

DetECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN PMEL17 EN BOVINOS PARA CARNE DE ARGENTINA

*Detection of polymorphisms in the PMEL17
gene in beef cattle of Argentina*

Enrique Steinberg¹, J.H., Baeza², M.C. y Corva², P.M.

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata

Resumen

El color del pelaje es una de las características más distintivas de las razas bovinas. El objetivo de este trabajo fue determinar la base genética de un fenotipo anormal de dilución del color, en un rodeo bovino con base Angus/Hereford. Por sus antecedentes, se eligió como candidato para justificar dicho fenotipo al gen *premelanosome protein17* (PMEL17), que codifica una proteína necesaria para la maduración de los melanosomas. La secuenciación de dos exones del gen en tres animales de color blanco reveló una deleción de 3 pb en el exón 1 y una sustitución C>A en el exón 11. Estos polimorfismos se confirmaron en 20 animales del rodeo por PCR-RFLP. Los animales que no eran blancos pero que presentaron fenotipo de dilución (distintas tonalidades de gris) fueron heterocigotas para esos polimorfismos. También se realizó PCR-RFLP del locus Extensión en el gen *melanocortin 1 receptor* (MC1R) ya que el mismo define el color de capa base (negro o colorado) en los bovinos. Todos los animales que conformaban el grupo experimental resultaron homocigotas dominantes (E^D/E^D) o heterocigotas (E^D/e), genotipos a los que normalmente correspondería el color negro. A partir de los resultados se puede concluir que la deleción en el exón 1 de PMEL17, ya detectada en otras razas a nivel mundial, sería la responsable de la dilución del color. Dada la variabilidad en coloración observada dentro de las clases genotípicas definidas conjuntamente por la deleción en PMEL17 y el locus Extensión, es muy probable que otros genes estén segregando en esta población y contribuyendo a la dilución del color.

Palabras clave: bovinos para carne, color, dilución, PMEL17, polimorfismos.

Summary

Variation in coat color is one of the most distinctive features of cattle breeds. The aim of this study was to evaluate candidate genes involved in color determination in Angus-Hereford crossbred cattle showing a dilution phenotype. According to previous studies the *premelanosome protein* gene (PMEL17) which is responsible for encoding a protein necessary for the maturation of melanosomes, was considered the best candidate. Two exons of PMEL17 from three white animals were sequenced. A 3 bp deletion in exon 1 and a C>A substitution in exon 11 were identified. The rest of the animals with diluted color were analyzed by PCR-RFLP and they all were heterozygous for the deletion in exon 1 of PMEL17. PCR-RFLP was performed also for the *melanocortin 1 receptor* gene (MC1R) to define the genotype at the Extension locus (E^D/_: black;

Recibido: febrero de 2013

Aceptado: diciembre de 2013

1. Tesista de Grado, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

2. Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. C.C. 276 (7620) Balcarce, Buenos Aires. pcorva@balcarce.inta.gov.ar

e/e: red). All the animals with a dilution phenotype were heterozygotes (E^D/e) or dominant homozygotes (E^D/E^D) for MC1R. From these results it could be concluded that the deletion in exon 1 of PMEL17, already detected in other breeds around the world, would be responsible for the dilution of coat color. Given the variability observed within each genotypic class, it is likely that other genes affecting the diluted phenotype are segregating in this population.

Key words: beef cattle, coat color, dilution, PMEL17, polymorphisms

Introducción

El color del pelaje es una de las características más distintivas de las razas bovinas y de los animales domésticos en general, ya que constituye un indicador de identidad y de pureza racial. Las distintas asociaciones de criadores determinan un patrón de color propio al definir el estándar racial y las desviaciones severas del mismo son generalmente motivo de descalificación y exclusión de los registros.

El color puede influir marcadamente en el valor de los reproductores debido a preferencias muy arraigadas en los criadores, como es el caso de los equinos, e incluso puede haber asociaciones del color con alguna ventaja productiva. Por ejemplo, se ha encontrado evidencia reciente de una asociación significativa entre los genotipos para el *locus* de color en la raza bovina Angus y algunas variables de valor económico, de manera que novillos negros presentaron mayor contenido de grasa y llegaron antes al peso de faena que los colorados, mientras que estos últimos tuvieron más peso de res y fueron más musculosos (McLean y Schmutz, 2009). En el caso de hembras Holstein en climas cálidos, una mayor proporción de color blanco respecto al negro se ha considerado ventajosa para la producción lechera (King et al, 1988; Hansen, 1990).

La regulación genética de los patrones de pigmentación está definida a tres niveles. Ciertos genes definen un color de capa básico; otros genes modifican estos colores básicos, principalmente a través de la dilución de los mismos. Y un tercer grupo de genes define presencia, tamaño y distribución de áreas blancas no pigmentadas (manchas) (It et al, 2010).

La definición del color del pelaje a nivel bioquímico y genético es muy compleja y está lejos de ser completamente caracterizada. En los bovinos en particular se ha establecido una extensa lista de *loci* vinculados a la variabilidad del color en los tres niveles mencionados (Olson, 1999), pero la base molecular ha sido confirmada para un número todavía relativamente reducido de ellos.

