



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Estudio molecular de genes candidatos para el color de
capa de llamas (*Lama glama*)**

Tesista: Lic. Melina Anello

Director/a: Dra. Florencia Di Rocco

Codirector/a: Dra. Lidia Vidal Rioja

Año: 2019

El presente trabajo de tesis es para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. Se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) CONICET-UNLP-CIC- La Plata bajo la dirección de la Dra. Florencia Di Rocco y la codirección de la Dra. Lidia Vidal Rioja.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi directora, Flor, por todo lo que hiciste, que es mucho más que ser directora. Por enseñarme y formarme como profesional, y tantas veces como persona, sin nunca dejar de darme la libertad para tomar mis propias decisiones. Por acompañarme y dejarme crecer. Por todo el tiempo personal que me dedicaste, que va mucho más allá de un trabajo, todo el esfuerzo mental (y económico también), que pusiste en todos estos años para mi formación. Porque a pesar de las diferencias o discusiones, que siempre se tienen, nunca dejaste de confiar en mí. Por tratarme como a un par, discutiendo ideas, resultados y proyectos. Si tuviera que volver el tiempo atrás y decidir nuevamente un director de tesis, volvería a elegirte sin dudarlo.

Gracias a mi codirectora, “la Dra.”, por haber estado siempre acompañándome durante mi tesis. Por preocuparse de que no me falte nada para trabajar. Por corregirme innumerables veces los resúmenes, póster y trabajos con rojo, azul, verde...hasta quedarse sin colores! Por escucharme explicar y presentar mis resultados. Por aconsejarme siempre y por haber ayudado a formarme como profesional.

Gracias a la Universidad Nacional de La Plata, en especial a la Facultad de Ciencias Exactas, a la CIC y al CONICET por brindarme el espacio y el apoyo económico para mi formación académica.

Gracias a todo el personal y autoridades del IMBICE por recibirme durante tantos años y por hacer del laboratorio un lugar al que es placentero ir a trabajar y compartir con ustedes. En especial, gracias al grupo de becarios, con quienes compartimos tantos momentos y recuerdos.

Gracias a las chicas del LAB 6, que me acompañaron, me ayudaron, me soportaron, rieron y lloraron conmigo durante esta tesis. A las que están y a las que estuvieron durante este tiempo: Pau, Diana, Rebe, Vito, Sol, Elita, Sil y Estefi.

Gracias a Estefi por ser más que una compañera, por ser mi hermanita y mi psicóloga y por tantas charlas que compartimos. Por bancarme siempre aunque yo haya sido peor que Florencia con las correcciones de tu tesina (esa todavía no te la perdoné...).

Gracias a Sil por todos los momentos que pasamos juntas, muestreos, congresos, viajes y búsquedas de pilotos! Por ser una excelente compañera de trabajo que entiende y comparte lo que significa esto para nosotras.

Gracias a Miri por ser incondicional en todo momento, por ayudarme a sobrellevar trabajo y gente, por entenderme, por acompañarme al medio de la nada a buscar muestras y pelearse con toros para protegerlas!

Gracias a Silvia, por ayudarme a llevar a cabo un experimento que parecía imposible. Por haber confiado en mí y por tantos consejos laborales y personales que me diste siempre. Sin duda, una integrante no oficial del Laboratorio de Genética Molecular.

Gracias a todos aquellos que colaboraron con mi trabajo, sin cuyos aportes no hubiese sido posible llevar a cabo esta tesis: a la Dra. Sandra Romero, al Dr. Eduardo Frank, al Ing. Francisco Rigalt, al Dr. Marcelo Miragaya, al Dr. Emilio De Simone y a todo el equipo de trabajo que los acompaña. A los productores de Llamas Carlos Poplavsky, Carlos Rusconi y Lilian Brodtmann. Gracias a todos por interesarse en el trabajo que realizamos y colaborar aportando su tiempo y sus recursos para la toma de muestras.

Gracias al Dr. Carlo Renieri por recibirme en su laboratorio de Italia, por ocuparse de mí y por ayudarme a llevar a cabo una parte muy importante de mi tesis. Gracias también a Cristina, Stefano, Irene y Dario, por ser excelentes compañeros de trabajo, por recibirme con la mejor predisposición y por haberme ayudado durante mi estadía.

Gracias a Euge, Lau y Ana por compartir momentos y ser mis psicólogas en este último tiempo que tanto lo necesité. Gracias chicas por entenderme y aconsejarme.

Gracias a Sole, Flachi y Marita, mis amigas que conocí en la facu, hace ya diez años (diez?!) y desde ese momento nunca dejaron de estar. Cada vez que nos vemos se siente como si el tiempo no hubiera pasado! Gracias por estar siempre, por entenderme (tal vez quienes mejor lo hacen!), por compartir conmigo viajes, cursos, congresos y sobre todo momentos inigualables de la vida!

Gracias a Eli, Diane, Lula y Celi, mis amigas de toda la vida. Gracias porque a pesar de que vivimos lejos, de que tenemos distintas ocupaciones y, muchas veces, distintas opiniones, siempre están y siempre me acompañan! Gracias por bancarme, por reírse

conmigo y por ser la voz de mi consciencia cuando la mía no funciona. Gracias por todos los momentos que pasamos!

Gracias a Santi por ser el mejor novio que se pueda imaginar. Por estar durante todos estos años de manera incondicional, por entender lo importante que es para mí esta tesis y ayudarme a llevarla a cabo. Gracias por escucharme hablar de cosas que ni conocías (ahora sí, ya hasta sabes hacer PCRs!), por darme tu opinión, por calmarme y enseñarme a ver las cosas de otra manera. Gracias por acompañarme en congresos, viajes, cenas, etc., siempre con la mejor predisposición y con una sonrisa. Gracias por todos lo que vivimos juntos y por todo lo que vendrá!

Gracias a mi familia, en especial mis papás Marcela y Edgardo, por acompañarme siempre, por darme la confianza de ser quien soy. Por estar en las buenas y en las malas. Por comprender mis momentos de ausencia y por festejar mis logros como si fueran propios. Gracias. Este trabajo de tesis doctoral está dedicado a ustedes!

PUBLICACIONES DERIVAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

En revistas internacionales con referato:

- CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF KIT AND MITF-M GENES IN LLAMAS AND THEIR RELATION TO WHITE COAT COLOR. **M. Anello**, M. S. Daverio, M. B. Silbestro, L. Vidal-Rioja and F. Di Rocco. 2019. Animal Genetics, 50(2):143-149. Doi:10.1111/age.12769
- TYR GENE IN LLAMAS: POLYMORPHISMS AND EXPRESSION STUDY IN DIFFERENT COLOR PHENOTYPES. **Anello M**, Fernández E, Daverio MS, Vidal-Rioja L and Di Rocco F. 2019. Frontiers in Genetics. 10:568. doi: 10.3389/fgene.2019.00568

Capítulos en libros:

- CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF SLC7A11 IN LLAMAS. **M. Anello**, E. Fernandez, M. Silbestro, F. Veiga, L. Vidal Rioja, F. Di Rocco. En Advances in Fibre Production Science in South American Camelids and other Fibre Animals. M. Gerken, C. Renieri, D. Allain, H. Galbraith, J. P. Gutiérrez, L. McKenna, R. Niznikowski, M. Wurzinger (eds.) (2019). Universitätsverlag Göttingen, Göttingen. ISBN: 978-3-86395-408-6. DOI: <https://doi.org/10.17875/gup2019-1158>
- ADVANCES IN LLAMA (Lama Glama) COAT COLOR GENETICS. M.S. Daverio, **M. Anello**, L. Vidal Rioja, F. Di Rocco. En Advances in Fibre Production Science in South American Camelids and other Fibre Animals. M. Gerken, C. Renieri, D. Allain, H. Galbraith, J. P. Gutiérrez, L. McKenna, R. Niznikowski, M. Wurzinger (eds.) (2019). Universitätsverlag Göttingen, Göttingen. ISBN: 978-3-86395-408-6. DOI: <https://doi.org/10.17875/gup2019-1158>

RESUMEN

La llama es el más grande de los Camélidos Sudamericanos domésticos y el más abundante en Argentina. Es una especie productora de fibra que se caracteriza por presentar una gran diversidad de colores y patrones de pigmentación. El color de la fibra tiene un impacto directo sobre su valor comercial, siendo el blanco uno de los colores más buscados. La pigmentación en los mamíferos es un proceso altamente conservado en el cual el color de capa base está dado por la relación entre eumelanina y feomelanina, controlada principalmente por los genes MC1R y ASIP. Se conoce que la producción de eumelanina en la llama está asociada a mutaciones recesivas en la región codificante de ASIP, mientras que los alelos de MC1R muestran asociación con la presencia/ausencia de pigmento. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular que genera el fenotipo blanco. El objetivo general de esta tesis es estudiar a nivel molecular genes que intervienen en la ruta de síntesis de los pigmentos y determinar su rol en la producción del color de capa blanco en llamas. En primer lugar se realizó un estudio de los alelos de MC1R para determinar su asociación con este color. Se logró identificar el alelo dominante de la serie (alelo E) y se confirmó que MC1R*2 está asociado al blanco pero, necesariamente debe existir otro gen implicado en la producción de este fenotipo. En base a esto, se evaluaron distintas hipótesis que plantean mecanismos alternativos para la obtención del fenotipo blanco. Se estudiaron los genes KIT y MITF y los genes TYR y SLC7A11 relacionados con alteraciones en el desarrollo, la diferenciación o la migración de los melanocitos y con la dilución de melaninas o hipopigmentación, respectivamente. Para todos ellos se secuenció y se describió la región codificante y se estudiaron sus polimorfismos y su expresión en llamas con distintos fenotipos de color. No se encontraron mutaciones en ninguno de ellos que puedan ser causales del fenotipo blanco, pero se observó que todos los genes se expresaron significativamente menos en las llamas blancas respecto de las pigmentadas. Este patrón de expresión se puede explicar por la acción de ASIP. Se observó que este gen presenta una sobreexpresión en animales blancos y feomelánicos comparado con los negros. Se estudiaron las variantes transcripcionales de ASIP y se pudo determinar que la sobreexpresión es causada por un transcrito cuya región 5'UTR

pertenece al gen NCOA6, sugiriendo que existe un reordenamiento de ASIP en el genoma de las llamas con los fenotipos blanco y feomelánico. Este transcripto podría corresponder al alelo de ASIP denominado A^{wt}. Finalmente, considerando los alelos de MC1R y de ASIP se propone un modelo para la producción de los fenotipos de color de capa sólidos en la llama.

ABSTRACT

The llama is the largest of the domestic South American Camelids and the most abundant in Argentina. It is a fiber-producing species that presents a great diversity of coat colors and pigmentation patterns. Fiber color has a direct impact on its commercial value and white is one of the most cherished colors. Pigmentation in mammals is a highly conserved process in which the base coat color is given by the relationship between eumelanin and pheomelanin, controlled mainly by MC1R and ASIP genes. The production of eumelanin in llamas is associated with recessive mutations in the coding region of ASIP, while the alleles of MC1R show association with the presence/absence of pigment. However, the molecular mechanism that controls the white phenotype is still unknown. The main objective of this thesis is to study, at the molecular level, genes involved in the pigmentation pathway and determine their role in the production of white color in llamas. First, MC1R alleles were studied to determine their association with this color. The dominant allele of the series (E allele) was identified, and the association between MC1R*2 and white was confirmed, although another gene is necessarily involved in the production of this phenotype. Based on this, different hypotheses that propose alternative mechanisms for the production of the white phenotype were evaluated. The genes KIT and MITF and TYR and SLC7A11 that are related to alterations in the development, differentiation or migration of melanocytes and to melanin dilution or hypopigmentation, respectively, were studied. Their coding region was sequenced and their polymorphisms and expression levels were described for llamas with different color phenotypes. No mutations were found in any of them that could cause the white phenotype, but it was observed that all genes were significantly less expressed in white llamas compared to pigmented ones. This expression pattern can be explained by the action of ASIP. This gene was overexpressed in white and pheomelanic compared to black llamas. The study of transcriptional variants of ASIP allowed to determine that the overexpression due to a transcript whose 5'UTR region belongs to the NCOA6 gene, suggesting a rearrangement of ASIP in the genome of llamas with white and pheomelanic phenotypes. This transcript could

correspond to the ASIP allele called A^{wt} . Finally, considering the alleles of MC1R and ASIP, a model for the production of solid coat color phenotypes in the llama is proposed.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
PUBLICACIONES DERIVAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	9
ÍNDICE	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	15
ÍNDICE DE FIGURAS.....	17
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO GENERAL	19
1.1 INTRODUCCIÓN	20
1.1.1 Camélidos Sudamericanos.....	20
1.1.2 La llama.....	21
1.1.3 Domesticación y color de capa.....	23
1.1.4 El proceso de pigmentación	26
1.1.5 Variaciones en el color de capa.....	29
1.1.6 Antecedentes en el estudio del color de capa de camélidos domésticos	30
1.2 OBJETIVO GENERAL	32
CAPÍTULO 2: EL GEN MC1R.....	33
2.1 INTRODUCCIÓN	34
2.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.3.1 Muestras y extracción de ADN	36
2.3.2 Genotipado de SNPs del MC1R	36

2.3.3	Análisis estadístico.....	38
2.3.4	Predicción del efecto de los cambios no sinónimos en la proteína	39
2.4	RESULTADOS.....	39
2.4.1	SNPs, haplotipos de MC1R y los fenotipos de color.....	39
2.4.2	Predicción del efecto de los SNPs en la proteína	43
2.5	DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO 3: LOS GENES KIT Y MITF		47
3.1	INTRODUCCIÓN	48
3.2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.3.1	Muestras.....	50
3.3.2	Extracción de ARN y síntesis de cADN.....	51
3.3.3	Secuenciación y descripción de KIT y MITF-M.	51
3.3.4	Perfiles de expresión génica	54
3.4	RESULTADOS.....	56
3.4.1	KIT	56
3.4.2	MITF-M	59
3.4.3	Perfiles de expresión	61
3.5	DISCUSIÓN	62
CAPÍTULO 4: EL GEN TYR		65
4.1	INTRODUCCIÓN	66
4.2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
4.3.1	Muestras.....	68
4.3.2	Extracción de ADN y amplificación por PCR	69
4.3.3	Genotipado y análisis de polimorfismos de interés	71

4.3.4 Extracción de ARN y análisis de expresión	73
4.4 RESULTADOS.....	74
4.4.1 Descripción del gen TYR	74
4.4.2 Polimorfismos de TYR y fenotipos de color.....	77
4.4.3 Expresión de TYR en diferentes fenotipos de color	81
4.4.4 Regiones reguladoras del gen TYR en llamas	82
4.5 DISCUSIÓN	85
CAPITULO 5: EL GEN SLC7A11	89
5.1 INTRODUCCION	90
5.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	92
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
5.3.1 Muestras y extracción de ARN	92
5.3.2 Secuenciación y descripción de SLC7A11	93
5.3.3. Estudio de expresión	94
5.4 RESULTADOS.....	95
5.4.1. Descripción de SLC7A11	95
5.4.2 Expresión de SLC7A11	98
5.5 DISCUSIÓN	98
CAPÍTULO 6: EL GEN ASIP	100
6.1 INTRODUCCIÓN	101
6.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	103
6.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
6.3.1 Obtención y caracterización de las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP	104
6.3.2 Secuenciación de las regiones genómicas que comprenden los exones no codificantes.....	107

6.3.3 Expresión de los transcritos de ASIP	108
6.4 RESULTADOS.....	110
6.4.1 Descripción de las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP	110
6.4.2 Análisis de expresión	114
6.5 DISCUSIÓN	115
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL.....	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
ANEXO.....	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Definición de los principales haplotipos de MC1R en la llama.	35
Tabla 2.2. Primers alelo-específicos para genotipar los haplotipos de MC1R.	37
Tabla 2.3. Distribución de genotipos observada para MC1R.	41
Tabla 3.1. Lista de primers utilizados para la amplificación de KIT y MITF-M.	52
Tabla 3.2. Lista de primers utilizados para el análisis de la expresión de KIT y MITF-M.	54
Tabla 3.3. Polimorfismos encontrados en el gen KIT.	57
Tabla 3.4. Distribución de genotipos entre grupos de color para los polimorfismos no sinónimos de KIT.	58
Tabla 4.1. Lista de primers empleados la descripción de TYR.	69
Tabla 4.2. Primers alelo-específicos usados para el genotipado de los polimorfismos de interés de TYR.	71
Tabla 4.3. Primers empleados para el estudio de expresión de TYR.	72
Tabla 4.4. Alelos observados en homocigosis para el microsatélite del intrón 2.	77
Tabla 4.5. Alelos y genotipos observados para el microsatélite del intrón 4.	78
Tabla 4.6. Distribución de genotipos entre grupos fenotípicos.	79
Tabla 4.7. Distribución de haplotipos entre grupos fenotípicos.	79
Tabla 5.1. Lista de primers utilizados para la secuenciación de SLC7A11.	92
Tabla 5.2. Primers empleados para el estudio de expresión de SLC7A11.	93
Tabla 5.3. Exones de SLC7A11 y polimorfismos en llama.	96
Tabla 6.1. Primers empleados para RACE-PCR.	105

Tabla 6.2. Primers empleados para amplificar y secuenciar las regiones genómicas de ASIP que comprenden los exones no codificantes.	107
Tabla 6.3. Primers empleados para la cuantificación de la expresión de los transcritos de ASIP.	108
Tabla 6.4. Transcritos de ASIP aislados de la piel de la llama.	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Especies de camélidos sudamericanos.	21
Figura 1.2. Fotografías de llamas ilustrando algunos fenotipos de color.	25
Figura 1.3. Etapas del proceso de la pigmentación.	26
Figura 1.4. Esquema de la primera etapa de la melanogénesis dentro de un melanocito.	27
Figura 1.5. Síntesis de melaninas.	28
Figura 2.1. Asignación de genotipos para el SNP c.259G>A.	38
Figura 2.2. Distribución de frecuencias genotípicas relativas en llamas blancas y pigmentadas.	40
Figura 3.1. Representación esquemática del diseño de los primers para la amplificación de las variantes transcripcionales MITF-M (-) y MITF-M (+).	53
Figura 3.2. Esquema de la proteína codificada por KIT.	55
Figura 3.3. Variantes de splicing de MITF-M.	59
Figura 3.4. Expresión relativa de KIT, MITF-M, MITFM(-) y MITF-M(+) en piel de llamas.	61
Figura 4.1. Alineamiento múltiples de la secuencia de la proteína TYR para distintas especies.	74
Figura 4.2. Representación esquemática del gen TYR con su distribución de polimorfismos en llamas.	76
Figura 4.3. Alineamiento de los tres tipos de alelos del microsatélite en el intrón 2 del gen TYR de llama.	77
Figura 4.4. Expresión relativa de TYR en la piel de las llamas.	81
Figura 4.5. (A) Región promotora proximal del gen TYR. (B) Región LCR.	83
Figura 5.1. Ejemplo del efecto del locus Intenso (I) en perros sabuesos afganos.	89

Figura 5.2. Efecto de la mutación <i>sut</i> sobre el fenotipo de color en ratones.	90
Figura 5.3. (A) Alineamiento de la secuencia de la proteína SLC7A11 de la llama con proteínas ortólogas. (B) Predicción de la localización de los dominios transmembrana de SLC7A11.	95
Figura 5.4. Expresión relativa de SLC7A11 en llamas.	97
Figura 6.1. (A) Estructura genómica de ASIP en ratón y cerdo. (B) ARNm con diferentes 5'UTR aislados de la piel de cerdo.	101
Figura 6.2. Esquema de primers para PCR-RACE.	105
Figura 6.3. Esquema de la organización propuesta para el gen ASIP en la llama.	113
Figura 6.4. Expresión relativa de ASIP total y de T6 en la piel de la llama.	114
Figura 7.1. Modelo para la producción de los fenotipos de color de capa sólidos en la llama.	124

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Camélidos Sudamericanos

La familia Camelidae está compuesta por los Camélidos del Viejo Mundo (camello, bactriano y dromedario) y los Camélidos Sudamericanos, dentro de los cuales se reconocen cuatro especies: guanaco (*Lama guanicoe*), vicuña (*Vicugna vicugna*), llama (*Lama glama*) y alpaca (*Vicugna pacos*). El guanaco y la vicuña son especies silvestres que derivaron de un ancestro común hace aproximadamente dos millones de años y por domesticación dieron origen a la llama y la alpaca (Kadwell et al., 2001; Marín et al., 2007).

En la actualidad, las llamas, alpacas y vicuñas habitan la zona alto-andina, entre los 3.800 y 4.500 metros sobre el nivel del mar en Argentina, Perú, Bolivia y Chile. Los guanacos presentan una distribución más amplia, abarcando desde los 8° hasta los 55° de latitud sur en Tierra del Fuego. Se pueden encontrar individuos en altitudes que varían desde el nivel del mar hasta los 5.200 metros de altitud (Franklin, 1982).

Las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos poseen características comunes, como la presencia de glándulas metatarsianas, una almohadilla plantar en cada dedo, labio leporino, organización social polígama, ausencia de marcado dimorfismo sexual y ovulación inducida con la producción de una sola cría por parto (Wheeler, 1991). A su vez, las cuatro especies presentan el mismo cariotipo $2n=74$ (Taylor et al., 1968) y pueden producir híbridos fértiles.

El guanaco es el Camélido Sudamericano más grande, con una altura a la cruz de entre 100 y 120 cm, y un peso de alrededor de 100 kg. Su pelaje es de color amarronado, con el pecho, el vientre y la entrepierna blancos; la cabeza presenta distintos tonos de grises, con zonas más claras alrededor de los ojos y base de las orejas (Figura 1.1 A).

La vicuña, en cambio, es el Camélido Sudamericano más pequeño. Mide cerca de 80 cm y pesa alrededor de 35-40 kg. El color del pelaje es beige o marrón claro rojizo en el lomo con áreas blancas en el vientre y las patas (Figura 1.1 B). Existen dos subespecies

geográficas: al sur *Vicugna vicugna vicugna* (Molina, 1872) y al norte *Vicugna vicugna mensalis* (Thomas, 1917), que se distingue de la primera por la presencia de un típico mechón pectoral de casi 20 cm de largo. La fibra de vicuña está considerada una de las más finas del mundo.

La alpaca, junto con la llama, es una especie de Camélidos Sudamericanos doméstica (Figura 1.1 D). La distribución actual de la alpaca abarca una franja desde el norte de Perú hasta el sur de Bolivia, con muy pocos animales en el norte de Chile y de Argentina (De Lamo, 2011). Esta especie se cría principalmente por su fibra, que presenta una finura similar a la de la vicuña.

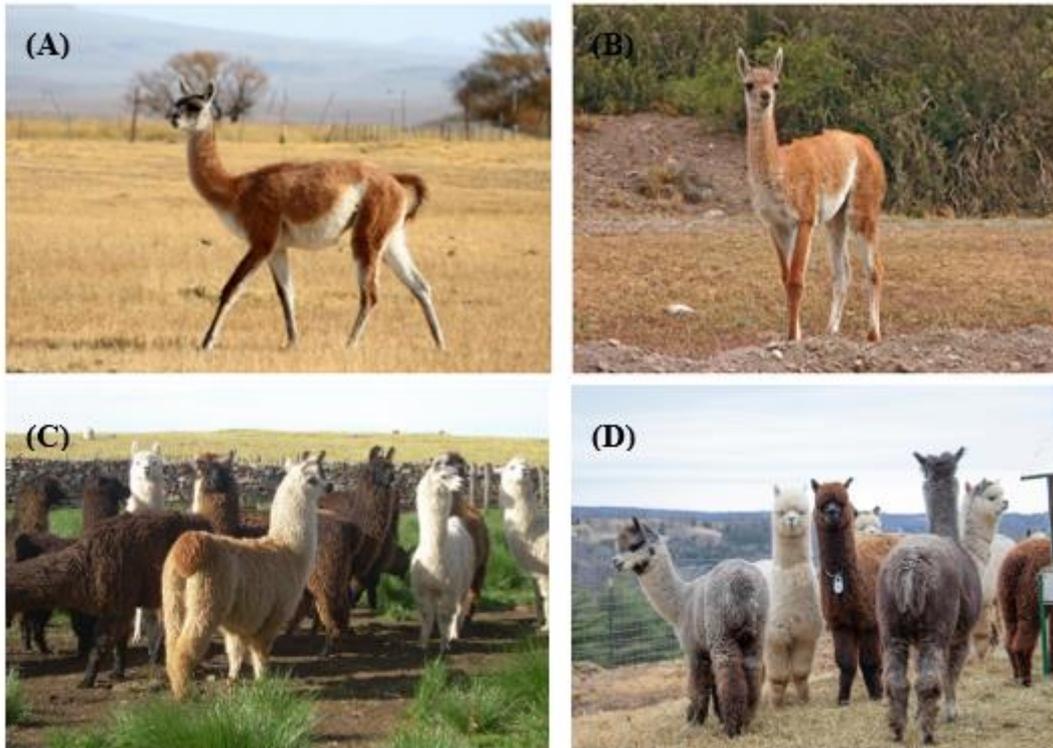


Figura 1.1. Especies de camélidos sudamericanos. (A) Guanaco. (B) Vicuña. (C) Llamas. (D) Alpacas.

1.1.2 La llama

La llama es el más grande de los Camélidos Sudamericanos domésticos y el más abundante en Argentina (Figura 1.1 D). Se asemeja en muchos aspectos morfológicos y comportamentales a su progenitor silvestre, el guanaco. Existen dos variedades

fenotípicas: el tipo Pelado o K'ara, que tiene poca fibra en el cuerpo con la cara y las patas peladas, y el tipo Lanudo o Ch'aku, con mayor cantidad de fibra en el cuerpo cubriendo la cabeza y las orejas (Wheeler, 1991).

Durante la época incaica, la llama se utilizaba principalmente como animal de carga ya que podía llevar hasta 40 kg de peso y desplazarse fácilmente por terrenos empinados. También se aprovechaba su fibra para la confección de vestimenta, el cuero para la elaboración de calzado y otros objetos, y la carne era consumida tanto fresca como secada al sol y deshidratada (charqui). Además, la llama era sacrificada como ofrenda para los dioses. Con la expansión del imperio Inca, caravanas de llamas acompañaron a los ejércitos reales, extendiendo su distribución a lo largo de los Andes, desde el sur de Colombia pasando por Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina hasta a la zona central de Chile (Wheeler et al., 1995). Posteriormente, durante la conquista, los españoles reemplazaron a las llamas y alpacas con sus propias especies domésticas (principalmente ovejas y vacas), por lo cual tanto el número de animales como su rango de distribución geográfica disminuyó considerablemente (FAO, 2005).

En la actualidad los países andinos reconocen la importancia de las especies de camélidos domésticos para su cultura y desarrollo rural. Según los datos del último censo ganadero nacional, en el año 2002, había 161.402 llamas en Argentina (INDEC, 2002) y el número estimado para 2014 era de al menos 200.000 (Muller et al., 2015). La investigación sobre el manejo y la cría de la llama (y la de la alpaca) se ha establecido y junto con el desarrollo de las industrias involucradas en la producción de fibra y carne son consideradas un recurso fundamental para el progreso rural de ciertas regiones, principalmente en la Puna (Paz et al., 2012). Se estima que en Argentina, la cantidad anual de fibra de llama producida es de aproximadamente 60.000 kg, incluidos unos 20.000 kg de fibra de uso doméstico (MECON, 2010).

En los últimos años se han exportado llamas a Estados Unidos, Europa, Australia y Nueva Zelanda, donde hay un creciente interés por esta especie, no solo como animales productores de carne, cuero y fibra, si no también como mascotas y utilizados en zooterapias (Quispe et al., 2009).

1.1.3 Domesticación y color de capa

Una característica general de los animales domésticos modernos es su gran variación fenotípica, que no se encuentra en ninguno de sus ancestros silvestres. Una de las diferencias más evidentes entre los animales domesticados y los salvajes es la coloración del pelaje. Los animales silvestres suelen presentar un fenotipo uniforme con colores y patrones específicos para cada especie. Por el contrario, los animales domésticos son altamente variables tanto en colores como en patrones de color. Estas diferencias se deben al manejo realizado por el hombre, mediante el cual se fueron seleccionando ciertas características fenotípicas que se creían ventajosas o atractivas (Cieslak et al., 2011; Kaelin and Barsh, 2013).

La domesticación de los camélidos sudamericanos y la diversidad fenotípica de estos fue moldeada inicialmente por las necesidades de los primeros amerindios y por los cambios en las prácticas de la reproducción después de la llegada de los europeos y la conquista española (Kadwell et al., 2001). Se ha planteado ampliamente la hipótesis de que las llamas se seleccionaron primero por rasgos asociados con la producción de carne para consumo humano, luego por su capacidad para transportar cargas pesadas y más recientemente por las características de su fibra. La alpaca, en cambio, habría sido principalmente seleccionada por su fibra, por lo cual su coloración del pelaje es mucho más uniforme que la de la llama. Sin embargo, es posible que las variaciones del color del pelaje producidas en alpacas se hayan incorporado rápidamente a las llamas, dado el uso de llamas machos en cruzamientos con alpacas hembras (Marín et al., 2018).

Con el propósito de caracterizar la fibra de las llamas argentinas Frank et al. (2006) propusieron una clasificación que incluye la estructura del vellón, el patrón pigmentario, el tipo de mancha, el color de la capa y la categoría de finura. El color de la capa en esta especie se refiere al color del vellón que recubre uniformemente el cuerpo del animal incluyendo las extremidades. A diferencia de otros parámetros de interés productivo relacionados a la calidad, como el peso del vellón o el diámetro de la fibra, que son caracteres cuantitativos e influenciados por el ambiente, el color de capa es de herencia mendeliana, con escasa o nula influencia ambiental.

La llamas se caracterizan por presentar una gran diversidad de colores y patrones de pigmentación. Los colores sólidos van desde el negro pasando por marrón chocolate y muchos tonos de marrón claro (de rojo a crema pálido) hasta la capa blanca completa. También presentan manchas y patrones, como el marrón rojizo con cara y patas negras. En la Figura 1.2 se muestran algunos ejemplos de los fenotipos de color en la llama.

Según estudios realizados por (Hick et al., 2009) y Frank et al. (2006), en la provincia de Jujuy el 41% de las llamas son blancas, el 27% marrón claro y el 16% por ciento marrón chocolate. Solo el 16% es de otros colores como negro, gris o mixto. En la provincia de Catamarca, en cambio, las llamas marrones son más comunes (Rigalt, comunicación personal).



Figura 1.2. Fotografías de llamas ilustrando algunos fenotipos de color. (A) Negro. (B) Marrón rojizo (feomelánico no diluido). (C) Marrón rojizo con cara y patas negras. (D) Gris. (E) Marrón claro (feomelánico diluido). (F) Blanco.

1.1.4 El proceso de pigmentación

A pesar de algunas diferencias, la pigmentación en los mamíferos es un proceso altamente conservado. Se puede dividir en las siguientes etapas (Figura 1.3):

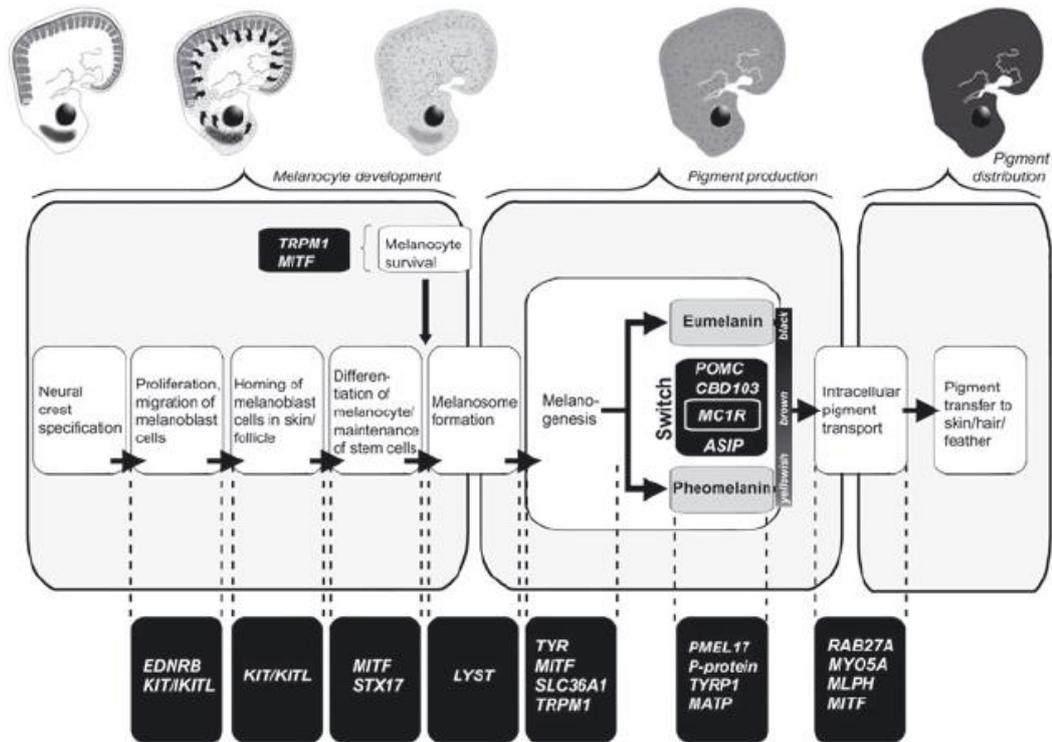


Figura 1.3. Etapas del proceso de la pigmentación. Progresión del desarrollo de las células pigmentarias, síntesis de pigmentos, transporte de pigmentos intracelulares y transferencia de pigmentos. Las cajas blancas muestran las etapas del proceso de pigmentación y las cajas negras muestran los genes asociados con el color en cada etapa. Reproducida de Cieslak et al. (2011).

