

Validación de la técnica de PCR para la amplificación de una secuencia de 118pb. del exón 2 perteneciente al gen *TLR2* de alpaca (*Vicugna pacos*)

Angel Montes¹, Jorge Rodríguez², Juan Agapito^{1,*}

¹ Laboratorio de Genómica, Instituto Peruano de Energía Nuclear.

Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular-LID. Universidad Peruana Cayetano Heredia

Av. Honorio Delgado 430, SMP, Perú

Resumen

Las enfermedades infecciosas en alpacas, constituyen un serio problema en la pérdida económica del sector alpaquero. Este trabajo tuvo por objetivo validar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación de una secuencia de 118 pb del exón 2 del *TLR2* utilizando cebadores reportados en ovino. Para este estudio se evaluaron 100 muestras de ADN de alpacas pertenecientes al Fundo Mallkini –Melgar, Puno. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la PCR utilizando diferentes condiciones de PCR y concentraciones de ADN genómico de alpaca (5 ng/μL, 10 ng/μL, 15 ng/μL, 20 ng/μL, 25 ng/μL, 30 ng/μL). La técnica de PCR mostró una elevada sensibilidad y especificidad para la amplificación de un fragmento de 118 pb del exón 2 del *TLR 2* y es una alternativa para la amplificación de una región conservada del *TLR 2* utilizando cebadores provenientes de ovino.

Palabras claves.: *TLR 2, PCR, alpacas, validación*

Abstract

Infectious diseases in alpacas are a problem because of the economical loss in this important sector of the economy. The aim of the study was to validate the technique of Chain Reaction Polymerase (PCR) to amplify a 118 bp sequence of exon 2 of *TLR 2* using primers reported in ovine. One hundred samples of alpaca DNA belonging to the Mallkini breeding center Melgar-Puno were examined. The PCR sensibility and specificity were evaluated using different PCR conditions and genomic alpaca DNA concentrations (5 ng/μL, 10 ng/μL, 15 ng/μL, 20 ng/μL, 25 ng/μL, 30 ng/μL). The PCR technique showed a high sensibility and specificity for the amplification of a 118pb fragment from Exon 2 of *TLR 2* and it is an alternative for the amplification of conservated region of *TLR2* using ovine primers.

Keys word: *TLR 2, PCR, alpacas, validation*

1. Introducción

Los camélidos sudamericanos han sido desde épocas remotas un recurso importante para los pobladores altoandinos debido a su fuerza de carga, su carne y por la calidad de su fibra. La alpaca (*Vicugna pacos*) constituye un recurso de importancia económica para un vasto sector de la población altoandina. El 11% de la población se relaciona con la crianza de alpacas que cuenta con más de 120,000 criadores. Así mismo, nuestro país cuenta con la mayor población de alpacas a nivel mundial, superando los 3 millones de ejemplares y se constituye en el principal productor de fibra (80%) de alpaca en el mundo (CONACS, 2003) [1].

En la actualidad, el 90% de la producción de fibra de alpaca se destina al mercado

internacional, representando aproximadamente el 1.35% de las exportaciones en los últimos años[2]. Esta cifra ha ido disminuyendo debido a la pérdida de la calidad de la fibra y a la alta tasa de mortalidad y morbilidad tanto en neonatos como en animales adultos, produciendo una disminución en las tasas productivas y reproductivas que a su vez generan cuantiosas pérdidas económicas en este sector productivo.

Las enfermedades infecciosas como colibacilosis y enterotoxemia son las causas más frecuentes de mortalidad en las crías entre 13 y 68 % [3]. El conocimiento de la respuesta inmune en alpacas constituye una

* Correspondencia autor: jagapito@ipen.gob.pe

herramienta básica para el diseño de alternativas de prevención y control de enfermedades infecciosas. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de los patógenos cuyo mecanismo reconoce un patrón común y constante en la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógeno (PMAP) a través de receptores conocidos como receptores reconocedores de patógenos (PRR).

Entre las proteínas con características de PRR hay que destacar a los receptores similares a Toll (TLR). La identificación de esta proteína se inició con el descubrimiento de una proteína llamada Toll que es componente esencial de la vía que establece el desarrollo dorso-ventral del embrión de *Drosophila melanogaster* [4]. Debido a la homología de Toll con el receptor de interleuquina 1 (RIL1) [5] y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria [6,7], lo cual se corroboró con la demostración de su participación en la inducción de resistencia a infecciones producidas por hongos [8].

