



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL DEL POLIMORFISMO EN GENES *TLR*
Y *NLR* PORCINOS

MIGUEL ÁNGEL DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ

TESIS DOCTORAL

TITULO: *Identificación y caracterización funcional del poliformismo en genes TLR y NLR porcino*

AUTOR: *Miguel Ángel Domínguez Martínez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLIMORFISMO EN GENES TLR Y NLR PORCINOS.

DOCTORANDO/A: MIGUEL ÁNGEL DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La idea directriz del trabajo de tesis de D. Miguel Ángel Domínguez Martínez ha sido la identificación y caracterización funcional de la variación genética afectando a regiones promotoras y codificantes de los genes TLR2, TLR4, TLR5, NOD1 y NOD2 porcinos con el fin de contribuir al conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos subyacentes a los procesos de resistencia/susceptibilidad a la infección generada por microbios patógenos. Los resultados obtenidos se ajustan a los objetivos inicialmente previstos y son de gran interés como demuestra que algunos de ellos ya han sido publicados o presentados en congresos especializados:

Trabajos en Congresos

Miguel A. Domínguez, Vincenzo Landi, Luis Morera, Juan J. Garrido. 2013. Análisis funcional del polimorfismo en secuencias promotoras y codificantes de los genes TLR-2, TLR-4 y TLR-5 porcinos. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Genética, Girona, España.

Patrick Mlynarcik, Lucia Pulzova, Stanislaw Hresko, Elena Bencurova, Saskia Dolinska, Andrej Kovac, Miguel A. Domínguez, Juan J. Garrido, Mangesh R. Bhide. 2013. Identification of amino acids residues of Ospa of *Borrelia* involved in binding to CD40. 4th Management Committee Meeting and 3rd Meeting of Working Groups 1, 2 & 3 of COST Action FA1002, Kosice, Eslovaquia.

Miguel A. Domínguez, Vincenzo Landi, Luis Morera, Juan J. Garrido. 2012. Polimorfismo en genes de la inmunidad innata. Análisis funcional. XVI Reunión de Mejora Genética Animal, Ciutadella, Menorca, España.

Miguel A. Domínguez, Vincenzo Landi, Amparo Martínez, Luis Morera, Juan J. Garrido. 2011. Variabilidad genética en secuencias promotoras de genes con función relevante en la respuesta inmune contra la infección en porcino. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética, Murcia, España.

Publicaciones:

Domínguez MA., Landi V., Martínez A., Garrido JJ. 2014. Identification and functional characterization of novel genetic variations in porcine TLR-5 promoter. *DNA and Cell Biology* 33: 1-8.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 4 de Junio de 2014

Firma del/de los director/es

Fdo.: Juan José Garrido Pavón

Amparo Martínez Martínez

D. JUAN JOSÉ GARRIDO PAVÓN, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que el trabajo titulado “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLIMORFISMO EN GENES *TLR* Y *NLR* PORCINOS” realizado por D. Miguel Ángel Domínguez Martínez bajo su dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, se expide el siguiente informe.

Córdoba, 06 de junio del 2014

Prof. Dr. Juan José Garrido Pavón

Departamento de Genética

Universidad de Córdoba

Dña. MARÍA DEL AMPARO MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Investigadora del Grupo AGR218-Mejora y conservación de recursos genéticos de animales domésticos.
Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que el trabajo titulado “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLIMORFISMO EN GENES *TLR* Y *NLR* PORCINOS” realizado por D. Miguel Ángel Domínguez Martínez bajo su dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, se expide el siguiente informe.