- **Desarrollo de los melanocitos**

Durante la embriogénesis de los vertebrados, las células de la cresta neural se distribuyen a lo largo del tubo neural dorsal y algunas de ellas se diferencian en melanoblastos (precursores de los melanocitos). Los melanoblastos ingresan en la epidermis y se localizan en los folículos del pelo, donde se diferencian a melanocitos. La especificación de los melanoblastos, la migración y la diferenciación de melanocitos dependen de una cascada de señales moleculares, que incluye sistemas ligando-receptor como el receptor de endotelina tipo B (EDNRB) y endotelina 3 (EDN3) o el receptor KIT y su ligando (KITL), y factores de transcripción como el factor de

transcripción asociado a la microftalmia (MITF), la caja pareada 3 (PAX3) o la caja determinante del sexo 10 (SOX10).

- **Melanogénesis**

Los melanocitos son los encargados de producir los pigmentos que mediante el proceso de la melanogénesis dan el color de capa. Estos pigmentos son la eumelanina (que va desde el negro al marrón) y la feomelanina (desde el rojo intenso al amarillo claro). La proporción de eumelanina/feomelanina está regulada principalmente por el sistema de ligando-receptor de la proteína de señalización Agutí (ASIP) y el receptor 1 de melanocortina (MC1R). La unión de la hormona melanocito estimulante (α -MSH) a MC1R conduce a un aumento del intermediario cAMP y lleva a la síntesis de eumelanina, mientras que la unión de ASIP inhibe la transducción de señales, disminuyendo el cAMP, lo que provoca que los melanocitos produzcan feomelanina (Figura 1.4).

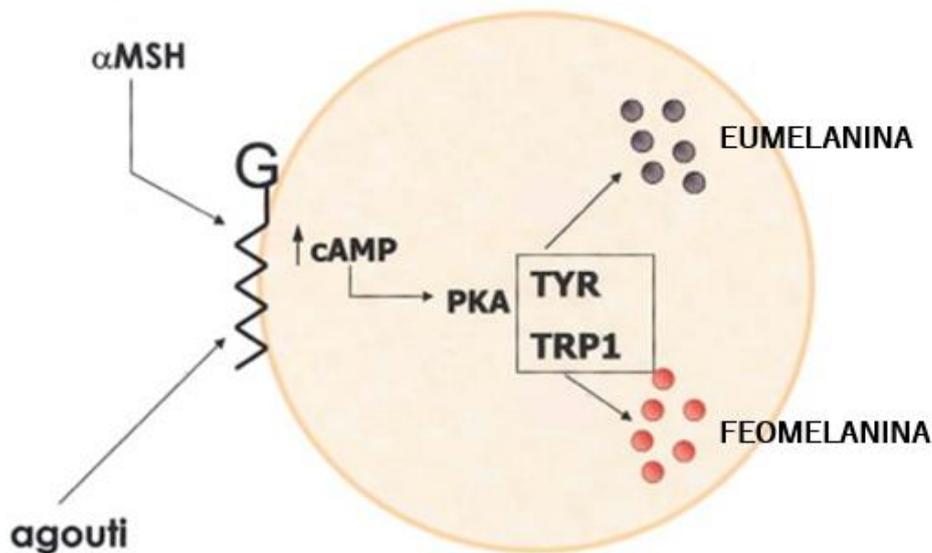


Figura 1.4. Esquema de la primera etapa de la melanogénesis dentro de un melanocito. Se muestra el receptor de membrana MC1R acoplado a proteína G (indicado un zigzag con una G). Adaptada de Rees (2004).

Las melaninas son generadas a partir de L-tirosina en una serie de reacciones con la presencia de la enzima tirosinasa (TYR), la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TYRP1) y la dopacromo tautomerasa (DCT o TYRP2). TYR está involucrada en la

conversión de tirosina en L-dihidroxifenilalanina (DOPA) y luego DOPA en DOPA quinona (DQ). Después de la formación de DQ las rutas de eumelanina y feomelanina se separan. En la síntesis de feomelanina, DQ reacciona con la cisteína para obtener cistenil-DOPAs, que se oxidan y polimerizan aún más para formar pigmentos de feomelanina. Mientras que, en la síntesis de eumelanina, DQ se cicla para formar DOPAcromo, que luego se descarboxila espontáneamente generando 5,6-dihidroxiindol (DHI) y ácido DHI-2-carboxílico (DHICA) en presencia de TYRP2. Finalmente, estos DHI y DHICA se oxidan y polimerizan rápidamente para producir eumelanina. TYRP1 cataliza la oxidación de DHICA (Figura 1.5).

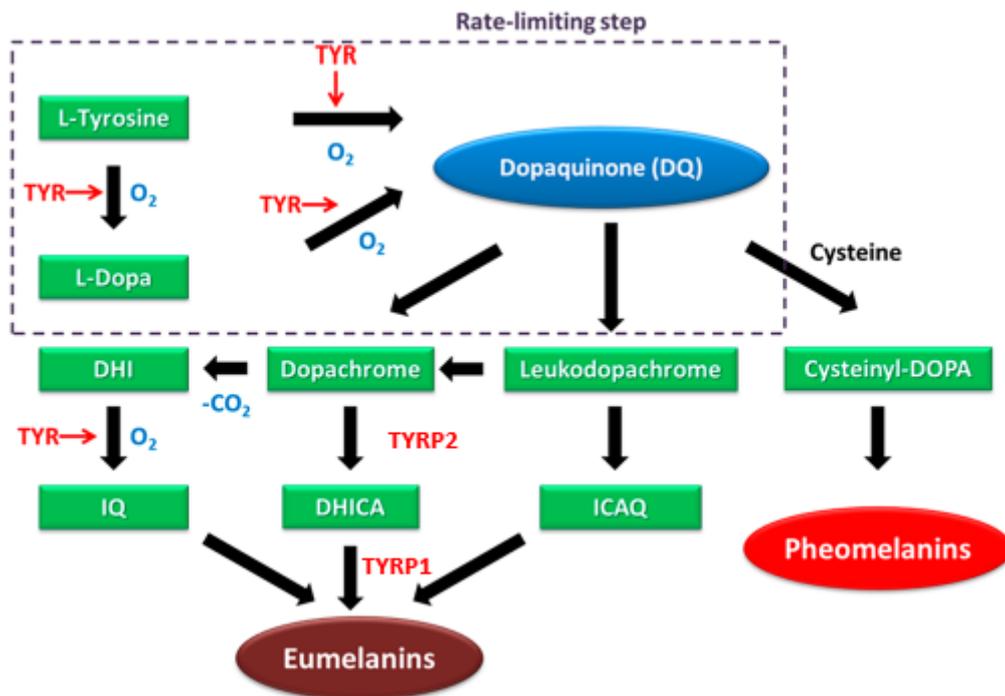


Figura 1.5. Síntesis de melaninas. Adaptada de Pillaiyar et al. (2018).

- **Transporte y transferencia de los pigmentos**

Una vez sintetizados, los pigmentos se empaquetan en melanosomas y se transfieren a los queratinocitos del pelo en formación o a células epidérmicas, donde se observa la coloración. Los melanosomas contienen componentes específicos, como proteínas estructurales (SILV o PMEL17), canales de transporte de membrana, como OCA2, y

portadores de solutos. Entre ellos es importante destacar el intercambiador de cistina/glutamato, que permite que la cistina (dímeros de cisteína) ingrese a los melanosomas para poder llevar a cabo la síntesis de feomelanina. El transporte de los melanosomas se logra gracias a un complejo proteico motor formado por melanofilina (MLPH), RAB27A y miosina VA (MYO5A).

- **Supervivencia de las células madre de los melanocitos**

Los melanocitos que expresan la coloración son recambiados en cada nuevo ciclo del pelo gracias a una reserva de células madre que se ubica en el folículo. Varios genes regulan la supervivencia de los melanocitos, entre ellos MITF y c-KIT a través de la regulación de los genes BCL2 y SNAI2 que tienen funciones anti-apoptóticas (Melanocyte stem cells, StemBook¹).

1.1.5 Variaciones en el color de capa

El fenotipo de color final dependerá de la expresión e interacción de todos los genes involucrados en las distintas etapas del proceso de pigmentación. Se pueden producir alteraciones, que dependiendo de la etapa en que ocurran, producirán variaciones diferentes sobre el fenotipo:

- alteraciones en el desarrollo de los melanocitos, en su diferenciación o migración, suelen producir fenotipos blanco no albino o manchas blancas (Hofstetter et al., 2019; Fontanesi et al., 2014; Hauswirth et al., 2013).
- alteraciones en la etapa de la melanogénesis que afectan a MC1R o a ASIP tienen efecto sobre la proporción de eumelanina/feomelanina. Las mutaciones que generan ganancia de función en el gen MC1R o pérdida de la función de ASIP producen pigmentación eumelánica, mientras que aquellas que causan pérdida de función de MC1R o ganancia de ASIP conducen a fenotipos feomelánicos (Dürig et al., 2018; Schneider et al., 2012). Por otro lado, mutaciones en el gen TYR pueden causar fallas

¹Disponible en: <https://www.stembook.org/node/581>

en la producción de melanina dando como resultado el fenotipo blanco albino (Imes et al., 2006; Utzeri et al., 2016). Mientras que mutaciones en TYRP1 afectan el tipo de eumelanina, produciendo eumelanina marrón oscura en lugar de negra (Becker et al., 2015; Cirera et al., 2016).

- alteraciones en genes que intervienen la formación del melanosoma, de sus canales o que afectan el transporte y la transferencia de los pigmentos, suelen generar fenotipos diluidos (Cirera et al., 2013; Li et al., 2016). La dilución puede afectar a ambos tipos de melaninas o solo a uno.
- si la reserva de melanocitos no se mantiene o éstos no prolifera adecuadamente la coloración del pelo se va perdiendo produciendo un “engrisamiento” (Rosengren Pielberg et al., 2008; Schmutz and Berryere, 2007).

1.1.6 Antecedentes en el estudio del color de capa de camélidos domésticos

Si bien el valor de la fibra de los Camélidos depende mucho su diámetro, el color y tipo de fibra juegan un rol importante en la industria textil (Mueller et al., 2010). Para los productores de llamas, el peso del vellón es de gran importancia, seguido del color, la estructura del vellón y el diámetro medio de la fibra (Frank, Hick and Adot, 2012). En la producción textil, existe una fuerte demanda por el color blanco total, porque es fácil de teñir, y por los colores naturales como el negro, los colorados y castaños (Valbonesi et al., 2011).

El color de la fibra de la llama se ha abordado previamente mediante el estudio de la determinación química de las melaninas y la morfología y ultraestructura de los melanosomas (Cecchi et al., 2004; 2007). También se han realizado cruzamientos de animales, para estudiar la segregación de los fenotipos coloreados (Frank et al. 2006). De acuerdo a estos resultados, los autores postularon que los fenotipos pigmentados están segregados por el locus Agutí y que el color blanco es dominante con penetrancia

incompleta sobre los fenotipos manchados y los pigmentados sólidos. Sin embargo, la falta de conocimiento de las bases moleculares de la producción de color hace que los apareamientos basados solo en el fenotipo del animal proporcionen resultados no deseados o difíciles de predecir.

Comparado con otras especies domésticas, existen pocos estudios moleculares sobre los mecanismos que controlan la pigmentación en camélidos, centrándose principalmente en el color de la alpaca. En esta especie, diferentes autores han estudiado genes relacionados con el proceso de pigmentación: MC1R (Chandramohan et al., 2015; Feeley and Munyard, 2009; Guridi et al., 2011; Powell et al., 2008), ASIP (Chandramohan et al., 2013; Feeley et al., 2011), KIT (Jackling et al., 2014), TYR y MATP (Cransberg and Munyard, 2011). En la llama, existe solo un estudio molecular previo, que se realizó en el mismo laboratorio donde se desarrolló esta tesis, y se estudiaron los genes MC1R y ASIP (Daverio et al., 2016)). En ASIP, se hallaron dos polimorfismos asociados con el color de capa eumelánico mientras que para MC1R, los alelos encontrados en las llamas presentaron una asociación con presencia/ausencia de pigmento. En base a estos resultados, en la presente tesis se propone continuar y ampliar el estudio de genes candidatos para la producción del color de capa en la llama.

1.2 OBJETIVO GENERAL

El color de capa blanco en la llama es uno de los más demandados por los productores. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los mecanismos genéticos que controlan la pigmentación en esta especie y aún se desconoce cómo se genera este fenotipo.

El objetivo general de esta tesis es estudiar a nivel molecular genes que intervienen en la ruta de síntesis de los pigmentos y determinar su rol en la producción del color de capa blanco en llamas.

Las hipótesis a evaluar así como los objetivos específicos se presentarán en cada capítulo.

CAPÍTULO 2: EL GEN MC1R

2.1 INTRODUCCIÓN

El receptor 1 de melanocortina (MC1R) es un receptor acoplado a proteína G con siete dominios transmembrana. Es uno de los reguladores clave del tipo de pigmento que se produce. La activación de MC1R induce al melanocito a producir eumelanina, mientras que la inhibición de MC1R conduce a la producción de feomelanina. En la mayoría de las especies MC1R presenta un alelo dominante (E) que produce color negro y un alelo recesivo (e) responsable del color rojizo (Kijas et al., 1998; Marklund et al., 1996; Schmutz et al., 2003). Asimismo, las mutaciones de ganancia de función en el gen MC1R producen pigmentación eumelánica, mientras que aquellas que causan pérdida de función conducen a fenotipos feomelánicos. También se han descrito otros alelos de MC1R, como el E^M que genera una “máscara de melanina”, visible en perros con capas feomelánicas (Schmutz et al., 2003).

Si bien lo más común es que mutaciones en otros genes sean las responsables del color blanco, en algunos casos se observó que el este fenotipo puede estar relacionado con mutaciones de MC1R. En el “oso negro de Kermode” (*Ursus americanus*) una sustitución en el gen de MC1R produce la pérdida de la pigmentación negra característica de esta especie (Ritland et al., 2001). Además, en perros pastores australianos y huskies siberianos, se observaron diferentes mutaciones que son responsables de los colores crema y blanco en esas respectivas razas (Dürig et al., 2018). En los camélidos existen varios estudios donde se ha observado asociación entre el fenotipo blanco y variaciones en el receptor 1 de melanocortina. Particularmente, una misma sustitución (c.901C>T) fue observada en alpacas (Chandramohan et al., 2015; Feeley and Munyard, 2009; Guridi et al., 2011; Powell et al., 2008) y dromedarios (Almathen et al., 2018; Alshanbari et al., 2019) y su presencia es suficiente para que el fenotipo del animal sea blanco.

La variación del gen MCR1 en llamas se estudió previamente en nuestro laboratorio (Daverio et al., 2016). Al contrario de lo que ocurre en la mayoría de las especies, los alelos de MC1R encontrados en las llamas no se vieron asociados con fenotipos feomelánicos/eumelánicos, sino con presencia/ausencia de pigmento, en tanto que la diferenciación entre producción de eumelanina o feomelanina está determinada por

alelos del gen ASIP. Los alelos de MC1R en la llama están determinados por combinaciones de los SNPs c.259G>A; c.376G>A y c.383T>C, formando tres haplotipos principales (Tabla 2.1). El alelo MC1R*3 es el silvestre, presente en el guanaco, y el alelo MC1R*1 está asociado a la presencia de pigmentos. Si bien el alelo MC1R*2 en homocigosis solo fue observado en el fenotipo blanco, también se observaron llamas blancas con otros genotipos y, debido al limitado número de animales empleados en ese estudio, la asociación no fue concluyente. En este capítulo se propone analizar la relación del alelo MC1R*2 con el fenotipo blanco en la llama aumentando el número de animales analizados.

Tabla 2.1. Definición de los principales haplotipos de MC1R en la llama (Daverio et al. 2016).

	c.259G>A	c.376G>A	c.383T>C
MC1R*1	A	A	T
MC1R*2	G	G	C
MC1R*3	G	G	T

2.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo los resultados previos, se plantea la siguiente hipótesis:

- El gen del receptor 1 de melanocortina (MC1R) presenta un alelo asociado al fenotipo blanco en la llama.

Para evaluar la hipótesis se propone como objetivo específico:

- Determinar si existe asociación entre los SNPs o los haplotipos de MC1R con el fenotipo blanco.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Muestras y extracción de ADN

Se colectaron 114 muestras de llamas procedentes de diversos establecimientos: Cabaña de Ganadería de Catamarca (n=23), Catamarca; Estación Experimental Agropecuaria Abra Pampa (n=27), INTA, Jujuy; Criadero de Llamas Gulla (n=9), Buenos Aires; Facultad de Ciencias Veterinarias (n=17), UBA, Buenos Aires; Criadero de llamas Piedra del Agua (n=34), San Luis; Parador La Quebrada(n=2), Salta; Criadero de llamas Ríos de Arena (n=2), Tucumán.

Se eligieron animales adultos jóvenes no relacionados y de ambos sexos en proporciones similares. Se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular. Se documentó el fenotipo del color, verificando que ninguno de los animales pigmentados tuviera manchas blancas en el cuerpo y se tomaron fotografías siempre que fue posible.

Los fenotipos muestreados se dividieron en dos grupos: blancos (n=44) y pigmentados (n=70). El grupo de llamas pigmentadas agrupó llamas negras, de diferentes tonos de marrón y el fenotipo marrón rojizo con cara y extremidades negras.

El ADN genómico total se extrajo mediante un protocolo con LiCl como se explica en Daverio (2014). El ADN se resuspendió en tampón TE y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

2.3.2 Genotipado de SNPs del MC1R

Para determinar los alelos de MC1R presentes en las muestras, se genotiparon los SNPs c.259G>A y c.383T>C, ya que estos forman los tres principales haplotipos de MC1R (Daverio et al., 2016). Estos últimos están definidos por combinaciones de los SNPs c.259G>A; c.376G>A y c.383T>C, pero como c.259G>A y c.376G>A están en

desequilibrio de ligamiento, sólo es necesario genotipar uno de ellos para obtener el haplotipo (Tabla 2.1).

Se diseñaron primers alelo-específicos para los SNPs c.259G>A y c.383T>C usando la secuencia de MC1R de la llama (GenBank KP715426). Para cada variante, se diseñó un par de primers con el correspondiente nucleótido complementario en el extremo 3' del primer forward (Tabla 2.2). Además, se utilizó una estrategia para mejora la especificidad del primer alelo-específico que consiste en cambiar la cuarta base desde el extremo 3' del primer, de manera tal que para el alelo no correspondiente existan dos bases no complementarias, dificultando aún más la unión inespecífica.

Tabla 2.2. Primers alelo-específicos para genotipar los haplotipos de MC1R

Primer	Secuencia 5'-3'	T annealing (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
MC1R259G-F	CCGCGTCGGACCTGTTGG	64	331
MC1R259G-R	CAGAGGAGGACGGCTGTGTG		
MC1R259A-F	CCGCGTCGGACCTGTTGA	64	439
MC1R259A-R	CTCTTGTGGAGCTGGGCGAT		
MC1R383T-F	TGCCATCACCAAGAACCGCAAC	58	220
MC1R383T-R	AGAGCAGAGGCTGGACCCCA		
MC1R383C-F	TGCCTGGAGGTGTCTGTTCCC	58	299
MC1R383C-R	GAGCAGAGGCTGGACCCCG		

Los primers fueron utilizados para reacciones de PCR en las que se empleó 1U de la enzima Taq FirePol (Solis Biodyne) en una mix con buffer de PCR 1X (Solis Biodyne), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM de cada primer y 40-60 ng de DNA. El perfil del

ciclado consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 50 segundos a la temperatura de annealing correspondiente a cada par de primers, 40 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Cada reacción se llevó a cabo en tubos separados y los productos alélicos, que presentaban diferentes longitudes, se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% corridos a 90V durante 90 minutos. Para la determinación de cada variante se utilizaron muestras control, cuyos genotipos se determinaron por secuenciación. En Figura la 2.1 se muestra un ejemplo de asignación de alelos para el SNP c.259G>A.

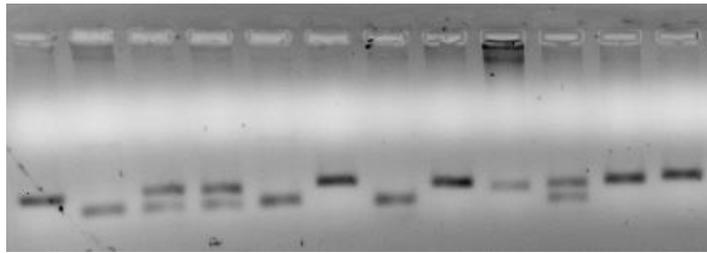


Figura 2.1. Asignación de genotipos para el SNP c.259G>A. Las primeras tres calles corresponden a muestras control con los genotipos A/A, G/G y A/G respectivamente. Por comparación se asignaron los genotipos de las 9 muestras siguientes.

2.3.3 Análisis estadístico

A las 114 muestras colectadas se le agregaron las del estudio de Daverio et al. (2016), dando un total de 73 animales blancos y 125 pigmentados (53 eumelánicos, 44 feomelánicos y 28 marrón cara negra) que fueron utilizados para los distintos análisis.

La asociación entre las frecuencias alélicas o genotípicas y los fenotipos para cada SNP se determinó mediante la prueba de Chi cuadrado o el método de Monte Carlo, según la distribución del conjunto de datos, y aplicando la corrección de Yates. Se utilizó el software PASW Statistics 1.8 (SPSS Inc., versión 2009. PASW Statistics para Windows,

versión 18.0. Chicago: SPSS Cía). La asociación entre los alelos (haplotipos) del receptor se realizó utilizando los mismos métodos, pero sólo se incluyeron aquellas muestras (n=179) cuyos haplotipos se pudieron determinar sin ambigüedades (probabilidad de fase gamética mayor a 0,90, calculadas con Arlequin v3.5.1.2).

2.3.4 Predicción del efecto de los cambios no sinónimos en la proteína

Los servidores web SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y PROVEAN Protein (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) se usaron para predecir el posible impacto de las sustituciones de aminoácidos en la proteína de MC1R. SIFT predice si una sustitución de aminoácidos afecta la función de la proteína. Asume que los residuos importantes se conservan durante la evolución de especies por lo que compara secuencias homologas y propiedades físicas de los aminoácidos para clasificar las sustituciones en toleradas o deletéreas según un puntaje (es perjudicial si el puntaje es $\leq 0,05$ y se tolera si el puntaje es $> 0,05$). PROVEAN Protein aplica un método similar basado en la conservación evolutiva y califica un SNP como neutral o perjudicial (los números iguales o inferiores a -2,5 se consideran perjudiciales).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 SNPs, haplotipos de MC1R y los fenotipos de color

En primer lugar, se evaluó el efecto de cada uno de los polimorfismos c.259G>A y c.383T>C individualmente y luego se estudiaron en conjunto, analizando los haplotipos.

Se verificó que los SNPs c.259G>A y c.383T>C estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos de color blanco y pigmentado ($p < 0,05$) y se calcularon las distribuciones de frecuencias genotípicas, resultando ambas significativamente diferentes en ambos grupos de color (test chi cuadrado; $p < 0,0001$). Para el primer SNP, se observó que los animales pigmentados presentaron el alelo A, tanto en homocigosis como en heterocigosis. Los genotipos A/A y A/G combinados presentaron una frecuencia de 0,92 en el grupo pigmentado, mientras que la frecuencia de estos genotipos en el grupo blanco sólo fue de 0,03. Las llamas blancas presentaron en su mayoría el genotipo G/G (Figura 2.2 A). Para el SNP c.383T>C se observó que los tres genotipos posibles estuvieron presentes en los animales blancos con frecuencias similares. En cambio, en los animales pigmentados la frecuencia del genotipo T/T fue de 0,78 (Figura 2.2 B). En el Anexo se muestra una tabla con los valores absolutos de frecuencia para cada genotipo.

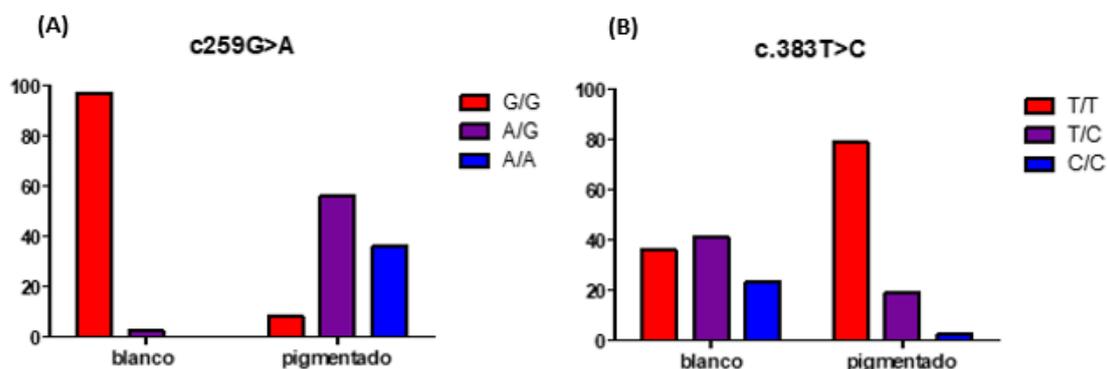


Figura 2.2. Distribución de frecuencias genotípicas relativas en llamas blancas y pigmentadas. (A) Para el SNP c.259G>A. (B) Para el SNP c.383T>C.

Se determinaron los haplotipos derivados de los SNPs c.259G>A y c.383T>C y se calculó la distribución de frecuencias genotípicas respectiva (Tabla 2.3). Comparando ambos grupos de color esta distribución genotípica fue significativamente diferente ($p < 0,0001$).

Tabla 2.3. Distribución de genotipos observada para MC1R

	MC1R*1/ MC1R*1	MC1R*1/ MC1R*3	MC1R*2/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*3	Total
BLANCO	0	1	17	29	25	72
PIGMENTADO	41	51	0	2	8	102
Total	41	52	17	31	33	174

En la Tabla 2.3 se muestran solo los genotipos más frecuentes, pero, además de los alelos MC1R*1, MC1R*2 y MC1R*3, se observó la combinación c.259A/c.383C en heterocigosis en cinco llamas pigmentadas, la cual representa un cuarto haplotipo (MC1R*4).

Las llamas blancas mostraron una alta frecuencia de los alelos MC1R*2 y MC1R*3, comparado con el MC1R*1. En cambio, los animales pigmentados presentaron una alta proporción de este último alelo, tanto en homocigosis como en heterocigosis.

Al igual que lo observado en el estudio previo, el genotipo homocigota MC1R*2/MC1R*2 sólo estuvo presente en animales blancos y ausente en los pigmentados. Este genotipo se encontró en el 24% de las llamas blancas.

El 40% de las llamas blancas presentaron el genotipo heterocigota MC1R*2/MC1R*3 y el 35% el genotipo homocigota MC1R*3/MC1R*3. Se realizó un test comparando la distribución de animales blancos y pigmentados con cada uno de esos genotipos vs todo los otros genotipos y ambos resultaron significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

Solo dos animales pigmentados presentaron el genotipo MC1R*2/MC1R*3, una llama feomelánica y una eumelánica; y ocho animales pigmentados resultaron homocigotas MC1R*3/MC1R*3: tres feomelánicos, uno eumelánico y cuatro con patrón marrón rojizo con cara y patas negras.

Para verificar que los resultados no estén influenciados por la existencia de estructura poblacional se calcularon las frecuencias haplotípicas y se analizó la asociación con el fenotipo de color de manera individual para las muestras provenientes de Jujuy y Catamarca. En ambas provincias, la distribución de frecuencias haplotípicas totales fue

significativamente diferente cuando se compararon los animales blancos y pigmentados ($p < 0,001$). Igual que cuando se estudió la muestra completa, la frecuencia de los genotipos MC1R*2/MC1R*2 y MC1R*2/MC1R*3 fue significativamente más alta en los animales blancos que en los pigmentados ($p < 0,001$). Finalmente, la distribución de frecuencias comparando los genotipos MC1R*3/MC1R*3 con todos los otros sólo fue diferente entre los grupos blanco y pigmentado para la provincia de Jujuy ($p < 0,001$). En el Anexo se muestra una tabla con los valores absolutos de frecuencia para cada provincia.

2.4.2 Predicción del efecto de los SNPs en la proteína

El SNP c.259A/G corresponde a una mutación no sinónima que genera un cambio del aminoácido Valina en la posición 87 por una Metionina (p.V87M). Los puntajes obtenidos para este cambio de acuerdo a SIFT y PROVEAN Protein fueron de 0,01 y -2,700 respectivamente.

El SNP c.383T>C reemplaza Metionina por Treonina en el residuo 128 de la proteína (p.M128T). Los resultados de SIFT y PROVEAN Protein puntuaron este cambio con valores de 0,00 y -2,999 respectivamente.

También se analizó el efecto del polimorfismo c.376G>A, el cual está en desequilibrio de ligamiento con c.259A/G y en combinación determinan el alelo MC1R*1. La mutación c.376G>A cambia la Glicina 126 por una Serina (p.G126S). El puntaje otorgado por SIFT para este cambio fue de 0,57, mientras que PROVEAN Protein le otorgó 1,261.

De acuerdo a las predicciones realizadas los SNPs c.259A/G y c.383T>C producen cambios deletéreos, que afectan la función de la proteína de MC1R, mientras que c.376G>A genera un cambio de tipo neutral/tolerado.

2.5 DISCUSIÓN

En este capítulo se analizaron las mutaciones que definen los principales alelos de MC1R en la llama, abordando el estudio individual de los SNPs y de los haplotipos

En el análisis de SNP c.259G>A se vio que el alelo c.259A está asociado a los pigmentados. Previamente Daverio et al. (2016) propusieron que la combinación c.259A/c.383T (haplotipo MC1R*1) es la que determina la presencia de pigmento. En el presente trabajo se observó un cuarto haplotipo del MC1R, determinado por la combinación c.259A/c.383C. Los animales con esta combinación también pertenecieron al grupo de pigmentados. Esto indica que no sería el haplotipo MC1R*1, si no el alelo c.259A, quien presenta asociación con la pigmentación.

No obstante, como el SNP c.259G>A está ligado a c.376G>A (que no fue tipificado), cualquiera de los dos podría ser responsable de la pigmentación. Sin embargo, existen evidencias que indican que es el primero de ellos. En primer lugar, c.259G>A provoca un reemplazo de aminoácidos en una posición altamente conservada (p.V87M), mientras que la mutación c.376G>A produce un cambio de aminoácidos (p.G126S) en una posición que puede ser ocupada indistintamente por Glicina o Serina en diferentes especies de mamíferos (Daverio et al., 2016). En segundo lugar, los resultados de SIFT y PROVEAN Protein coincidieron en que el cambio p.V87M afecta la función de la proteína de MC1R, a diferencia de p.G126S, que es un cambio neutral.

En resumen, la presencia de por lo menos un alelo A en la posición 259 es determinante de la pigmentación y este sería el alelo dominante de la serie: E.

En el caso del SNP c.383T>C no es posible analizarlo individualmente, es necesario estudiarlo en conjunto con c.259G>A ya que no permite diferenciar los alelos MC1R*1 y MC1R*3.

Analizando entonces ambos SNPs combinados se observó que el alelo MC1R*2 presentó una frecuencia significativamente mayor en el grupo blanco (0,87) con respecto al pigmentado (0,03). Además, el genotipo homocigota MC1R*2/MC1R*2 no se observó

en ninguno de los 102 animales pigmentados analizados. Esto permite confirmar que el alelo MC1R*2 está asociado al fenotipo blanco, como había sido propuesto en el estudio de Daverio et al. (2016). Sin embargo, al aumentar el número de muestras, se observó que el genotipo MC1R*2/MC1R*2 tiene una frecuencia más baja que la informada previamente.