En este trabajo se presenta el análisis genómico tendiente a determinar la causa de un fenotipo de coloración anormal, que surgió en un rodeo bovino con base genética de las razas Angus y Hereford. Los animales de este rodeo presentaban una gama de pelajes grisáceos e incluso blancos, lo que llevó a plantear como hipótesis la existencia de una mutación que afectaba la manifestación normal del color negro o colorado, que depende del *locus* Extensión (gen MC1R; Klugland et al, 1995). El análisis genómico permitió detectar la existencia de una mutación ya conocida en otros países, en un gen muy bien caracterizado por su efecto sobre la dilución del color en diferentes especies domésticas, que ahora se confirma también está segregando en razas carniceras de Argentina.

Materiales y Métodos

Grupo Experimental

La población bovina estudiada se originó hace aproximadamente 20 años, por el apareamiento de toros Hereford y hembras Angus. El criador decidió conservar los animales de color atípico que fueron naciendo para formar un rodeo independiente. En la actualidad, el rodeo tiene aproximadamente 65 hembras y cuatro machos para servicio. La particularidad

es que las vacas son de pelajes variados que van desde blanco hasta gris oscuro, mientras que los toros actualmente en servicio son de color gris oscuro. Si bien se eligen reproductores dentro del mismo rodeo, para el primer servicio de vaquillonas eventualmente se han utilizado toros Angus negros.

El grupo experimental se conformó con 20 hembras del rodeo que fueron elegidas para abarcar todas las variantes de color presentes y también los cuatro toros utilizados para servicio. Dado que se trata de un sistema de cría netamente comercial, no fue posible disponer de ninguna información productiva o de identificación (paternidad, genealogía) de los animales.

Elección del gen candidato

La búsqueda e identificación de genes que controlan un fenotipo de interés pueden ser enfocadas con diferentes estrategias experimentales. Debido a que no se disponía de información genealógica y a que el número de animales era reducido, no fue posible realizar un estudio de asociación (búsqueda por la posición en el genoma) y se optó entonces por la evaluación de genes candidatos. Para ello, se recopiló toda la información disponible en bovinos y otras especies domésticas sobre genes que generaran fenotipos de dilución del color.

En bovinos, dos ejemplos comunes de fenotipos de dilución se presentan en las razas Charolais (*locus* D^C) y Simmental (*locus* D^S) (Kuhn y Weikard, 2007). Estos *loci* corresponderían a mutaciones distintas en cada raza. En la raza Charolais, el genotipo para el *locus* Extensión (gen MC1R) que es el que determina el color de capa base, es mayoritariamente *e/e* y por lo tanto le corresponde el fenotipo colorado. Sin embargo, la raza presenta un color blanco característico debido a su genotipo D^C/D^C (Gutiérrez-Gil et al, 2007). El *locus* D^S propio de Simmental no ha sido aún caracterizado a nivel molecular como en

el caso de D^C en Charolais. La mutación de dilución D^S es dominante incompleta sobre el alelo de no dilución, por lo que se puede producir una variedad de intensidades de color (Olson, 1999).

El *locus* de dilución D^C de la raza Charolais coincide con el *locus* homólogo a "Silver" en el ratón, que se corresponde con el gen *premelanosome protein* que codifica para *Pmel17*, una proteína integral de membrana esencial para el desarrollo de los melanosomas. En una población F_2 producida por la cruce de las razas Charolais y Holstein, los individuos mostraron una asociación entre la mutación c.64G>A en el exón 1 del gen y el fenotipo de dilución; individuos G/G tenían pigmentación normal en función del genotipo del *locus* Extensión, mientras que los de color blanco tenían genotipo homocigota para el alelo mutado, A/A (Gutiérrez-Gil et al, 2007).

El gen *PMEL17* se ha asociado con fenotipos de dilución también en perros, como es el caso reportado por Clark et al (2006) en el cual la funcionalidad del gen es afectada por la inserción de un retrotransposón. Distintas inserciones y deleciones en *PMEL17* caracterizan también a distintos alelos que definen el color del plumaje en pollos (Kerje et al, 2004). En caballos, Brunberg et al (2006) reportaron una mutación sin sentido en el exón 11 (pArg618Cis) del gen *PMEL17*, que se asoció con el fenotipo denominado "plata" (*Silver*). Estos ejemplos demuestran que *PMEL17* está involucrado en la determinación del color en las más diversas especies, a través de los fenotipos de dilución.

En base a toda la evidencia recopilada, particularmente para bovinos, se consideró a *PMEL17* como el candidato prioritario a evaluar en el presente trabajo. *PMEL17* se ubica en el cromosoma 5 del bovino (BTA5). El gen tiene 11 exones y una extensión total de 8.107 pb. El ARNm tiene 2.046 pb y da origen a una proteína de 649 aminoácidos.

