

Evaluación del polimorfismo genético mediante PCR-SSCP en dos secuencias del gen *TLR2* en alpacas (*Vicugna pacos*) y su relación con enfermedades infecciosas

Angel Montes¹, Rufino Quilla², Máximo Díaz³, Jorge Rodríguez⁴,
Juan Agapito^{1,*}

¹ Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470. San Borja, Lima, Perú

² Fundo Huaycuyo, Ganadería Alta Gracia SCRL. Distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar Departamento de Puno, Perú

³ Fundo Chaupihuasi, Provincia de Sicuani, Departamento de Cuzco, Perú

⁴ Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Universidad Peruana Cayetano Heredia Lima, Perú

Resumen

Se evalúa el Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) en dos secuencias del gen *TLR2*, en una población de 154 alpacas entre sanas y enfermas, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido del análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (PCR-SSCP) y secuenciación de ADN. Tres loci polimórficos de SSCP, representados en tres diferentes secuencias fueron identificados: T/637/C, G/715/A y G/777/A. A su vez, el SNP G/715/A generó una mutación no sinónima produciendo un cambio de aminoácido de Valina/239/Isoleucina. El estudio determinó que la población analizada no se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos ($p < 0.05$), además los tres loci polimórficos no presentan desequilibrio de ligamiento ($p > 0.05$). Así mismo el análisis de asociación entre los SNP's y el estado sanitario del animal sano o enfermo tampoco presentó valores estadísticos significativos para el Chi cuadrado ($p > 0.05$); por otro lado, el Odds Ratio (OR) demostró la existencia de relación entre el estado sanitario y los SNP G/715/A y G/777/A ($OR > 1$, $IC > 1$, $P < 0.05$). En conclusión los resultados sugieren que la población evaluada presenta loci heredados al azar y no existe una asociación significativa de los SNPs ($p = 0.4$) con la variación para el fenotipo de enfermos y sanos.

Palabras clave: TLR2; Polimorfismo de nucleótido simple; Alpaca

Abstract

We studied the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in two *TLR2* gene sequences in a population of 154 alpacas, between healthy and sick, using the chain reaction (PCR), followed by the analysis of Polymorphism, Single-Stranded Conformation (PCR-SSCP) and DNA sequencing. Three SSCP polymorphic loci, represented in three different sequences were identified: T/637/C, G/715/A and G/777/A. In turn, the SNP G/715/A generated a nonsynonymous mutation causing an amino acid change of Valine/239/Isoleucine. The study founded that the population under study was not in Hardy-Weinberg equilibrium due to a deficit of heterozygotes ($p < 0.05$), in addition, three polymorphic loci showed no linkage disequilibrium ($p > 0.05$). Also the analysis of association between SNPs and the health conditions of healthy and sick animals did not present statistical significances for the Chi square test ($p > 0.05$), on the other hand, the Odds Ratio (OR) showed the existence of relationship between the health conditions and G/715/A and G/777/A SNP ($OR > 1$, $CI > 1$, $P < 0.05$). In conclusion the results suggest the studied population has randomly inherited loci and there is no significant association of SNPs ($p = 0.4$) with the variation for the phenotype of sick and healthy individuals.

Keywords: TLR2, Single nucleotide polymorphism; Alpaca

1. Introducción

Los camélidos sudamericanos (CSA) constituyen un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y para algunos de los

países de la Región Andina. El Perú tiene el privilegio de ocupar el primer lugar en el mundo en la tenencia de alpacas y vicuñas, y el segundo lugar en llamas, después de

* Correspondencia autor: jagapito@ipen.gob.pe

Bolivia [1]. El aprovechamiento racional de esta ventaja comparativa es el reto que el país encara como el medio más efectivo de lucha contra la pobreza y la inseguridad alimentaria, que afecta a las comunidades campesinas que viven de la crianza de estas especies. Además constituye el principal productor de fibra de alpaca en el mundo.