En el alelo MC1R*2 se cambia una Metionina por Treonina en el residuo 128 (p.M128T) de la proteína, que es un sitio altamente conservado en mamíferos (Daverio et al., 2016). Además, según las predicciones de SIFT y PROVEAN Protein, este cambio resulta deletéreo. Pérez Oliva et al. (2009) estudiaron la misma sustitución en la proteína MC1R de humano y determinaron que representa una marcada pérdida de función y reduce la afinidad de unión del agonista (α -MSH). En ese sentido, el alelo MC1R*2 es semejante a la mutación c.901C>T que presentan las alpacas y los dromedarios y que también está asociada a fenotipos blancos (Chandramohan et al., 2015; Feeley and Munyard, 2009; Guridi et al., 2011; Powell et al., 2008; Almathen et al., 2018; Alshanbari et al., 2019). El SNP c.901C>T afecta un residuo de Arginina ubicado en la última región transmembrana del receptor y se cree que su cambio por Cisteína lleva a una pérdida de función total resultando en animales completamente blancos. En la llama esta posición está casi fijada para la variante eumelánica mientras que las alpacas y los dromedarios no presentan variación en la posición 383. Sin embargo, es posible que ambas mutaciones tengan un efecto equivalente, generando un receptor no funcional en los camélidos y, en consecuencia, color de capa blanco, aunque para confirmarlo es necesario estudiar la expresión y la funcionalidad del alelo MC1R*2 de la llama.

Cabe mencionar que la combinación genotípica MC1R*1/MC1R*2 no aparece en la distribución de genotipos analizada debido a que involucra a los animales heterocigotas para los dos SNPs (c.259A/G y c.383T>C). Como no fue posible determinar con confianza la fase haplotípica presente en estas llamas, fueron excluidas del análisis. Pero aun asumiendo que las 19 muestras excluidas tuvieran el genotipo MC1R*1/MC1R*2, se observa que 18 de estas llamas presentan pigmento, lo que es esperado debido a la presencia del alelo dominante E. Sólo un animal blanco tendría el genotipo MC1R*1/MC1R*2, aunque podría ser una excepción, como las mencionadas previamente. Un análisis de segregación familiar de los alelos del MC1R en llamas con

genealogía conocida ayudaría a resolver los haplotipos cuya fase gamética no pudo resolverse y a establecer si efectivamente los alelos MC1R*1 y MC1R*2 aparecen combinados.

El alelo MC1R*3 en homocigosis se observó en ambos grupos de color, aunque esta combinación fue significativamente más frecuente en el grupo blanco. Sin embargo, MC1R*3 es el alelo silvestre que está presente en el guanaco, por lo codifica un receptor funcional con capacidad de generar pigmentos.

En resumen, el alelo MC1R*2 está asociado al color blanco y si fuese dominante con respecto al MC1R*3 permitiría explicar por qué las llamas heterocigotas MC1R*2/MC1R*3 son blancas. Pero no se podrían explicar los animales blancos con el genotipo MC1R*3/MC1R*3. Otros genes epistáticos a MC1R, relacionados con los procesos de diferenciación, desarrollo y supervivencia de los melanocitos, podrían estar involucrados en la determinación del color blanco. Este fenotipo también se podría explicar por una dilución extrema de melaninas o por interacciones entre MC1R y un alelo aún no identificado de ASIP.

Aumentar el número de muestras respecto al estudio anterior, permitió realizar los siguientes aportes: se redefinió el alelo dominante de la serie (alelo E), se confirmó que el alelo MC1R*2 está asociado al color blanco y se concluyó que necesariamente debe existir otro gen implicado en la producción de este fenotipo. Esto llevó al planteo de nuevas hipótesis sobre los mecanismos moleculares que controlan el color blanco que se irán evaluando a lo largo de esta tesis.

CAPÍTULO 3: LOS GENES KIT Y MITF

3.1 INTRODUCCIÓN

El gen KIT codifica un receptor tirosin-kinasa ubicado en la membrana celular y, junto con su ligando (KITL), regulan la proliferación, migración y supervivencia de diferentes tipos de células, incluidos los melanocitos (Roskoski, 2005). KIT regula la melanogénesis a través de la activación de MITF, una proteína básica de tipo hélice-giro-hélice cierre de leucina (BHLH-LZ) que controla la diferenciación y el desarrollo de melanocitos, y es responsable de la transcripción de las enzimas de pigmentación TYR, TYRP1 y TYRP2.

Como todos los receptores de la familia de proteínas tirosin-kinasas, KIT presenta un dominio de unión a ligando extracelular, un solo segmento transmembrana y un dominio kinasa citoplasmática. Además, KIT pertenece a la clase de receptores III, que se caracterizan por la presencia de cinco dominios de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular (Roskoski, 2005). La unión del ligando lleva a la dimerización de KIT y a la activación de una cascada de señalización molecular que involucra, entre otros factores, a MITF. En algunas especies, como humanos, ratones y ovejas, se han identificado dos variantes transcripcionales de KIT, denominadas KIT(+) y KIT(-), que se caracterizan por la presencia o ausencia de una secuencia de tetra péptidos en la región yuxtamembrana del dominio extracelular (Reith et al., 1991; Saravanaperumal, 2011). Existe una diferencia en la cinética y la magnitud de la activación de la actividad intrínseca del receptor KIT entre las isoformas (Caruana et al., 1999).

La secuencia genómica de MITF en vertebrados presenta una compleja estructura intrón-exón donde el splicing alternativo del exón 1 da lugar a una familia de factores de transcripción. Esto es importante para la expresión específica en los tejidos y afecta el potencial de activación transcripcional de las proteínas resultantes. En particular, la isoforma específica que se expresa en los melanocitos se denomina MITF-M y deriva de un ARNm que contienen el exón 1M. (Hallsson et al., 2007; Shibahara, 2001). Además, MITF-M suele tener dos productos de splicing alternativos, llamados MITF-M (-) y MITF-M (+) dependiendo de la adición de 18 pb entre los exones 5 y 6. Estos tienen funciones distintas ya que MITF-M (+) se une al ADN con una afinidad ligeramente mayor que MITF-M (-) (Bismuth et al., 2005).

KIT y MITF muestran interacciones complejas: MITF es necesario para el mantenimiento de la expresión de KIT en los melanoblastos y, a su vez, la señalización de KIT modula la actividad y estabilidad de MITF en los melanocitos (Hou et al., 2000). Debido a su función biológica relacionada al desarrollo y supervivencia de los melanocitos, las mutaciones que presentan KIT y MITF-M suelen ser epistáticas sobre las de MC1R y ASIP (Hirooka et al., 2002). Además, mutaciones en estos genes suelen causar fenotipos blancos y con manchas blancas en varios mamíferos. Un ejemplo es el caballo, el cual presenta más de veinte mutaciones en la región codificante del gen KIT que producen el blanco dominante (Haase et al., 2010; Holl et al., 2017) y patrones manchados como sabino, tobiano o ruano (Dürig et al., 2017; Negro et al., 2017). Mutaciones en MITF-M son responsables del blanco dominante en algunas razas de vacas (Philipp et al., 2011) y también producen el fenotipo "blanco salpicado" en caballos (Dürig et al., 2017; Hauswirth et al., 2012).

No solo las mutaciones en MITF y KIT tienen efectos similares sobre el fenotipo; también hay evidencia de que interactúan genéticamente de manera aditiva. Por ejemplo, los ratones heterocigotos dobles para los alelos semi-dominantes KITW-36H y MITF^{Mi-wh} tienen un fenotipo de manchas más severo que los ratones heterocigotos para cualquier alelo solo (Wen et al., 2010). Además, Haase et al. (2013) han informado que la acumulación de mutaciones en estos loci aumenta progresivamente la extensión de las manchas blancas en el caballo.

En los camélidos, solo se abordó el estudio de KIT en alpacas de fenotipo blanco-ojos-celestes mediante el uso de marcadores microsatélites asociados a este gen. Se reportaron dos alelos asociados a dicho fenotipo (Jackling et al., 2014). Sin embargo en la llama, aún no se han estudiado los genes KIT ni MITF, por lo que en este capítulo se aborda la caracterización molecular de las llamas blancas a través del estudio de los mismos.

3.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que las llamas blancas pueden presentar una combinación alélica en el gen MC1R que también presentan las llamas pigmentadas (MC1R*3/MC1R*3), se evaluará si genes epistáticos a MC1R están involucrados en la determinación del color blanco. La hipótesis a evaluar es:

- Variantes en los genes del receptor del factor de crecimiento de mastocitos (c-KIT) y del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) están asociadas al fenotipo blanco en la llama

Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar la región codificante de los genes c-KIT y MITF-M en llamas.
2. Estudiar la asociación entre los polimorfismos hallados en c-KIT y MITF-M con el fenotipo blanco.
3. Estudiar los niveles de expresión de c-KIT y MITF-M en llamas con fenotipos blanco y pigmentado y analizar su asociación con dichos fenotipos.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Muestras

Debido a la gran extensión de los genes KIT y MITF, la descripción de sus regiones codificantes se realizó a partir de la secuenciación de mRNA. Se colectaron biopsias de piel de 31 llamas en cuatro establecimientos diferentes: Facultad de Ciencias Veterinarias (n=8), UBA, Buenos Aires; Cabaña San Bernardo (n=8), Buenos Aires; Cabaña Lama Malal (n=3), San Luis; y Criadero de llamas Piedra del Agua (n=12), San Luis.

Se tomaron biopsias del flanco, después de la última costilla, utilizando un sacabocados desechable de 3 mm de diámetro y se conservaron en RNAlater (SIGMA, Alemania) hasta su posterior extracción. Se seleccionaron animales no relacionados (según los registros de los criadores) de fenotipo pigmentado (n=16) o blanco (n=15). Para el grupo pigmentado, se tomaron muestras de llamas con vellón de color uniforme, incluyendo negro y diferentes tonos de marrón. El grupo blanco abarcó animales con una capa blanca completa.

Para el análisis de expresión, se tomaron nuevas biopsias de piel de llamas blancas y marrones de los dos criaderos de la provincia de Buenos Aires mencionados. Se tomaron 6 réplicas biológicas por grupo, de animales adultos jóvenes. Las biopsias fueron tomadas durante la misma semana y se mantuvieron en RNAlater (SIGMA, Alemania) durante su transporte al laboratorio, donde se extrajeron inmediatamente para evitar la degradación del ARN.

3.3.2 Extracción de ARN y síntesis de cADN

El ARN total se extrajo mediante homogeneización en TRIzol® y la adición de cloroformo para separar en fases. La fase acuosa se usó para la precipitación alcohólica de ARN. Luego, se lavó y se resuspendió en agua libre de ARNasa. La transcripción inversa para obtener cDNA se realizó en un volumen de reacción de 20 µl, utilizando 1 µg / µl de ARN, RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) y random primers (Biodynamics), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el agregado de 1 ug/ul de BSA .

3.3.3 Secuenciación y descripción de KIT y MITF-M.

Para obtener las regiones codificantes completas de KIT y MITF-M, se diseñaron primers con la herramienta Primer-BLAST (Ye et al., 2012) sobre regiones conservadas de secuencias de ARNm de mamíferos, como ovejas, cabras y otros ungulados, disponibles

en GenBank. Se utilizó un diseño de seis y cuatro fragmentos superpuestos para cubrir completamente la región codificante de los genes KIT y MITF respectivamente. La lista de todos los primers utilizados, sus secuencias y el fragmento amplificado por cada par se muestra en la Tabla 3.1. El primer MITF1-F se diseñó específicamente para reconocer el exón1-M, mientras que para estudiar las variantes de transcripción de MITF-M en llamas, se diseñaron primers específicos flaqueando la región de inserción (MITFvar F y MITFvar R; Tabla 3.1). Luego se separaron las variantes mediante electroforesis en agarosa al 3%, se cortaron las dos bandas del gel y se secuenciaron. Continuando con el análisis de las variantes, se diseñaron primers específicos de cada una que pegaban dentro de la región de 18 pb o en la unión entre los exones 5 y 6. La Figura 3.1 muestra la estrategia de diseño de cebadores para amplificar variantes de MITF-M.

Tabla 3.1. Lista de primers utilizados para la amplificación de KIT y MITF-M

Primer	Secuencia (5'-3')	T annealing °C	Tamaño del amplicón (pb)
KIT1 F KIT1 R	GAGAGCAGGAACGTGGAACAGA GGTCAGCGACAAACGTCAGG	57	544
KIT2 F KIT2 R	CCCGGAGGTGACCCATTACTC ACCAGATCCACATTCTCTCCATCG	59	572
KIT3 F KIT3 R	GGATCAGCAAATGTCACAACA AACTCTTGCCACATCGTT	53	613
KIT4 F KIT4 R	ATGTTCTGTTCCCATCGGGC GCGCCGAGAAGATTCACGAT	56	618
KIT5 F KIT5 R	CGAGAAGCCCTAATGTCTGA TTGAAAATGCTCTCAGGTGC	53	629
KIT6 F KIT6 R	GTCTAGCCCCGAGACATCAAG GAGGCGAGTCAAAGGAAAAC	53	591
MITF1 F MITF1 R	AGTGCCTTCTCTATGCCAGTC TCCATCAAGCCCAGGATTTCT	55	517
MITF3 F MITF3 R	ACATGCGCTGGAACAAGGGA GAGAATGCAGAGCAGGGGGAA	55	573
MITFvar F MITFvar R	TGTCTCTGGAACTTGATTGACCT GTACCTAGTTCCTTGATGCGGT	56	204/222
MITF2.1 F MITF2.1 (-) R	GGAGAGCGAATGCCCAAGTA TCAGACTCTGTGAGCTCCCTT	56	273
MITF2.1 F MITF2.1 (+) R	GGAGAGCGAATGCCCAAGTA GGGAAAATACACGCTGTGAGC	56	308
MITF2.2 (-) F MITF2.2 R	AAGGGAGCTCACAGAGTCTGA GCATTTCAAGTTCCTGGATTCTGAG	57	280
MITF2.2 (+) F MITF2.2 R	GCTCACAGCGTGTATTTTTCCC GCATTTCAAGTTCCTGGATTCTGAG	57	320

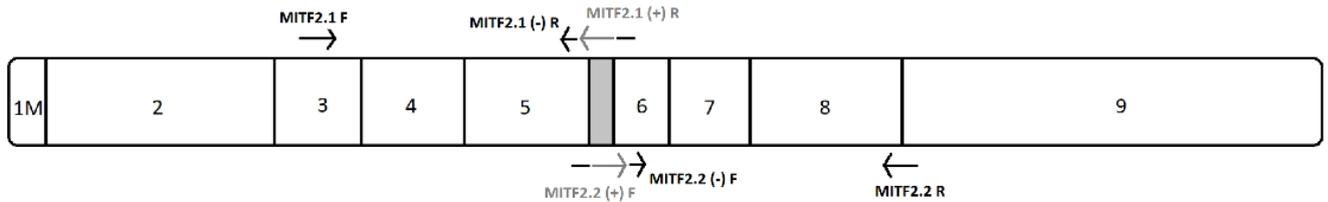


Figura 3.1. Representación esquemática del diseño de los primers para la amplificación de las variantes transcripcionales MITF-M (-) y MITF-M (+). Los rectángulos numerados corresponden a exones en el cADN; el sombreado gris indica los 18 pb adicionales presentes en MITF-M (+). Las flechas derechas representan los primer forward y las flechas hacia la izquierda los primers reversos. Cada variante se amplificó en dos fragmentos, uno se representa sobre el esquema de cADN y el otro debajo. En cada amplificación de fragmento se usó un primer común, representado por la flecha negra completa, y se combinó con un primer específico para MITF-M (+) (color gris) o un primer específico para MITF-M (-) (flecha negra fragmentada).

Las reacciones de amplificación para las regiones codificantes de KIT y MITF-M se realizaron por PCR, usando el mismo protocolo que se explicó en el capítulo 1 con el agregado de 60 μg de BSA cada 25 μl de mezcla final. Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRedTM, se purificaron mediante precipitación con PEG y se secuenciaron por MacroGen Inc., Corea. Las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron utilizando Geneious (v.6.1.8, Biomatters). Los límites de los exones se determinaron por comparación con los genes KIT y MITF-M ortólogos de otras especies disponibles en GenBank. La topología y los dominios de las proteínas se predijeron utilizando el software CCTOP (Dobson et al., 2015) y CDD (Marchler-Bauer et al., 2017) respectivamente, y se compararon con las entradas revisadas de UniProt (Bateman et al., 2017).

3.3.4 Perfiles de expresión génica

Se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando primers específicos diseñados sobre la región codificante de cada gen, y de cada isoforma en el caso de MITF-M. Además, los primer de cada par se diseñaron sobre exones diferentes o en la unión exón-exón para evitar la amplificación genómica (Tabla 3.2). Los genes GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y 18S se probaron como controles endógenos. Ambos se habían utilizado anteriormente para estudiar la expresión de los

genes de la melanogénesis en la piel de las ovejas (Saravanaperumal et al., 2014). En nuestros ensayos, solo 18S se expresó de forma estable y no mostró variación entre los grupos. Por esa razón, posteriormente fue utilizado para la normalización de datos.

Tabla 3.2. Lista de primers utilizados para el análisis de la expresión de KIT y MITF-M

Primer	Secuencia (5'-3')	T annealing °C	Tamaño del amplicón (pb)	Ubicación en el mRNA*
qKIT F	TCAAGGAAGGTTCCGAATG	58	159	2636-2794
qKIT R	AAATGTGGTTGGTGCTCTCC			
qMITF F	CACTATCAGGTGCAGACCCAC	58	128	25-152
qMITF R	AAGCTCAGGACTTGGTTGGC			
MITF2.1 F	GGAGAGCGAATGCCCAAGTA	60	273	294-566
MITF2.1 (-) R	TCAGACTCTGTGAGCTCCCTT			
MITF2.1 F	GGAGAGCGAATGCCCAAGTA	60	308	294-573
MITF2.1 (+) R	GGGAAAATACACGCTGTGAGC			
18S F	GTAACCCGTTGAACCCATT	60	150	1577-1727
18S R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG			

* Las ubicaciones para cada conjunto de primers hacen referencia a la posición correspondiente en el ARNm de llama (secuencias obtenidas en este estudio; números de acceso a GeneBank MH062992, MH062994 y MH062993), excepto los primers 18S que se refieren a la secuencia de ovejas (número de acceso de GeneBank KY129860.1)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un RotorGene Q (Qiagen) y consistieron en 20 µl, incluyendo 4 HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne), 0,5 mM de cada primer y 1 ng de cADN. Los parámetros del ciclo fueron: 15 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg. a 95°C, 20 seg. a 60°C, 20 seg. a 72°C y un gradiente final de 95°C a 72°C. Cada reacción qPCR fue optimizada; Las eficiencias de PCR calculadas a partir de la pendiente se encontraron dentro del 90-110%, r2 por encima del 98%. Cada gen se amplificó en un evento de qPCR que incluyó tres réplicas técnicas para cada muestra y dos controles NTC. El análisis de la curva de melting se realizó después de la

amplificación para verificar la ausencia de amplificación no específica o de dímero de primer. Los Ct fue determinado por el software Rotor-Gene Q Pure Detection versión 2.3.1. La cuantificación de la abundancia de los transcritos se realizó mediante el método del ciclo de umbral comparativo ($\Delta\Delta Ct$) de Livak y Schmittgen (2001) y se utilizó un t-Test para evaluar si las diferencias en la expresión eran significativas.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 KIT

La región codificante completa de KIT en la llama presentó 2919 pb comprendidos en 21 exones. La secuencia de ADNc de KIT fue depositada en GenBank con el número de acceso MH062992.

En la piel de la llama se identificó una sola variante de transcripción, a pesar de que en otras especies, como en la oveja, se han informado dos variantes transcripcionales de KIT, KIT(+) y KIT(-) (Saravanaperumal, 2011).

Se predijo que la proteína codificada por KIT tiene 972 aminoácidos y sus dominios están conservados entre especies. La identidad con proteínas ortólogas fue alta, 99% con otros camélidos y más de 90% con otros mamíferos. El receptor KIT presentó un péptido señal de 25 aminoácidos, 5 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (tipo Ig), un segmento transmembrana (comprendido entre los aminoácido 525 y 545), un dominio intracelular tirosin-kinasa (entre los aminoácidos 553 y 928) y una cola C-terminal intracelular (Figura 3.2).



Figura 3.2. Esquema de la proteína codificada por KIT. “Ig” indica dominios de tipo Inmunoglobulina y “TM” región transmembrana.

Respecto a la variación del gen KIT, se observaron 18 SNPs en total: 1 en la región 5'UTR, 10 SNPs dentro de los dominios de tipo inmunoglobulina, 5 en el dominios tirosina quinasa, 1 en la cola C-terminal y 1 en la región 3'UTR (Tabla 3.3). La mayoría de estas sustituciones fueron sinónimas, excepto por 3 SNPs localizados dentro de los dominios extracelulares tipo Ig de la proteína.

Tabla 3.3. Polimorfismos encontrados en el gen KIT

Polimorfismo (cDNA)	Ubicación en el gen	Cambio de aminoácido	Dominio de la proteína
c.-15A>G	5'UTR	-	-
c.324T>C	exón 2	sin	Tipo Ig
c.840A>G	exón 5	sin	Tipo Ig
c.866C>T	exón 5	p.T289M	Tipo Ig
c.967G>C	exón 6	p.V323L	Tipo Ig
c.1119C>T	exón 7	sin	Tipo Ig
c.1122A>G	exón 7	sin	Tipo Ig
c.1173G>A	exón 7	sin	Tipo Ig
c.1265C>T	exón 8	p.A422V	Tipo Ig
c.1377A>G	exón 9	sin	Tipo Ig
c.1485C>T	exón 9	sin	Tipo Ig
c.1830G>A	exón 12	sin	Tirosina quinasa
c.1845C>T	exón 12	sin	Tirosina quinasa
c.2715T>C	exón 20	sin	Tirosina quinasa
c.2721T>C	exón 20	sin	Tirosina quinasa
c.2745G>A	exón 20	sin	Tirosina quinasa
c.2808G>A	exón 21	sin	cola C-terminal
c.*17A>G	3'UTR	-	-

La posición +1 corresponde al codón ATG; sin: mutaciones sinónimas.

Ninguno de los SNP no sinónimos presentó asociación con los fenotipos de color, ya que no se observaron diferencias en la distribución de los genotipos cuando se compararon los animales pigmentados con los blancos (Tabla 3.4). El primer SNP no sinónimo, c.866C> T en el exón 5, cambia una Treonina por una Metionina en la posición 289 del receptor KIT. Todas las llamas analizadas fueron homocigotas para el alelo C (que corresponde a la treonina en la proteína), excepto dos animales pigmentados que resultaron heterocigotas. El segundo SNP no sinónimo, c.967G> C, se encontró en el exón 6 y representa un cambio de Valina a Leucina en la proteína. Este SNP fue muy frecuente y se observaron los tres genotipos posibles tanto en animales blancos como pigmentados. El último SNP no sinónimo, c.1265C> T, produce un cambio en la proteína de Alanina a Valina; este se observó solo una vez en una llama pigmentada.

Tabla 3.4. Distribución de genotipos entre grupos de color para los polimorfismo no sinónimos de KIT.

	c.866C>T			c.967G>C			c.1265C>T		
	C/C	C/T	T/T	G/G	G/C	C/C	C/C	C/T	T/T
Blanco	15	-	-	6	5	4	15	-	-
Pigmentado	14	2	-	6	8	2	15	1	-

3.4.2 MITF-M

La región codificante de MITF-M presentó 9 exones, incluido el exón 1M, específico de los melanocitos. La identidad de esta región estuvo entre 99 y 93% con otros mamíferos, y del 100% para el exón 1M con respecto a otras especies, incluidos carnívoros, ungulados, primates, roedores y placentarios. La secuencia del exón 1M presentó 33 pb (ATGCTGGAAATGCTAGAATATAATCACTATCAG) que codifican los primeros 11 aminoácidos de la proteína MITF-M (MLEMLEYNHYQ).

Además, MITF-M presentó dos productos de splicing alternativos: MITF-M(-) con 1242 pb y MITF-M(+), con la inserción de 18 pb entre los exones 5 y 6. Estas variantes se separaron por electroforesis y luego se secuenciaron por separado con un par de

primers flanqueantes. La Figura 3.3A muestra un gel de agarosa con los amplificadores de PCR de ambas variantes transcripcionales, y la Figura 3.3B, las secuencias correspondientes. Una vez que se obtuvo cada secuencia, se diseñaron nuevos primers específicos para la amplificación de MITF-M(+) y MITF-M(-). Las secuencias de nucleótidos de ambos productos de splicing se depositaron en GenBank con los números de acceso MH062994 y MH062993, respectivamente.

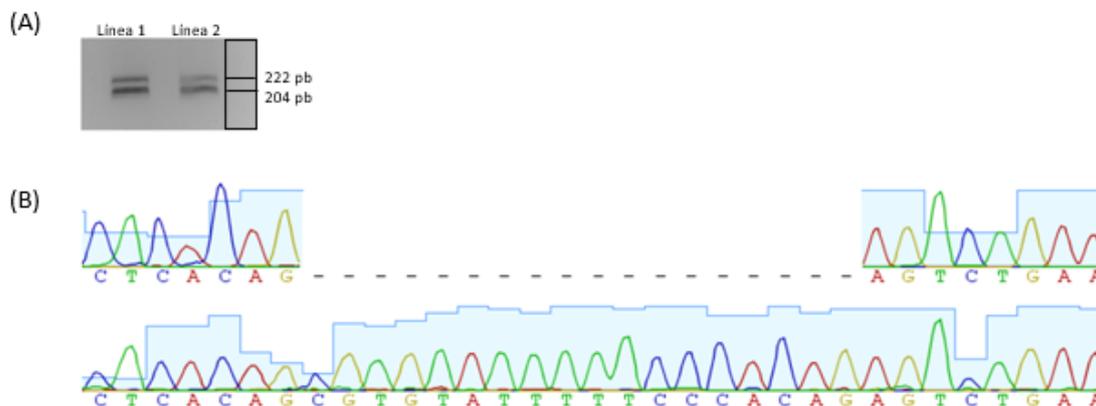


Figura 3.3. Variantes de splicing de MITF-M (A) Gel de agarosa que muestra bandas correspondientes a las variantes de MITF-M (-) y MITF-M (+). Línea 1: corresponde a una muestra de llama coloreada; línea 2: corresponde a una muestra de una llama blanca. (B) Secuencias alineadas de las dos variantes.

En la llama, MITF-M(-) codifica una proteína de 413 aminoácidos, mientras que la proteína codificada por MITF-M(+) contiene 6 aminoácidos adicionales (ACIFPT). Estos se ubican justo antes de un dominio básico “cremallera de leucina hélice-bucle-hélice (BHLH-LZ)”, que abarca desde el aminoácido 197 hasta el 252. Este dominio se encuentra en proteínas específicas de unión al ADN que actúan como factores de transcripción y se requiere para la unión y dimerización del ADN. Además del dominio BHLH-LZ, la proteína predicha presenta un dominio altamente conservado entre los aminoácidos 11-87 que generalmente se encuentra en el extremo N-terminal de varios factores de transcripción, incluido MITF. También presenta un dominio de transactivación altamente conservado que contiene la secuencia de reclutamiento para el cofactor de transcripción CBP/p300 (Sato et al., 1997) y se expande desde el aminoácido 114 a 132 (MQMDDVIDDIISLESSYNE).

Solo se encontró un SNP en la región de codificación MITF-M, un cambio sinónimo de T a C en el nucleótido 532 (c.532T> C). Este polimorfismo fue observado en ambas variantes transcripcionales y se observaron los tres genotipos posibles tanto en animales pigmentados como en blancos.

3.4.3 Perfiles de expresión

Todas las muestras amplificaron consistentemente tanto el gen de control endógeno como el gen de interés. Las curvas de melting de qPCR confirmaron que se amplificó un solo producto en cada PCR y los controles NTC no mostraron amplificación. Se compararon los niveles de expresión de KIT, la expresión total de MITF-M y luego cada variante de MITF-M por separado, para llamas pigmentadas y blancas. Los resultados mostraron que los niveles de expresión de KIT, MITF-M y MITF-M(+) fueron significativamente más bajos en los animales blancos que en los pigmentados ($p < 0,05$). La diferencia de expresión para MITF-M(-) no fue estadísticamente significativa entre los grupos ($p = 0,1626$) (Figura 3.4).

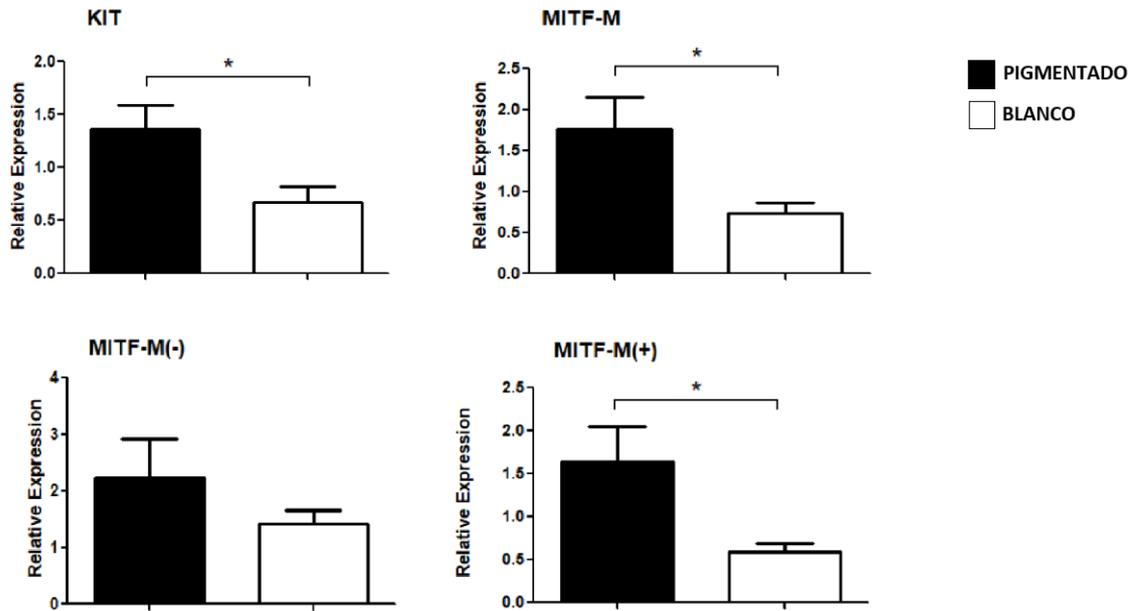


Figura 3.4. Expresión relativa de KIT, MITF-M, MITFM(-) y MITF-M(+) en piel de llamas. Los gráficos de barras muestran valores medios. Las barras de error representan el error estándar (SE). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

3.5 DISCUSIÓN

La isoforma de MITF específica de los melanocitos (MITF-M) se expresó y se amplificó con éxito tanto en animales pigmentados como en blancos, lo cual demuestra que las llamas blancas presentan melanocitos en la piel, en concordancia con las observaciones de Frank (2001).

La estructura de los genes KIT y MITF-M fue similar a la descrita anteriormente en otros vertebrados (Hallsson et al., 2007; Opatowsky et al., 2014). Aunque se han informado variantes de splicing para ambos genes, en la llama se observaron dos variantes de transcripción de MITF-M y solo una de KIT. La presencia o ausencia de 12 pb entre los exones 9 y 10 da como resultado las isoformas KIT(+) y KIT(-) (Gokkel et al., 1992; Reith et al., 1991) pero, según Reith et al. (1991), las variantes KIT(+) y KIT(-) se expresan conjuntamente en algunos tipos de células siendo predominante la forma KIT(-). En este estudio solo se encontró la variante que corresponde a KIT(-). Se utilizaron primers

específicamente diseñados para detectar las variantes (+) y (-) (KIT4-F y KIT4-R), ya que flanqueaban la inserción de 12 pb que las diferencia pero siempre se obtuvo un solo producto de PCR y una secuencia clara del electroferograma. Podría ser que KIT (+) no se exprese en la piel de la llama o que se exprese en niveles tan bajos que no se pueda detectar.

En muchos mamíferos, las mutaciones en KIT y MITF-M son responsables de los fenotipos blancos. Sin embargo, en la llama no se encontraron mutaciones en estos genes que puedan explicar este fenotipo.

Además, todos los SNP no sinónimos encontrados en KIT se ubicaron en los dominios tipo Ig, donde las mutaciones generalmente producen una hiperactivación del receptor (Ray and Krishnamoorthy, 2008). En cambio, se espera que sean mutaciones que disminuyan la función KIT aquellas que puedan ser causales del fenotipo blanco.