Estrategia de muestreo y elección de los controles

De cada uno de los bovinos del grupo experimental se tomó una muestra de sangre de la vena yugular utilizando *Vacutainers* con EDTA (Becton, Dickinson and Company).

Como controles en el análisis genómico se utilizaron muestras de individuos de las razas Angus (n=1) y Hereford (n=1), que correspondían a la constitución genética alegada para el rodeo en estudio y dos razas reconocidas por ser portadoras de mutaciones que producen dilución del color: Simmental con y sin dilución (n=2 y n=1, respectivamente) y Charolais (n=1). Las muestras de sangre de Angus y Hereford provenían de animales del rodeo experimental de la E.E.A. Balcarce de INTA, mientras que las muestras correspondientes a razas continentales se solicitaron a Centros de Inseminación Artificial.

La extracción del ADN genómico a partir de sangre o semen se llevó a cabo mediante la técnica de *Salting Out* (Miller et al, 1988) modificada por Fernández Macedo (2008). La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría ultravioleta a 260 nm.

Secuenciación

En el experimento de Gutiérrez-Gil et al (2007) en la raza Charolais, además de la sustitución c.64A>G encontrada en el exón 1 de PMEL17 se observaron otros polimorfismos, como por ejemplo, una mutación no sinónima en el exón 11 que afecta al segundo nucleótido del codón 612 (c.1835C>A, pA-la612Glu). Para poner en evidencia posibles mutaciones en los exones 1 y 11 de PMEL17, se decidió analizar las secuencias de ADN de esas regiones en tres vacas blancas del grupo experimental, asumiendo que eran homocigotas para una supuesta mutación que diluía el color de capa base.

Para la amplificación del exón 1 del gen PMEL17, los *primers* utilizados fueron F-5'GAACTGTGTGTGTCTGGTACGTG3' y R-5'CGTGAACCCTGACTTGGACTT3'. Para la amplificación del exón 11 los *primers* utilizados fueron F-5'CAAAGTCAACCTGGG TTATGG 3' y R-5' CTCATCACCTCCACCA CGTC3'.

La reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del exón 1 y el exón 11 se realizó con las siguientes concentraciones finales: 1X PCR Buffer (Invitrogen Life Technologies®), 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0,3 µM Primer mix, 100 ng de ADN, 1,0 unidad Taq DNA Pol (Invitrogen Life Technologies®).

El programa utilizado para la amplificación de ambos fragmentos consistió en un primer ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos consecutivos compuestos por: 30 s a 94°C, 30 s a 61°C y 45 s a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C. La secuenciación de ADN se realizó en laboratorios de INTA en Castelar. Para la comparación de secuencias, se utilizó el programa *Bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Con la misma metodología se analizaron las secuencias de los animales elegidos como controles.

PCR-RFLP del exón 1 del gen PMEL17 y del locus Extensión

El análisis de las secuencias de vacas blancas reveló una mutación particular en el exón 1 de PMEL17, por lo que se decidió utilizar la metodología de PCR-RFLP en todos los animales problema, utilizando el mismo fragmento amplificado para la secuenciación. La enzima de restricción (ER) elegida fue MboII (Thermo SCIENTIFIC, Fermentas).

Se diseñó también un sistema de PCR-RFLP para establecer el genotipo del *locus* Extensión (gen MC1R, Klugland et al, 1995), que determina el color de capa base (negro o colorado), asumiendo que la mutación hipotética en PMEL17 interactuaba con este *locus* para producir el fenotipo de dilución.

Para la amplificación de un fragmento de 401 pb del gen MC1R se utilizaron los *primers* diseñados por Crepaldi et al (2003). Los *primers* utilizados fueron F-5'AAGAACC GCAACCTGCACT3' y R-5'GAGCAACCGGA GAAGTATCG3'. El gen MC1R posee un único exón de 1.751 pb. El alelo E^D posee una sustitución T/C en la posición 579 de la secuencia del transcripto (número de acceso en Genbank: NM_174108.2), mientras que en el alelo e se evidencia la delección de una G en la posición 593.

La reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen MC1R se realizó con las siguientes concentraciones finales: 1X PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μM de la mezcla de ambos primers, 100 ng ADN, 1,0 unidad Taq DNA Polimerasa (Invitrogen Life Technologies®). El programa utilizado para la amplificación consistió en un primer ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos consecutivos compuestos por: 30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 45 s a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C. La enzima de restricción (ER) utilizada fue MspI (Thermo SCIENTIFIC, Fermentas).