Córdoba, 06 de junio del 2014

Dra. María del Amparo Martínez Martínez

Departamento de Genética

Universidad de Córdoba

ÍNDICE

Introducción	1
1 Descubrimiento de los Receptores de Reconocimiento de Patrones.....	3
2 Características de los PRR.....	5
3 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).....	6
4 Principales familias de PRR.....	7
5 Receptores Tipo Toll.....	7
5.1 Receptor TLR2.....	10
5.2 Receptor TLR4.....	10
5.3 Receptor TLR5.....	11
5.4 Otros miembros de la familia TLR.....	12
6 Vías de señalización de los TLR.....	13
6.1 Señalización dependiente de MyD88.....	14
6.2 Señalización independiente de MyD88.....	15
7 Receptores Tipo NOD (NLR).....	15
7.1 Receptor NOD1.....	17
7.2 Receptor NOD2.....	18
8 Vía de señalización de NOD1 y NOD2.....	19
9 Variabilidad genética en la respuesta inmune innata.....	20
10 Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP).....	21
11 Polimorfismos en los genes PRR.....	22
12 El polimorfismo como herramienta en el control de las enfermedades.....	24
Objetivos	27
Materiales y métodos	31
1 Animales, células y estirpes bacterianas.....	33
1.1 Animales.....	33
1.2 Líneas celulares.....	33
1.3 Estirpe bacteriana.....	34

2	Ácidos nucleicos.....	34
2.1	Extracción de ADN genómico.....	34
2.2	Extracción de ARN.....	35
2.3	Síntesis de ADN copia (ADNc).....	35
3	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	36
4	Purificación de fragmentos de ADN.....	37
4.1	Purificación en geles de agarosa y reacción de PCR.....	37
4.2	Sistema de purificación de fragmentos <i>EXO-SAP</i>	38
5	Extracción de plásmidos.....	38
5.1	Mini-preps.....	38
5.2	Maxi-preps.....	39
6	Búsqueda y análisis de secuencias.....	40
6.1	Análisis de regiones promotoras y codificantes de los genes <i>TLR</i> y <i>NLR</i>	40
7	Identificación de polimorfismos.....	41
7.1	Diseño de cebadores para identificación de variaciones genéticas.....	42
8	PCR-SSCP (Polimorfismo de conformación de cadena simple).....	44
9	Genotipado de poblaciones porcinas.....	46
9.1	Minisequenciación.....	46
10	Clonación génica.....	40
10.1	Diseño de construcciones de ADN recombinante.....	50
10.2	Endonucleasas de restricción.....	52
10.3	Ligación.....	53
10.4	Desfosforilación.....	54
10.5	Obtención de células competentes.....	54
10.6	Transformación bacteriana.....	55
10.7	Determinación de la orientación de los insertos.....	55
10.8	Secuenciación.....	56

11 Mutagénesis dirigida.....	56
12 Co-transfección celular.....	59
13 Estimulación celular.....	60
13.1 Estimulación con LPS, PAM3CSK4 y Flagelina.....	60
13.2 Estimulación con <i>Salmonella typhimurium</i> inactivada.....	61
14 Ensayo luciferasa.....	62
15 PCR de comprobación de la transfección.....	64
16 Tratamiento estadístico.....	65
Resultados	67
1 Análisis del polimorfismo en el gen <i>TLR2</i> porcino.....	69
1.1 Caracterización del promotor <i>TLR2</i> porcino y búsqueda de variaciones genéticas.....	69
1.2 Identificación de polimorfismos en la secuencia codificante del gen <i>TLR2</i> porcino.....	72
1.3 Estudio poblacional de las variaciones genéticas detectadas en el gen <i>TLR2</i>	74
1.4 Análisis funcional del polimorfismo en el promotor del gen <i>TLR2</i> porcino.....	77
1.5 Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen <i>TLR2</i> porcino.....	78
2 Análisis del polimorfismo en el gen <i>TLR4</i> porcino.....	81
2.1 Identificación de elementos reguladores en el promotor de <i>TLR4</i> porcino.....	88
2.2 Identificación de polimorfismos en la región promotora y secuencia codificante del gen <i>TLR4</i>	83
2.3 Estudio poblacional del polimorfismo identificado en el gen <i>TLR4</i> porcino.....	84