MITF-M resultó mucho menos variable que KIT. Sólo se encontró una mutación: c.532T>C. Este mismo SNP había sido observado previamente por Saravanaperumal et al. (2014) en la variante MITF-M(+) de oveja. Estos autores propusieron que el SNP afecta la formación de dímeros o la unión al ADN de MITF-M(+), debido a su ubicación próxima a la región básica de MITF-M. Por el contrario, en la llama se observó esta sustitución en ambas variantes transcripcionales.

Aunque las regiones codificantes de MITF-M y KIT no mostraron ninguna mutación relacionada con el fenotipo blanco, los patrones de expresión observados indican que estos genes podrían tener un papel en la producción del blanco en la llama. Los resultados muestran niveles de expresión de KIT y MITF-M significativamente más bajos en los animales blancos que en los de color. En particular, la diferencia encontrada en MITF-M parece ser causada por la variante MITF-M(+), dado que MITF-M(-) no mostró diferencias significativas entre animales blancos y pigmentados. Se sabe que MITF-M(+) se une a las cajas E del promotor con mayor afinidad y transcribe la enzima tirosinasa de manera más eficiente que MITF(-) (Murakami et al., 2007). De acuerdo con eso, los ratones MITF^{mi-sp} ("manchas de microftalmía"), que solo expresan la variante MITF-M(-), presentan una pigmentación leve (Bismuth et al., 2005). De manera similar, en las

llamas blancas, MITF-M(+) se expresa menos que en las pigmentadas, lo que podría causar una disminución en la síntesis de las enzimas productoras de melanina.

Finalmente, era esperado encontrar el mismo patrón de expresión en los genes KIT y MITF-M ya que se regulan mutuamente. MITF-M es necesario para mantener la expresión de KIT en los melanoblastos y KIT es necesario para la diferenciación de estos melanoblastos en melanocitos, que luego expresan MITF-M para producir melanina (Hou et al., 2000).

CAPÍTULO 4: EL GEN TYR

4.1 INTRODUCCIÓN

La tirosinasa, codificada por el gen TYR, es una enzima clave para la síntesis de melanina. Esta enzima, que contiene cobre, cataliza los dos primeros pasos en la ruta de biosíntesis de las melaninas (Figura 1.5). TYR se conoce comúnmente como el locus albino ya que las mutaciones en este gen dan como resultado albinismo en varias especies, incluidos los humanos. Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen TYR en personas con albinismo oculocutáneo tipo 1 (The Albinism Database²). Debido a la falta de producción de melanina, estos pacientes presentan cabello blanco, ojos claros y una piel muy pálida que no se broncea. El albinismo también se ha descrito en ratones (Beermann et al., 2004; Yokoyama et al., 1990), gatos (Imes et al., 2006), ganado bovino (Schmutz et al., 2004), conejos (Aigner et al., 2000), búfalos (Damé et al., 2012) y burros (Utzeri et al., 2016) entre otros mamíferos.

Además, se ha encontrado que otras mutaciones TYR causan fenotipos más leves. Por ejemplo, el fenotipo Himalaya se produce por diferentes mutaciones que resultan en una actividad de TYR regulada por la temperatura, donde las partes más frías del cuerpo están pigmentadas, mientras que las partes más cálidas permanecen blancas. Estas mutaciones se han descrito en ratones (Kwon et al., 1989), visones (Benkel et al., 2009), conejos (Aigner et al., 2000) y gatos (Imes et al., 2006). Otro ejemplo es el alelo Chinchilla de ratones, que codifica una tirosinasa cuya actividad es desde un tercio a la mitad de lo normal. Esto es causado por una mutación puntual en el gen TYR, por la cual los ratones Chinchilla exhiben un color grisáceo (Lamoreux et al., 2001). Otra mutación puntual en el gen TYR es responsable del fenotipo Platinum de los ratones, que produce animales con pérdida de pigmentación casi completa (Orlow et al., 1993). Recientemente, se describieron otros dos alelos de TYR en ratones, Dhoosara y Chandana, caracterizados por una hipopigmentación marcada en el cuerpo y los ojos (Challa et al., 2016).

²Disponible en: <http://www.ifpcs.org/albinism/oca1mut.html>

La mayor parte de lo que se conoce sobre la regulación del gen TYR deriva de estudios realizados en ratones y extendidos a humanos (Giraldo et al., 2003; Murisier and Beermann, 2006; Reinisalo et al., 2012). Según estos estudios, TYR está regulado por una combinación de elementos promotores proximales y secuencias reguladoras distales, siendo la región de control del locus (LCR) la más importante. El LCR se ubica aproximadamente a -15 kb, contiene dos cajas (A y B,) con sitios de unión para distintos factores transcripción y además funciona como un límite que protege la regulación del gen TYR de los efectos de la cromatina vecina (Beermann et al., 2004; Regales et al., 2003).

4.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La dilución extrema o la hipopigmentación es un mecanismo posible para la producción del fenotipo blanco. El gen Tyr puede presentar mutaciones que causan estos fenotipos pero este gen aún no ha sido descrito en la llama. Por lo tanto, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

- Variantes en el gen de la enzima Tirosinasa (TYR) están asociadas a fenotipos diluidos o hipopigmentados en la llama.

Para evaluar la hipótesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la región codificante del gen TYR y describir la variación existente en llamas.
2. Caracterizar las regiones del promotor proximal y el LCR de TYR en llamas.
3. Estudiar la asociación entre los polimorfismos hallados en TYR con fenotipos de color diluidos y blanco.
4. Estudiar los niveles de expresión de TYR y analizar su asociación con los fenotipos no diluidos, diluidos y blanco.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Muestras

Para determinar la secuencia de TYR y la variación en las llamas, se recolectaron muestras de sangre de 29 animales no relacionados y de diferentes establecimientos de Argentina (nombrados en los capítulos 2 y 3). Se incluyeron 85 muestras adicionales para el genotipado de polimorfismos de interés. Todas las muestras se tomaron de animales adultos jóvenes mediante punción de la vena yugular. Las proporciones de sexo, aproximadamente iguales, y la falta de relación entre los animales analizados se verificó consultando los registros de los criadores. Se documentó el fenotipo del color para cada muestra y se tomaron fotografías siempre que fue posible.

Los fenotipos seleccionados se dividieron en tres grupos: no diluido (n=47), diluido (n=27) y blanco (n=40). El primer grupo incluyó los fenotipos negro: llamas eumelánicas con capas pigmentadas negras o marrón oscuro no diluidas; rojos: llamas con pelaje rojo feomelánico, completamente pigmentadas; y cara negra: animales que presentaron pigmentación feomelánica no diluida con cara y patas negras, un fenotipo muy común entre las llamas. Por el contrario, en el grupo de diluidos se agruparon animales con dilución de eumelanina o feomelanina, incluyendo los fenotipos: GRIS: individuos con capa eumelánica diluida; y crema: llamas con feomelanina diluida (marrón claro, beige y crema). Finalmente, el grupo blanco incluyó dos fenotipos: blanco, llamas no albinas con ojos oscuros y una capa blanca completa; y blanco-ojos-azules: individuos con capa blanca y ojos azules.

Para el análisis de expresión de TYR, se recolectaron biopsias de piel de llamas feomelánicas no diluidas, feomelánicas diluidas y blancas. Se tomaron tres réplicas biológicas de cada fenotipo, utilizando un sacabocados descartable de 3 mm de diámetro. Para evitar la degradación del ARN las muestras se mantuvieron en RNAlater (SIGMA, Alemania) durante su transporte al laboratorio, donde se procesaron de inmediato.

4.3.2 Extracción de ADN y amplificación por PCR

El ADN genómico total se extrajo de muestras de sangre mediante procedimientos estándar, como se explicó en el capítulo 2. El ADN se resuspendió en tampón TE y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

Se diseñaron primers flanqueantes a cada exón usando como referencia el genoma de alpaca disponible en Genome Browser (GCA_000164845.2). La Tabla 4.1 muestra las secuencias de los primers y la longitud de los amplicones.

Además, se amplificaron dos regiones del promotor de TYR en 15 muestras. Un fragmento de 792 pb correspondiente a la región del promotor proximal y un fragmento de 789 pb donde se ubicó la región de control del locus (LCR), aproximadamente a -9 kb. Dado que la información disponible sobre esta última región se limita a ratón y a humano (Números de acceso de GenBank: AF364302.1 y AY180962.1), sus secuencias fueron alineadas con las secuencias no anotadas de otros camélidos disponibles en GenBank (*Camelus dromedarius* NW_011591148.1, *Camelus bactrianus* NW_011544909.1, *Camelus ferus* NW_001111119.1) y *Vicugna pacos* NW_005883058.1) para diseñar los primers correspondientes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Lista de primers empleados la descripción de TYR

Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Tamaño del amplicón (bp)	T annealing (°C)
TYREX1-F	CCGAAGGGGTAGCTGAAAAGT	TYR exón 1	958	60
TYREX1-R	GCCAGAAGAGGCGATTGCTA			
TYREX2-F	ACCTGGAGGAGGAGACAGCA	TYR exón 2	521	65
TYREX2-R	ACCCCGCTAGGGTTATTGGC			
TYREX3-F	GGCACCCAGAATGTGAAGAA	TYR exón 3	363	58
TYREX3-R	ACTGCATTTAAAACCAACAAACA			
TYREX4-F	TTGGCATCTGTCCAGGGCTT	TYR exón 4	541	60
TYREX4-R	AGTGCTCTCCACAGTTGC			
TYREX5-F	GCGCCTGACTCCAAAGTGC	TYR exón 5	441	62
TYREX5-R	AGGCCAAGGATGTCTGCTGG			
TYR-PPROX-F	CCCCAAATAAAGCAGACCACCC	TYR promotor proximal	792	65
TYR-PPORX-R	TTCTTGGAGGAGGCACAGGC			
TYR-LCR-F	TTGTGAAAAACACAGACTAGGCA	TYR-LCR	789	58
TYR-LCR-R	TTACCCAGTGTGAAGCCTCG			

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron como se describió en el capítulo 2. Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, se purificaron mediante precipitación con PEG y se secuenciaron en Macrogen Inc., Corea.

Las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron para identificar polimorfismos utilizando el software Geneious (v.6.1.8, Biomatters). Los elementos en las regiones reguladoras se identificaron por alineamiento con las secuencias de ratón y de humano.

La topología de la proteína y los dominios se predijeron usando el software CCTOP (Dobson et al., 2015) y CDD (Marchler-Bauer et al., 2017) respectivamente, y se compararon con las entradas revisadas de UniProt (Bateman et al., 2017). Se utilizó el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) para la predicción de las

regiones transmembrana. La proteína TYR de llama se alineó con las proteínas homólogas de las siguientes especies: *Vicugna pacos* (XP_006218431.1), *Ovis aries* (NP_001123499.1), *Capra hircus* (NP_001274491.1), *Homo sapiens* (AAB60319.1), *Mus musculus* (AAA40516) .1), *Desmodus rotundus* (XP_024428480.1), *Canis lupus familiaris* (NP_001002941), *Delphinapterus leucas* (XP_022449451) y *Neovison vison* (AJO1592525.1).

4.3.3 Genotipado y análisis de polimorfismos de interés

Los SNP c.1-26C>T y c.1490G>T se genotiparon mediante amplificación por PCR alelo-específica. Para cada variante, se diseñó un par de primers con el correspondiente nucleótido complementario en el extremo 3' del primer forward (Tabla 3.2). Además, para mejorar la especificidad se utilizó la misma estrategia que se explica en el capítulo 2. Cada reacción se llevó a cabo en un tubo separado y los productos alélicos, que presentaban diferentes longitudes, se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (durante 90 minutos a 90 V) teñidos con GelRed™. Se utilizaron controles secuenciados positivos para cada determinación de variante.

Tabla 4.2. Primers alelo-específicos usados para el genotipado de los polimorfismos de interés de TYR

Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Tamaño del amplicón (bp)	T annealing (°C)
TYR-26C-F	TGTGGCTCAATTAATCAGCTCAAGC	c.1-26C>T	140	63
TYR-26C-R	CAGGTTCTTGGAGGAGGCACA	alelo C		
TYR-26T-F	TGTGGCTCAATTAATCAGCTCAAGT	c.1-26C>T	183	63
TYR-26T-R	GACTCCCATCACCTCCAC	alelo T		
TYR1490G-F	GTGCTGGGTGGGCTCAATCG	c.1490G>T	164	60
TYR1490G-R	CGAGGCCAGGCTTTTTGACCC	alelo G		
TYR1490T-F	GTGCTGGGTGGGCTCAATCT	c.1490G>T	105	60
TYR1490T-R	CAGCAGGCTGTGGTAATCCTCC	alelo T		

Los SNPs c.428A>G y c.859G>T se genotiparon mediante PCR-RFLP utilizando muestras secuenciadas como controles. Los productos de la PCR del exón 1 se digirieron con la enzima Rsa1, que reconoce la mutación c.428A> G. Si el amplicón presentaba el alelo A, la enzima lo cortaba en dos fragmentos de 818 pb y 140 pb, mientras que si el amplicón presentaba el alelo G, se creaba un nuevo sitio de restricción y la digestión daba como resultado tres fragmentos de 506 pb, 312 pb y 140 pb. La mezcla de digestión consistió en 7 µl de producto de PCR, 5 U de Rsa1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) y 1,5 µl de 10X Buffer Tango. Las digestiones se incubaron a 37°C durante la noche y los fragmentos de restricción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% durante 90 minutos a 90 V, teñidos con GelRed™. Los productos de la PCR del exón 2 se digirieron con la enzima BsmAI para genotipo del SNP c.859G>T. Si el producto tenía el alelo T, BsmAI lo cortaba en dos fragmentos de 433 pb y 88 pb, mientras que si presentaba el alelo G, permanecía sin digerir. La mezcla de digestión consistió en 7 µl de producto de PCR, 5 U de BsmAI (New England BioLabs Inc.) y 1,5 µl de tampón 10X. Las digestiones se incubaron a 55°C durante la noche y los fragmentos de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 8% (180 min a 160 V) teñido con GelRed™.

La asociación entre las frecuencias alélicas o genotipos y fenotipos se determinó mediante la prueba exacta de Fisher o el método de Monte Carlo, según la distribución del conjunto de datos, utilizando PASW Statistics 1.8 (SPSS Inc., versión 2009). La asociación entre los haplotipos para los tres SNP no sinónimos se realizó utilizando los mismos métodos, incluyendo las muestras cuyos haplotipos se pudieron determinar sin ambigüedades.

Para predecir el posible impacto de las sustituciones de aminoácidos en la proteína TYR, se usaron los servidores web SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y PROVEAN Protein (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php), mencionados anteriormente (capítulo 2, pag xx) y se empleó también PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Este último utiliza un enfoque basado en la secuencia y la estructura y clasifica los SNP como benignos, posiblemente dañinos o probablemente dañinos utilizando una puntuación de conteo independiente específica de la posición, que varía de 0 a 1.

4.3.4 Extracción de ARN y análisis de expresión

Tanto para la extracción de ARN como para la obtención de cADN se procedió como se describe en el capítulo 3.

Luego se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un par de primers específicos para este ensayo, donde uno de ellos se diseñó sobre la unión exón-exón para evitar la amplificación genómica (Tabla 4.3). Se utilizó el gen 18S para la normalización de los datos. Las reacciones de amplificación y la cuantificación de la abundancia se realizaron de la misma manera que se explicó en el capítulo anterior.

Tabla 4.3. Primers empleados para el estudio de expresión de TYR

Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Tamaño del amplicón (bp)	T annealing (°C)
qTYR-F	CCTGAAGCCAATGCACCCAT	qPCR- TYR mRNA	140	60
qTYR-R	TCCGGGTCTGAATCTTGTAGGT			

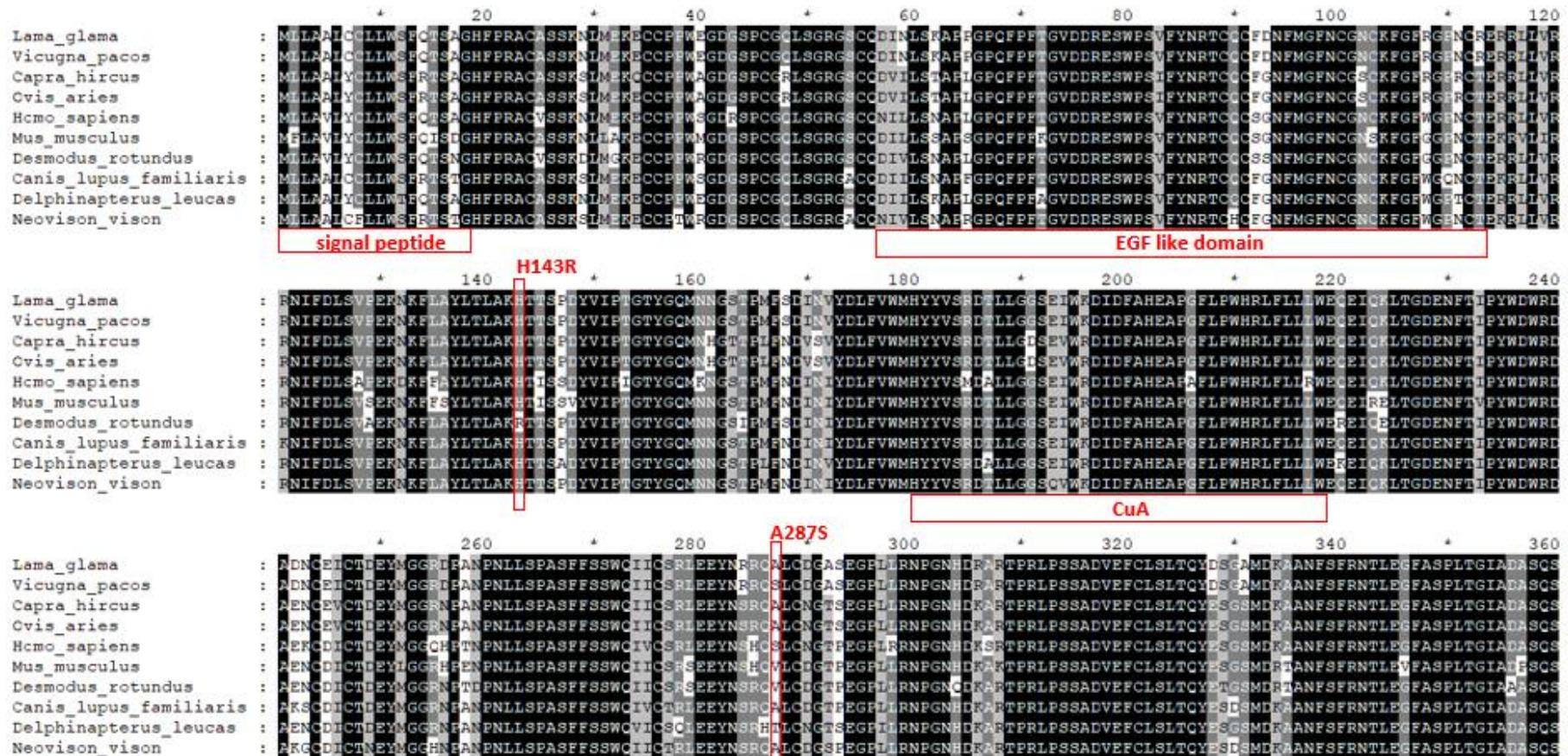
4.4 RESULTADOS

4.4.1 Descripción del gen TYR

Se secuenciaron los cinco exones de TYR con sus regiones flanqueantes, que incluyen 58 pb de la región 5'UTR y 85 pb de la región 3'UTR. La secuencia codificante completa comprendió 1593 pb, dividida en: 819 pb para el exón 1, 218 pb para el exón 2, 147 pb para el exón 3, 182 pb para el exón 4 y 227 pb para el exón 5. La secuencia del gen TYR de la llama se depositó en GenBank con número de acceso MK089778.

Se predice que la proteína codificada por el gen TYR tiene 530 aminoácidos. Presenta un péptido señal de 18 residuos, un dominio similar a EGF³ (desde el aminoácido 57 al 113) y una región transmembrana (desde 474 a 496). El dominio tirosinasa característico que une a dos iones de cobre, a través de dos conjuntos de tres histidinas, se expande desde el aminoácido 170 hasta el 403 (Figura 4.1). La identidad con proteínas ortólogas fue alta: 99% con alpaca, 91% con ovejas y cabras, 88% con humanos y 85% con ratones.

³EGF: siglas en inglés para Factor de Crecimiento Epidérmico.



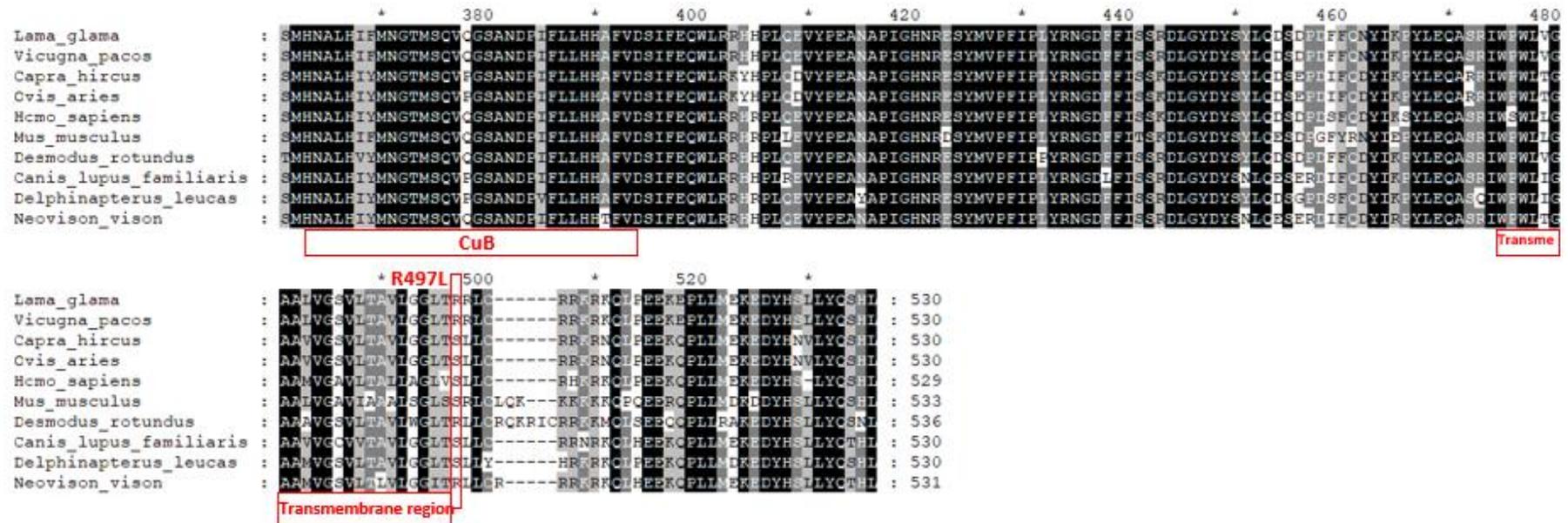


Figura 4.1. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína TYR para distintas especies. Los residuos se sombrearon según la conservación entre las especies, el color más oscuro (negro) indica las posiciones más conservadas. Los dominios de la proteína están indicados con recuadros rojos debajo del alineamiento. Los cuadrados verticales rojos indican los cambios de aminoácidos producidos por los SNP encontrados en la llama.

4.4.2 Polimorfismos de TYR y fenotipos de color

Para estudiar la variación del gen TYR, se secuenciaron los exones y sus regiones flanqueantes (3058 pb en total) en 29 llamas de diferentes orígenes y con diferentes fenotipos de color. Se detectó un total de 17 polimorfismos. La Figura 4.2 muestra la distribución de polimorfismos a lo largo del gen. La región codificante mostró 9 SNP, tres de los cuales resultaron no sinónimos: c.428A>G, ubicado en el exón 1, produce un cambio de aminoácido en la proteína de Histidina a Arginina en el residuo 143 de la enzima; c.859G>T se detectó en el exón 2 y cambia la Alanina del residuo 287 a Serina; y c.1490G>T, en el exón 5, reemplaza Arginina por Leucina en la posición 497. Además, se observó una transición C/T 26 pb antes del codón de inicio (ATG) y se detectaron dos SNP consecutivos en la región 3'UTR, 14 y 15 pb después del codón de stop (c.1593+14T>C y c.1593+15G>T). También se observaron seis SNPs sinónimos en los exones 1 y 5.

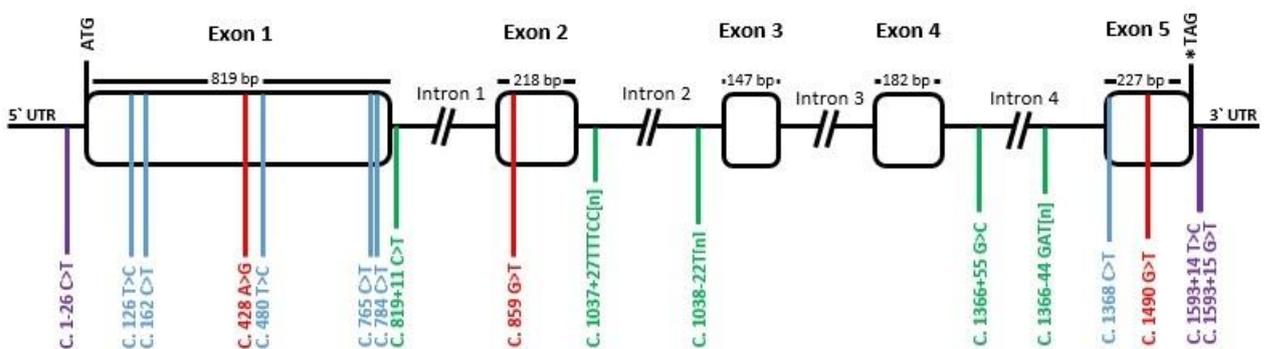


Figura 4.2. Representación esquemática del gen TYR con su distribución de polimorfismos en llamas. Las cajas rectangulares corresponden a los exones, mientras que los intrones y las regiones no traducidas se representan con líneas negras. Las posiciones +1 se asignaron al sitio de inicio de la traducción (codón ATG) y * indica el codón de parada. La numeración de los polimorfismos es relativa a la secuencia de ADN codificante y se indica mediante líneas de color transversales. Violeta corresponde a mutaciones en las regiones UTR, azul corresponde a mutaciones sinónimas en la región de codificación, rojo a mutaciones no sinónimas y verde a mutaciones intrónicas.

Además, se detectó variación en las regiones intrónicas: se identificaron dos SNP, dos microsatélites y una repetición homopolimérica en las regiones flanqueantes a los

exones de TYR (Figura 4.2). El primer microsatélite se encontró en el intrón 2, 27 pb después del final del exón 2 y consistió en cinco nucleótidos (TTTCC) que se repiten un número variable de veces. Los alelos variaron en el número de repeticiones, entre 20 y 30, y presentaron imperfecciones en su motivo. De acuerdo con el motivo, se clasificaron los alelos en tres tipos: el tipo 1 consistió en los cinco nucleótidos TTTCC repetidos, mientras que el tipo 2 agregó el patrón (TT)-(TTTCC)₂-(TT) entre las repeticiones. El tipo 3 presentó una delección de 1 base al principio (TTTC) y una sustitución de 1 base en otras de las repeticiones (TCTCC). Se observó que este último alelo segregó junto con la variante T/T de SNP c.859G>T. Un ejemplo de cada tipo y una lista de los alelos observados se proporcionan en la Figura 4.3 y en la Tabla 4.4. Sin embargo, es probable que existan más alelos, ya que hubo animales heterocigotos para los cuales no fue posible determinar los alelos por secuenciación directa.

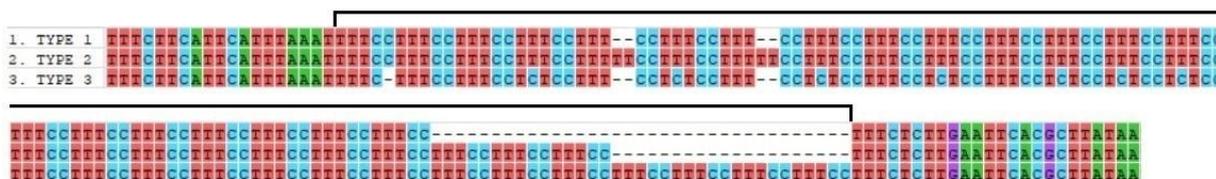


Figura 4.3. Alineamiento de los tres tipos de alelos del microsatélite en el intrón 2 del gen TYR de llama. El corchete indica el motivo que se repite en el microsatélite.

Tabla 4.4. Alelos observados en homocigosis para el microsatélite del intrón 2.

	Motivo alélico	n° de repeticiones
tipo 1	(TTTCC) ₂₀	20
	(TTTCC) ₂₁	21
	(TTTCC) ₂₃	23
tipo 2	(TTTCC) ₁₂ -(TT)-(TTTCC) ₂ -(TT)-(TTTCC) ₁₄	28
	(TTTCC) ₉ -(TT)-(TTTCC) ₂ -(TT)-(TTTCC) ₁₆	27
	(TTTCC) ₆ -(TT)-(TTTCC) ₂ -(TT)-(TTTCC) ₂₂	30
	(TTTCC) ₆ -(TT)-(TTTCC) ₂ -(TT)-(TTTCC) ₁₄	22
	(TTTCC) ₄ -(TT)-(TTTCC) ₂ -(TT)-(TTTCC) ₁₈	24
tipo 3	(TTTC)-(TTTCC) ₂ -[(TCTCC)-(TTTCC)] ₄ -(TCTCC) ₃ - (TTTCC) ₁₄	28

El segundo microsatélite se detectó en el intrón 4, 44 pb antes del inicio del exón 5 y consistió en un motivo de tres nucleótidos (GAT) que se repitieron 13-15 veces. Ocasionalmente, en algunas muestras, una repetición del motivo GAT fue reemplazada por AAT. La lista presentada en la Tabla 4.5 muestra los genotipos observados y la posible combinación de alelos.

Tabla 4.5. Alelos y genotipos observados para el microsatélite del intrón 4.

Alelos observados en homocigosis	n° de repeticiones
(GAT)13	13
(GAT)5-(AAT)-(GAT)7	13
(GAT)5-(AAT)-(GAT)9	15
Genotipos observados	Posible combinación de alelos
(GAT)5-(RAT)-(GAT)7	(GAT)13 + (GAT)5-(AAT)-(GAT)7
(GAT)4-(RAT)2-(GAT)7	(GAT)13 + alelo desconocido
(GAT)3-(RAT)-(GAT)-(RAT)-(GAT)7	(GAT)5-(AAT)-(GAT)7 + (GAT)5-(AAT)-(GAT)9

Finalmente, una repetición homopolimérica de timidina se observó 22 pb antes del inicio del exón 3. Presentó una longitud variable de 9 o 10 timidinas consecutivas.

De toda la variación encontrada en el gen TYR, se analizaron en 85 muestras adicionales de llama sólo aquellos polimorfismos que podrían influir en el fenotipo del color: los SNP no sinónimos y el que se encuentra 26 pb aguas arriba del codón ATG. La distribución de cada genotipo por grupo de color se muestra en la Tabla 4.6. Con respecto a los SNP codificantes, no se encontró asociación significativa entre ninguno de los genotipos y grupos de color. Sin embargo, la distribución de las frecuencias alélicas para el SNP c.428A>G fue significativamente diferente entre los grupos ($p=0,015$). El alelo G fue más frecuente en el grupo blanco en comparación con el no diluido ($p=0,026$), pero la diferencia no fue estadísticamente diferente cuando se comparó con el diluido ($p=0,103$).