Resultados y Discusión

Comparación de secuencias de PMEL17

Se secuenciaron los exones 1 y 11 del gen PMEL17 en tres vacas de color blanco y controles: Simmental con dilución y sin dilución, Charolais, Hereford y Angus (Figuras 1 a 3). La secuencia consenso del exón 1 de cada individuo deriva de dos lecturas, sentido y antisentido. La secuencia consenso del exón 11 de cada uno de los individuos deriva de una lectura, antisentido. Para la comparación de secuencias se agregó la secuencia de referencia de PMEL17 (Gene ID: ENSBTAG00 00000 4019) tomada de la base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

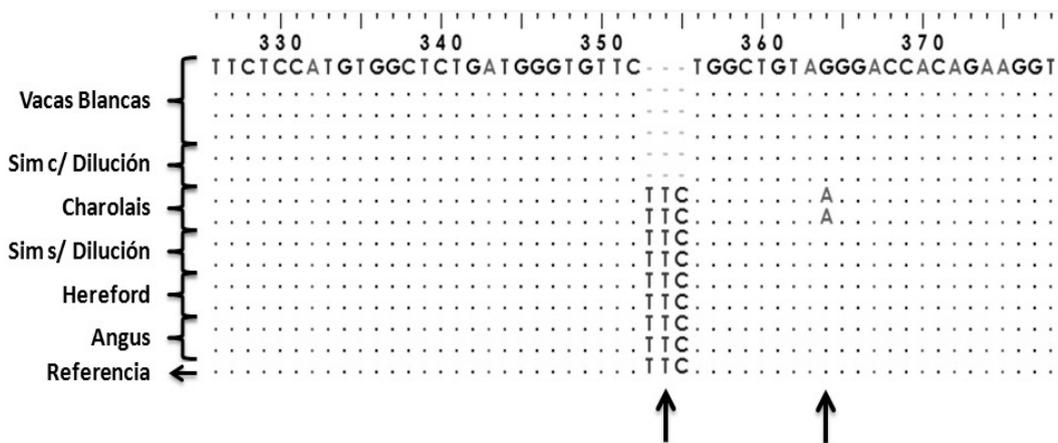


Figura 1: Secuencia parcial en ambos sentidos del exón 1 del gen PMEL17. Las flechas indican la delección de 3pb (TTC) en dos vacas blancas (A126 y A461) y en Simmental con dilución (X7722) y la sustitución c.64G>A típica de la raza Charolais. La vaca blanca A015 resultó heterocigota para la delección. Secuencia de referencia tomada de *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

Figure 1: Partial sequence (forward and reverse) of PMEL17 (exon 1). The arrows show a 3 bp-deletion (TTC) in two white cows and diluted Simmental (bull X7722), and the c.64G>A substitution that is typical of the Charolais breed. White cow A015 was heterozygous for the deletion. Reference sequence downloaded from *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

```

      420      430      440      450      460      470
ensembl ACCGTGTGGCAGCTGGGGAAGGGGGACTGCTGAGCCTTGCTTCATAAGTCTTCGCCTGA
Her      .....
Ang      .....
X1159    .....
A126     .....T.....
A461     .....T.....
X7722    .....T.....
A015     .....N.....
X302     .....N.....

```

Figura 2: Secuencia parcial del exón 11 del gen PMEL17. Se puede ver una sustitución G>T en dos animales de fenotipo blanco y en Simmental con dilución. "N" indica que el animal es heterocigota. Her: Hereford, Ang: Angus, X1159: Charolais, A126 y A461: vacas blancas, X7722: Simmental con dilución, A015: vaca blanca, X302: Simmental sin dilución.

Figure 2: Partial sequence of exon 11 of PMEL17 showing a G>T substitution in two white cows and diluted Simmental. "N" indicates a heterozygote. Her: Hereford, Ang: Angus, X1159: Charolais, A126 and A461: White cows, X7722: Diluted Simmental, A015: White cow, X302: Non-diluted Simmental.

```

      280      290      300      310      320
ensembl GAGAAAAGACAGGCCTTGCTCTCCACCTGGGTAAATCATGACTTCACATAAGAG
Her      .....
Ang      .....
X1159    .....G.....
A126     .....G.....
A461     .....G.....
X7722    .....G.....
A015     .....N.....
X302     .....N.....

```

Figura 3: Secuencia parcial del exón 11 del gen PMEL17. Se puede ver una sustitución C>G (rs133262489 en Genbank). "N" indica que el animal es heterocigota. Her: Hereford, Ang: Angus, X1159: Charolais, A126 y A461: vacas blancas, X7722: Simmental con dilución, A015: vaca blanca, X302: Simmental sin dilución.

Figure 3: Partial sequence of exon 11 of PMEL17 showing a C>G substitution (Genbank rs133262489). "N" indicates a heterozygote. Her: Hereford, Ang: Angus, X1159: Charolais, A126 and A461: White cows, X7722: Diluted Simmental, A015: White cow, X302: Non-diluted Simmental.

En el exón 1 del gen PMEL17 se identificó una deleción de 3 pb (TTC) en dos de los animales de fenotipo blanco y en Simmental con dilución (Figura 1). En Charolais no se detectó la deleción pero se evidenció una mutación que sería característica de la raza, correspondiente a una sustitución c.64G>A (Gutiérrez-Gil et al, 2007). Tampoco se evidenció la deleción en Simmental sin dilución, Hereford o Angus.