La fibra de alpaca, cuya producción es de 3,400 toneladas anuales, es destinada en un 90 % a la industria del mercado internacional, representando en promedio el 1.35 % de nuestras exportaciones en los últimos años [2]. Esta cifra ha ido disminuyendo debido a la pérdida de la calidad de la fibra. Sumando a esta problemática las enfermedades infecciosas y parasitarias que constituyen un factor limitante de gran magnitud en la producción de camélidos domésticos y en la conservación y aprovechamiento de las especies silvestres.

En general, las enfermedades infecciosas causan alta mortalidad y morbilidad en crías y adultos lo que se traducen en graves pérdidas económicas, mientras que las enfermedades parasitarias afectan el estado general de los animales, reduciendo la productividad o afectando a la calidad de los productos, como la sarcocistiosis que afecta a la carne y los ectoparásitos que afectan la calidad de la fibra [3]. Más aún, cuando no ha sido posible el desarrollo de vacunas ni de antibióticos que controlen efectivamente estas enfermedades, o bien, el fenómeno de resistencia a las drogas ha frustrado la posibilidad de control por la vía terapéutica.

Actualmente, hay poca información sobre el rol del sistema inmune en alpacas lo que hace difícil establecer terapias adecuadas para el control y la prevención de estas enfermedades.

En los últimos años los avances científicos han permitido identificar una familia de proteínas encargadas de la activación del sistema inmune innata, llamados Toll Like Receptor (TLR). Su importancia radica, en que forman la primera línea de defensa contra diferentes patógenos y a su vez desencadenan la respuesta inmunitaria adquirida.

Tomando como antecedente, los estudios realizados sobre TLR para otras especies relacionadas filogenéticamente con la alpaca,

se decidió evaluar el polimorfismo genético en dos secuencias codantes del gen *TLR2* y su asociación con enfermedades infecciosas.

2. Material y Métodos

2.1 Población de alpacas

Fueron seleccionados 154 alpacas de la zona sur del Perú, procedentes de los Fundos Malkini (Puno), Huaycuyo (Puno) y Chaupihuasi (Cuzco).

2.2 Material Biológico

Se utilizó muestras de sangre de cada uno de los animales, entre machos (n=85) y hembras (n=69); pertenecientes a la raza Huacaya (n=147) y Suri (n=7). De los cuales 144 fueron catalogados como sanos y 10 enfermos.

2.3 Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de sangre periférica mediante la técnica de precipitación por sales (*Salting out*) [4]. Para este proceso se utilizó 3 ml de sangre y finalmente el ADN obtenido fue resuspendido en 100 μ l de TE (Tris-EDTA) 1X y almacenado a 4 °C hasta su uso. La concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ 1000 (Termo Scientific).

2.4 Ensayo de PCR

Se amplificó una región conservada de 118 y 539 pb del gen *TLR2*. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos para bovino [5] *TLR2-1F*:(5'-GACTTCTCCCATTTCCGCT-3') y *TLR2-1R*: (5'-TCATTATCTTCCGCAGCTTA-3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, 1X de Buffer de PCR, 200 μ M de cada dNTPs, 2,5 μ M de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada oligonucleótido, 20 ng de ADN y 1,5 U de AmpliTaq Gold (PROMEGA). El protocolo de amplificación fue: 35 ciclos a 94 °C por 3 min, 94 °C por 60 s 55° C por 45 s, 72° C por 60 s y 72° C por 10 min.

Para la amplificación del segmento de 539 pb los oligonucleótidos fueron: *TLR2-2F*: (5'-CAAAACACTTGGGGAAACATC-3') y *TLR2-2R* (5'-TCCGTATTGTAAACGTCTCCAC-3') [6] y la reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 20 μ l, 1X de Buffer PCR, 200 μ M de cada dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 μ M de cada oligonucleótido, 20 ng de ADN y 1,5 U de AmpliTaq Gold

(PROMEGA). El protocolo de amplificación fue de 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C a 20 s, 72 °C a 60 s y 72 °C por 10 min. Los productos de PCR, fueron separados en geles de agarosa al 2 % (p/v) para la secuencia de 118 pb. y al 1 % (p/v) para la secuencia de 539 pb.