Tabla 4.6. Distribución de genotipos entre grupos fenotípicos

		c.1-26C/T			c.428A>G			c.859G>T			c.1490G>T		
		C/C	C/T	T/T	A/A	A/G	G/G	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T
FENOTIPOS NO DILUIDOS	NEGRO	20	3	-	22	1	-	13	4	6	17	6	1
	ROJO	7	2	1	9	1	-	8	1	1	8	1	1
	CARA NEGRA	9	2	2	12	1	-	13	-	-	5	7	1
	TOTAL	36	7	3	43	3	-	34	5	7	30	14	3
FENOTIPOS DILUIDOS	CREMA	11	7	1	19	1	-	13	1	3	9	8	3
	GRIS	2	3	-	6	1	-	5	-	-	3	4	-
	TOTAL	13	10	1	25	2	-	18	1	3	12	12	3
FENOTIPOS BLANCOS	BLANCO	33	4	-	29	6	2	26	5	6	26	10	1
	BLANCO- OJOS-AZULES	1	2	-	2	1	-	3	-	-	1	2	-
	TOTAL	34	6	0	31	7	2	29	5	6	27	12	1

Además, el análisis de distribución de los haplotipos para los tres SNP no sinónimos no mostró asociación con el color de capa ($p > 0,05$) (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Distribución de haplotipos entre grupos fenotípicos

	AGG/ AGG	AGT/ AGT	ATG/ ATG	AGG/ AGT	AGG/ GGG	AGG/ ATG	ATG/ ATT	GTG/ GTG	GGG/ GGG	ATT/ AGT
FENOTIPOS NO DILUIDOS	19	2	5	10	2	4	2	-	-	1
FENOTIPOS DILUIDOS	7	2	3	8	1	-	-	-	-	-
FENOTIPOS BLANCOS	12	1	4	9	5	3	1	1	1	-
TOTAL	38	5	12	27	8	7	3	1	1	1

Los resultados de PolyPhen-2, SIFT y PROVEAN Protein clasificaron los tres SNP no sinónimos como benignos/neutros/tolerados. El SNP c.428A>G priva a la proteína de la Histidina 143, reemplazándola con otro aminoácido básico, Arginina. Aunque esta posición está relativamente conservada entre las especies, los murciélagos también presentan un residuo de arginina (Figura 4.1). La sustitución c.859G>T genera un cambio de Alanina a Serina en el residuo 287, una sustitución bastante común en esa posición (Figura 4.1). Por último, el SNP c.1490G>T cambia Arginina a Leucina en el aminoácido 497, el cual se encuentra al final de la región transmembrana. Esta misma mutación se informó en el gen TYR de alpaca y se predijo que tendría un efecto biológico trivial (Cransberg and Munyard, 2011).

Para el SNP no codificante c.1-26C/T, la distribución entre fenotipos resultó significativamente diferente ($p=0,023$). El genotipo heterocigoto C/T fue significativamente más frecuente en el grupo diluido en comparación con el no diluido ($p=0,042$) y el blanco ($p=0,013$) (Tabla 4.6).

Finalmente, para los polimorfismos de TYR que presentaron diferencias en su distribución (c.1-26C/T y c.428A>G), se analizó qué variantes estaban presentes en las llamas blancas con el genotipo MC1R*3/MC1R*3. Se observaron diferentes genotipos posibles para cada uno de los SNPs de TYR. Esto sugiere que no existe una relación entre estos polimorfismos y el genotipo de MC1R.

4.4.3 Expresión de TYR en diferentes fenotipos de color

Todas las muestras presentaron amplificación para los genes 18S y TYR; las curvas de melting confirmaron un solo producto en cada PCR y los controles NTC no mostraron amplificación. Se compararon los niveles de expresión de TYR para los fenotipos no diluidos, diluidos y blancos. Según los resultados obtenidos el nivel de expresión en el grupo blanco fue significativamente más bajo ($p<0.05$) que en el grupo no diluido. Aunque el nivel de expresión fue menor en las llamas blancas en comparación con las

diluidas, esta diferencia no fue significativa. Tampoco lo fue la diferencia en la expresión entre no diluidos y diluidos (Figura 4.4).

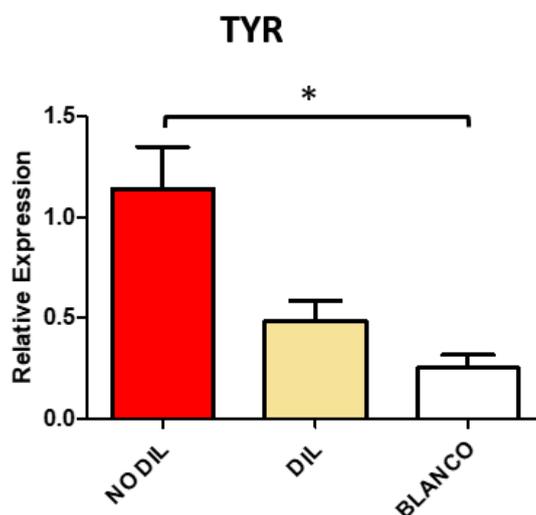


Figura 4.4. Expresión relativa de TYR en la piel de las llamas. Los gráficos de barras muestran valores medios. Las barras de error representan el error estándar (SE). Se analizaron tres réplicas biológicas para cada grupo de color. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.4.4 Regiones reguladoras del gen TYR en llamas

El promotor proximal TYR (número de acceso de GenBank MK847855) mostró tres elementos conservados, dos cajas E (CATGTG) y una caja M (AGTCATGTGCT), que son sitios de unión conocidos para los factores de transcripción bHLH-LZ, como MITF. También presentó dos sitios de unión para OTX2, que es otro factor de transcripción que no está involucrado en la melanogénesis, pero es importante en el epitelio pigmentario de la retina. Además, se identificó una secuencia correspondiente a la caja TATA entre 110 y 104 pb antes del primer codón. No se observó variación dentro de estos elementos reguladores (Figura 4.5 A).

Además del SNP c.1-26C>T, ya descrito, se detectó otro SNP que cambia una C por una T 402 pb arriba del codón de inicio; se observaron los tres genotipos posibles en

los diferentes grupos fenotípicos. También se detectaron otros dos polimorfismos menos frecuentes: una repetición homopolimérica de 8 o 9 timidinas, que se encontró en heterocigosis en tres llamas, una de cada grupo fenotípico; y un motivo repetido imperfecto, que comúnmente presentó 11 repeticiones, excepto por dos individuos, uno diluido y otro no diluido, que fueron heterocigotas con 11 y 12 repeticiones par cada alelo.

La Figura 4.5B muestra la región LCR (número de acceso de GenBank MK847856). La posición de las cajas A y B, correspondientes a los sitios putativos de unión para los factores de transcripción, están indicadas y alineadas con las de ratón y humano (X76647 y AY180962). Los polimorfismos encontrados en esta región, SNPs y una delección de 1 pb, también se encuentran marcados en la figura. Todos ellos se ubicaron por fuera de las cajas A y B, excepto una transición de T a C, dentro de la caja A. Sin embargo, esa posición no está conservada entre humanos y ratones, ya que uno presenta una C y el otro una T, como se observó en la llama. Los otros polimorfismos presentaron diferentes genotipos dentro cada grupo de color, sin mostrar ninguna relación aparente.

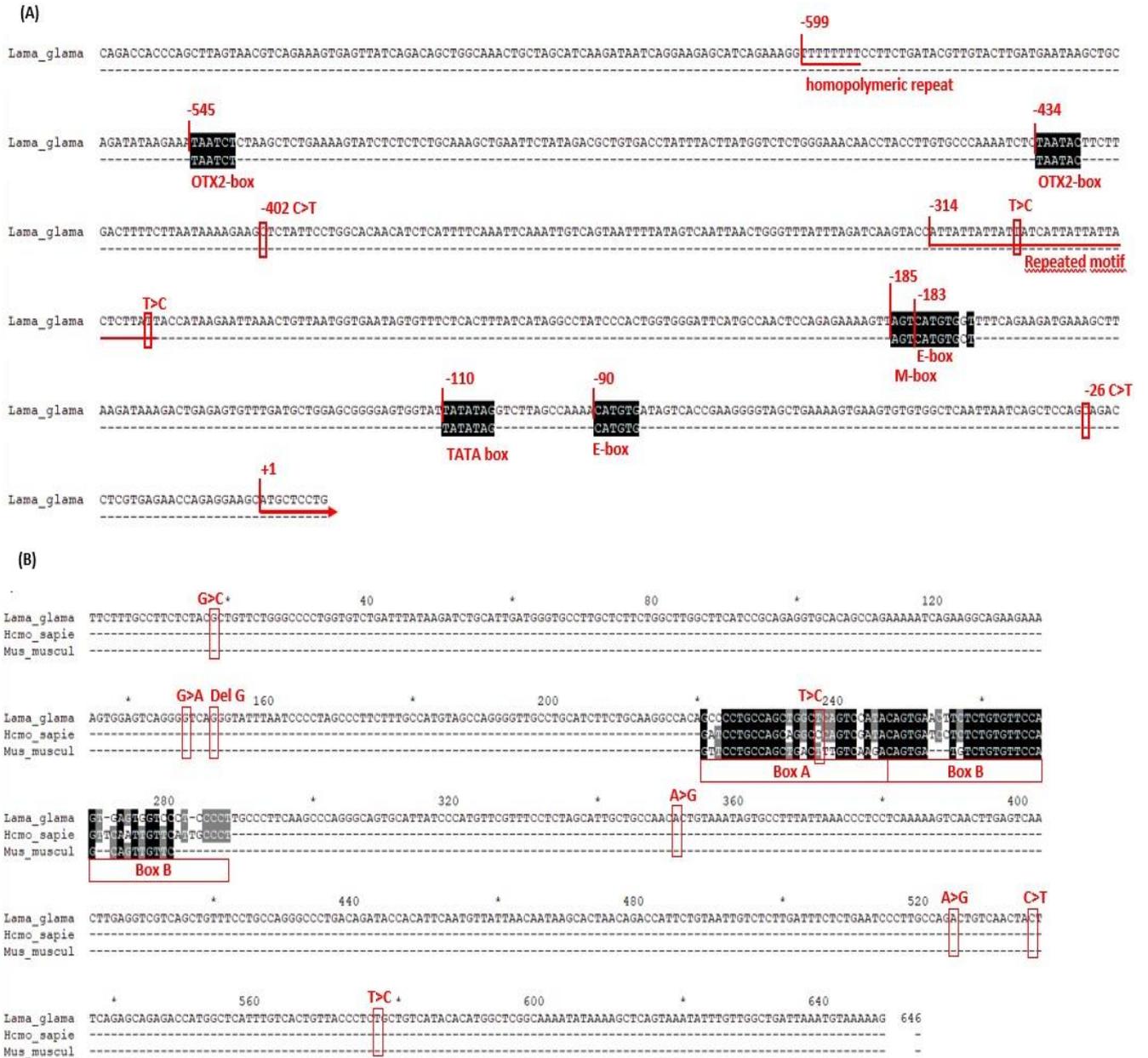


Figura 4.5. (A) Región promotora proximal del gen TYR. La posición +1 se asignó al sitio de inicio de la traducción (codón ATG). Los elementos reguladores están alineados con su secuencia consenso en bloques negros y se nombran debajo. Los números sobre los elementos indican posiciones relativas. Los recuadros rojos indican la ubicación de los SNP encontrados en las llamas y los elementos repetidos están subrayados. (B) Región LCR. Las posiciones de los nucleótidos (de 1 a 646) se indican en negro sobre la secuencia. El número 1 fue asignado arbitrariamente para el primer nucleótido mostrado. Las cajas A y B están alineadas con las de ratón y humano (X76647 y AY180962) y la variación encontrada en las llamas está recuadrada en color rojo.

4.5 DISCUSIÓN

La estructura del gen TYR de la llama resultó similar a la descrita anteriormente en humanos y otras especies (García-Borrón and Solano, 2002; Kanteev et al., 2015). Los exones fueron relativamente conservados, al igual que los dominios de la proteína codificada. Además, los valores de identidad en comparación con proteínas ortólogas fueron altos.

Con respecto a la variación genética observada en las llamas, estas presentaron varios polimorfismos a lo largo del gen TYR que incluyeron diferentes tipos de variación. Sin embargo, los exones 3 y 4, que codifican la región activa de la enzima, no presentaron ninguna mutación.

Este estudio mostró diferentes secuencias repetidas en regiones no codificantes del gen TYR: microsatélites y repeticiones homopoliméricas. Aunque aún no se comprende por completo, hay evidencias de que los elementos repetidos tienen una función en el genoma y de que su distribución no es aleatoria (Vieira et al., 2016). Existen numerosos estudios que indican que las repeticiones ubicadas en intrones pueden afectar la transcripción de genes, el splicing de ARNm o su exportación al citoplasma (Li et al., 2004). Además, algunas de estas repeticiones pueden tener un efecto en el fenotipo y la longitud de los microsatélites es particularmente importante en este aspecto (Sjakste et al., 2013). Los alelos largos se asocian con una alta predisposición a patologías (Belguith-Maalej et al., 2013). En relación con el color de capa, un estudio reciente reveló la presencia de una gran inserción intrónica en la proteína asociada a tirosinasa 1 (TYRP1) de los visones americanos, la cual altera el splicing del gen y produce el fenotipo “Palomino americano” (Cirera et al., 2016). Debido a la complejidad de las secuencias repetidas observadas en las llamas, que variaron en longitud y en motivo, no fue posible determinar el número total de alelos. Se debe realizar un estudio más exhaustivo para analizar estas variantes en particular y su relación con el color de capa. Sin embargo, es importante describirlas lo más detallado posible, ya que existen pocos microsatélites descritos para camélidos en comparación con otras especies y tienen

importantes aplicaciones para otro tipo de estudios, como el análisis de ligamiento, la evolución, la genética forense y la genética de poblaciones.

Generalmente, mutaciones disruptivas en el gen TYR, como los cambios de marco de lectura o las mutaciones sin sentido, dan como resultado una proteína truncada inactiva y producen animales albinos en diferentes especies (Anistoroaei et al., 2008; Blaszczyk et al., 2005; Imes et al., 2006; Oetting, 2000; Schmutz et al., 2004). La hipopigmentación, por otro lado, ha sido asociada más frecuentemente con mutaciones puntuales con cambio de sentido. En consecuencia, hay al menos siete alelos descritos que resultan en hipopigmentación en ratones (Challa et al., 2016). Los visones también presentan el alelo Himalaya, que produce un fenotipo hipopigmentado y es el resultado de una única sustitución de nucleótidos (Benkel et al., 2009). También, los fenotipos diluidos siameses y birmanos en gatos están asociados con sustituciones en TYR (Lyons et al., 2005). En llamas, se analizó el gen TYR en fenotipos no diluidos, diluidos y blancos y se observaron tres SNP no sinónimos. Aunque el análisis in silico predijo que los tres SNP producirían cambios benignos en la proteína, la frecuencia del alelo G para c.428A>G fue significativamente mayor en el grupo blanco en comparación con el no diluido, lo que sugiere una asociación fenotípica. Este alelo produce un cambio de aminoácidos de Histidina a Arginina en el residuo 143 de la enzima tirosinasa. Aunque es una posición relativamente conservada entre las especies, la proteína homóloga de los murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*) presenta también una Arginina en esta posición. Además, se buscó en la base de datos de humanos del proyecto Ensembl y se encontró que la misma mutación fue observada con una frecuencia muy baja (0,00006153), pero no se informa si hay algún fenotipo asociado. Teniendo en cuenta toda la información que acabamos de mencionar, es difícil evaluar la posible relevancia funcional de esta variante.

Además de estudiar su variación, se analizó la expresión del gen TYR. Se observó que TYR se expresó significativamente menos en el grupo blanco comparado con el no diluido. Esto se esperaba, ya que se encontró que el gen MITF-M, que regula la expresión de TYR, se expresa menos en llamas blancas que en las de color (Anello et al., 2019). Estos resultados también son consistentes con las observaciones de Paterson et al. (2015), quienes demostraron que la depleción parcial de TYR inhibe la maduración del

melanosoma y la expresión de genes que regulan la melanogénesis, alterando el color del pelaje del ratón.

Los niveles de expresión de TYR también fueron estudiado por Munyard (2011), quien observó que TYR, junto con otros siete genes relacionados con el color, se expresan en un patrón común en las alpacas: alto en negro, moderado en marrón claro y bajo en blanco. Del mismo modo, Chen et al. (2012) analizaron la expresión de TYR en la piel de las cabras grises de Jining y resultó más alta en las cabras de color gris oscuro que en las de color gris claro. Kim et al. (2014) también observaron que TYR se expresaba más en el hocico oscuro que en el claro de las vacas nativas coreanas. En el presente estudio, la expresión en el grupo diluido resultó intermedia a la de los otros dos grupos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto podría deberse a diferencias pequeñas en la expresión sólo se podrían detectar con una muestra más grande. Además, diferencias en el grado de dilución de los animales que conformaron el grupo diluido podrían haber influido en este resultado.

Dado que las regiones UTR tienen importantes elementos reguladores que controlan la expresión génica (Matoulkova et al., 2012), en este estudio se analizaron las regiones reguladoras más importantes del gen TYR: el promotor proximal y el LCR. Sin embargo, se encontró que todos los elementos reguladores descritos anteriormente en estas regiones estaban conservados en la llama; la variación detectada se ubicó por fuera de los elementos. Ninguno de los polimorfismos observados en estas regiones parece explicar las diferencias de expresión observadas entre animales de color y blancos.

Inesperadamente c.1-26C>T presentó una frecuencia significativamente mayor del genotipo C/T en animales diluidos comparados con los otros grupos fenotípicos. Sin embargo, este polimorfismo sólo no es causal de la dilución del color, ya que el genotipo C/T se observó también en llamas no diluidas, donde se espera que la actividad de la tirosinasa sea normal. Una posible explicación para este resultado podría ser que la misma mutación de TYR en diferentes contextos genéticos produzca diferentes fenotipos, tal como se propuso para conejos de diferentes cepas (Aigner et al., 2000). Además, otros polimorfismos podrían contribuir junto con c.1-26C>T al fenotipo de color final. Finalmente, no se puede excluir que otro polimorfismo en desequilibrio de

ligamiento con c.1-26C>T, ubicado en regiones no contempladas en este estudio (como las regiones intrónicas u otras reguladoras) sea causal de la dilución de la melanina.

CAPITULO 5: EL GEN

SLC7A11

5.1 INTRODUCCION

Según su origen, los fenotipos blancos pueden dividirse en dos clases principales: blanco albino, causado por una falla en la producción de melanina debido a mutaciones en el locus albino (gen TYR), y blanco no albino, causado por trastornos en el desarrollo de los melanocitos, en su diferenciación o en su migración. Sin embargo, la dilución extrema de la feomelanina también se ha propuesto como un posible mecanismo para la obtención de fenotipos blancos o crema. En perros, Sponenberg y Rothschild (2001) describieron un locus Intenso (I) que diluye solo la feomelanina y sería el responsable del color en los sabuesos afganos, que parecen casi blancos pero aún conservan una máscara eumelánica (Figura 5.1). En este sentido, genes que afecten la síntesis o el transporte de la feomelanina pero no de la eumelanina son buenos candidatos para generar fenotipos diluidos y blancos.



Figura 5.1. Ejemplo del efecto del locus Intenso (I) en perros sabuesos afganos. A la izquierda se muestra el fenotipo marrón feomelánico no diluido y a la derecha el color crema. Nótese que ambos presentan una coloración eumelánica en el hocico y en la punta de las orejas, demostrando que la dilución no afecta a este pigmento. Reproducido de: Genetics of Coat Color and Type in Dogs by Sheila Schmutz-2016 (<http://homepage.usask.ca/schmutz/dogcolors.html>)

La síntesis de feomelanina es llevada a cabo en el melanosoma y, a diferencia de la eumelanina, requiere de la cistina (dímero de cisteína) como precursor (Figura 1.4). La cistina ingresa al melanosoma gracias al intercambiador de cistina/glutamato, el cual

pertenece a la familia de transportadores de aminoácidos heterodiméricos, ya que está formado por una cadena ligera (xCT) y una cadena pesada (4F2) (Lewerenz et al., 2013). La cadena ligera es codificada por el gen SLC7A11 (familia de portadores de soluto 7 número 11), el cual es un importante regulador la síntesis de la feomelanina en los melanocitos y en el pelo, pero no interviene en la síntesis de eumelanina. Esto se ha demostrado en un estudio llevado a cabo por Chintala et al. (2005), quienes encontraron que una mutación en SLC7A11 era responsable del fenotipo gris sutil (*sut*) en el ratón; los mutantes *sut* perdieron su recubrimiento amarillo feomelánico demostrando que el transporte de cistina a los melanocitos es esencial para la síntesis de feomelanina in vivo. En cambio, la síntesis de la eumelanina no se vio afectada en los mutantes *sut* (Figura 5.2). Otros autores encontraron que existe una relación entre la expresión de SCL7A11 y el fenotipo de color. Por ejemplo, He et al. (2012) observaron que la sobreexpresión de SCL7A11 incrementa la síntesis de feomelanina en modelos in vitro e in vivo en ovejas. Asimismo, Tian et al. (2015) detectaron diferencias en los niveles de expresión de SLC7A11 entre alpacas marrones y blancas. Aparte de los tres trabajos mencionados no hay otros estudios que analizan la relación de SCL7A11 con el color de capa.

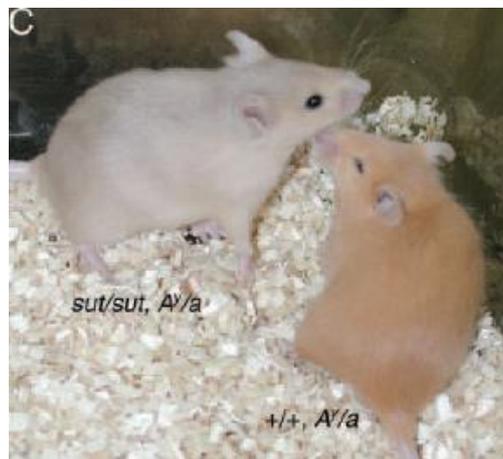


Figura 5.2. Efecto de la mutación *sut* sobre el fenotipo de color en ratones. A la derecha se muestra un ratón control con capa feomelánica y a la izquierda un mutante *sut/sut* que presenta una dilución casi total. Reproducido de Chintala et al. (2005).

5.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La llama puede presentar fenotipos feomelánicos con un gran rango de diluciones, que van desde el rojo oscuro, pasando por diferentes tonos hasta llegar al crema. Además, la dilución extrema de feomelanina es un posible mecanismo para la producción del fenotipo blanco. Sin embargo, aún no se conoce qué genes intervienen en el proceso de dilución de feomelanina en esta especie. En este capítulo se propone estudiar el posible rol de SLC7A11 en este proceso, planteando evaluar la siguiente hipótesis:

- Variantes en el gen de la cadena ligera del intercambiador de cistina/glutamato (SLC7A11) están asociadas a fenotipos diluidos y blanco en la llama.

Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar la región codificante del gen SLC7A11 en llamas con fenotipos de color feomelánico y blanco.
2. Estudiar los niveles de expresión de SLC7A11 en llamas con fenotipos feomelánicos no diluidos, feomelánicos diluidos y blanco y analizar su asociación con dichos fenotipos.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Muestras y extracción de ARN

Para estudiar la variación y la expresión de SLC7A11, se tomaron biopsias de piel de llamas con fenotipos blancos (n=6) y feomelánico (n=7) de la Cabaña San Bernardo y de Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. La recolección de muestras, la extracción de ARN y la obtención de cADN se realizó como se describe en el capítulo 3.

5.3.2 Secuenciación y descripción de SLC7A11

Para secuenciar la región codificante de SCL7A11 se diseñaron primers sobre regiones conservadas de otras secuencias de mamíferos disponibles en GenBank. Se utilizó un diseño de cuatro fragmentos superpuestos para cubrir completamente la región codificante y parte de las 5' y 3'UTR. En la tabla 4.1 se muestran una lista de los primers empleados. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando el protocolo descrito previamente en el capítulo 2, y los productos fueron secuenciados por Macrogen Inc.

Tabla 5.1. Lista de primers utilizados para la secuenciación de SLC7A11.

Primer	Secuencia (5'-3')	T annealing °C	Tamaño del amplicón (pb)
SLC7A11-1-F	TCACACCAAGAGGCATCCAA	57	473
SLC7A11-1-R	CACCCAGACTCGCACAAAAG		
SLC7A11-2-F	CACTGTTTGGAGCCTTGTCTT	57	492
SLC7A11-2-R	AGTTGAGATAAAACCAGCCAGCA		
SLC7A11-3-F	TCCCTGGAGTGATGCAGCTAA	57	536
SLC7A11-3-R	GAGGTCCCCAGAGAAGAGCA		
SLC7A11-4-F	TCCATGATTCACGTCCGCAA	55	513
SLC7A11-4-R	TGTTTCAGCTCTTTGGGCAGA		

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas utilizando Geneious (v.6.1.8, Biomatters). Se usó el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) para la predicción de las regiones transmembrana, Pfam (<http://pfam.xfam.org>) para la identificación de dominios conservados y BLASTP (blast.ncbi.nlm.nih.gov) para estudiar

la homología de proteínas. El efecto en la proteína de las mutaciones encontradas se evaluó usando los servidores web SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) y PROVEAN Protein (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php).

5.3.3. Estudio de expresión

Para el análisis de la expresión, las muestras se dividieron en tres grupos de colores: feomelánico sin diluir (n=3), feomelánico diluido (n=3) y blanco (n=6). Los animales fueron clasificados en estos grupos según un análisis visual del fenotipo, seleccionando aquellos con una marcada dilución de feomelanina.

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando primers específicos diseñados sobre la región codificante de SLC7A11 de la llama (Tabla 5.2) y se utilizó el gen 18S como control endógeno. El protocolo de qPCR y la cuantificación de la abundancia se realizaron como se describe en el capítulo 3.

Tabla 5.2 Primers empleados para el estudio de expresión de SLC7A11

Primer	Secuencia (5'-3')	T annealing °C	Tamaño del amplicón (pb)
qSLC7A11-F	CGCTGGCTGGTTCTATCTCA	60	149
qSLC7A11-R	CCTCGGCACTAATGGTCGTA		

5.4 RESULTADOS

5.4.1. Descripción de SLC7A11

La región codificante completa de SLC7A11 de la llama presentó 1512 pb, divididos en 12 exones (Tabla 5.3). La extensión de cada exón fue determinada por homología y se muestra en la Tabla 5.3. De acuerdo a las predicciones realizadas, la proteína codificada por el gen SLC7A11 tendrá 503 aminoácidos con un dominio permeasa altamente conservado y 12 regiones de hélice transmembrana con residuos citoplasmáticos N-terminales y C-terminales (Figura 5.3B). Se alineó la secuencia predicha para la proteína de la llama con otras especies de mamíferos, y ésta presentó una alta identidad con sus homólogos (desde el 99% con alpaca a 91% con ratón). En la Figura 5.3 se muestra este alineamiento así como el dominio permeasa y las regiones transmembrana; se puede observar que estas regiones están altamente conservados entre especies.

(A)



(B)

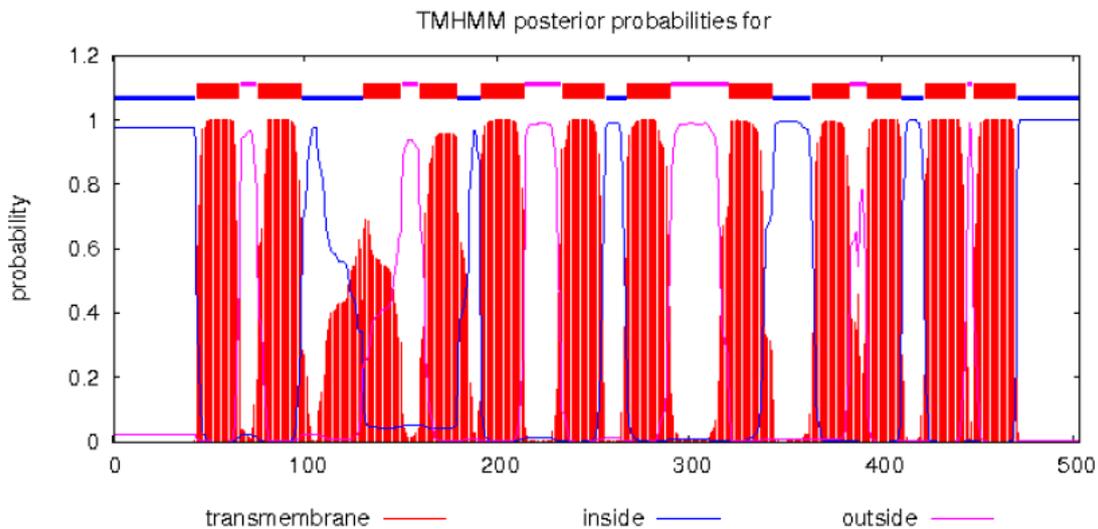


Figura 5.3. (A) Alineamiento de la secuencia de la proteína SLC7A11 de la llama con proteínas ortólogas. En rojo se recuadra el dominio permeasa y arriba en azul las 12 regiones transmembrana. (B) Predicción de la localización de los dominios transmembrana de SLC7A11.

Con respecto a la variación de SLC7A11 en la llama, se encontraron 7 SNPs en la región codificante (Tabla 5.3). Seis de ellos fueron cambios sinónimos en la proteína y 1 no sinónimo: el SNP c.418G>T, que cambia una Alanina por una Serina en el residuo 140 de la proteína. Este SNP se observó en un único animal feomelánico y de acuerdo a las predicciones de SIFT y PROVEAN Protein es un cambio tolerado que no afecta a la función de la proteína.

Tabla 5.3. Exones de SLC7A11 y polimorfismos en llama.

Exón	Extensión en la región codificante	Polimorfismos		Cambios en la proteína	
Exón 1	1- 277	-		-	
Exón 2	278 - 403	c.298 T>C	c.381 C>T	No	No
Exón 3	404 - 520	c.418 G>T		p.140 A>S	
Exón 4	521 - 646	c.522T>C		No	
Exón 5	647 - 746	-		-	
Exón 6	747 - 791	-		-	
Exón 7	792 - 915	c.837 T>C		No	
Exón 8	916 - 1019	c.984 T>C		No	
Exón 9	1020 - 1116	-		-	
Exón 10	1117 - 1266	-		-	
Exón 11	1267 - 1444	c.1380 G>T		No	
Exón 12	1445 - 1512	-		-	

5.4.2 Expresión de SLC7A11

Se estudió la expresión relativa de SLC7A11 en la piel de llamas con los fenotipos feomelánico no diluido, feomelánico diluido y blanco. Los niveles de expresión de SLC7A11 en el grupo no diluido difirieron significativamente de aquellos en animales diluidos y blancos ($p < 0.05$). La expresión del grupo blanco fue muy baja y cualitativamente menor que la del grupo diluido, sin embargo esta diferencia no fue significativa (Figura 5.4).

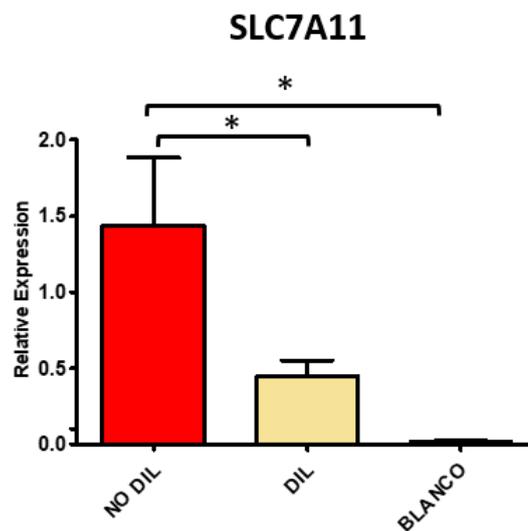


Figura 5.4. Expresión relativa de SLC7A11 en llamas. Los gráficos de barras muestran valores medios. Las barras de error representan el error estándar (SE). Se analizaron tres réplicas biológicas para los grupos diluido y no diluido y seis para el blanco. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

5.5 DISCUSIÓN

Hay muy pocos estudios que aborden la variación del gen SLC7A11 y su papel en la pigmentación de los mamíferos. En este capítulo, se describió la región codificante de este gen en la llama y se estudió su variación y expresión animales de fenotipos feomelánicos y blanco. En concordancia con estudios estructurales previos (Bridges et al., 2012; Gasol et al., 2004), la proteína codificada por el gen SLC7A11 de la llama

presentó un dominio permeasa y 12 hélices transmembrana. Además, su secuencia estuvo altamente conservada entre especies.

La variación observada en el gen SLC7A11 de la llama se debió principalmente a sustituciones sinónimas; el único SNP no sinónimo encontrado no parece estar asociado a ningún fenotipo de color. Sin embargo, sí se observaron diferencias en los niveles de expresión de SLC7A11 entre los grupos de color analizados. Las llamas del grupo feomelánico no diluido presentaron una mayor expresión que aquellas de los grupos feomelánico diluido y blanco. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Tian et al. (2014), quienes observaron que la expresión de SLC7A11 en alpacas marrones era mayor que en las alpacas blancas. Asimismo, concuerdan con los resultados de Chintala et al. (2005) que trabajaron con los ratones mutantes *sut* y lograron restituir el fenotipo Agutí normal insertando el alelo salvaje de SLC7A11 en los mutantes depigmentados. De manera inversa, insertaron el alelo *sut* en animales con fenotipo amarillo intenso y su pigmentación se atenuó dando un color crema claro. Esto demuestra que una mayor expresión de SLC7A11 produce un aumento en la síntesis de feomelanina y viceversa.

Si bien en la llama la expresión de SCL7A11 en el grupo blanco fue muy baja, esta no fue significativamente diferente a la del grupo feomelánico diluido. Este último mostró una expresión intermedia que sólo se diferenció de la del grupo no diluido. Esto podría deberse a la manera en que se eligieron los animales, ya que se tomaron muestras de llamas con una marcada dilución de feomelanina. Es decir que en el extremo más diluido del rango de todos fenotipos diluidos, se espera obtener valores de expresión cercanos a los del grupo de animales blancos, mientras que en el otro extremo los valores deberían ser más similares a los de los animales con capas sin diluir.