Uno de los animales blancos (vaca A015), resultó heterocigota para la deleción y por ello se utilizó como control para las reacciones posteriores de digestión. Este es un resultado relevante, ya que por un lado destaca la importancia de las imprecisiones en la determinación de fenotipos previa al análisis genómico, sobre todo cuando se trata de una apreciación visual como en este caso (es decir, clasificar como blanca una vaca que en realidad no lo es). Por otro lado, la supuesta inconsistencia entre genotipo y fenotipo podría deberse a la existencia de otros genes modificadores del grado de dilución, tal como reportaron Gutiérrez-Gil et al (2007) para la interacción entre la mutación c.64G>A de Charolais y un *locus* detectado en el cromosoma 28, para el cual el mejor candidato es el gen LYST.

La secuenciación del exón 11 mostró una sustitución C>A (G>T en la Figura 2), que afecta al segundo nucleótido del codón 612 de PMEL17 causando la sustitución de Alanina por Acido Glutámico. En la secuencia parcial se puede observar que dos vacas blancas (A126 y A461) fueron homocigotas para la sustitución al igual que Simmental con dilución (X7722). El toro Simmental sin dilución (X302) y la vaca blanca A015 fueron heterocigotas para la sustitución. Charolais (X1159), Hereford y Angus coincidieron con la secuencia de referencia de *Ensembl*.

En el exón 11 también se encontró una sustitución C>G (SNP rs133262489 en Genbank) en la región 3' no traducida del gen (Figura 3), resultando homocigotas las dos vacas blancas (A126 y A461), el toro Simmental con dilución (X7722) y el Charolais (X1159). Los controles de Hereford y Angus

no presentaron la mutación. El toro Simmental sin dilución (X302) y la vaca blanca A015 resultaron heterocigotas para esta sustitución.

El análisis de los resultados de la secuenciación indicó que las vacas de color blanco compartían un haplotipo común con el toro Simmental con dilución del color, que contrastaba con los animales controles Angus, Hereford y Charolais. Los resultados en otras razas (Gutiérrez-Gil et al, 2007; Jolly et al, 2008; Schmutz y Dreger, 2013) donde también se analizó la secuencia del exón 11 y el hecho de que la deleción de tres nucleótidos origina la pérdida de un aminoácido en el péptido señal, apuntan a este polimorfismo como la causa más probable del fenotipo estudiado. Por ello se decidió determinar el genotipo del resto del grupo experimental tomando como referencia esta deleción.

PCR-RFLP de PMEL17 y MC1R

En la Figura 4 se pueden observar los patrones de restricción generados para el exón 1 del gen PMEL17 con la endonucleasa MbolI y para el *locus* Extensión (gen MC1R) con MspI, respectivamente. A fin de facilitar la interpretación de los genotipos y los fenotipos resultantes, en el Cuadro 1 se resumen los resultados de los animales utilizados como controles para los dos *loci* de interés. Todas las hembras con un fenotipo de dilución pero no de color blanco, resultaron heterocigotas para la deleción en PMEL17, lo mismo que los tres toros para servicio que eran de color gris oscuro.

Con excepción de ocho hembras que fueron heterocigotas (E^D/e), todos los animales del grupo experimental tuvieron el genotipo E^D/E^D para el *locus* Extensión. De acuerdo a estos genotipos, todos estos animales deberían haber sido de color negro, lo que no se cumple por su genotipo en PMEL17. Sorprendentemente, ningún animal resultó homocigota para el genotipo e/e . Cabe mencionar que entre las hembras con dilución, había algunas con el patrón de manchas blancas característico de la raza Hereford (que es e/e). Estas no fueron incluidas en la toma de muestras. Como se mencionó, en el rodeo se han utiliza-