2.4	Análisis funcional del polimorfismo en el promotor del gen <i>TLR4</i> porcino.....	89
2.5	Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen <i>TLR4</i>	90
3	Análisis del polimorfismo en el gen <i>TLR5</i> porcino.....	93
3.1	Análisis de la región promotora del gen <i>TLR5</i> porcino.....	93
3.2	Identificación de variaciones genéticas en la región promotora del gen <i>TLR5</i> porcino.....	95
3.3	Identificación de polimorfismos en la secuencia codificante del gen <i>TLR5</i> porcino.....	96
3.4	Estudio poblacional del polimorfismo en <i>TLR5</i> porcino.....	97
3.5	Estudio funcional de variaciones genéticas del promotor <i>TLR5</i> porcino.....	101
3.6	Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen <i>TLR5</i>	104
4	Análisis del polimorfismo en genes <i>NLR</i> porcinos.....	107
4.1	Análisis de las regiones promotoras de los genes <i>NOD1</i> y <i>NOD2</i>	107
4.2	Identificación de variaciones polimórficas en los genes <i>NLR</i> porcinos.....	111
4.3	Estudio poblacional del polimorfismo detectado en los genes <i>NLR</i> .	114
4.4	Análisis funcional de polimorfismo situado en las regiones promotoras de los genes <i>NOD1</i> y <i>NOD2</i> porcinos.....	119
Discusión		121
1	Elementos de regulación transcripcional en los PRR.....	124
1.1	Regulación de <i>TLR2</i> porcino dependiente de SP1.....	124
1.2	El elemento TBP/TFIID como principal activador de la expresión del gen <i>TLR4</i>	126

1.3	<i>TLR5</i> porcino, regulación mediada por el complejo CpG-XCPE-SP1.....	128
1.4	Regulación de <i>NOD1</i> mediada por el elemento CpG.....	129
1.5	Regulación transcripcional NFκB-dependiente en <i>NOD2</i> porcino.	131
1.6	Funciones similares con diferentes mecanismos de regulación transcripcional.....	132
2	Identificación de polimorfismos.....	133
3	Estudio poblacional.....	136
4	Funcionalidad de las variaciones genéticas en las regiones promotoras.....	138
4.1	La presencia del SNP -103G→A reduce la actividad promotora mediante la interrupción de la interacción PAX5-ADN.....	139
4.2	La alteración del núcleo de bases conservadas para la unión del factor ETSF disminuye la actividad transcripcional en <i>TLR4</i> porcino.....	140
4.3	La creación de un nuevo sitio STAT mediante la inserción de 23 pb en el promotor <i>TLR5</i> produce un incremento en la actividad transcripcional.....	141
4.4	El SNP -920G→A del promotor <i>NOD2</i> interfiere con la actividad del complejo NFAT/ICSBP.....	143
4.5	La presencia de la variante alélica -2393A en el promotor <i>NOD2</i> genera un nuevo sitio de unión a CEBP que incrementa la expresión del gen reportero.....	145
4.6	La frecuencia de las variaciones genéticas muestra una estrecha relación con su funcionalidad.....	146
5	Funcionalidad de las variaciones genéticas en las secuencias codificantes..	147
5.1	La variante 136A del SNP +561C→G altera la capacidad de interacción de <i>TLR2</i> con el ligando.....	147
5.2	El receptor <i>TLR2</i> porcino es incapaz de reconocer al LPS de <i>Salmonella typhimurium</i>	148

5.3 El cambio asparragina por histidina en un dominio LRR del receptor TLR4 modifica la capacidad de reconocimiento al LPS.....	149
5.4 La sustitución del aminoácido altamente conservado 402prolina afecta significativamente la función de reconocimiento desarrollada por TLR5.....	151
6 Consideraciones generales.....	153
Conclusiones.....	155
Bibliografía.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Vías de señalización intracelular de las proteínas Toll y TLR.....	4
Figura 2. Familias de PRR presentes en células de mamífero.....	8
Figura 3. Vías de señalización intracelular dependientes de TLR.....	14
Figura 4. Complejos multiproteicos formados por los NLR.....	17
Figura 5. Ruta de señalización de los NOD.....	20