Se puede concluir que la expresión de SLC7A11 tiene un rol en la determinación del color de capa de la llama, pero se necesita más investigación para comprender cómo se controla esta expresión.

CAPÍTULO 6: EL GEN ASIP

6.1 INTRODUCCIÓN

La proteína de señalización Agutí (ASIP) actúa como antagonista de la hormona α -MSH, uniéndose a MC1R y estimulando la síntesis de feomelanina. Esta unión genera fenotipos claros, de color amarillo y rojizo. Por el contrario, mutaciones recesivas en el locus, que afectan la actividad de la proteína, resultan en un color de pelaje oscuro. Además, el locus ASIP controla los patrones de pigmentación espaciales y temporales. Por ejemplo, en ratones con el genotipo A/A se sintetiza pigmento amarillo solo durante la mitad del ciclo de crecimiento del pelo, por lo cual estos ratones tienen una banda subapical amarilla sobre un fondo negro tanto en su vientre como en su dorso. En cambio, ratones que portan el alelo A^W (“light-bellied”) sintetizan el pigmento amarillo durante todo el ciclo de crecimiento del pelo, lo que conduce a un fenotipo de vientre completamente amarillo y dorso bandeado (Vrieling et al., 1994). Hasta el momento se han identificado más de 50 alelos de ASIP en ratones, considerando mutaciones naturales e inducidas (Montoliu et al., 2011), y se ha estudiado este gen y sus variaciones sobre el fenotipo de color en muchas otras especies de mamíferos (Dreger et al., 2013; Mallarino et al., 2017; Schneider et al., 2012).

ASIP está incorporado en un bloque cromosómico conservado entre especies que contiene los genes RALY, IF2S2, XPOTP1, ASIP, AHCY, ITCH, PIGU, NCOA6 y GGT7 (Chandramohan et al., 2013). La región codificante de ASIP consta de solo tres exones, exones 2,3 y 4. Sin embargo, el gen completo presenta una estructura compleja con diferentes promotores y primeros exones no traducidos que están separados de la parte codificante del gen por grandes intrones (hasta 60-70 kb aproximadamente). Estos primeros exones se dividen en dos bloques: el primero comprende a los exones 1A y 1A', involucrados en la distribución de pigmentos en diferentes regiones del cuerpo; y el segundo contiene a los exones 1B y 1C que son específicos del ciclo de crecimiento de la fibra (Lightner, 2009) (Figura 6.1 A). Los exones no codificantes se transcriben alternativamente formando las regiones 5' no traducidas (5'UTR) de los ARNm (Figura 6.1 B).

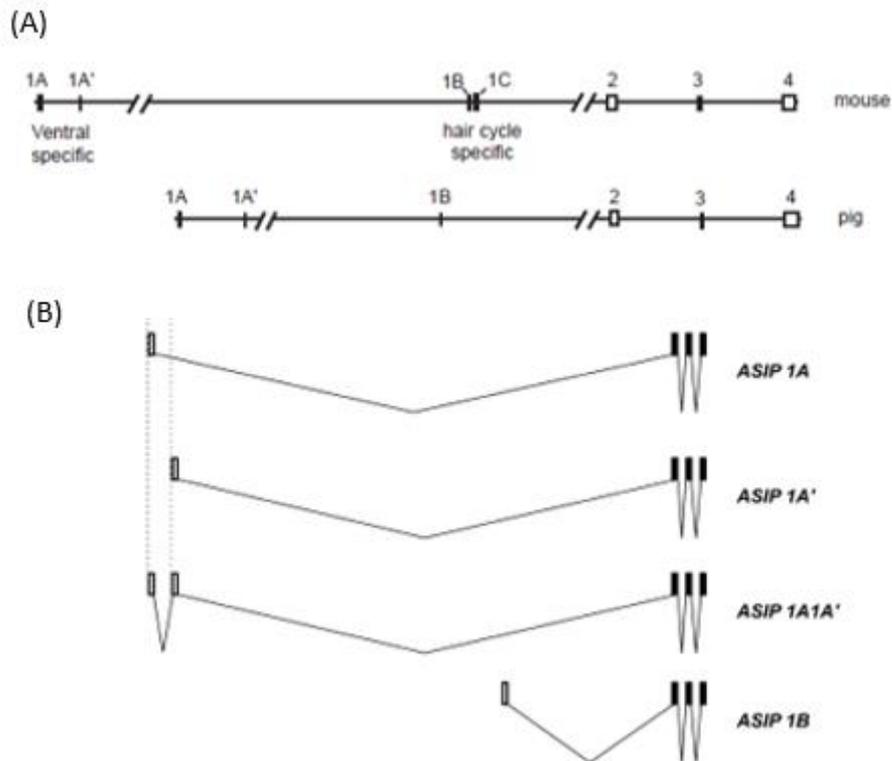


Figura 6.1. (A) Estructura genómica de ASIP en ratón y cerdo. Adaptada de Lightner (2009). (B) ARNm con diferentes 5'UTR aislados de la piel de cerdo. Adaptada de Drögemüller et al. (2006).

Las 5'UTR son importantes regiones regulatorias ya que controlan la expresión de los genes a través de distintos elementos presentes en su secuencia: sitios internos de entrada de ribosomas (IRES), sitios de unión a proteínas represoras o activadoras, estructura secundaria de la región, codones de inicio no AUGs, entorno del AUG, codones de inicio previos al marco de lectura (uAUG) y marcos de lectura previos al principal (uORF) (Barbosa et al., 2013). La variación que presentan las 5'UTRs es igual o incluso de mayor importancia que la variación en regiones codificantes para la determinación del fenotipo (Rouzaud et al., 2010). En ASIP, particularmente, existen varios estudios en animales domésticos y silvestres que relacionan transcritos con diferentes 5'UTRs con colores y patrones de pigmentación. Por ejemplo, en ratones de vientre claro y en conejo con el mismo fenotipo, la distribución de pigmentos está controlada por transcritos de ASIP con diferentes 5'UTR (Bultman et al., 1994; Fontanesi et al., 2010). En cerdos, se han encontrado cinco transcritos con diferentes 5'UTR y todos ellos se expresan en las regiones dorsales y ventrales. En esta especie la

coloración dorso-ventral depende de los niveles de expresión de los transcritos y no de transcritos específicos (Drögemüller et al., 2006). Por otro lado, en la alpaca se aislaron tres transcritos con diferentes 5'UTR que presentan diferencias de expresión en fenotipos blanco, marrón y negro (Chandramohan et al., 2013).

Además, la sobreexpresión de ASIP ha sido asociada con el fenotipo blanco en distintas especies. En ovejas, por ejemplo, Norris and Whan (2008) reportaron una duplicación que coloca ASIP bajo el promotor ICTH, lo que resulta en la expresión constitutiva de este gen, produciendo un color de capa blanco. De manera similar, en cabras, Fontanesi et al., (2009) confirmaron la presencia de variaciones en el número de copias (CNV) que afectan a los genes ASIP y AHCY y sugieren que podrían estar relacionada al color blanco. En la alpaca, Chandramohan et al. (2013) observaron un transcrito con elevada expresión en el fenotipo blanco y proponen que sería producto de una recombinación cromosómica entre los genes ASIP y NCOA6.

La región codificante de ASIP en llamas fue estudiada en nuestro laboratorio (Daverio et al., 2016). Se observaron dos polimorfismos en el exón 4 asociados con la capa eumelánica: una deleción de 57 pb y un SNP no sinónimo (c.292C>T). Tanto los animales feomelánicos como los blancos presentaron las mismas variantes y codifican una proteína funcional.

6.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este capítulo se propone profundizar en el conocimiento sobre el locus ASIP. Aún se desconoce la regulación y la expresión de este gen y la forma en que estos procesos afectan el fenotipo de color en la llama. La hipótesis a evaluar es:

- Existe variantes transcripcionales de ASIP que se expresan diferencialmente en los distintos fenotipos de color en la llama.

Para analizar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar y caracterizar las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP en llamas con diferentes fenotipos de color.
2. Estudiar los niveles de expresión de los diferentes transcritos de ASIP y analizar su asociación con el fenotipo de color.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Obtención y caracterización de las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP

Las 5'UTRs de los transcritos de ASIP se aislaron a partir de biopsias de piel de una llama blanca y una marrón. La toma de biopsias se realizó de la misma forma descrita anteriormente y el ARN total se extrajo con el kit RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar las secuencias desconocidas de las regiones 5'UTR presentes en los ARNm de ASIP se utilizó la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (PCR 5'-RACE). En este caso se utilizó el kit GeneRacer (Invitrogen). El procedimiento consta de 7 pasos:

- 1) Desfosforilación del ARN: Los ARN mensajeros completos están protegidos de las fosfatasas gracias a la presencia del capuchón (CAP), por lo cual en este paso se empleó la enzima CIF (calf intestinal phosphatase) para eliminar los ARN mensajeros truncados y los ARN no mensajeros.
- 2) Remoción del CAP de los mensajeros completos: una vez "purificados" los ARN mensajeros completos, se utilizó la enzima TAP (tobacco acid pyrophosphatasa) para eliminar los CAP dejando un fosfato 5' libre para la posterior adhesión de un oligonucleótido.
- 3) Ligación del oligonucleótido al extremo 5' del mensajero: se empleó la enzima ARN Ligasa T4 para ligar un oligonucleótido (GeneRacer RNA Oligo) al extremo 5'

de los mensajeros. Este contiene la secuencia de los primers 5' que se utilizaron posteriormente.

- 4) Transcripción reversa de los ARN mensajeros: se sintetizó el ADNc empleando la enzima Super Script III y el primer específico de ASIP AR3 (Tabla 6.1).
- 5) Amplificación de los extremos 5' del ADNc: se usaron los primers GenRacer 5' y AR1 (Tabla 6.1) que reconocen la secuencia del oligonucleótido ligado y la secuencia específica del gen, respectivamente, para primera una reacción de PCR. Y luego se realizó una segunda reacción de PCR anidada con los primers 5' GenRacer Nested y AR2 (Tabla 6.1). Para ambas reacciones de PCR se utilizó la enzima Phusion High Fidelity DNA Polimerase (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En la Figura 6.2 se muestra el diseño de los primers para la síntesis de ADNc y para ambas reacciones de PCR.
- 6) Análisis y purificación de los productos de PCR-RACE en gel de agarosa: el producto de PCR-RACE fue sembrado en un gel agarosa 3% y las bandas discretas se extrajeron y purificaron usando columnas de purificación incluidas en el kit GeneRacer.
- 7) Clonado y secuenciación de los productos de PCR-RACE: antes de llevar a cabo el clonado fue necesario generar extremos romos en los productos de PCR-RACE purificados. Para ello, se realizó una incubación de 15' a 74°C con 0.5 ul de la enzima Pfu (DSBIO), 1 ul Buffer 10x (DSBIO) y 1 ul de dNTPs 5 mM para 5 ul de producto de PCR-RACE. Luego se realizó la ligación al plásmido pJet1.2 (Thermo Scientific) en una proporción de plásmido:inserto 1:5 con 0.25 ul de Ligasa T4 (Thermo Scientific). incubando a 4°C durante una noche. Esta ligación se utilizó para transformar bacterias competentes E.coli JM109. La transformación se realizó por shock térmico, 30' en hielo y 45'' a 42°C. Se agregaron 800 ul de medio SOC (2% de triptona, 0,05% de NaCl, 0,02% de KCl, 0,5% de extracto de levadura y 20mM de glucosa) y se incubó 35' a 37°C con agitación. Luego las bacterias se sembraron en placas de LB-ágar con ampicilina (1,5% agar, 1% triptona, 0,5% NaCl, 0,5% extracto de levadura y 100mg/ml de ampicilina) y se incubaron a 37°C durante 16 hs. Para la selección de transformantes, el plásmido pJet 1.2 cuenta con un mecanismo de selección directo, dado que posee un gen letal que es interrumpido cuando se liga un inserto. Es decir, que sólo crecen aquellas

colonias de bacterias que hayan adquirido un inserto. Estas, luego se repicaron en medio LB (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,5% extracto de levadura) y crecieron a 37°C durante 16 hs con agitación. Finalmente se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias mediante el protocolo de Miniprep que se describe en Sambrook and Russell (2001). Los plásmidos extraídos fueron secuenciados por MacroGen Inc., Corea, usando el primer interno de la región codificante AR2 (Tabla 6.1). Se secuenció un mínimo de 8 clones por cada banda de PCR-RACE purificada.

Tabla 6.1. Primers empleados para RACE-PCR

	Primer	Secuencia (5'-3')
Ligación del Oligo	GeneRacer RNA	CGACUGGAGCACGAGGACACUGACA
	Oligo	UGGACUGAAGGAGUAGAAA
Síntesis del ADNc	AR3	ACGCCCTGTCCCTGCAAGCTA
Primera reacción de PCR	5'GeneRacer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
	AR1	TCAACAGGTGGGGCTGAGCAC
Segunda reacción de PCR	5'GeneRacer Nested	GGCACTGACATGGACTGAAGGAGTA
	AR2	GCTGATCTTCTTGGATTTCTTGTC

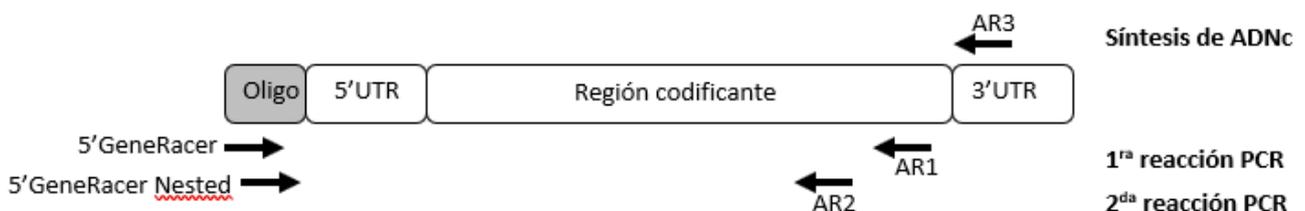


Figura 6.2. Esquema de primers para PCR-RACE. Las flechas derechas representan los primer forward y las flechas hacia la izquierda los primers reversos.

Las secuencias obtenidos fueron analizados con el programa MEGA7 v.7.027. En cada una de ellas se identificó la región codificante de ASIP y la secuencia del oligonucleótido ligado. La región comprendida entre ambas es la región 5'UTR de los mensajeros. Para identificar los exones no traducidos en las 5'UTR se realizaron alineamientos múltiples con transcritos de ASIP ya descritos en otras especies y disponibles en GenBank.

Se usó el software RNAstructure v.6.1 para predecir la estructura secundaria más probable y la estabilidad correspondiente de cada uno de los transcritos. Para realizar estas predicciones, a cada región 5'UTR aislada se le agregó la secuencia de la región codificante de la llama (KP715432.) y la región 3'UTR de la alpaca (FJ847229).

El servidor web ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) fue empleado para ubicar los marcos de lectura de cada transcripto e identificar uORFs en algunos de ellos.

6.3.2 Secuenciación de las regiones genómicas que comprenden los exones no codificantes

Una vez identificados los exones no traducidos, se buscaron secuencias homólogas en los genomas no anotados de alpaca (NW_005883058.1) y dromedario (NW_011591148.1) disponibles en la base de datos de GenBank. Se identificaron regiones conservadas entre ambos genomas y se diseñaron primers para amplificar y secuenciar estas regiones del genoma de la llama (Tabla 6.2). Los productos obtenidos mediante reacciones de PCR fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron mediante precipitación con PEG para su posterior secuenciación en MacroGen Inc.

Tabla 6.2. Primers empleados para amplificar y secuenciar las regiones genómicas de ASIP que comprenden los exones no codificantes

Primer	Secuencia (5'-3')	T annealing (°C)	Tamaño del amplicón	Exones en el amplicón
ASIP GENOM1 F	TAGGAACTGGGGGCTTGAGG	56	1184 pb	1E, 1A'long, 1A'
ASIP GENOM1 R	GTGCATGTCGCTCCGTTAGA			
ASIP GENOM3 F	ACCAAGTGCTCCTTAGCCCA	58	1132 pb	1C, 1D, 1D'
ASIP GENOM3 R	GATTCTGGAGTCAGGATTGAG			

6.3.3 Expresión de los transcritos de ASIP

Para el estudio de expresión se tomaron muestras de biopsias de piel de llamas procedentes de la Estación Experimental Agropecuaria Abra Pampa, INTA, Jujuy. Se seleccionaron animales con fenotipos de color blanco, marrón feomelánico y negro (n=5 por grupo). La extracción de ARN total y la síntesis de cDNA se realizó como fue explicada en el capítulo 3.

De acuerdo con las secuencias obtenidas para las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP, se diseñaron 7 juegos de primers: uno para cuantificar la expresión total del gen y 6 juegos específicos de cada 5'UTR. Excepto el juego 4, el resto de los juegos de primers compartieron un mismo primer reverso y distintos forwards (Tabla 6.3). Se utilizó el gen 18S para la normalización de los datos.

Tabla 6.3. Primers empleados para la cuantificación de la expresión de los transcritos de ASIP.

Primer	Secuencia 5'-3'	Target
ASIP gral F	GAAGGGAGCCTGAGAAGCAA	Todos los transcritos
ASIP gral R	TTTCTGCTGATCTTCTTGGATTTCT	Todos los transcritos
ASIPT R1	AGGAAGCACAGGCAGACCAG	Transcritos 1,2,3,5 y 6
ASIPT R2	TGGGCTTTTCGTCAGGTGCT	Transcritos 1,2,3,5 y 6
ASIPT1 F	TGAGATGGGGAGGCCAGCTA	Transcripto 1
ASIPT2 F	GAGCACTACAGACAAGCCCCA	Transcripto 2
ASIPT3 F	GGAGTCCCAGAGAGAACCCTTC	Transcripto 3
ASIPT4 F	GTCCCAGAGAGCCCACAGAA	Transcripto 4
ASIPT4 R	AGGAAGAGGCGGGTGACATC	Transcripto 4
ASIPT5 F	TGTGGGCACTGAGCTAAAAGGA	Transcripto 5
ASIPT6 F	CGCGCTCAGGAATCAGGGAA	Transcripto 6

Las reacciones de PCR en tiempo real así como la cuantificación de la abundancia de los transcritos, también se llevaron a cabo con la misma metodología que se explicó en los capítulos anteriores.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Descripción de las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP

En total, de la piel de la llama, se aislaron siete transcritos de ASIP con distintas 5'UTR (Tabla 6.4). Los transcritos T1, T2, T3, T4, T5 y T7 fueron aislados del fenotipo feomelánico mientras que T6 fue aislado del blanco.

Los exones no codificantes presentes en las regiones 5'UTR fueron identificados por homología con otras especies (Anexo I). Las regiones 5'UTR de los transcritos presentaron uno o dos de los exones no codificantes y una secuencia común de 10 pb, que pertenece al intrón 1 y precede al codón de inicio de la traducción (ATG) (indicada con cursiva en la Tabla 6.4). De acuerdo a los resultados de RNAstructure software, todos los transcritos presentaron estructuras secundarias estables ($dG < 0$).

El transcripto T1, presentó exón 1C y fue el único con un uORF en su secuencia 5'UTR (indicado en azul en la Tabla 6.3). Además del uORF, presentó un uATG fuera del marco de lectura (subrayado en la Tabla 6.3)

El transcripto T2 presentó los exones denominados 1D y 1D'. Estos fueron idénticos a los designados 2A y 3A en la alpaca por Chandramohan et al. (2013), pero como los números 2, 3 y 4 se utilizan habitualmente para designar a los exones codificantes de la proteína ASIP y como los identificados en la alpaca no presentan homología con los exones 1A de otras especies, en esta tesis no se mantuvo la nomenclatura de Chandramohan et al. (2013), y en su lugar se denominaron 1D y 1D'.

Los transcritos T3, T4, T5 y T7 presentaron los exones 1A, 1A' y 1A'_{long}. Los dos últimos exones comparten la misma secuencia de 90 pb (indicada en verde en la Tabla 6.4) pero el "long" agrega 93 pb más previas a las de 1A' (se muestran en color rojo en la Tabla 6.4). Además T5, presentó el exón denominado 1E. Este exón no fue homólogo a ninguno de los identificados en otras especies, pero al secuenciar la región genómica de

la llama que contiene a los exones no codificantes, se encontró la secuencia que corresponde al exón 1E.

Finalmente, en el transcripto T6 se identificó el exón NCOA6b, idéntico al observado en la alpaca por Cransberg (2017) y denominado así ya que presenta homología con una región del gen NCOA6. Este transcripto también presentó dos uATG fuera del marco de lectura (subrayado en la Tabla 6.3).

Tabla 6.4. Transcritos de ASIP aislados de la piel de la llama.

Transcripto	Exones en 5'UTR	Secuencia de 5'UTR	Longitud de 5'UTR	Energía libre standard del transcripto
T1	1C	<u>ATGAGATG</u> GGGAGGCCAGCTACTGGGTC TTCCTGCGGAATTCTAAAAATCTCACAGA AACACATTTTGTCTCTGCTATTTTAAGGAC AGGGAAGAGCTCAGCTCTGGCTTCCCTTA GAGAGGCCGATAAAGAGCACTATCTCCCA GGATG	147 pb	-353.8 kcal/mol
T2	1D+1D'	TTCCCTTAGAGAGGCCGATAAAGAGCACT ACAGACAAGCCCCAAGCCTCCTCTGCTG CAAGATCTCCAGGATG	72 pb	-263.4 kcal/mol
T3	1A+1A'	AAAGTATTATCCCTGACAGGCTAAGTCC TTGAGCCTCTGCAGACTGTGGAAAAGGG AATCTTCAGCTGAAAGAGTCAAGAACCAG GGAGTCCCAGAGAGAAACCCTTCTTTTCAT CTGGAATTATCTATCATTGACCGCAGAGA GCTGCTTCTGACGACTCCTGGGACAGGGC CCTGTGTAGTGAGAGATCTCCAGGATG	198 pb	-308.4 kcal/mol
T4	1A+1A' _{long}	AAAGTATTATCCCTGACAGGCTAAGTCC TTGAGCCTCTGCAGACTGTGGAAAAGGG AATCTTCAGCTGAAAGAGTCAAGAACCAG GGAGTCCCAGAGAGCCACAGAACGATT GGAAGAATCTTTGCAGACCCACCAGAGAT CCCTGGATTCCACTTGAGAACCATTGAT CTAAAAACATCTTGATTCAGAACCCTTCT TTTCATCTGGAATTATCTATCATTGACCGC AGAGAGCTGCTTCTGACGACTCCTGGGAC	291 pb	-330.9 kcal/mol

		<i>AGGGCCCTGTGTAGTGAGAGATCTCCCAG</i> GATG		
T5	1E+1A'	GACATTTTTCTTCACTCCACACCTGAACTC CTGCTTCTGGAAGAGAAACCTGAGTAAA GACAGCTGTAGCGACAGAGAAGCGTTCT TCTTGGTAGTGGCCACTTCTGACTTCAGAT TTGTGGGCACTGAGCTAAAAGGAGTGCA GAGAGAGAGGACTCGGAGAACCTTCTT <i>TTCATCTGGAATTATCTATCATTGACCGCA</i> <i>GAGAGCTGCTTCTGACGACTCCTGGGACA</i> <i>GGGCCCTGTGTAGTGAGAGATCTCCCAG</i> GATG	261 pb	-328.0 kcal/mol
T6	NCOA6b	GAGAGGGCTGGGGCCGCGCTCAGGAATC AGGGAAGATTTTGTGAACCACTGGCACTT GAGAC <u>ATG</u> TCCTGAAGGGTAGAGGAGTT TGCCAG <u>ATG</u> CAGAGTTGGAAGAGAAGAG CCTTCAGATCTCCCAG GATG	130 pb	-289.6 kcal/mol
T7	1A' long	<i>AGCCACAGAACGATTGGAAGAATCTTTG</i> <i>CAGACCCACCAGAGATCCCTGGATTCCAC</i> <i>TTGGAGAACCATTGATCTAAAAACATCTT</i> <i>GATTCAGAACCTTCTTTTCATCTGGAAT</i> <i>TATCTATCATTGACCGCAGAGAGCTGCTT</i> <i>CTGACGACTCCTGGGACAGGGCCCTGTGT</i> <i>AGTGAGAGATCTCCCAGGATG</i>	193 pb	-296.2 kcal/mol

Las bases en cursiva pertenecen al intrón 1 y preceden al sitio de inicio de la traducción ATG, señalado con negrita. En la secuencia 5'UTR de T1 se señalan con azul los codones de inicio y stop correspondientes al uORF observado en este transcrito. Los ATG fuera de marco están subrayados en las secuencias de T1 y T6.

En base a las secuencias obtenidas de las regiones genómicas que comprenden los exones no codificantes (ver alineamiento en Anexo I) y a la homología con otras especies se propone un esquema de la organización del gen ASIP en la llama (Figura 6.3). Los exones 1C, 1D y 1D' son los más cercanos a la región codificante y se encuentran comprendidos en una región de poco menos de 500 pares de bases. Los exones 1E, 1A' y 1A'_{long} se encuentran más alejados y están comprendidos en algo más de 700 pb. Finalmente, la región que contiene al exón 1A no pudo ser secuenciada del genoma de la llama y se ubicó precediendo a los otros exones por comparación y conservación con otras especies. Si bien se intentó, no se logró amplificar esta región, posiblemente debido a diferencias entre el genoma de la llama y los de las especies que se usaron para el diseño de los primers.

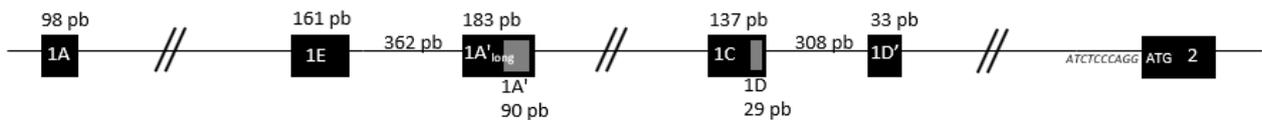


Figura 6.3. Esquema de la organización propuesta para el gen ASIP en la llama.

6.4.2 Análisis de expresión

Se estudió la expresión total de ASIP por qPCR en los tres grupos fenotípicos. Los grupos blanco y marrón feomelánico mostraron una sobreexpresión de ASIP comparada con la del negro ($p < 0,0001$), pero no se observaron diferencias significativas entre blanco y marrón (Figura 6.4A).

Si bien los transcritos fueron aislados de distintos fenotipos, se analizó cómo contribuye cada uno de ellos a la expresión total de ASIP en tres fenotipos de color distintos (blanco, marrón feomelánico y negro).

A excepción de T6, los transcritos presentaron niveles de expresión bajos, por lo cual se realizó un análisis cualitativo. Se observó que T1, T2 y T4 se expresaron en niveles aproximadamente iguales en los tres fenotipos analizados. El transcrito T7 presentó el

exón 1A_{long}, al igual que T4, por lo que no fue posible estudiarlo de forma independiente. En cambio, para los transcritos T3 y T5 no se detectó expresión en ninguno de los fenotipos. Para descartar que la baja/ausencia de expresión fuera debida a problemas metodológicos, se diseñó y se empleó un primer reverso alternativo para las reacciones de qPCR. Los resultados fueron confirmados.

Como el transcripto T6 presentó una alta expresión, fue cuantificado. Se observó altamente expresado en blanco y marrón, pero no fue detectado en negro ($p < 0,0001$). La diferencia de expresión entre blanco y marrón feomelánico no fue estadísticamente significativa (Figura 6.4B).

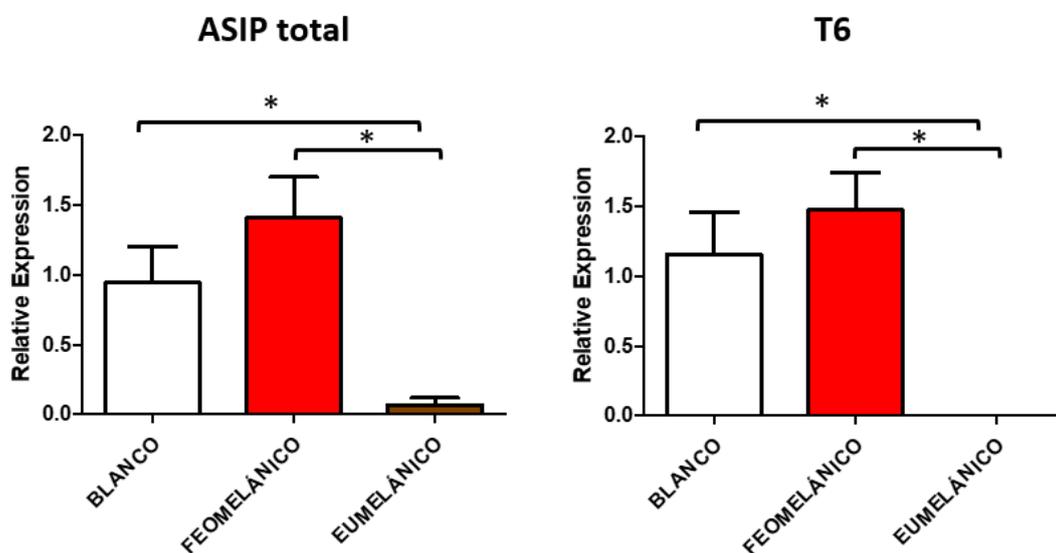


Figura 6.4. Expresión relativa de ASIP total y de T6 en la piel de la llama. Los gráficos de barras muestran valores medios. Las barras de error representan el error estándar (SE). El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa (prueba ANOVA $p < 0,001$).

6.5 DISCUSIÓN

Las mutaciones recesivas de ASIP en general están asociadas a la pérdida de función de la proteína y producen fenotipos oscuros. Este tipo de mutaciones se ha identificado en varias especies. Por ejemplo, tanto en la llama como en la alpaca y el camello, se observaron polimorfismos que tienen un efecto deletéreo sobre la proteína y, por lo

tanto, se asociaron con la producción de eumelanina (Almathen et al., 2018; Daverio et al., 2016; Feeley et al., 2011). Las mutaciones regulatorias, que reducen el nivel de ARNm o de proteína que se traduce, tienen el mismo efecto sobre el fenotipo de color, pero sólo han sido descritas en unas pocas especies (Dreger and Schmutz, 2011; Girardot et al., 2005). Todavía hay menos estudios sobre regulación de la expresión temporal y espacial de ASIP. En ellos se confirma que ASIP se transcribe en mensajeros alternativos con diferentes 5'UTR. Sin embargo, el número de transcritos de ASIP varía de acuerdo a las diferentes especies y también depende de la metodología utilizada para aislarlos. Así es que, de la piel de ratón se aislaron cuatro transcritos con diferentes 5'UTR (Vrieling et al., 1994), mientras que en cerdo se detectaron cinco (Drögemüller et al., 2006) y en ovejas siete (Norris and Whan, 2008). En este trabajo, se estudió la piel de llamas con distintos fenotipos de color y se aislaron siete transcritos de ASIP con diferentes regiones 5'UTR. El método de PCR-RACE que se empleó permite aislar ARNm completos, ya que se eliminan aquellos truncados, pero no discrimina entre transcritos de mayor abundancia o mayor estabilidad de aquellos transitorios.

Se caracterizaron las regiones 5'UTR de los transcritos de ASIP aislados y se identificaron distintos exones no codificantes. Todos ellos presentaron homología con exones de otras especies, excepto el 1E. Sin embargo, su secuencia fue hallada dentro del gen ASIP, cercana al bloque de exones 1A y 1A', involucrados en la distribución de pigmentos en diferentes regiones del cuerpo. Es muy probable que el 1E se trate de otro exón del mismo bloque. Además, dentro de este bloque de exones, se encontró el exón 1A'_{long} que comparte la misma secuencia que el 1A' pero agrega más bases. Dado que los homólogos descritos en otras especies presentan tamaños disimiles no queda claro si las bases adicionales corresponden a otro exón distinto y ubicado continuo al 1A' en genoma o si por algún mecanismo regulatorio se transcriben más nucleótidos en algunos transcritos que en otros.

Por otro lado, en el segundo bloque de exones, específico del ciclo de crecimiento de la fibra, se identificó al exón 1C. En otras especies, como ratón (Bultman et al., 1992), el exón 1B también conforma este bloque pero no estuvo presente en los transcritos aislados de la llama. Lo mismo pasa en conejo (Fontanesi et al., 2010) y alpaca (Chandramohan et al., 2013) que también presentan solo el 1C y en el cerdo que

presenta solo el 1B (Drögemüller et al., 2006). Además, se identificaron los exones 1D y 1D' que se ubicaron próximos al 1C en el genoma, sin embargo no hay estudios que indiquen si estos también forman parte del bloque de ciclo de crecimiento de la fibra. Esto es porque los D solo fueron homólogos a los de alpaca (2A y 3A en esta especie) y no se reportaron en otras especies.

