** para restringir la

pigmentación negra a la crin, cola, parte baja de las patas y bordes de la oreja. Por tanto un caballo castaño posee uno de los siguientes cuatro genotipos posibles: **AA/EE**, **AA/Ee**, **Aa/EE** o **Aa/Ee**.

La asignación de muchos colores del pelaje de los caballos puede realizarse correctamente con base al aspecto físico de éste (fenotipo), sin embargo, una prueba genética con base en el DNA, es necesaria no solamente para definir los fenotipos que son visualmente ambiguos, si no que esta prueba resulta imprescindible para conocer cual o cuales colores de la capa pueden ser producidos por determinada cruce. Investigadores del área de la genética trabajan para identificar los genes específicos y las mutaciones responsables del color del pelaje del caballo. Actualmente están disponibles pruebas para los *locus* de Extensión (factor rojo), Agutí, Dilución Crema, Overo Letal Blanco y Tobiano.

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 9 caballos Pura Raza Español (P.R.E.) color castaño, procedentes de cuadras del estado de Jalisco, los cuales en su totalidad (100%) fueron animales importados de España. Se obtuvo DNA genómico a partir de muestras de sangre completa siguiendo protocolos estándares (Ayala-Valdovinos *et al.*, 2003).

De acuerdo a los datos de secuencia del DNA para el gen ASIP del caballo (*Equus caballus*), 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 60 segundos, alineación a 62°C por 60 segundos y polimerización a 72°C por 60 segundos.

Resultados y Discusión

El análisis molecular (PCR-RFLP) permitió la amplificación de fragmentos de DNA genómico correspondiente al gen del ASIP 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 bandeo específico para los genotipos del gen ASIP del caballo (A/A, homocigótico dominante; A/a, heterocigótico; y a/a, homocigótico recesivo).

El gen del ASIP se encontró en el 100% de los animales P.R.E. genotipificados (**Cuadro 1** y **Figura 1**). De los nueve caballos analizados, cinco (55.55%) fueron homocigóticos dominantes (A/A) y cuatro (44.44%) fueron heterocigóticos (A/a). De manera consecuente fueron genotipificados estos mismos animales para el gen Extensión,

del cual se conoce la asociación de la condición dominante (E/_) de este gen con el gen Agutí en condición dominante (A/A o A/a) para que se exprese el fenotipo de pelaje castaño. El genotipo identificado tras el análisis del gen de Agutí y Extensión fue doble homocigótico dominante (A/A E/E) en el 33.33%, A/A E/e en el 22.22% y A/a E/E en el 44.44%. Como se observa no fue identificado el genotipo doble heterocigótico (A/a E/e) en ninguno de los animales analizados, lo cual muy probablemente se deba al reducido tamaño de la muestra (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Genotipos Encontrados para los Genes Agutí y Extensión en Caballos Pura Raza Española Color Castaño Importados a México Procedentes de España (n = 9).

Genotipo		No. de animales	Porcentaje
Gen Agutí	Gen Extensión		
AA	EE	3	33.33
AA	Ee	2	22.22
Aa	EE	4	44.44
Aa	Ee	0	0.0
Total		9	99.99%



Figura 1. Sementales Pura Raza Española color castaño con genotipo A/A para el **gen Agutí**. Genotipo obtenido mediante prueba de DNA en el Instituto de Biotecnología Animal de la Universidad de Guadalajara.

Dado que un caballo con pelaje castaño puede poseer un genotipo de los siguientes cuatro posibles **AA/EE**, **AA/Ee**, **Aa/EE** o **Aa/Ee**, en las razas donde los pelajes negros y castaños son apreciados por algunos criadores, como en los caballos Pura Raza Española, a través de la selección asistida con marcadores genéticos moleculares para los genes Agutí y Extensión, se puede establecer un sistema de selección y cruzamiento a favor de estos pelajes, es así como realmente se puede establecer un auténtico rancho especializado en la coloración del pelaje de los caballos.

Conclusiones

1. La técnica molecular PCR-RFLP permitió identificar el genotipo para el gen Agutí en nueve caballos Pura Raza Española, importados a México y procedentes de yegudas de España.
2. El presente trabajo establece la utilidad del análisis molecular para el diagnóstico preciso y oportuno del gen Agutí en caballos castaños P.R.E., haciendo énfasis en la importancia del diagnóstico molecular (PCR) como una medida imprescindible para establecer un rancho especializado en la coloración del pelaje de los caballos.

Literatura Citada

1. Ayala-Valdovinos MA, Villagómez, DAF, Galindo-García J, y Sánchez-Chiprés DR. 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 de 2003:141–144. México.
2. Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.* 1996 Aug;12(8):299-305.
3. Chowdhary BP, Bailey E. Equine genomics: galloping to new frontiers. *Cytogenet Genome Res.* 2003;102:184-8.
4. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome.* 1995;6:636-9.
5. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature.* 1994 Oct 27;371:799-802.
6. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehffuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell.* 1993;72:827-34.
7. Rouzaud F, Martin J, Gallet PF, Delourme D, Goulemot-Leger V, Amigues Y, Menissier F, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol.* 2000 Sep-Oct;32:511-20.
8. Scholzen T, Solursh M, Suzuki S, Reiter R, Morgan JL, Buchberg AM, Siracusa LD, Iozzo RV. The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269:28270-81.
9. Spontenberg DP. *Equine color genetics.* Iowa State University Press, Ames, 1996.
10. Trommershausen-Smith A, Suzuki Y, Stormont C. Use of blood typing to confirm principles of coat-color genetics in horses. *J Hered.* 1976;67:6-10.