Materiales y métodos

Figura 1. Condiciones de la reacción rutinaria de amplificación de fragmentos de ADN.....	35
Figura 2. Esquematación de la técnica PCR-SSCP.....	43
Figura 3. Método de genotipado por minisequenciación.....	45
Figura 4. Obtención de variantes alélicas mediante mutagénesis dirigida.....	55
Figura 5. Ensayo luciferasa.....	61

Resultados

Figura 1. Estructura del gen <i>TLR2</i> porcino.....	69
Figura 2. Región promotora del gen <i>TLR2</i> porcino.....	71
Figura 3. Localización de los SNP identificados en la secuencia codificante del gen <i>TLR2</i>	73
Figura 4. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR2</i> SNP4 -103G→A.....	78
Figura 5. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR2</i> SNP COD1 +561C→G (Pam3CSK4).....	79
Figura 6. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR2</i> SNP COD1 +561C→G (LPS).....	80
Figura 7. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR2</i> SNP COD1 +561C→G (<i>Salmonella typhimurium</i> inactivada).....	80
Figura 8. Región promotora del gen <i>TLR4</i> porcino.....	82
Figura 9. Estructura del gen <i>TLR4</i> porcino.....	84

Figura 10. Frecuencias alélicas de las variaciones polimórficas en el gen <i>TLR4</i>	86
Figura 11. Valores de H_o y H_e para cada uno de los <i>loci</i> analizados en el gen <i>TLR4</i>	87
Figura 12. Diversidad genética en <i>TLR4</i> de cerdos domésticos y jabalíes.....	87
Figura 13. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR4</i> SNP6 -280C→T.....	89
Figura 14. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR4</i> SNP COD1 +807A→C (LPS).....	91
Figura 15. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR4</i> SNP COD1 +807A→C (<i>Salmonella typhimurium</i> inactivada).....	91
Figura 16. Estructura del gen <i>TLR5</i> porcino.....	93
Figura 17. Región promotora del gen <i>TLR5</i> porcino.....	94
Figura 18. Localización de los polimorfismos identificados en la secuencia codificante de <i>TLR5</i>	97
Figura 19. Frecuencias alélicas de las variaciones genéticas identificadas en <i>TLR5</i>	98
Figura 20. Análisis funcional del SNP6-495A→G (<i>TLR5</i>).....	102
Figura 21. Análisis funcional de la variación <i>TLR5</i> Indel 1 (23pb).....	103
Figura 22. Análisis funcional de la variación <i>TLR5</i> Indel 2 (5 pb).....	103
Figura 23. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR5</i> SNP COD3 +1272C→T (Flagelina).....	104
Figura 24. Ensayo funcional del polimorfismo <i>TLR5</i> SNP COD3 +1272C→T (<i>Salmonella typhimurium</i> inactivada).....	105
Figura 25. Isla CpG del promotor <i>NOD1</i>	108
Figura 26. Región promotora del gen <i>NOD1</i> porcino.....	109
Figura 27. Región promotora del gen <i>NOD2</i> porcino.....	110

Figura 28. Representación esquemática de los promotores *NOD1* y *NOD2* porcinos..... 112

Figura 29. Representación esquemática de la estructura genómica y proteica de los receptores *NOD1* y *NOD2*..... 113

Figura 30. Frecuencia del alelo menor de los polimorfismos en los genes *NLR* porcinos..... 115

Figura 31. Análisis de varianza molecular entre cerdos domésticos y jabalíes (*NOD1* y *NOD2*)..... 117

Figura 32. Análisis funcional de la variación *NOD1* SNP1 -920G→A..... 120

Figura 33. Análisis funcional de la variación *NOD2* SNP3 -2393G→A..... 120

Discusión

Figura 1. Regulación de la actividad transcripcional de *TLR2* porcino..... 125

Figura 2. Regulación de la actividad transcripcional de *TLR4* porcino..... 127

Figura 3. Principales elementos reguladores de la transcripción del gen *TLR5* porcino..... 129

Figura 4. Esquematzación de la regulación transcripcional del promotor *TLR5* porcino..... 130

Figura 5. Regulación de la actividad promotora del gen *NOD2* porcino mediada por el elemento NFκB..... 131