Al medir la expresión total de ASIP se encontró elevada en los fenotipos blanco y marrón feomelánico y baja en el negro. Esta diferencia estuvo principalmente dada por T6, que se vio sobre expresado en los grupos blanco y marrón pero no se detectó en el negro. Aunque no pudo ser cuantificada, la expresión de los transcritos T1, T2 y T4 fue baja y aproximadamente igual en los tres fenotipos analizados, mientras que los transcritos T3 y T5 no se expresaron en ninguno de los fenotipos. Este último resultado era esperado ya que, como se mencionó previamente, con el método empleado se pueden aislar mensajeros transitorios o de muy baja abundancia. Sin embargo, no se puede descartar que T3 y T5 tengan alguna función regulatoria, dado que los dos transcritos que no se expresaron contienen el exón 1A', mientras que T4, que tiene el exón 1A'_{long}, sí presentó expresión. Esto podría representar un mecanismo regulatorio, en el cual se transcribe un exón más largo o más corto para regular la expresión. No obstante, es necesario profundizar en el estudio de los transcritos para confirmar o desechar esta hipótesis.

La presencia de elementos regulatorios en la región 5'UTR de algunos transcritos también ayuda a comprender sus patrones de expresión. Particularmente, el transcripto T1, presentó un uAUG y un uORF. Estos se correlacionan con una reducción de la expresión de proteínas ya que pueden reducir la eficacia del inicio de la traducción del ORF principal o desencadenar la descomposición del ARNm por diversos mecanismos (Barbosa et al., 2013). Mallarino et al. (2017), estudiaron la función de los transcritos e isoformas alternativas de ASIP en la determinación del color del "ratón ciervo" (*Peromyscus maniculatus*) y observaron que uno de ellos contenía un uORF y no mostraba diferencias de expresión entre los fenotipos analizados. Según los autores, desde el punto de vista funcional es esperado que estos transcritos no presenten diferencias en su expresión ya que contienen secuencias que reprimen la traducción de proteínas. Asimismo, Chandramohan et al. (2013) observaron que la alpaca presenta un

transcripto que también contiene uAUGs y uORFs en su región 5'UTR, al que denominaron "common" por tener una expresión similar en los colores blanco, marrón y negro.

La expresión de T6 es sin duda la responsable de la elevada expresión total de ASIP en llamas blancas y marrones. Este transcripto contiene el exón NCOA6b, que consta de una región que pertenece al gen NCOA6. Este gen se encuentra ubicado cerca de ASIP, y ambos pertenecen a un bloque cromosómico conservado. La presencia de un transcripto "quimera" podría indicar que existe un reordenamiento o una duplicación de estos loci. Estos reordenamientos fueron observados y confirmados previamente en otras especies e involucran al gen ASIP y a otro de los que integran el bloque. En ovejas existe una duplicación que coloca ASIP bajo el promotor del gen ICTH (Norris and Whan, 2008) y en cabras existen variaciones en el número de copias que afectan a los genes ASIP y AHCY (Fontanesi et al., 2009). En ambos casos el reordenamiento resulta en la expresión constitutiva de ASIP y produce un color de capa blanco. En la alpaca, si bien no se pudo corroborar, es muy probable que también exista un reordenamiento ya que dos autores diferentes observaron transcriptos quimera entre ASIP y NCOA6. Cransberg (2017) observó dos transcriptos de ASIP con 5'UTR homólogas a regiones del gen NCOA6 y las denominó exones NCOA6a y NCOA6b. En cambio, Chandramohan et. al (2013) encontraron sólo uno, que el que corresponde al NCOA6a; lo denominaron "white", ya que se observó asociado al fenotipo blanco. El transcripto T6 de la llama es idéntico al segundo observado por Cransberg y presentó una expresión elevada y similar en blanco y marrón, pero no se expresó en negro. De la misma forma, Cransberg observó una sobre expresión de ASIP total en los fenotipos blancos y marrón con respecto al negro, pero no determinó cual era el transcripto responsable en esta especie.

En conclusión, tanto las llamas con fenotipos blanco como las marrón feomelánicas expresan los mismos transcriptos y presentan una elevada expresión total de ASIP, dada principalmente por T6. Estos dos fenotipos se diferencian del negro, ya que este presenta una baja expresión de ASIP, a la que sólo contribuyen T1, T2 y T4. El fenotipo negro no se explicaría solo por las mutaciones que presenta la región codificante (Daverio et al., 2016), sino que también podría ser causado por una mutación regulatoria que genera una baja expresión de ASIP. Además, es probable que las llamas blancas y

marrones que expresan el transcripto quimera NCOA6-ASIP presenten variaciones en el número de copias de ASIP.

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL

Los métodos para estudiar las relaciones genotipo-fenotipo se pueden dividir en dos tipos principales: de ligamiento y de asociación (Landes and Schork, 1994). Ambos métodos pueden aplicarse al genoma completo o al estudio de genes candidatos para una determinada característica. El genoma de la llama aún no está disponible y solo recientemente se ha logrado obtener un ensamblado con buena calidad del genoma de otros camélidos (Richardson et al., 2019). Estos podrían usarse para futuros estudios, pero no fue posible durante el transcurso de esta tesis.

La estrategia de ligamiento implica proponer un modelo para explicar el patrón de herencia de fenotipos y genotipos observados en un pedigrí. Es muy útil para evaluar un modelo de herencia y para seleccionar un marcador que segregue junto con un fenotipo en particular (Landes and Schork, 1994). Esto se puede aplicar a programas de mejoramiento genético de manera directa, aún sin conocer el mecanismo molecular que está detrás (Gill-Langarica and Mayek-Pérez, 2008).

En el caso de la pigmentación, desde hace años las mutaciones del color del pelaje en ratones de laboratorio se usan como un modelo para estudiar la acción de genes en una gran variedad de procesos biológicos, por lo que se cuenta con una importante cantidad de información, tanto sobre la ruta bioquímica como sobre los genes involucrados y sus interacciones (Hoekstra, 2006). Además, como el proceso de la pigmentación está altamente conservado en los vertebrados, la comprensión de la genética del color del pelaje del ratón fue rápidamente trasladada a estudios sobre la base molecular de la pigmentación en otras especies (Cieslak et al., 2011). La cantidad de información disponible facilita la selección de genes candidatos para un determinado fenotipo de color (Kwon and Goate, 2000).

Por otro lado, los estudios de asociación se pueden realizar empleando individuos no relacionados, a diferencia del mapeo de ligamiento (Devlin et al., 2001). Esto es una ventaja en el caso de la llama, ya que la mayoría de los establecimientos de cría no cuentan con un registro genealógico completo que incluya varias generaciones.

Estos motivos llevaron a que en la presente tesis se elija la estrategia de genes candidatos para estudiar la asociación genotipo-fenotipo en color de capa de la llama empleando individuos no relacionados. Esta estrategia aportó además las secuencias

de todos los genes caracterizados, que ahora están disponibles para otros tipos de estudios en el futuro.

A continuación se presenta una revisión conjunta de todos los resultados obtenidos durante el trabajo de esta tesis y se discuten los posibles mecanismos moleculares de producción de los fenotipos de color de capa en la llama.

La pigmentación en los mamíferos es un proceso altamente conservado en el cual los genes MC1R y ASIP son los principales reguladores de la proporción de eumelanina y feomelanina. En la mayoría de las especies los alelos de MC1R están asociados con el tipo de pigmento que se produce, siendo el alelo dominante (E) responsable de la síntesis de eumelanina. Sin embargo, en la llama no ocurre así, ya que la producción de eumelanina está asociada a mutaciones recesivas en la región codificante de ASIP. Tanto las llamas feomelánicas como las blancas codifican para la misma proteína de ASIP. Además, en esta especie los alelos de MC1R están asociados a la presencia/ausencia de pigmento pero aún no se puede explicar el mecanismo molecular que genera el fenotipo blanco (Daverio et al., 2016).

En esta tesis se continuó con el estudio del gen MC1R de la llama y se determinó que la presencia de la variante A en el SNP c.259G>A es condición suficiente para que se sintetice pigmento, es decir que es el alelo dominante de la serie (alelo E). Además se verificó que el alelo MC1R*2 está asociado al fenotipo blanco y se pudo confirmar que este alelo aparece en homocigosis sólo en llamas blancas y no en las pigmentadas. Por ello, se puede pensar que la proteína que genera MC1R*2 es un receptor no funcional, es decir, no es capaz de promover la síntesis de pigmentos, aunque aún es necesario estudiar la funcionalidad de este alelo para confirmarlo. De todas formas, no se puede explicar la totalidad de las llamas blancas por el alelo MC1R*2, ya que estas también fueron homocigotas para el alelo silvestre, MC1R*3, que puede estar presente en los fenotipos coloreados.

No obstante queda claro que las llamas blancas no pueden presentar cualquier genotipo en MC1R, necesariamente debe haber otro gen implicado en la producción de este fenotipo. El color blanco podría generarse por alteraciones en el desarrollo, la diferenciación o la migración de los melanocitos, controlado principalmente por lo

genes KIT y MITF-M; o por dilución extrema de melaninas o hipopigmentación, que involucra a los genes TYR y SLC7A11, entre otros; o por interacciones con alelos de ASIP aún no descriptos.

Por tales motivos, se estudiaron los genes KIT, MITF-M, TYR y SLC7A11 en la llama. Aunque no se encontraron mutaciones que puedan ser causales del fenotipo blanco, sí se observó un patrón común en la expresión de todos ellos. El fenotipo blanco se caracteriza por una baja expresión de los genes KIT, MITF-M, TYR y SLC7A11 comparado con los fenotipos pigmentados. Este patrón general de expresión se podría explicar por la acción de otro gen ubicado aguas arriba en la ruta y capaz de regular todo el proceso de pigmentación, como ASIP.

En el estudio de la expresión de ASIP en la llama se observó que los fenotipos blanco y feomelánico presentan una sobreexpresión comparados con el negro. En ratones de playa (Manceau et al., 2011), ovejas (Norris and Whan, 2008), cabras (Fontanesi et al., 2009) y alpacas (Chandramohan et al., 2013) también se observa que los animales blancos presentan sobreexpresión de ASIP. Para la cabra se cree que la sobreexpresión es causada por un reordenamiento entre los genes ASIP y AHCY (Fontanesi et al., 2009), mientras que en la oveja se pudo comprobar que la causa de la sobreexpresión es una duplicación que coloca a ASIP bajo el promotor del gen ICTH (Norris and Whan, 2008). En este último estudio sólo se analizaron animales de fenotipos blanco y negro, por lo que se desconoce qué ocurre en los feomelánicos. En cambio, en las alpacas se observó una sobreexpresión de ASIP en los fenotipos blanco y marrón con respecto al negro pero no se reportó la causa de su producción (Cransber, 2017).

Dado que ASIP presenta diversos transcriptos que pueden afectar el fenotipo de color, estos se estudiaron en la llama y se logró determinar que la sobreexpresión en los animales blancos y en los feomelánicos está causada por un transcripto en particular, T6. La región 5'UTR de T6 mostró identidad con el gen NCOA6, sugiriendo que existe un reordenamiento o una duplicación de los loci ASIP y NCOA6 en el genoma de las llamas con estos fenotipos. Este transcripto podría corresponder al alelo de ASIP denominado "white or tan", A^{wt}, que propusieron Adalsteinsson et al. (1994) y Sponenberg et al.

(1988) en ovejas y cabras. Se trata de un alelo dominante que puede producir tanto el fenotipo blanco como el marrón feomelánico en estas especies.

Teniendo en cuenta los alelos de MC1R y de ASIP, se propone un modelo para la producción de los fenotipos de color de capa sólidos en la llama (Figura 7.1):

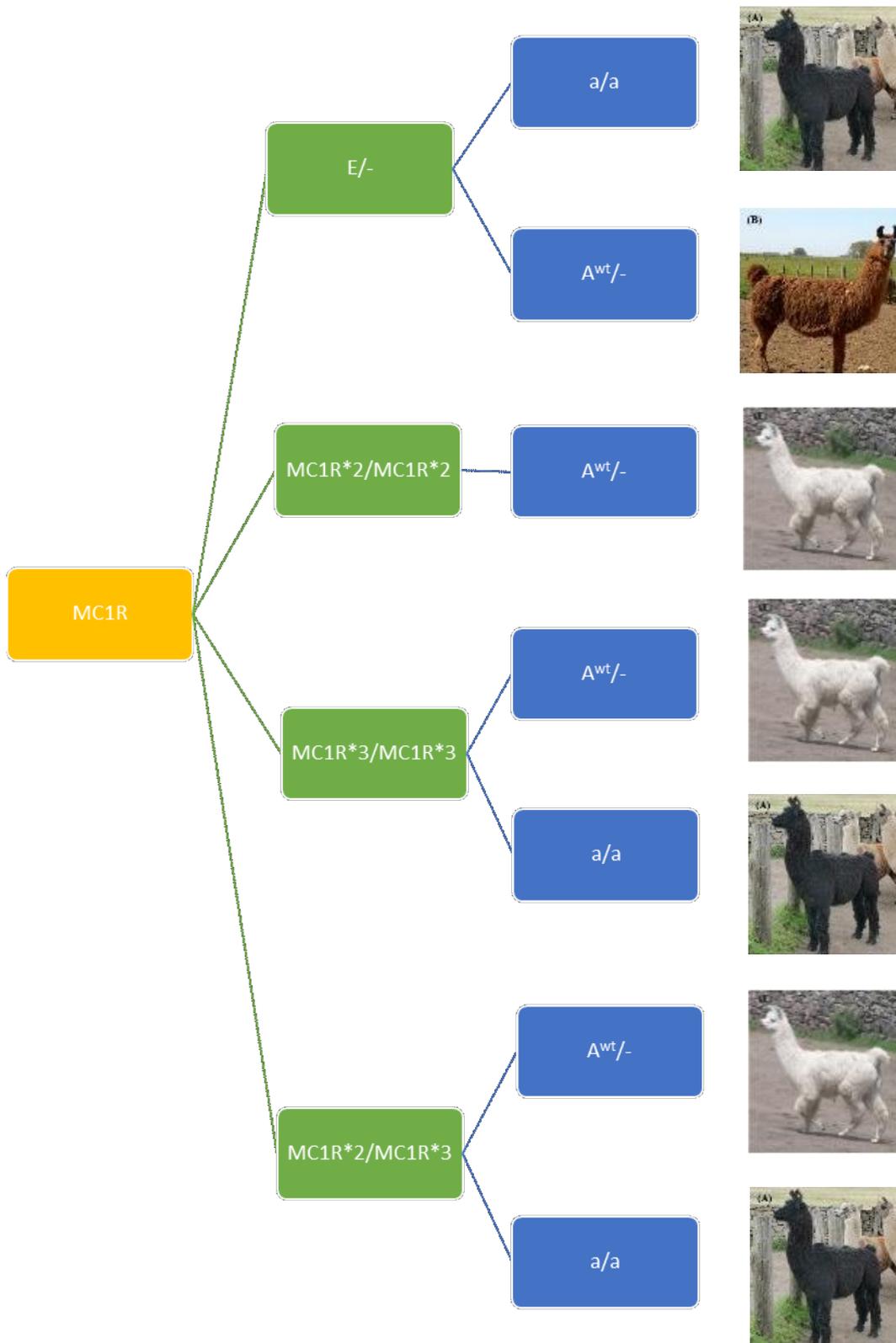


Figura 7.1. Modelo para la producción de los fenotipos de color de capa sólidos en la llama. El rectángulo amarillo muestra el gen MC1R y los rectángulos verdes las posibles combinaciones alélicas para MC1R. Los rectángulos azules se refieren a las combinaciones alélicas de ASIP. “-” indica que puede ser cualquier alelo del correspondiente gen.

-Si el receptor de MC1R presenta el alelo dominante E, se genera una proteína funcional que tiene la capacidad de activar la señalización celular para sintetizar melaninas. En este caso, se observa una alta expresión de los genes involucrados en la vía, como KIT, MITF-M, TYR y SCL7A11. El alelo E generará pigmento pero dependiendo del alelo presente ASIP será el tipo de melanina generada. Si ASIP presenta el genotipo a/a se producirá eumelanina, en cambio si la combinación presente es E con A^{wt} se sintetizará feomelanina.

-Como el alelo MC1R*2 en homocigosis se encontró en el fenotipo blanco y no se vio en ninguno de los 102 animales pigmentados, se puede postular que MC1R*2 genera una proteína no funcional. Esta no podrá activar la cascada de señalización celular para la síntesis de pigmentos resultando en un fenotipo de color de capa blanco. Consecuentemente, se observa una baja expresión de los genes KIT, MITF-M, TYR, SLC7A11. Si bien la sola presencia de MC1R*2 en homocigosis alcanzaría para producir un fenotipo blanco, las llamas blancas también presentan el alelo A^{wt} en ASIP. En este caso, la combinación MC1R*2 y A^{wt} causa el fenotipo blanco.

-Los animales homocigotas MC1R*3/MC1R*3 resultaron en su mayoría blancos, lo que podría explicarse por su combinación con el alelo A^{wt}. De todas formas, se sabe que el alelo MC1R*3 tiene la capacidad de activar la síntesis de melaninas, ya que es el alelo silvestre. Así es que en nuestro estudio, 8 animales homocigotas MC1R*3/MC1R*3 resultaron pigmentados. Entre ellos 1 eumelánico, 4 con el patrón marrón rojizo con cara y patas negras, y 3 feomelánicos. El primer fenotipo se explicaría con el genotipo a/a en ASIP; el segundo fenotipo no fue estudiado para ASIP y es probable que exista un alelo distinto que determina este patrón. En otras especies existen alelos que producen distribución de pigmentos, como el alelo A^w ("light-bellied") que genera un patrón feomelánico con el vientre blanco en el ratón o el alelo A^b ("badgerface") en cabras, que produce animales con dorso feomelánico y con el vientre, las patas y una raya dorsal negra que llega hasta la cabeza. Quedan por explicar los 3 animales feomelánicos homocigotas MC1R*3/MC1R*3.

-Las llamas heterocigotas MC1R*2/MC1R*3 también resultaron blancas en su gran mayoría (29/31), lo cual es esperado si estos dos alelos están combinados con A^{wt}. De

los dos animales restantes con genotipo MC1R*2/MC1R*3, una llama es eumelánica, lo cual se explicaría si en ASIP presenta el genotipo a/a, en tanto que la otra es feomelánica y queda, por el momento, sin explicar.

Con el modelo propuesto hasta el momento se puede explicar más del 90% de fenotipos de color de capa sólidos. Sólo 4/44 llamas feomelánicas no se podrían diferenciar de las blancas por su genotipo. Una posible explicación para el fenotipo de estos animales sería la existencia de otro alelo de ASIP no identificado, ya que es común que ASIP presente varios alelos en su serie. Si este alelo fuera poco frecuente en la llama es posible que no se haya aislado el transcripto.

Hubiera sido útil emplear los mismos animales para el estudio de todos los genes, sin embargo, por el tipo de muestras usadas y las dificultades para su recolección, esto no fue posible. En futuros estudios la elección de animales con genotipos específicos de MC1R permitirá profundizar el estudio de las interacciones entre los alelos de MC1R y los de ASIP. Además, el modelo propuesto se debe corroborar estudiando la segregación de los alelos de MC1R y ASIP en familias de llamas.

Sin dudas, el gen ASIP tiene un rol fundamental en la determinación del fenotipo de color en la llama. Debido a la complejidad que tiene este gen es necesario continuar con su estudio. Entre otros aspectos, resulta de interés determinar si presenta variación en el número de copias. Además, estudiar los transcriptos presentes tanto en el fenotipo silvestre como en fenotipos patrones ayudaría a definir la función de los mismos, a identificar alelos faltantes y sus interacciones con los alelos de MC1R.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- Adalsteinsson, S., Sponenberg, D. P., Alexieva, S., and Russel, A. J. F. (1994). Inheritance of goat coat colors. *J. Hered.* 85, 267–272. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a111454.
- Aigner, B., Besenfelder, U., Müller, M., and Brem, G. (2000). Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm. Genome* 11, 700–702. doi:10.1007/s003350010120.
- Almathen, F., Elbir, H., Bahbahani, H., Mwacharo, J., and Hanotte, O. (2018). Polymorphisms in MC1R and ASIP Genes are Associated with Coat Color Variation in the Arabian Camel. *J. Hered.* 109, 700–706. doi:10.1093/jhered/esy024.
- Alshanbari, F., Castaneda, C., Juras, R., Hillhouse, A., Mendoza, M. N., Gutiérrez, G. A., et al. (2019). Comparative FISH-mapping of MC1R, ASIP, and TYRP1 in New and old world camelids and association analysis with coat color phenotypes in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Front. Genet.* 10. doi:10.3389/fgene.2019.00340.
- Anello, M., Daverio, M. S., Silbestro, M. B., Vidal Rioja, L. and Rocco, F. Di (2019). Characterization and expression analysis of KIT and MITF-M genes in llamas and their relation to white coat color. 1–7. doi:10.1111/age.12769.
- Anistoroaei, R., Fredholm, M., Christensen, K., and Leeb, T. (2008). Albinism in the American mink (*Neovison vison*) is associated with a tyrosinase nonsense mutation. *Anim. Genet.* 39, 645–8. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01788.x.
- Barbosa, C., Peixeiro, I., and Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pgen.1003529.
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R., et al. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169. doi:10.1093/nar/gkw1099.
- Becker, D., Otto, M., Ammann, P., Keller, I., Drögemüller, C., and Leeb, T. (2015). The brown coat colour of Coppernecked goats is associated with a non-synonymous variant at the TYRP1 locus on chromosome 8. *Anim. Genet.* 46, 50–54. doi:10.1111/age.12240.
- Beermann, F., Orlov, S. J., and Lamoreux, M. L. (2004). The Tyr (albino) locus of the laboratory mouse. *Mamm. Genome* 15, 749–58. doi:10.1007/s00335-004-4002-8.
- Belguith-Maalej, S., Kallel, R., Mnif, M., Abid, M., Ayadi, H., and Kacem, H. H. (2013). Association of intronic repetition of SLC26A4 gene with Hashimoto thyroiditis disease. *Genet. Res. (Camb)*. 95, 38–44. doi:10.1017/S0016672313000037.
- Benkel, B. F., Rouvinen-Watt, K., Farid, H., and Anistoroaei, R. (2009). Molecular characterization of the Himalayan mink. *Mamm. Genome* 20, 256–259. doi:10.1007/s00335-009-9177-6.
- Bismuth, K., Maric, D., and Arnheiter, H. (2005). MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Res.* 18, 349–359. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00249.x.

- Blaszczyk, W. M., Arning, L., Hoffmann, K.-P., and Epplen, J. T. (2005). A Tyrosinase missense mutation causes albinism in the Wistar rat. *Pigment cell Res.* 18, 144–5. doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00227.x.
- Bridges, R. J., Natale, N. R., and Patel, S. A. (2012). System x_c- cystine/glutamate antiporter: An update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 165, 20–34. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x.
- Bultman, S. J., Klebig, M. L., Michaud, E. J., Sweet, H. O., Davisson, M. T., and Woychik, R. P. (1994). Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes Dev.* 8, 481–90. doi:10.1101/gad.8.4.481.
- Bultman, S. J., Michaud, E. J., and Woychik, R. P. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195–1204. doi:10.1016/S0092-8674(05)80067-4.
- Caruana, G., Cambareri, A. C., and Ashman, L. K. (1999). Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 18, 5573–5581. doi:10.1038/sj.onc.1202939.
- Cecchi, T., Cozzali, C., Passamonti, P., Ceccarelli, P., Pucciarelli, F., Gargiulo, A. M., et al. (2004). Melanins and melanosomes from llama (*Lama glama* L.). *Pigment Cell Res.* 17, 307–311. doi:10.1111/j.1600-0749.2004.00139.x.
- Cecchi, T., Valbonesi, A., Passamonti, P., Frank, E., and Renieri, C. (2007). Quantitative variation of melanins in llama (*Lama glama* L.). *Small Rumin. Res.* 71, 52–58. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.04.011.
- Challa, A. K., Boitet, E. R., Turner, A. N., Johnson, L. W., Kennedy, D., Downs, E. R., et al. (2016). Novel hypomorphic alleles of the mouse tyrosinase gene induced by CRISPR-Cas9 nucleases cause non-albino pigmentation phenotypes. *PLoS One* 11, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0155812.
- Chandramohan, B., Renieri, C., La Manna, V., and La Terza, A. (2013). The alpaca agouti gene: Genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene* 521, 303–310. doi:10.1016/j.gene.2013.03.060.
- Chandramohan, B., Renieri, C., La Manna, V., and La Terza, A. (2015). The alpaca melanocortin 1 receptor: gene mutations, transcripts, and relative levels of expression in ventral skin biopsies. *ScientificWorldJournal.* 2015, 265751. doi:10.1155/2015/265751.
- Chen, W., Wang, H., Dong, B., Dong, Z., Zhou, F., Fu, Y., et al. (2012). Molecular cloning and expression analysis of tyrosinase gene in the skin of Jining gray goat (*Capra hircus*). *Mol. Cell. Biochem.* 366, 11–20. doi:10.1007/s11010-012-1275-1.
- Chintala, S., Li, W., Lamoreux, M. L., Ito, S., Wakamatsu, K., Sviderskaya, E. V, et al. (2005). Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. 102.
- Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M., and Ludwig, A. (2011). Colours of domestication. *Biol. Rev.* 86, 885–899. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.

- Cirera, S., Markakis, M. N., Christensen, K., and Anistoroaei, R. (2013). New insights into the melanophilin (MLPH) gene controlling coat color phenotypes in American mink. *Gene* 527, 48–54. doi:10.1016/j.gene.2013.05.047.
- Cirera, S., Markakis, M. N., Kristiansen, T., Vissenberg, K., Fredholm, M., Christensen, K., et al. (2016). A large insertion in intron 2 of the TYRP1 gene associated with American Palomino phenotype in American mink. *Mamm. Genome* 27, 135–143. doi:10.1007/s00335-016-9620-4.
- Cransberg, R., and Munyard, K. A. (2011). Polymorphisms detected in the tyrosinase and matp (slc45a2) genes did not explain coat colour dilution in a sample of Alpaca (*Vicugna pacos*). *Small Rumin. Res.* 95, 92–96. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.10.004.
- Cransberg, R. (2017). Insights into the alpaca skin transcriptome in relation to fibre colour. TESIS DOCTORAL. Curtin University. 147 p
- Damé, M. C. F., Xavier, G. M., Oliveira-Filho, J. P., Borges, A. S., Oliveira, H. N., Riet-Correa, F., et al. (2012). A nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo. *BMC Genet.* 13, 1. doi:10.1186/1471-2156-13-62.
- Daverio, M.S. (2014). Caracterización de genes vinculados al crecimiento y al color de capa en la Llama (*Lama glama*). TESIS DOCTORAL. UNLP. 109p
- Daverio, M. S., Rigalt, F., Romero, S., Vidal-Rioja, L., and Di Rocco, F. (2016). Polymorphisms in MC1R and ASIP genes and their association with coat color phenotypes in llamas (*Lama glama*). *Small Rumin. Res.* 144, 83–89. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.08.003.
- De Lamo, D. (2011). Camélidos sudamericanos: Historia, usos y sanidad animal. *Senasa*, 37.
- Devlin, B., Roeder, K., and Bacanu, S. A. (2001). Unbiased methods for population-based association studies. *Genet. Epidemiol.* 21, 273–284. doi:10.1002/gepi.1034.
- Dobson, L., Reményi, I., and Tusnády, G. E. (2015). CCTOP: a Consensus Constrained TOPOlogy prediction web server. *Nucleic Acids Res.* 43, W408-12. doi:10.1093/nar/gkv451.
- Dreger, D. L., Parker, H. G., Ostrander, E. A., and Schmutz, S. M. (2013). Identification of a mutation that is associated with the saddle tan and black-and-tan phenotypes in Basset Hounds and Pembroke Welsh Corgis. *J. Hered.* 104, 399–406. doi:10.1093/jhered/est012.
- Dreger, D. L., and Schmutz, S. M. (2011). A SINE Insertion Causes the Black-and-Tan and Saddle Tan Phenotypes in Domestic Dogs. *J. Hered.* 102, S11–S18. doi:10.1093/jhered/esr042.
- Drögemüller, C., Giese, A., Martins-Wess, F., Wiedemann, S., Andersson, L., Brenig, B., et al. (2006). The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitzta pigs maps to the porcine ASIP locus but does not affect its coding sequence. *Mamm. Genome* 17, 58–66. doi:10.1007/s00335-005-0104-1.

- Dürig, N., Jude, R., Holl, H., Brooks, S. A., Lafayette, C., Jagannathan, V., et al. (2017a). Whole genome sequencing reveals a novel deletion variant in the KIT gene in horses with white spotted coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* 48, 483–485. doi:10.1111/age.12556.
- Dürig, N., Jude, R., Jagannathan, V., and Leeb, T. (2017b). A novel MITF variant in a white American Standardbred foal. *Anim. Genet.* 48, 123–124. doi:10.1111/age.12484.
- Dürig, N., Letko, A., Lepori, V., Hadji Rasouliha, S., Loechel, R., Kehl, A., et al. (2018). Two MC1R loss-of-function alleles in cream-coloured Australian Cattle Dogs and white Huskies. *Anim. Genet.* 49, 284–290. doi:10.1111/age.12660.
- FAO (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en argentina. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914: 1-38.
- Feeley, N. L., Bottomley, S., and Munyaerd, K. A. (2011). Three novel mutations in ASIP associated with black fibre in alpacas (*Vicugna pacos*). *J. Agric. Sci.* 149, 529–538. doi:10.1017/S0021859610001231.
- Feeley, N. L., and Munyard, K. A. (2009). Characterisation of the melanocortin-1 receptor gene in alpaca and identification of possible markers associated with phenotypic variations in colour. *Anim. Prod. Sci.* 49, 675. doi:10.1071/AN09005.
- Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Gómez González, E., Dall'Olio, S., Davoli, R., et al. (2009). Copy number variation and missense mutations of the agouti signaling protein (ASIP) gene in goat breeds with different coat colors. *Cytogenet. Genome Res.* 126, 333–347. doi:10.1159/000268089.
- Fontanesi, L., Forestier, L., Allain, D., Scotti, E., Beretti, F., Deretz-Picoulet, S., et al. (2010). Characterization of the rabbit agouti signaling protein (ASIP) gene: Transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95, 166–175. doi:10.1016/j.ygeno.2009.11.003.
- Fontanesi, L., Vargiolu, M., Scotti, E., Latorre, R., Pellegrini, M. S. F., Mazzoni, M., et al. (2014). The kit gene is associated with the english spotting coat color locus and congenital megacolon in checkered giant rabbits (*oryctolagus cuniculus*). *PLoS One* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0093750.
- Frank, E.N. (2001). Descripción y análisis de segregación de fenotipos de color y tipos de vellón en Llamas argentinas. TESIS DOCTORAL. UBA, 204pp.
- Frank, E. N., Hick, M. V. H., Gauna, C. D., Lamas, H. E., Renieri, C., and Antonini, M. (2006). Phenotypic and genetic description of fibre traits in South American domestic camelids (llamas and alpacas). *Small Rumin. Res.* 61, 113–129. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.07.003.
- Frank, E.N., Hick, M.V.H., Adot, O. (2012). Determination of dehairing , carding , combing and spinning difference from Lama type of fleeces. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* 2, 61–70.