Poco tiempo después, mediante búsquedas en las bases de datos de identificadores de secuencias expresadas (EST) y utilizando secuencias conservadas en el dominio de señalización de Toll/RIL1, se identificó un homólogo del receptor Toll de *Drosophila* en el humano [9]. A partir de este hallazgo y utilizando estrategias similares, se identificó una familia de proteínas estructuralmente relacionada con la proteína Toll de *Drosophila* que colectivamente se les denomina receptores tipo Toll (TLR) [10]. En el humano la familia de receptores tipo Toll consta de 11 miembros y son los que mayormente han sido estudiados [11,5,12]. Este receptor tipo Toll en mamíferos señala la presencia de un grupo de constituyentes microbianos (PMAPs) que incluye los proteoglucanos de las bacterias grampositivas [13].

El *TLR2* responde a lipoproteínas y lipopéptidos de una amplia gama de agentes patógenos como *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* y *Mycoplasma fermentans* [14]. En células deficientes en

TLR2 se confirmó que puede actuar como un receptor para los componentes de las bacterias Gram-positivas, ya que eran altamente susceptibles a la infección con *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* [15,16]. Asimismo *TLR2*, al igual que otros *TLR*, presenta diferencias en humanos y ratones en la expresión, transcripción, concentración tisular y regulación [17].

La información geómica en alpacas es escasa y no hay secuencias reportadas para los principales genes vinculados con la respuesta inmune innata como los TLR. El presente trabajo busca validar una técnica de PCR para amplificar un fragmento del exón 2 del *TLR2* utilizando cebadores reportados en ovinos como alternativa para su amplificación en ADN genómico de alpaca.

2. Material y Método

2.1 Extracción de ADN

ADN geómico fue extraído a partir de 3 mL de sangre con anticoagulante proveniente de 100 alpacas (*Vicugna pacos*) pertenecientes al fundo Mallkini – Michell Cia (Melgar – Puno) mediante la técnica de precipitación por sales (salting out). La concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se amplificó una región conservada de 118 pares de bases del exón 2 del TLR 2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos F1 (5'-GACTTCTCCCATTTCGGTCT-3') y F2 (5'-TAAGCTGCGGAAGATCATGA-3') [18] en un volumen final de 20 µL, conteniendo 20 ng ADN genómico, 1X de Buffer de PCR, 200 µM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 1µM de cada oligonucleótido y 0,5U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems®). Los ciclos termales utilizados fueron una denaturación inicial de 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 60 segundos y una extensión final de 72° por 10 minutos [19], la amplificación se realizó en un termociclador modelo TECHNE, TC-

412. La región del exón 2 de TLR 2 depositados en el GenBank bajo el número de acceso EU413951.1 fue utilizada como secuencia de referencia para el presente estudio.

2.3 Electroforesis de ADN

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% (p/v) en una solución tampón de TBE 1X (0.045mM de Trisborato, 1mM de EDTA pH = 8 ± 0.2), a 60V durante 1 hora, teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.01 mg/mL) y fotografiados bajo luz ultravioleta. Se utilizó como marcador de peso molecular 100pb (Fermentas).

Estudio de reproducibilidad de la PCR

La reproducibilidad de la técnica se evaluó mediante un ensayo piloto de 45 repeticiones de PCR, bajo las mismas condiciones de manipulación, equipos y reactivos (Figura 1).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

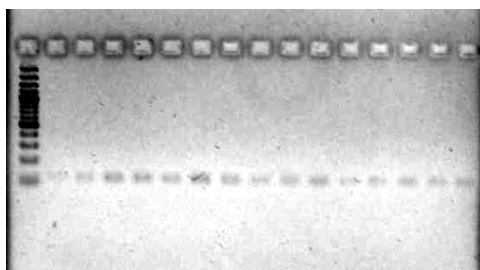


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Amplificación de la secuencia del gen *TLR2*, a partir de muestras de alpaca, M = marcador de peso molecular de 100pb, Línea 1 - 15, productos de PCR.