Figura 6. Visualización de los SNP no sinónimos identificados en el dominio extracelular de *TLR5* porcino..... 151

Figura 7. Alineamiento de los dominios LRR de *TLR5*..... 152

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Principales PAMP reconocidos por los TLR.....	9
---	---

Materiales y métodos

Tabla 1. Cebadores usados en la estimación de la eficiencia de la retrotranscripción.....	34
Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación de regiones promotoras.	40
Tabla 3. Cebadores diseñados para amplificar las secuencias codificantes.....	41
Tabla 4. Cebadores diseñados para el genotipado en secuencias promotoras.	46
Tabla 5. Cebadores diseñados para el genotipado en secuencias codificantes	47
Tabla 6. Cebadores usados para el diseño de construcciones en el vector pGL4.17.....	49
Tabla 7. Cebadores empleados para el diseño de construcciones en el vector pcDNA3.1+.....	50
Tabla 8. Vectores utilizados en los ensayos funcionales del polimorfismo.....	51
Tabla 9. Cebadores diseñados para generar las variantes alélicas mediante mutagénesis dirigida.....	56
Tabla 10. Cebadores diseñados para comprobar la transfección en células HEK293T.....	62

Resultados

Tabla 1. Polimorfismos identificados en la secuencia codificante de TR2.....	73
Tabla 2. Frecuencias alélicas para cada <i>locus</i> analizado en el gen <i>TLR2</i>	75
Tabla 3. Valores de heterocigosidad, número efectivo de alelos y F_{ST} (<i>TLR2</i>)	76
Tabla 4. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en <i>TLR2</i>	77
Tabla 5. Haplotipos y frecuencias haplotípicas globales y por poblaciones (<i>TLR4</i>).....	88
Tabla 6. Polimorfismos identificados en la secuencia codificante del gen <i>TLR5</i> porcino.....	97

Tabla 7. Valores de H_e , H_o , N_e y F_{ST} calculados en las poblaciones de cerdos domésticos y jabalíes (<i>TLR5</i>).....	99
Tabla 8. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en el gen <i>TLR5</i> porcino.....	101
Tabla 9. Valores de H_e , H_o , N_e y F_{ST} entre los cerdos domésticos y jabalíes (<i>NOD1</i> y <i>NOD2</i>).....	117
Tabla 10. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en <i>NOD1</i> y <i>NOD2</i>	118
Discusión	
Tabla 1. SNP reportados en la base de datos del NCBI.....	134

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AP1	Proteína activadora 1
AP2	Proteína activadora 2
ARID	Dominio de interacción rico en AT
ARN	Ácido ribonucleico
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
CD14	<i>Cluster</i> de diferenciación 14
CEBP	Proteína de unión a la secuencia CAAT
DEC	Dominio extracelular
DIC	Dominio intracelular
ETSF	Factor transcripcional <i>E-Twenty-Six</i>
EVI1	Integración del virus ecotrópico 1
E2FF	Factor regulador del ciclo celular E2F
F _{ST}	Índice de fijación
GATA	Proteína de unión a GATA
GCMF	Factor transcripcional específico de corion
He	Heterocigosidad esperada
HEK293T	Células humanas embrionarias de riñón 293T
Ho	Heterocigosidad observada
ICSBP	Proteína de secuencias consenso de unión a interferón
IKRS	Factor transcripcional ikaros
IL	Interleucina
IRF	Factor regulador del interferón
KLF	Factor de transcripción de tipo Krüppel
LBP	Proteína de unión al LPS

LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repetición rica en leucina
MD-2	Proteína de diferenciación mieloide 2
Ne	Número efectivo de alelos
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFκB	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptor tipo NOD
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
NRF	Factor nuclear respiratorio
OCT1	Factor 1 de transcripción de unión a octámeros
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PAX5	Proteína de caja pax 5
PPAR	Receptor activado por el factor proliferador de peroxisomas
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTF1	Factor de transcripción pancreático 1
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SP1	Especificidad de proteínas 1
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TAF	Factor de unión a TATA
TBP	Proteína de unión a TATA
TFII	Factor de transcripción II
TIR	Dominio citoplasmático del receptor de la interleucina I
TLR	Receptor tipo toll
TM	Dominio transmembranario
XBBF	Factor de unión a la caja X
XCPE	Elemento del núcleo del promotor X
ZF02	Proteína con dedo de zinc 02