- Franklin, W. L. (1982). Biology, ecology and relationship to man of the South American camelids. In *Mammalian Biology in South America*, ed. M. A. Mares and H. H. Genoways (Pittsburgh, Pennsylvania: Pymatuning Laboratory of Ecology, PITT), 457-489
- García-Borrón, J. C., and Solano, F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15, 162–173. doi:10.1034/j.1600-0749.2002.02012.x.
- Gasol, E., Jiménez-Vidal, M., Chillarón, J., Zorzano, A., and Palacín, M. (2004). Membrane topology of System xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J. Biol. Chem.* 279, 31228–31236. doi:10.1074/jbc.M402428200.
- Gill-Langarica, H., and Mayek-Pérez, N. (2008). Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 164–176.
- Giraldo, P., Martínez, A., Regales, L., Lavado, A., García-Díaz, A., Alonso, A., et al. (2003). Functional dissection of the mouse tyrosinase locus control region identifies a new putative boundary activity. *Nucleic Acids Res.* 31, 6290–305.
- Girardot, M., Martin, J., Guibert, S., Leveziel, H., Julien, R., and Oulmouden, A. (2005). Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res.* 18, 34–41. doi:10.1111/j.1600-0749.2004.00195.x.
- Gokkel, E., Grossman, Z., Ramot, B., Yarden, Y., Rechavi, G., and Givol, D. (1992). Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. *Oncogene* 7, 1423–1429.
- Guridi, M., Soret, B., Alfonso, L., and Arana, A. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the Melanocortin 1 Receptor gene are linked with lightness of fibre colour in Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*). *Anim. Genet.* 42, 679–682. doi:10.1111/j.1365-2052.2011.02205.x.
- Haase, B., Rieder, S., Tozaki, T., Hasegawa, T., Penedo, M. C. T., Jude, R., et al. (2010). Five novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* 42, 337–340. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02143.x.
- Haase, B., Signer-Hasler, H., Binns, M. M., Obexer-Ruff, G., Hauswirth, R., Bellone, R. R., et al. (2013). Accumulating Mutations in Series of Haplotypes at the KIT and MITF Loci Are Major Determinants of White Markings in Franches-Montagnes Horses. *PLoS One* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0075071.
- Hallsson, J. H., Hafliðadóttir, B. S., Schepsky, A., Arnheiter, H., and Steingrímsson, E. (2007). Evolutionary sequence comparison of the Mitf gene reveals novel conserved domains. *Pigment Cell Res.* 20, 185–200. doi:10.1111/j.1600-0749.2007.00373.x.
- Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., et al. (2012). Mutations in MITF and PAX3 cause “splashed white” and other white

- spotting phenotypes in horses. *PLoS Genet.* 8. doi:10.1371/journal.pgen.1002653.
- Hauswirth, R., Jude, R., Haase, B., Bellone, R. R., Archer, S., Holl, H., et al. (2013). Novel variants in the KIT and PAX3 genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* 44, 763–765. doi:10.1111/age.12057.
- He, X., Li, H., Zhou, Z., Zhao, Z., and Li, W. (2012). Production of Brown/Yellow Patches in the SLC7A11 Transgenic Sheep via Testicular Injection of Transgene. *J. Genet. Genomics* 39, 281–285. doi:10.1016/j.jgg.2012.04.005.
- Hick, M. V. H., Lamas, H. E., Echenique, J., Prieto, A., Castillo, M. F., and Frank, E. N. (2009). Estudio demográfico de los atributos morfológicos y productivos en poblaciones de llamas (*Lama glama*) de la provincia de Jujuy, Argentina. *Animal Genetic Resources Information*, 45, iv. Food and Agriculture Organization of the United Nations. doi:10.1017/S1014233909990460
- Hirooka, H., de Koning, D. J., van Arendonk, J. a M., Harlizius, B., de Groot, P. N., and Bovenhuis, H. (2002). Genome scan reveals new coat color loci in exotic pig cross. *J. Hered.* 93, 1–8.
- Hofstetter, S., Seefried, F., Häfliger, I. M., Jagannathan, V., Leeb, T., and Drögemüller, C. (2019). A non-coding regulatory variant in the 5'-region of the MITF gene is associated with white-spotted coat in Brown Swiss cattle. *Anim. Genet.* 50, 27–32. doi:10.1111/age.12751.
- Holl, H. M., Brooks, S. A., Carpenter, M. L., Bustamante, C. D., and Lafayette, C. (2017). A novel splice mutation within equine KIT and the W15 allele in the homozygous state lead to all white coat color phenotypes. *Anim. Genet.* 48, 497–498. doi:10.1111/age.12554.
- Hou, L., Panthier, J. J., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Development* 127, 5379–5389. doi:10.1111/j.2007.0906-7590.05171.x.
- INDEC. (2002). Censo Nacional Agropecuario. Argentina, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.
- Imes, D. L., Geary, L. A., Grahn, R. A., and Lyons, L. A. (2006). Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation. *Anim. Genet.* 37, 175–178. doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01409.x.
- Jackling, F. C., Johnson, W. E., and Appleton, B. R. (2014). The genetic inheritance of the blue-eyed white phenotype in alpacas (*Vicugna pacos*). *J. Hered.* 105, 847–857. doi:10.1093/jhered/ess093.
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., et al. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 2575–2584. doi:10.1098/rspb.2001.1774.
- Kaelin, C. B., and Barsh, G. S. (2013). Genetics of Pigmentation in Dogs and Cats. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 125–156. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103659.
- Kanteev, M., Goldfeder, M., and Fishman, A. (2015). Structure-function correlations in

- tyrosinases. *Protein Sci.* 24, 1360–1369. doi:10.1002/pro.2734.
- Kijas, J. M. H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M., and Andersson, L. (1998). Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150, 1177–1185.
- Kim, S. H., Hwang, S. Y., and Yoon, J. T. (2014). Microarray-based analysis of the differential expression of melanin synthesis genes in dark and light-muzzle Korean cattle. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0096453.
- Kwon, B. S., Halaban, R., and Chintamaneni, C. (1989). Molecular basis of mouse Himalayan mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 252–60.
- Kwon, J. M., and Goate, A. M. (2000). The candidate gene approach. *Alcohol Res. Heal.* 24, 164–168. doi:10.1007/3-540-29623-9_6380.
- Lamoreux, M. L., Wakamatsu, K., and Ito, S. (2001). Interaction of Major Coat Color Gene Functions in Mice as Studied by Chemical Analysis of Eumelanin and Pheomelanin. 23–31.
- Landes, E. S., and Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 355–356. doi:10.1038/ng0496-355.
- Lewerenz, J., Hewett, S. J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P. W., Kalivas, P. W., et al. (2013). The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in health and disease: From molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 18, 522–555. doi:10.1089/ars.2011.4391.
- Li, W., Sartelet, A., Tamma, N., Coppieters, W., Georges, M., and Charlier, C. (2016). Reverse genetic screen for loss-of-function mutations uncovers a frameshifting deletion in the melanophilin gene accountable for a distinctive coat color in Belgian Blue cattle. *Anim. Genet.* 47, 110–113. doi:10.1111/age.12383.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., and Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21, 991–1007. doi:10.1093/molbev/msh073.
- Lightner, J. K. (2009). Genetics of Coat Color II: The Agouti Signaling Protein (ASIP) Gene. *Answers Res. J.* 2, 79–84.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lyons, L. A., Imes, D. L., Rah, H. C., and Grahn, R. A. (2005). Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*). *Anim. Genet.* 36, 119–126. doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01253.x.
- Mallarino, R., Linden, T. A., Linnen, C. R., and Hoekstra, H. E. (2017). The role of isoforms in the evolution of cryptic coloration in *Peromyscus* mice. *Mol. Ecol.* 26, 245–258. doi:10.1111/mec.13663.
- Manceau, M., Domingues, V. S., Mallarino, R., and Hoekstra, H. E. (2011). The Developmental Role of Agouti in Color Pattern Evolution. *Science (80-.)*. 331, 1062–

1065. doi:10.1126/science.1200684.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., et al. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45, D200–D203. doi:10.1093/nar/gkw1129.
- Marín, J. C., Rivera, R., Varas, V., Cortés, J., Agapito, A., Chero, A., et al. (2018). Genetic Variation in Coat Colour Genes MC1R and ASIP Provides Insights Into Domestication and Management of South American Camelids. *Front. Genet.* 9. doi:10.3389/fgene.2018.00487.
- Marín, J. C., Zapata, B., González, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C., et al. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: Nueva evidencia cromosómica y molecular. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 80, 121–140. doi:10.4067/s0716-078x2007000200001.
- Marklund, L., Moller, M. J., Sandberg, K., and Andersson, L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 7, 895–9. doi:10.1007/s003359900264.
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., and Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* 9, 563–576. doi:10.4161/rna.20231.
- MECON. (2010). Plan de competitividad del conglomerado camélido de la provincia de Jujuy. Secretaría de Política Económica del Ministerio de Economía y Finanzas Públicas de la Nación. Argentina. 42 p.
- Molina, J.I. (1782). Saggio Sulle Storia Naturale del Chile. Bologna.
- Montoliu, L., Oetting, W.S., Bennett, D.C. (2011). Color Genes. European Society for Pigment Cell Research. <http://www.espcr.org/micemut/>.
- Mueller, J.P., Rigalt, F., Lamas, H., Sacchero, D.M., Cancino, A.K. y Wurzinger, M. (2015). Fibre quality of South American camelids in Argentina: a review. *Animal Genetic Resources*, 56, 97–109. Food and Agriculture Organization of the United Nations, doi:10.1017/S2078633614000496
- Munyard K. (2011) Inheritance of White Colour in Alpacas (RIRDC Publication No. 11/074). Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Australia.
- Murakami, M., Iwata, Y., and Funaba, M. (2007). Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Mol. Cell. Biochem.* 303, 251–257. doi:10.1007/s11010-007-9474-x.
- Murisier, F., and Beermann, F. (2006). Genetics of pigment cells: Lessons from the tyrosinase gene family. *Histol. Histopathol.* 21, 567–578. doi:10.14670/HH-21.567.
- Negro, S., Imsland, F., Valera, M., Molina, A., Solé, M., and Andersson, L. (2017). Association analysis of KIT, MITF, and PAX3 variants with white markings in Spanish horses. *Anim. Genet.* 48, 349–352. doi:10.1111/age.12528.

- Norris, B. J., and Whan, V. A. (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res.* 18, 1282–1293. doi:10.1101/gr.072090.107.
- Oetting, W. S. (2000). The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* 13, 320–325. doi:10.1034/j.1600-0749.2000.130503.x.
- Opatowsky, Y., Lax, I., Tomé, F., Bleichert, F., Unger, V. M., and Schlessinger, J. (2014). Structure, domain organization, and different conformational states of stem cell factor-induced intact KIT dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 1772–1777. doi:10.1073/pnas.1323254111.
- Orlow, S. J., Lamoreux, M. L., Pifko-Hirst, S., and Zhou, B. K. (1993). Pathogenesis of the Platinum (cp) mutation, a model for oculocutaneous albinism. *J. Invest. Dermatol.* 101, 137–140. doi:10.1111/1523-1747.ep12363621.
- Paterson, E. K., Fielder, T. J., MacGregor, G. R., Ito, S., Wakamatsu, K., Gillen, D. L., et al. (2015). Tyrosinase depletion prevents the maturation of melanosomes in the mouse hair follicle. *PLoS One* 10, 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0143702.
- Paz, R., Sossa Valdez, F., Lamas, H., Echazu, F., y Califano, L. (2010). Diversidad, mercantilización y potencial productivo de la Puna jujeña. EEA INTA Abra Pampa, CR Salta Jujuy, 80 p.
- Pérez Oliva, A. B., Fernández, L. P., Detorre, C., Herráiz, C., Martínez-Escribano, J. A., Benítez, J., et al. (2009). Identification and functional analysis of novel variants of the human melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. *Hum. Mutat.* 30, 811–22. doi:10.1002/humu.20971.
- Philipp, U., Lupp, B., Mömke, S., Stein, V., Tipold, A., Eule, J. C., et al. (2011). A MITF mutation associated with a dominant white phenotype and bilateral deafness in German Fleckvieh cattle. *PLoS One* 6, 4–9. doi:10.1371/journal.pone.0028857.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., and Jung, S. H. (2018). Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *J. Med. Chem.* 61, 7395–7418. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00967.
- Powell, A. J., Moss, M. J., Tree, L. T., Roeder, B. L., Carleton, C. L., Campbell, E., et al. (2008). Characterization of the effect of Melanocortin 1 Receptor, a member of the hair color genetic locus, in alpaca (*Lama pacos*) fleece color differentiation. *Small Rumin. Res.* 79, 183–187. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.07.025.
- Quispe, E. C., Rodríguez, T. C., Iñiguez, L. R., and Mueller, J. P. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Anim. Genet. Resour. Inf.* 45, 1–14. doi:10.1017/s1014233909990277.
- Ray, P., and Krishnamoorthy, N. A. R. (2008). Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells. *Cell Cycle* 15, 32826–2832. doi:10.1002/nbm.3066.
- Rees, J. L. (2004). The Genetics of Sun Sensitivity in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 739–751. doi:10.1086/425285.

- Regales, L., Giraldo, P., García-Díaz, Á., Lavado, A., and Montoliu, L. (2003). Identification and Functional Validation of a 5' Upstream Regulatory Sequence in the Human Tyrosinase Gene Homologous to the Locus Control Region of the Mouse Tyrosinase Gene. *Pigment Cell Res.* 16, 685–692. doi:10.1046/j.1600-0749.2003.00100.x.
- Reinisalo, M., Putula, J., Mannermaa, E., Urtti, A., and Honkakoski, P. (2012). Regulation of the human tyrosinase gene in retinal pigment epithelium cells: the significance of transcription factor orthodenticle homeobox 2 and its polymorphic binding site. *Mol. Vis.* 18, 38–54.
- Reith, a D., Ellis, C., Lyman, S. D., Anderson, D. M., Williams, D. E., Bernstein, A., et al. (1991). Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 10, 2451–9.
- Richardson, M. F., Munyard, K., Croft, L. J., Allnut, T. R., Jackling, F., Alshanbari, F., et al. (2019). Chromosome-level alpaca reference genome VicPac3.1 improves genomic insight into the biology of new world camelids. *Front. Genet.* 10, 1–15. doi:10.3389/fgene.2019.00586.
- Ritland, K., Newton, C., and Marshall, H. D. (2001). Inheritance and population structure of the white-phased “Kermode” black bear. *Curr. Biol.* 11, 1468–1472. doi:10.1016/S0960-9822(01)00448-1.
- Rosengren Pielberg, G., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M. H., et al. (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.* 40, 1004–1009. doi:10.1038/ng.185.
- Roskoski, R. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1307–1315. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.150.
- Rouzaud, F., Oulmouden, A., and Kos, L. (2010). The untranslated side of hair and skin mammalian pigmentation: Beyond coding sequences. *IUBMB Life* 62, 340–346. doi:10.1002/iub.318.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (David W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saravanaperumal, S. A. (2011). Sheep Coat Colour Genes: Characterization of Multiple Splice Variants and Differential Gene Expression Analysis of SCF, c-KIT and MITF in White Merino Sheep. *phD Thesis*, 1–227.
- Saravanaperumal, S. A., Pediconi, D., Renieri, C., and La Terza, A. (2014). Alternative splicing of the sheep MITF gene: Novel transcripts detectable in skin. *Gene* 552, 165–175. doi:10.1016/j.gene.2014.09.031.
- Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C. R. (1997). CBP / p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* 14, 3083–3092.
- Schmutz, S. M., and Berryere, T. G. (2007). Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: A review. *Anim. Genet.* 38, 539–549. doi:10.1111/j.1365-

2052.2007.01664.x.

- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ciobanu, D. C., Mileham, A. J., Schmitz, B. H., and Fredholm, M. (2004). A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mamm. Genome* 15, 62–67. doi:10.1007/s00335-002-2249-5.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ellinwood, N. M., Kerns, J. A., and Barsh, G. S. (2003). MCIR Studies in Dogs with Melanistic Mask or Brindle Patterns. *J. Hered.* 94, 69–73. doi:10.1093/jhered/esg014.
- Schneider, A., David, V. A., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Barsh, G. S., Menotti-Raymond, M., et al. (2012). How the Leopard Hides Its Spots: ASIP Mutations and Melanism in Wild Cats. *PLoS One* 7, 3–9. doi:10.1371/journal.pone.0050386.
- Shibahara, S. (2001). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): Multiplicity in structure, function, and regulation. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 6, 99–104. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00010.x.
- Sjakste, T., Paramonova, N., and Sjakste, N. (2013). Functional significance of microsatellite markers. *Med.* 49, 505–509. doi:10.1177/0090591700028006008.
- Sponenberg, D. P., Ito, S., Wakamatsu, K., and Eng, L. A. (1988). Pigment Types in Sheep, Goats, and Llamas. *Pigment Cell Res.* 1, 414–418. doi:10.1111/j.1600-0749.1988.tb00145.x.
- Taylor, K. M., Hungerford, D. A., Snyder, R. L., and Ulmer, Jr., F. A. (1968). Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenet. Genome Res.* 7, 8–15. doi:10.1159/000129967.
- Tian, X., Meng, X., Wang, L., Song, Y., Zhang, D., Ji, Y., et al. (2015). Molecular cloning , mRNA expression and tissue distribution analysis of Slc7a11 gene in alpaca (Lama pacos) skins associated with different coat colors. *Gene* 555, 88–94. doi:10.1016/j.gene.2014.10.029.
- Utzeri, V. J., Bertolini, F., Ribani, A., Schiavo, G., Dall'Olio, S., and Fontanesi, L. (2016). The albinism of the feral Asinara white donkeys (*Equus asinus*) is determined by a missense mutation in a highly conserved position of the tyrosinase (TYR) gene deduced protein. *Anim. Genet.* 47, 120–124. doi:10.1111/age.12386.
- Valbonesi, A., Apaza, N., La Manna, V., Gonzales, M. L., Huanca, T., and Renieri, C. (2011). Inheritance of white, black and brown coat colours in alpaca (*Vicuna pacos* L.). *Small Rumin. Res.* 99, 16–19. doi:10.1016/J.SMALLRUMRES.2011.04.003.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., and Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 39, 312–328. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- Vrieling, H., Duhl, D. M. J., Millar, S. E., Miller, K. A., and Barsh, G. S. (1994). Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5667–5671. doi:10.1073/pnas.91.12.5667.
- Wen, B., Chen, Y., Li, H., Wang, J., Shen, J., Ma, A., et al. (2010). Allele-specific genetic

- interactions between Mitf and Kit affect melanocyte development. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 441–447. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00699.x.
- Wheeler, J. C., Russel, A. J. F., and Redden, H. (1995). Llamas and Alpacas: Pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *J. Archaeol. Sci.* 22, 833–840. doi:10.1016/0305-4403(95)90012-8.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134.
- Yokoyama, T., Silversides, D. W., Waymire, K. G., Kwon, B. S., Takeuchi, T., and Overbeek, P. A. (1990). Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res.* 18, 7293–8.

ANEXO

Tabla A.1. Valores absolutos obtenidos para los SNPs c.259G>A y c.383T>C del gen MC1R.

		SNP259			SNP383		
		A/A	A/G	G/G	C/C	T/C	T/T
COLOR	BLANCO	0	2	71	17	30	26
	PIGMENTADO	43	72	10	3	22	100
Total		43	74	81	20	52	126

Tabla A.2. Distribución de genotipos observada para MC1R para la provincia de Jujuy.

	MC1R*1/ MC1R*1	MC1R*1/ MC1R*3	MC1R*2/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*3	Total
BLANCO	0	0	6	13	12	31
PIGMENTADO	4	19	0	1	4	49
Total	4	19	6	14	16	80

Tabla A.3. Distribución de genotipos observada para MC1R para la provincia de Catamarca.

	MC1R*1/ MC1R*1	MC1R*1/ MC1R*3	MC1R*2/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*2	MC1R*3/ MC1R*3	Total
BLANCO	0	0	8	8	3	19
PIGMENTADO	13	10	0	1	3	26
Total	13	10	8	31	5	45

Alineamientos de los exones no codificantes encontrados en los transcritos de ASIP de la llama con los de otras especies

EXON 1C

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
RATON_1C      : -----TTTAA : 5
CONEJO_1C     : -----AGAATGAAATGGGGAAGCCAGCTGCTGGGAGCTCCTGGGGTCTTTA : 46
PERRO_1C      : ----- : -
VACA_1C       : ----- : -
ALPACA_1C     : -----GGCCACTAGGATGAGTATGAAGGCAGTCTGCTTGGCTGAAAGCAAAGAGATGAGATGGGGAGGCCAGCTACTGGGTCTTCCTGCGGAATTCT : 92
LLAMA_1C      : -----ATGAGATGGGGAGGCCAGCTACTGGGTCTTCCTGCGGAATTCT : 43
GENOMICO1_LLAMA : GACCAGAACACAAGGCTGGTGGCCACTAGGATGAGTATGAAGGCAGTCTGCTTGGCTGAAAGCAAAGAGATGAGATGGGGAGGCCAGCTACTGGGTCTTCCTGCGGAATTCT : 112
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

          120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
RATON_1C      : AAATGTCTCACAGCAATGCTCCTTGCCTCTGCCATT-CAAGGACAGGAAGAATCTTGGCCTGGCTTCCC---TTAGGGGAGCTGATGCGGAATAGAGTCACTTGTGCTG : 112
CONEJO_1C     : AAAAATCTCACAGCAACACGCCCTTGCCTCTGCTACC-CAAGGACAGAAAAGACGCTCTGCTCTGGCTTCCC---TTAGAGAGGCTGATTAAGGGCATAGTCACTTGCCTG : 153
PERRO_1C      : -----ATATTTCTCTGCTGCT-TAAGGACAGGGAAGACGCTGAGCTCCAGCTTTCCGTCATTAACAGAGGCTGACTAAAGG-----GCACTG : 81
VACA_1C       : -----CTGCA---TAAGGACAGGGAAGACGCTCAGCTCTGGCTTCCC---TTAGAA---GATAAAG-----ACACT- : 58
ALPACA_1C     : AAAAATCTCACAGAAACACATTTTGTCTCTGCTATTTTAAGGACAGGGAAGA-GCTCAGCTCTGGCTTCCC---TTAGAGAGGCCGATAAAGA-----GCACTA : 187
LLAMA_1C      : AAAAATCTCACAGAAACACATTTTGTCTCTGCTATTTTAAGGACAGGGAAGA-GCTCAGCTCTGGCTTCCC---TTAGAGAGGCCGATAAAGA-----GCACTA : 138
GENOMICO1_LLAMA : AAAAATCTCACAGAAACACATTTTGTCTCTGCTATTTTAAGGACAGGGAAGA-GCTCAGCTCTGGCTTCCC---TTAGAGAGGCCGATAAAGA-----GCACT- : 206
GENOMICO2_LLAMA : -----A : 1

          *      240      *
RATON_1C      : C--TTCTCAGGATGATGTCAACCGCCTACTCC : 143
CONEJO_1C     : C--CTCTCAGGATGAATGTCACTCGCCTGCTCC : 184
PERRO_1C      : TGCCCTCCAGGATG----- : 95
VACA_1C       : ----- : -
ALPACA_1C     : T--CTCCAGGATGATGTCAACCGCCTCCTCC : 218
LLAMA_1C      : T--CTCCAGGATGATGTCAACCGCCTCTTCC : 169
GENOMICO1_LLAMA : ----- : -
GENOMICO2_LLAMA : T--CTCCAGGATGATGTCAACCGCCTCTTCC : 32

```

EXONES 1D Y 1D'

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
ALPACA_1A2A3A : -----AGGAGGGAACAGTAGCAGCAGGAACATCAGGTACCATGGGGCTTCCCTTAGAGAGGCCGATAAAGAGCACT----- : 71
LLAMA_1D1Dp   : -----TTCCCTTAGAGAGGCCGATAAAGAGCACT----- : 29
GENOMICO1_LLAMA : CACAGAAACACATTTTGTCTCTGCTATTTTAAGGACAGGGAGAGGCTCAGCTCTGGCTTCCCTTAGAGAGGCCGATAAAGAGCACTGTAAGTAGAGATTACAATTTTCTTTT : 112
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

                120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
ALPACA_1A2A3A : ----- : -
LLAMA_1D1Dp   : ----- : -
GENOMICO1_LLAMA : CTTCTGCTATCTACAGAGATCCTATCTCTTCCCTTAGGTTTAAGTTTCAAATGACCTGGATTGCTAAAGATCCCTCTGTAAAATAAATGCTTCCCTTTACTTTTGCTTCTT : 224
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

                *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
ALPACA_1A2A3A : ----- : -
LLAMA_1D1Dp   : ----- : -
GENOMICO1_LLAMA : TTGTAAAACCTGCTTTCCCTGGTCTGCTTATTGCTGCTTTTCTGATAATGAAATATTTCTTCTTTTCATTGAGGATCAGTGAGACTCTTCTGCCTATGAGATAGAGTGAGGT : 336
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

                340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
ALPACA_1A2A3A : -----ACAGACAAGCCCCAAAGCCTCCTCTGCTGCAAGATCTCCAGGATGGATGTCA : 124
LLAMA_1D1Dp   : -----ACAGACAAGCCCCAAAGCCTCCTCTGCTGCAAGATCTCCAGGATGGATGTCA : 82
GENOMICO1_LLAMA : TTAAAATGATTTTGTAGTATGATTATTTGTTTTCTTGTCTTTAAAATTGCAGACAGACAAGCCCCAAAGCCTCCTCTGCTGCAAG----- : 428
GENOMICO2_LLAMA : -----ATCTCCAGGATGGATGTCA : 20

                *      460
ALPACA_1A2A3A : GCCGCCTCTCC : 136
LLAMA_1D1Dp   : CCCGCCTCTCC : 94
GENOMICO1_LLAMA : ----- : -
GENOMICO2_LLAMA : CCCGCCTCTCC : 32

```

EXON 1A

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
RATON_1A   : -----GCTGGCATCAAAGTAC-CATTTCCACCACTCTGAGTCCTTGAGCCTCTGCAG-CCTCAG : 58
CERDO_1A   : -----TTTAAACCAA-----CTTGCAGTAACTGGCAACAAAGTAT-CATTTCTGCAAGCTGAGTCATTGAGTCTCTGCAGACTTTGG : 78
ZORRO_1A   : -----TGAAAACCAAAGCTTGGTCTCTGATTTTCACTGACCCTTCBAATCAGCAA-----TTTTCACAGCTGAG-CATTGAGACTCTGCAGACTTTGG : 88
CARNERO_1A : -----TTTAAACCAA-----CTTGCATGAACTGGCAACAGAGTATCCATGCTCTGCACAGANTGAGTCATTGAGCTTCTGCAGAPAGTTGG : 79
LLAMA_1A   : -----TTTAAACCAA-----AAAGTAT-TATTCCTGACAGGCTAAGTCCTTGAGCCTCTGCAGACTTTGG : 50
GENOMICO_ALPACA : CAGCATCTTGACAACCTATTTAAACCAA-----TTTGCAGTAACTGGCAACAAAGTAT-TATTCCTGACAGGCTAAGTCCTTGAGCCTCTGCAGACTTTGG : 96

```

```

          120      *      140      *      160      *
RATON_1A   : AACAGGGAGTCATCAGCTGAAACCTCCAGGAACCAACCGGGGTCCCAGAGGTATGT---- : 115
CERDO_1A   : AACAGGGAATCCTTCACTGAAACCTCTGGAGAACCA--GGGGATCCCAGAGAGG----- : 129
ZORRO_1A   : AACAGGAATCATTAGCTGAAACCTTGAAGAGCCA--GGGGTCCCAGAGAG----- : 138
CARNERO_1A : AACAGGGAATCCTTAGCTGAAACCTTTAAGAACCA--GGGGTCCCAGAGGA----- : 129
LLAMA_1A   : AACAGGGAATCCTCAGCTGAAAGAGTCAAGAACCA--GGGAGTCCCAGAG----- : 98
GENOMICO_ALPACA : AACAGGGAATCCTCAGCTGAAAGAGTCAAGAACCA--GGGAGTCCCAGAGGTATGTAAT : 155

```

EXON 1A' Y 1A'long

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
RATON_1Ap      : ----- : -
CERDO_1Ap      : -----ATCTTTGCAGACCCACCAGAGGTCCTGGATTCCATTTGGAGAACCATTGATCTAAAAACGACATCTTGATTTC : 74
LLAMA_1Ap      : ----- : -
LLAMA_1Aplong  : -----AGCCACAGAACGATTGGAAGAATCTTTGCAGACCCACCAGAGATCCCTGGATTCCACTTGGAGAACCATTGATCTAAAA---ACATCTTGATTTC : 93
GENOMICO1_LLAMA : CCTTGCATTTTGACCCAGCCACAGAACGATTGGAAGAATCTTTGCAGACCCACCAGAGATCCCTGGATTCCACTTGGAGAACCATTGATCTAAAA---ACATCTTGATTTC : 109
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

```

```

          120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
RATON_1Ap      : -----AGAGC-GATTATGATGAA TCCTGGACCA-TGCCCTGTA ACTGTAAGAG----- : 46
CERDO_1Ap      : AGAACCCCTCTTTTGATCTGGAATTATCTCTTATTGACCACAGAGAGCTGCTTATGACGATTCCTGGACAGGGCCCTGTATAGTGAGAGGCCCTCCAGGATGGATGTCAC : 186
LLAMA_1Ap      : AGAACCCCTCTTTTCATCTGGAATTATCTATCATTGACCGCAGAGAGCTGCTT-CTGACGACTCCTGGACAGGGCCCTGTGTAGTGAGAGATCTCCAGGATGGATGTCAC : 111
LLAMA_1Aplong  : AGAACCCCTCTTTTCATCTGGAATTATCTATCATTGACCGCAGAGAGCTGCTT-CTGACGACTCCTGGACAGGGCCCTGTGTAGTGAGAGATCTCCAGGATGGATGTCAC : 204
GENOMICO1_LLAMA : AGAACCCCTCTTTTCATCTGGAATTATCTATCATTGACCGCAGAGAGCTGCTT-CTGACGACTCCTGGACAGGGCCCTGTGTAGTGAGAG----- : 199
GENOMICO2_LLAMA : -----ATCTCCAGGATGGATGTCAC : 21

```

```

          *
RATON_1Ap      : ----- : -
CERDO_1Ap      : TCGCCTCTCT : 197
LLAMA_1Ap      : CCGCCTCTTCC : 122
LLAMA_1Aplong  : CCGCCTCTTCC : 215
GENOMICO1_LLAMA : ----- : -
GENOMICO2_LLAMA : CCGCCTCTTCC : 32

```

EXON 1E

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
LLAMA_1E      : -----GACATTTTCTTCACTCCACACCTGAACTCCTGCTTCCTGGAAGAGAAACCTGAGTAAAGACAGCTGTAGCGACAGAGAAGCGTTCTTCTTGGTACTGGCCACTTC : 106
GENOMICO_LLAMA : GCAATTGACATTTTCTTCACTCCACACCTGAACTCCTGCTTCCTGGAAGAGAAACCTGAGTAAAGACAGCTGTAGCGACAGAGAAGCGTTCTTCTTGGTACTGGCCACTTC : 112
GENOMICO_ALPACA : GCAATTGACATTTTCTTCACTCCACACCTGAACTCCTGCTTCCTGGAAGAGAAACCTGAGTAAAGACAGCTGTAGCGACAGAGAAGCGTTCTTCTTGGTACTGGCCACTTC : 112
GENOMICO_CERDO : -----GACATCTCTTTTCACTCCACACCTGAACTCCTGCTTCCTGGAAGAGAAACCTGAGTAAAGACAGCTGTAGCGACAGAGAAGCGTTATTCTTGTCAAGGCTGCTTC : 105

          120      *      140      *      160      *      180
LLAMA_1E      : TGACTTCAGATTTGTGGGCACTGAGCTA--AAAGGAGTGCAGAGAGAGAGGACTCGG----- : 161
GENOMICO_LLAMA : TGACTTCAGATTTGTGGGCACTGAGCTA--AAAGGAGTGCAGAGAGAGAGGACTCGGAGGTAATGACACTGGGAA : 186
GENOMICO_ALPACA : TGACTTCAGATTTGTGGGCACTGAGCTA--AAAGGAGTGCAGAGAGAGAGGACTCGGAGGTAATGACACTGGGAA : 186
GENOMICO_CERDO : TGACTTCAGAGCTGTGGGCACTGAGCTAGAGCAATAC--AGAGAGAGGACCAGGAAGTAAATG----- : 168

```

EXON NCOA6b

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
ALPACA_NCOA6b  : -----GCCCG---CCGCGCTC-AGGAAATCAGGGAAGATTTTGTGAACCACTGGCACTTGAGACATGTCCTGAAGGGTAGAGGAGTTGCCAGATGCAGAGTTGGAAGA : 99
LLAMA_NCOA6b   : ----GAGAGGGCTGGGGCCGCGCTC-AGGAAATCAGGGAAGATTTTGTGAACCACTGGCACTTGAGACATGTCCTGAAGGGTAGAGGAGTTGCCAGATGCAGAGTTGGAAGA : 107
GENOMICO_ALPACA : CACAGAGATGTCATGTCCTATTC-AGGAAATCAGGGAAGATTTTGTGAACCACTGGCACTTGAGACATGTCCTGAAGGGTAGAGGAGTTGCCAGATGCAGAGTTGGAAGA : 112
GENOMICO2_LLAMA : ----- : -

```

```

                120      *      140      *
ALPACA_NCOA6b  : GAAGAGCCTTCAG----- : 112
LLAMA_NCOA6b   : GAAGAGCCTTCAGATCTCCCAGGATGGATGTCACCCGCCTCTTC- : 151
GENOMICO_ALPACA : GAAGAGCCTTCAG----- : 125
GENOMICO2_LLAMA : -----ATCTCCCAGGATGGATGTCACCCGCCTCTTC : 32

```