2.5 Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple (SSCP)

Se prepararon geles no denaturantes al 10 % y 12 %, para las secuencias de 118 y 539 pb respectivamente. Todos los productos de PCR fueron denaturados con una solución de formamida al 95 %, azul de bromofenol 0,05%, xilen-cianol 0,05 % y EDTA 20mM [7]. La proporción de productos de PCR y solución denaturante fue de 1:1 y la denaturación fue de 95 °C durante 5 min y luego colocadas en hielo por 3 min. La electroforesis vertical se llevó a cabo en 0,5X TBE, 120 V, 400 mA durante 3 h a 4 °C. Finalmente los geles fueron teñidos utilizando Nitrato de plata, usando la metodología propuesta [8].

2.6 Secuenciación automática de ADN

Los productos de PCR con patrones de bandas distintas mediante el análisis por PCR-SSCP, fueron purificados con el protocolo de extracción Exo-SAP de Fermentas®, cuantificados y posteriormente secuenciados con un analizador Genético ABI 3130 de Applied Biosystems®.

3. Resultados

La reacción de PCR mostró tener una alta sensibilidad y especificidad. Se obtuvieron productos de amplificación de 118 y 539 pb, para el gen *TLR2* (Figura 1). Mediante el análisis por SSCP de los productos de PCR, se identificó un solo alelo o patrón de banda en la secuencia de 118 pb y dos patrones de bandas en la secuencia de 539 pb (Figura 2).

Los resultados de secuenciación en alpacas mostraron valores de calidad aceptables para la secuencia de 539 pb. Se encontró un total de 3 polimorfismos SNP, ubicados en las posiciones 637, 715 y 777 de la secuencia consenso de *B. taurus*. El cambio de base que originó cada SNP fue de: C/T, G/A y G/A en

cada una de las posiciones mencionadas anteriormente (Figura 3).

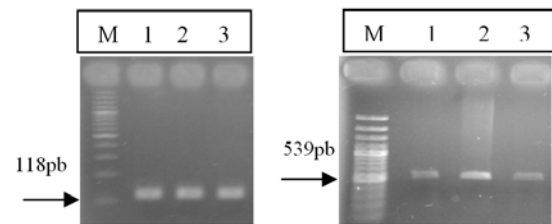


Figura 1. Resultado del PCR para la amplificación de las secuencias de 118 pb y 539 pb. del gen *TLR2*. M = marcador de PM de 100 pb.

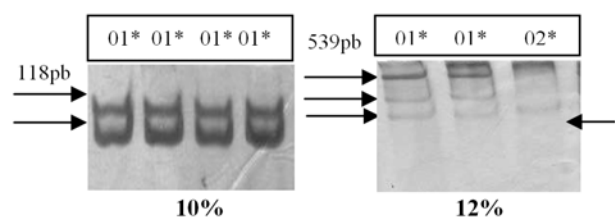


Figura 2. Dos patrones de bandas (01* y 02*) fueron amplificadas, mediante el análisis de SSCP para el fragmento de 118 y 539 pb del gen *TLR2* en un gel de poliacrilamida al 10 y 12 %.

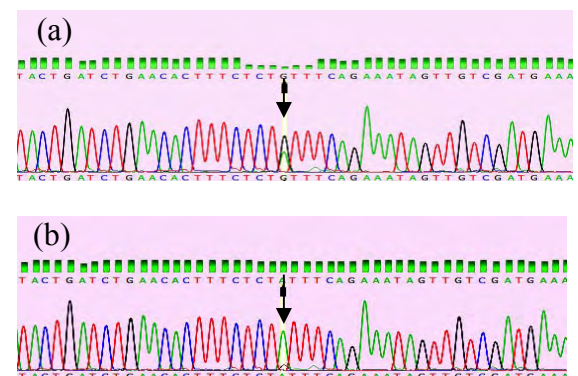


Figura 3. Electroferograma mostrando los SNP's para un locus polimórfico; (a) SNP codificando una Guanina "G", (b) SNP codificando una Adenina "A".