INTRODUCCIÓN

A lo largo del proceso evolutivo los organismos superiores han sido sometidos de forma constante al ataque de los microorganismos patógenos presentes en el medio ambiente. Este hecho llevó al desarrollo de un complejo y sofisticado mecanismo de defensa inmunológica, dividido en dos grandes ramas: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

Ambas ramas del sistema inmune conforman una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citoquinas, que establecen barreras físico-químicas dentro del organismo y cuya función principal es la detección y erradicación de los agentes patógenos que pudieran poner en peligro la salud y supervivencia del hospedador (Parkin y Cohen, 2001). Sin embargo, para poder llevar a cabo esta función vital dentro del organismo, el sistema inmune debe ser capaz de reconocer de manera pronta y eficaz cualquier microorganismo que suponga una amenaza, evitando su diseminación excesiva y por consiguiente el desarrollo del proceso patológico.

1 DESCUBRIMIENTO DE LOS RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES.

Fue a partir de la década de 1990, cuando las investigaciones desarrolladas por Charles Janeway en *Drosophila melanogaster* cambiaron radicalmente la forma de interpretar el sistema inmune, principalmente en lo referido al sistema inmune innato, que hasta esa fecha era considerado inespecífico.

Janeway observó que una proteína transmembranaria de nombre Toll, implicada en el correcto desarrollo del eje dorso-ventral embrionario de *Drosophila melanogaster*, desempeñaba funciones inmunológicas frente a infecciones micóticas en la etapa adulta de la mosca, al activar la ruta de señalización del factor transcripcional Dorsal (similar al NFκB en mamíferos), e inducir la transcripción del gen *Drosomicina* que codifica para el péptido anti fúngico del mismo nombre

(Janeway y Medzhitov, 2002). Este descubrimiento, sumado a la posterior identificación de un receptor homólogo en mamíferos, implicado en la respuesta inmune frente a bacterias, denominado Receptor Tipo Toll (TLR) por su similitud con Toll de *Drosophila* (Medzhitov *et al.*, 1997), fue el punto de partida en el estudio de los llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), despertando un enorme interés científico por el estudio de los receptores del sistema inmune innato y los mecanismos mediante los cuales son capaces de discriminar entre lo propio y lo ajeno. La consecuencia fue el descubrimiento de un gran número de moléculas receptoras cuya característica principal radica en su capacidad para detectar una amplia gama de patrones estructurales específicos altamente conservados en microorganismos, pero ausentes en el organismo hospedador (Figura 1).

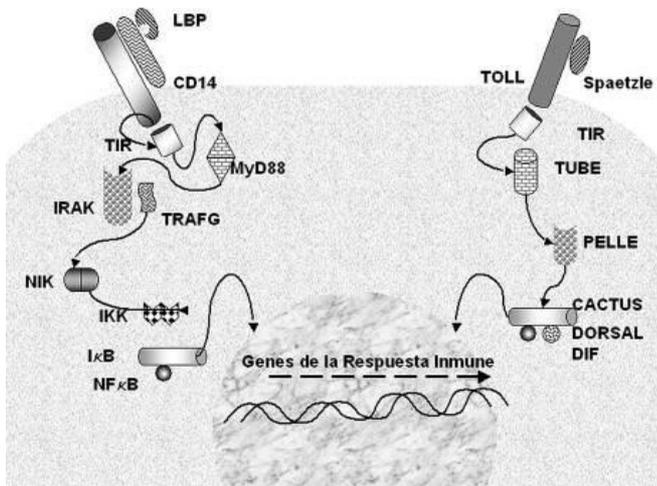


Figura 1. Vía de señalización intracelular de la proteína Toll (Derecha) y su homólogo mamífero TLR (Izquierda). Toll genera una respuesta antifúngica mediante la inducción del gen *Drosomicina* a través del complejo Toll/Spaetzle. Por su parte, TLR forma un complejo receptor con CD14 y LBP, activando un gran número de mediadores de la inflamación, como mecanismo de respuesta anti microbiano (Montaño y Vargas, 2002).