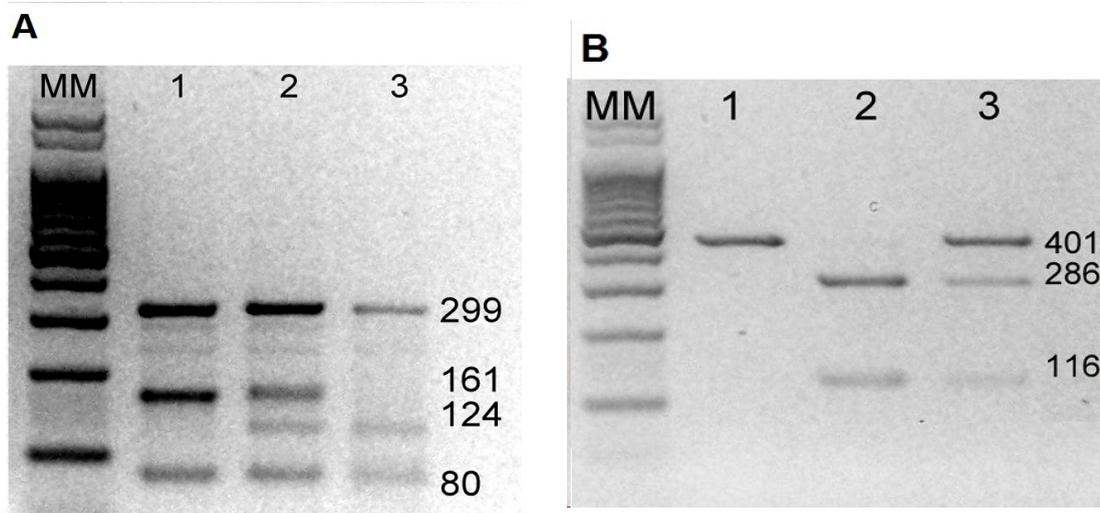


Figura 4: Resultados de los análisis de restricción. A) Patrón de digestión del exón 1 de PMEL17 con la enzima MboII. MM: Marcador de peso molecular. 1: *del/del* (Simmental X7722). 2: *+/del* (Vaca blanca A015). 3: *+/+* (Angus). En la figura no se visualizan bandas de 34 y 40pb. B) Patrón de digestión de MC1R con la enzima MspI. MM: Marcador de peso molecular. 1: *e/e* (Hereford). 2: *E^D/E^D* (Angus negro). 3: *E^D/e* (Hereford x Angus negro).

Figure 4: Results from the PCR-RFLP analyses. A) RFLP of PMEL17 (exon 1) digested with MboII. MM: Molecular weight marker. 1: *del/del* (Simmental bull X7722). 2: *+/del* (White cow A015). 3: *+/+* (Angus). Bands of 34 and 40 bp are not seen in the picture. B) RFLP of MC1R digested with MspI. MM: Molecular weight marker. 1: *e/e* (Hereford). 2: *E^D/E^D* (Black Angus). 3: *E^D/e* (Hereford x Black Angus).

do toros Angus negros en servicio de vaquillonas y esta práctica aumenta la frecuencia del alelo E^D. Además, por preferencias del propietario, los toros retenidos para servicio son de color gris oscuro, beneficiando al genotipo E^D/e. Independientemente de la influencia de estos factores de manejo, es probable que el genotipo *e/e* sea menos influenciado por la mutación de dilución, por lo que los animales *e/e* pasaron desapercibidos cuando se decidió la toma de muestras. La explicación posible de este hecho surge de la biogénesis de los melanocitos y de la biosíntesis de la melanina. Los animales de color de capa negro producen eumelanina en sus organelas pigmentadas, y para el depósito de este pigmento es esencial la formación previa de una estructura fibrilar. La formación de esta estructura fibrilar depende fundamentalmente de la síntesis de la proteína Pmel17, de su correcta endocito-

sis, y de la escisión de la proteína en fragmentos que luego de polimerizarse formaran una matriz fibrilar en forma de lámina. Cuando el alelo *e* se encuentra en el *locus* Extensión se bloquea la síntesis de eumelanina. Los melanocitos que producen feomelanina y que dan la pigmentación colorada, por el contrario, no presentan la estructura fibrilar formada por los fragmentos de la proteína Pmel17 (Delevoye et al, 2011).

Identidad del locus de dilución

El análisis genómico de un fenotipo anormal de dilución de la pigmentación en un rodeo de cría descrito en este trabajo, surgió a partir de una iniciativa del propio criador. Es tal la significancia que se le da al pelaje en animales domésticos, que se cuestionaba cuál era ahora la pertenencia racial de sus animales. A pesar de tratarse de un rodeo originado

por dos razas británicas, la pigmentación de los animales en distintos grados de gris refería inmediatamente a cruza con razas continentales, tales como Simmental o Charolais. Aun así, la raza Murray Grey de Australia, con un color gris característico, se habría originado a partir de apareamientos de Angus con Short-horn (<http://www.murraygrey.com.au/>).

La abundante información sobre el rol de PMEL17 en la determinación de fenotipos de dilución en distintas especies domésticas, hizo considerar a este gen un candidato prioritario para justificar el fenotipo en estudio. En el caso particular de los bovinos, distintas líneas de evidencia sugerían que este gen podía explicar el fenotipo de dilución. Jolly et al (2008) describieron un caso de deficiencia en la formación y desarrollo del pelo (hipotricosis) acompañado de dilución del color del pelaje en terneros producidos por vacas Holstein en servicio con toros Hereford, en Nueva Zelanda. Dicho trabajo aclara que la hipotricosis no afecta a las zonas blancas (no pigmentadas) del cuerpo del animal. En ese caso, se identificaron la misma sustitución C>A en el exón 11 de PMEL17 y una delección en el exón 1 (CTT), con una base de diferencia con respecto a la aquí reportada (TTC). Sin embargo, en la Figura 1 puede verse que la secuencia normal del gen en esa región del exón 1 es TTCTTC. En ambos casos la secuencia resultante es la misma, se pierde una leucina y no sería posible discernir entre una delección y la otra. Es así que probablemente se trate de la misma mutación.