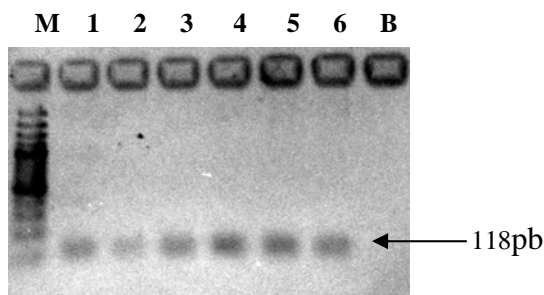


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 2% Sensibilidad de la técnica de PCR (5 ng/ μ l, 10 ng/ μ L, 15 ng/ μ L, 20 ng/ μ L, 25 ng/ μ L, 30 ng/ μ L) M = marcador de peso molecular de 100pb, Línea.

Estudio de Sensibilidad

Para el estudio de sensibilidad se ensayaron 6 diferentes concentraciones de ADN (5 ng/ μ L,

10 ng/ μ L, 15 ng/ μ L, 20 ng/ μ L, 25 ng/ μ L, 30 ng/ μ L). Cada concentración fue utilizada en la reacción de PCR, según las condiciones indicadas anteriormente (Figura 2).

3. Resultados y Discusión

Se amplificó un fragmento de 118 pares de bases pertenecientes al exón 2 del *TLR 2* en ADN genómico de alpaca (Figura 1).

La PCR mostró una alta sensibilidad y reproducibilidad, aún utilizando distintas concentraciones de ADN genómico (5 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 15 ng/ μ L, 20 ng/ μ L, 25 ng/ μ L, 30 ng/ μ L) (Figura 2). Así mismo, evidenció una elevada especificidad con la ausencia de amplificación inespecífica (Figura 1). Los cebadores reportados para amplificación del exón 2 del *TLR 2* ovino han demostrado la capacidad de amplificación cruzada en alpacas, demostrando el alto nivel de conservación de dichas secuencias.

El método de PCR desarrollado en este estudio puede utilizarse como herramienta para determinar la variabilidad genética de la región conservada del exón 2 del *TLR 2*, la identificación de variantes relacionadas con la resistencia y/o susceptibilidad a infecciones por microorganismos Gram positivos y al mejor entendimiento de la respuesta inmune innata en alpacas.

4. Conclusiones

La técnica de PCR para la amplificación del exón 2 del *TLR* en alpacas ha demostrado tener una elevada sensibilidad y especificidad.

5. Agradecimientos

Al Bgo. Marco Espinoza por las facilidades brindadas en el Laboratorio de Citogenética y Radiobiología, al Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), a INCAGRO (Proyecto del Ministerio de Agricultura N° 05-0010), al Instituto Peruano de Alpaca y Camélidos (IPAC) y al Proyecto FINCyT – PIBAT 2007.

6. Bibliografía

- [1] Concejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS. Población de Alpacas por departamentos. Programa de Camélidos domésticos. Lima: Perú; 2003.
- [2] Palacios C, Perales R, Chavera A, López

- T. Caracterización Anatómo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2005; 16(1):34-40.
- [3] Torres D. Entre el pasado y la innovación. La fibra de alpaca en el sur peruano. Lima: DESCO; 2005.
- [4] Moreno C, Sánchez-Ibarrola A. Receptores tipo Toll: Bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev Med Univ Navarra*. 2003; 47(3):29-33.
- [5] Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991; 351:355-6.
- [6] Wasserman SA. A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell*. 1993; 4:767-71.
- [7] Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996; 12:393-416.
- [8] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86:973-83.
- [9] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-7.
- [10] Bautista Garfias C, Mosqueda Gualito J. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su aplicación en medicina veterinaria. *Vet Méx*. 2005; 36(4):453-68.
- [11] Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988; 52:269-79.
- [12] Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA *et al*. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004; 303:1522-1526.
- [13] Janeway Charles, Travers Paul, Walport Marcos, Shlomchik Marcos. *Inmunobiología*. 2001. 2da. Ed., Editorial Masson, S.A.
- [14] Khor, C. C., Chapman, S. J., Vannberg, F.O., Dunne A, Murphy C, Ling EY, *et al*. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature Genetics*. 2007; 39:523-528.
- [15] Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*. 2002; 186:798-806.
- [16] Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, *et al*. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immuno*. 2002; 169:10-14.
- [17] Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*. 2002; 23:375-378.
- [18] White SN, Kata SR, Womack JE. Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. *Mammalian Genome*. 2003; 14:149-155.
- [19] Mucha R, Bhide MR, Chakukar EB, Novak M, Mikula Sr. I. Toll like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009;128:381-388.