Mediante un alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW [9], se evaluó la secuencia polimórfica de las alpacas sanas y enfermas, acorde con la secuencia consenso del gen *TLR2* de bovino (*Bos taurus*). Los resultados identificaron que los 3 SNP estaban presentes en ambos grupos de alpacas, tanto sanas como enfermas. Así, mismo los SNP fueron ubicados en sus respectivos codones de traducción para la proteína TLR2, encontrándose que solo el SNP G/715/A presentó una mutación no

sinónima; generando un cambio de aminoácido, esta mutación se ubicó en el codón 239 acorde a la secuencia consenso de *B. taurus*, produciendo un cambio de aminoácido de Valina por Isoleucina.

Cuando se evaluaron los resultados de la Genotipificación se determinó que los tres locus polimórficos: C/637/T, G/715/A y G/777/A, presentaron los genotipos homocigotos: TT, CC, AA y GG y en dos locus G/715/A y G/777/A se encontraron los genotipos heterocigotos: GA y AG. En los tres locus polimórficos se encontraron un total de 4 alelos representados por nucleótidos C, T, G y A, cada locus presentó dos alelos: C y T para el locus 637 y A y G para los locus 715 y 777. Así mismo, la mayor frecuencia alélica estaba dada para el alelo T y la menor frecuencia para el alelo C, pertenecientes al locus C/637/T.

Por otro lado cuando se analizó los valores de heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) y el contenido de Información Polimórfica (PIC) por locus, se encontró valores relativamente bajos ($PIC < 0.5$).

De igual forma para conocer si la población en estudio se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, debido al déficit de heterocigotos ($p < 0.05$), se encontró que la población analizada no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Además los tres loci polimórficos no presentaron desequilibrio de ligamiento ($p > 0.05$).

Así mismo, el análisis de asociación de los SNP versus el estado sanitario de las alpacas: sanas y enfermas tampoco presentó valores significativos para el Test de Chi cuadrado ($p > 0.05$). El Odds Ratio (OR) demostró la existencia de relación entre el estado sanitario y los SNP G/715/A y G/777/A ($OR > 1$, $IC > 1$, $P < 0.05$).

4. Discusión

La mayoría de las enfermedades infecciosas que afectan a la alpaca son originadas por patógenos extracelulares. En respuesta a este tipo de patógeno, la primera línea de defensa está dada por la inmunidad innata que a través de receptores de membrana reconocen estructuras moleculares altamente conservadas entre los patógenos (PAMP's), desencadenando procesos inflamatorios y a su vez iniciando la respuesta inmune

adquirida. Las enfermedades infecciosas constituyen un factor limitante de gran magnitud en la producción de Camélidos y en la conservación y aprovechamiento de estas especies.

Actualmente, se conoce que algunas mutaciones en los TLR's pueden estar relacionadas con la capacidad de reconocimiento de PAMP's y por lo tanto, pueden interferir con la capacidad de activación de la inmunidad innata. Estas variaciones genéticas han sido descritas tanto en humanos como en ganado doméstico, pudiendo ser útiles para guiar la selección genética hacia la resistencia a enfermedades en alpacas. Además, se ha encontrado asociación entre los fenotipos de resistencia y susceptibilidad natural y otros polimorfismos del gen TLR2 [11,14, 15].

Las secuencias codificantes del gen TLR2 planteadas para este estudio pertenecen a dos regiones muy importantes de los receptores tipo Toll. La de 118 pb pertenece a la región citoplasmática llamada TIR siendo altamente conservada y la secuencia de 539 pb perteneciente a la región extracelular, la cual está formada por repeticiones ricas en Leucina llamadas LRR. Estas regiones son de gran importancia dado que se encargan del reconocimiento de los PAMPs y además presentan los mayores porcentajes de polimorfismos en el receptor, principalmente entre los LRR10 y LRR15, importantes por ser de unión a ligando [6,18].

Nuestros resultados muestran la factibilidad de utilizar la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales. El análisis por PCR-SSCP generó un solo patrón de banda para la secuencia de 118 pb, por lo tanto no se evidenció la presencia de polimorfismo, esto podría atribuirse a la ubicación de la secuencia dentro del dominio citoplasmático TIR, siendo uno de los dominios proteicos de los TLRs más conservados en todos los organismos [12]. Sin embargo, en bovinos se ha reportado sustituciones de gran impacto en la señalización del receptor para el dominio TIR [13,14]. La secuencia de 539 pb presentó diferentes patrones de banda, evidenciando la posible existencia de polimorfismos en esta secuencia correspondiente al dominio extracelular de unión a ligando del TLR2.