Pmel17 es una proteína esencial para la maduración de los melanosomas que se sintetiza en el retículo endoplasmático como un precursor y es ampliamente modificada en el aparato de Golgi. La forma madura que emerge del aparato de Golgi, atraviesa la membrana plasmática, donde se internaliza en el sistema endosomal por endocitosis dependiente de Clatrina/AP-2 (complejos de proteínas adaptadoras) mediante la interacción con una di-leucina en el dominio citoplásmico de la proteína (Delevoe et al, 2011). Los ratones *Silver* son mutantes con un truncamiento de la proteína Pmel17 que origina la eliminación de la señal di-leucina, lo que resulta en la acumulación de la misma en la membrana plasmática y la deficiencia en los melanocitos (Theos et al, 2005). Tanto la mutación a la que se atribuye la coloración de Charolais (*locus D^C*) como la delección del codón 18, afectan la secuencia del péptido señal. En concordancia con el resultado de Gutiérrez Gil et al (2007), sólo el toro Charolais utilizado como control tenía el alelo (c.64A>G) en el exón 1 que le daría a esa raza su color característico.

En el rodeo en estudio no se detectaron signos de hipotricosis, pero en algunos animales había evidencia de una cola más fina y con menos pelo en el extremo, principalmente en los toros para servicio, lo que ha sido definido como "síndrome de cola de rata". El síndrome de "cola de rata" fue descrito por Schalles y Cundiff (1999). Este fenotipo se manifestaría en el primer cruzamiento entre razas continentales, particularmente Simmental, y Angus

Cuadro 1: Genotipos de MC1R y PMEL17 para los animales utilizados como controles.

Table 1: Genotypes of control animals for MC1R and PMEL17.

Raza	MC1R	PMEL17
Hereford	<i>e/e</i>	<i>+/+</i>
Angus Negro	<i>E^D/E^D</i>	<i>+/+</i>
Charolais (X1159)	<i>E^D/e</i>	<i>+/+</i>
Simmental sin dilución (X302)	<i>e/e</i>	<i>+/+</i>
Simmental con dilución (X2103)	<i>e/e</i>	<i>del/del</i>
Simmental con dilución (X7722)	<i>E^D/e</i>	<i>del/del</i>

negro. Por esta razón, Schalles y Cundiff (1999) propusieron que para su manifestación era necesario que el animal fuera heterocigota en el *locus* Extensión y también en un *locus* hipotético asociado al síndrome. En el rodeo en estudio varias de las hembras analizadas presentaron genotipos *del/+* (PMEL17) y E^D/e (Extensión), pero no se detectó una asociación inequívoca con alteraciones del pelo o un fenotipo "cola de rata".

Al mismo tiempo en que se estaba finalizando este trabajo experimental, fueron reportados los resultados de una investigación realizada en Canadá para explicar los diferentes colores de pelaje observados en la raza Highland (Schmutz y Dreger, 2013). Los distintos fenotipos de dilución fueron también atribuidos a una delección en el exón 1 (c.50-52delTTC, p.Leu18del) de PMEL17. En el caso de Highland, seis posibles colores de pelaje (negro, "dun", "silver dun", colorado, amarillo y blanco crema) pueden ser explicados por la combinación de los genotipos en PMEL17 (+/+, *del/+* y *del/del*) y MC1R ($E^D/_$ y e/e). Sin embargo, en ese caso no se hace mención a la presencia de hipotricosis o "cola de rata".

Asociaciones de criadores de Hereford de Estados Unidos, Canadá y Nueva Zelanda reconocen la existencia de un *locus* de dilución segregando en la raza y están disponibles listados de reproductores que son portadores (para ejemplo, ver <http://www.hereford.org/node/25>). Aunque no se han reportado detalles de la base molecular del mismo, es posible que se trate de la misma delección del exón 1 de PMEL17, según mencionan Jolly et al (2008).

Junto con la delección en el exón 1, se encontraron dos SNP en el exón 11 del gen. Uno de ellos (SNP rs133262489, en la región 3' no traducida) aparece también en el toro Charolais utilizado como control. El otro, un SNP en el codón 612 que produce la sustitución de alanina por ácido glutámico ya había sido identificado por Hetch (2006) y también Jolly et al (2008). Hetch (2006) indicó que esta mutación no cosegregaba con el fenotipo de "cola de rata" en cruza con Simmental. Tam-

poco Gutiérrez Gil et al (2007) o Schmutz y Dreger (2013) le asignaron un rol distintivo a la mutación del exón 11. Queda claro que en el presente caso el haplotipo que comprende a la delección y los dos SNP en los animales con dilución del color y otros posibles efectos como "cola de rata" es "del-T-G", mientras que en animales "normales" el haplotipo es "+-G-C" y "+-G-G" para el toro Charolais. Sería necesario investigar un número muy grande de animales para identificar posibles recombinantes y clarificar el rol de cada mutación.

Como en este caso sólo se evaluaron dos toros Simmental con dilución, no puede confirmarse la identidad del *locus* D^S propio de esa raza. Pero la consistencia entre los haplotipos de toros Simmental con y sin dilución y los animales problema hace que este polimorfismo de PMEL17 sea un muy buen candidato.

Conclusiones

El fenotipo de dilución estudiado puede atribuirse a la delección de un triplete de bases en el exón 1 del gen PMEL17, que ya había sido reportada en otras razas y países. Podría tratarse de una mutación muy antigua, o asumirse que en algún momento ha ocurrido introgresión de material genético entre razas. Ahora se confirma que la mutación está presente en razas carniceras de Argentina, y ante la aparición de nuevos individuos con fenotipos de dilución, puede determinarse la identidad de la mutación en forma expeditiva con la metodología reportada.

La hipótesis de trabajo que se planteó originalmente (una mutación con dos alelos y tres genotipos posibles en interacción con el *locus* Extensión) posiblemente sea un modelo excesivamente simplificado para justificar la gran variabilidad de color en animales con fenotipos de dilución dentro de un mismo genotipo para PMEL17 y MC1R. Es probable que otros genes con efecto sobre la pigmentación estén segregando en esta población. Por esta razón, este rodeo es un buen modelo experimental para continuar la investigación de la regulación genética del color del pelaje en animales domésticos.

Bibliografía

- Brunberg, E., Andersson, L., Cothran, G., Sandberg, K., Mikko, S. y Lindgren, G. 2006. A missense mutation in *PMEL17* is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genetics*. 7:46 doi:10.1186/1471-2156-7-46.
- 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. *P.N.A.S.* 103(5): 1376-1381.
- Crepaldi, P., Marilli, M., Gorni, C., Meggiolaro, D., Cicogna, M. y Renieri, C. 2003. Preliminary study on *MC1R* polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. *Italian J. Anim. Sci.* 2(1): 13-15.
- Delevoeye, C., Giordano, F., Marks, M. S. y Raposo, G. 2011. Biogenesis of Melanosomes. In Borovansky, J. y Riley, P. A. ed. *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions*. First Edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 247-280.
- Fernández Macedo, G. 2008. Asociación de polimorfismos en el gen de leptina con composición corporal de novillos Brangus. Programa de Postgrado en Ciencias Agrarias, Área Producción y Sanidad Animal. Unidad Integrada Balcarce (UNMDP/INTA). 103 p.
- Gutiérrez-Gil, B., Wiener, P. y Williams, J.L. 2007. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais × Holstein population. *BMC Genetics* 8: 56-68.
- Hansen, P.J. 1990. Effects of coat color on physiological responses to solar radiation in Holsteins. *Vet. Rec.* 127:333-334.
- Hecht, B.C. 2006. Sequence analysis of *PMEL17* as a candidate gene for causing rat-tail syndrome in cattle. Tesis MSc. USA. Brigham Young University, Provo Utah, U.S.A. 26 p.
- It, V., Rogberg, A. y Díaz, S. 2010. Genética del color de la pigmentación. In Giovambattista, G. y Peral García, P. ed. *Genética de animales domésticos*. Buenos Aires: Editorial Intermedia. pp. 41-71.
- Jolly, R.D., Wills, J.L., Kenny, J.E., Cahill, J.I. y Howe, L. 2008. Coat-colour dilution and hypotrichosis in Hereford crossbred calves. *N. Zeal. Vet. J.* 56(2): 74-77.
- Kerje, S., Sharma, P., Gunnarsson, U., Kim, H., Bagchi, S., Fredriksson, R., Schütz, K., Jensen, P., Heijne, G., Okimoto, R. y Andersson, L. 2004. The dominant white, dun and smoky color variants in chicken are associated with Insertion/Deletion polymorphisms in the *PMEL17* gene. *Genetics*. 168: 1507-1518.
- King, V.L., Denise, S.K., Armstrong, D.V., Torabi, M. y Wiersma, F. 1988. Effects of a hot climate on the performance of first lactation Holstein cows grouped by coat color. *J. Dairy Sci.* 71:1093-1096.
- Klungland, H., Våge, D.I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S. y Hen, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6: 636-639.
- Kuhn, C. y Weikard, R. 2007. An investigation into the genetic background of coat colour dilution in a Charolais × German Holstein F2 resource population. *Anim. Genet.* 38: 109-113.
- Mclean, K.L. y Schmutz, S.M. 2009. Associations of melanocortin 1 receptor genotype with growth and carcass traits in beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 8: 295-300.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. y Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc. Acid Res.* 16(3): 1215.
- Olson, T.A. 1999. Genetics of Colour Variation. In Fries, R. y Ruvinsky, A. Ed. *The Genetics of Cattle*. Wallingford. CABI. pp. 33-54.
- Schalles, R.R. y Cundiff, L.V. 1999. Inheritance of the "rat-tail" syndrome and its effect on calf performance. *J. Anim. Sci.* 77: 1144-1147.
- Schmutz, S.M. y Dreger, D.L. 2013. Interaction of *MC1R* and *PMEL* alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Anim. Genet.* 44(1): 9-13.
- Theos, A.C., Truschel, S.T., Raposo G. y Marks, M.S. 2005. The silver locus product *pmel17/gp100/silv/me20*: controversial in name and in function. *Pigm. Cell Res.* 18: 322-336.