En este estudio se encontraron tres polimorfismos de nucleótido simple (SNP) para el gen *TLR2* que corresponde a la región de unión al ligando, estudios similares a los nuestros han sido reportado para otras especies de mamíferos [14, 15, 16, 17].

Frente a estos resultados es importante tener en cuenta que la falta de asociación estadística se debió probablemente al bajo número de animales evaluados, pero a la luz de los resultados obtenidos se sugiere que la población presenta loci heredados al azar y no existe una asociación significativa de los SNPs ($p=0.4$) con la variación para el fenotipo de sanos y enfermos.

5. Conclusiones

El análisis de PCR-SSCP demostró que en condiciones ideales suele ser útil y efectiva para identificar mutaciones puntuales.

Se encontró un polimorfismo genético en la secuencia de 539 pb para el gen *TLR2* de alpaca.

No existe asociación entre el estado sanitario y los SNPs C/637/T, G/715/A y G/777/A del gen *TLR2* en alpaca.

6. Agradecimientos

A los propietarios de los fundos y otras personas, por las facilidades brindadas para el muestreo de sus animales. Este proyecto fue cofinanciado por el fondo concursable Concytec-Procyt 2010.

7. Bibliografía

- [1] CONACS. Población de Alpacas por departamentos. Programa de Camélidos domésticos. 2003. Lima-Perú.
- [2] Bonavia D. Los Camélidos Sudamericanos, una introducción a su estudio. IFEA-UPCH. Conservation Internacional, Perú. 1996.
- [3] Fernández-Baca, S. La Alpaca: reproducción y crianza. Boletín de Divulgación N° 7. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura, 1971. Lima (Perú).
- [4] Zhang D, Hewitt G. Isolation of animal cellular total DNA. In Molecular tools for screening biodiversity Plants and animals. Ed. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman & Hall. London.1998: 5-9.
- [5] Stephen N. White, Srinivas R. Kata, James E. Womack. Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regios. Mammalian Genome. 2003; 14:149-155.
- [6] Jann O, Werling D, Chang J, Haig D, Glass E. Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. BMC Evolutionary Biology. 2008; 8:288.
- [7] Mantilla J, Barreto E, Reguero M, Velandia D. Identifying cefotaximase genes in *Enterobacteriaceae* hospital isolates by PCR-SSCP. Rev. Colomb. Biotecnol. 2009; XI:57-65.
- [8] Byun S, Fang Q, Zhou H, Hickford J. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 2009; 385: 174-175.
- [9] European Molecular Biology Laboratory. European Bioinformatics Institute. Clustal W. [Home page]. Disponible en: URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- [10] Mariotti M, Williams J, Dunner S, Valentini A, Pariset L. Polymorphisms within the Toll-Like Receptor (TLR)-2, -4, and -6 Genes in Cattle. Diversity. 2009; 1:7-18.
- [11] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1989; 86:2766-2770.
- [12] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 335-376.
- [13] Xu Y , Tao X , Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL , Tong L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. Nature. 2000; 408:111-115.
- [14] Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun. 2000; 68(11):6398-6401.
- [15] Martínez-Córdova Z, Calzadilla-Lugo F, Artiles-Valor A. Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll-R) en la enfermedad y en el trasplante. Bioquímica. 2009; 34(2):83-94.

- [16] Asplin I, Carl D, Way S, Jones A. Role of Toll-like receptor 2 in innate resistance to Group B Streptococcus. *Microb Pathog*. doi: 10.1016/j.micpath.2007.08.001
- [17] Shinkaki Shinkai H, Tanaka M, Morozumi T, Eguchi-Ogawa T, Okumura N, Muneta Y, Awata T, Uenishi H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics*. 2006; 58:324-330.
- [18] Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*. 2007; 8:124.