2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRR.

A diferencia de los receptores antigénicos generados por las células linfocitarias del sistema inmune adaptativo, los PRR son receptores no clonales, codificados en la línea germinal, e independientes de la memoria inmunológica (Akira *et al.*, 2006, Kumar *et al.*, 2013). A pesar de la limitación que supone el hecho de que su especificidad esté determinada genéticamente, los PRR contrarrestan esta deficiencia gracias a su capacidad para identificar componentes de origen exclusivamente microbiano, denominados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), favoreciendo la generación de una respuesta inmunológica rápida y oportuna. Además de su capacidad para reconocer moléculas asociadas a patógenos, se ha demostrado que los PRR son capaces de reconocer componentes moleculares derivados del daño tisular originado por la infección, denominados Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMP) (Faddeel, 2012).

Los PRR son expresados de forma constitutiva, lo cual les permite detectar microorganismos invasores independientemente del ciclo de vida del organismo (Akira *et al.*, 2006). La expresión de los PRR tiene lugar fundamentalmente en la membrana externa, vesículas endocíticas y el citoplasma de una amplia variedad de células presentadoras de antígenos, particularmente monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células “*Natural killers*” (Hornung *et al.*, 2002). No obstante, también se ha comprobado su expresión en algunas células no profesionales como fibroblastos y células de la superficie epitelial (Akira *et al.*, 2006, Barbalat *et al.*, 2011) e incluso se ha descrito que pueden estar presentes en el torrente circulatorio y fluidos tisulares (Moreno y Sanchez-Ibarrola, 2003). Por otro lado, se ha observado que el panel de PRR puede variar entre las diferentes células inmunes, resultando en una amplia variedad de posibilidades para cada tipo de celular. A pesar de que los diferentes PRR únicamente reaccionan con PAMP concretos, muestran patrones de expresión diferenciados, activan vías de

señalización específicas y desencadenan distintas respuestas frente a los patógenos, se ha demostrado que pueden interactuar formando redes multimoleculares complejas que potencian su función de reconocimiento (Werling y Coffey, 2007).

3 PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS (PAMP).

Debido a su implicación en funciones esenciales para la supervivencia y capacidad patogénica de los microorganismos (Kumar *et al.*, 2013), la invariabilidad es una de las principales características de los PAMP y ello facilita la detección de cualquier agente patógeno mediante un limitado número de PRR.

Entre los principales PAMP conocidos, se encuentran los ácidos nucleicos microbianos, incluyendo motivos CpG no metilados, ARN de doble cadena, ARN de cadena simple, y ARN 5'-trifosfato, así como lipoproteínas, glicoproteínas de superficie, flagelina y algunos componentes de la membrana como peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipopolisacárido, manano y glicosilfosfatidilinositol (Hornung *et al.*, 2002, Kruithof *et al.*, 2007, Werling y Coffey, 2007, Tang *et al.*, 2012).

Cuando un PRR detecta su correspondiente PAMP, se desencadena una cascada de señalización intracelular que desemboca en una respuesta inflamatoria caracterizada por procesos tales como la fagocitosis, opsonización y producción de mediadores de la inflamación, entre los que se encuentran algunos péptidos antimicrobianos, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, e interferones del tipo I (IFN) (Trinchieri y Sher, 2007). Además de lo anterior, la respuesta mediada por PRR establece una conexión entre la inmunidad innata y adquirida, pues se ha demostrado su participación en la activación de mecanismos implicados en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Nemazee *et al.*, 2006).

4 PRINCIPALES FAMILIAS DE PRR.

Entre las principales familias de PRR descubiertas hasta la fecha, se encuentran los Receptores Lectina Tipo C (CLR), encargados del reconocimiento, captación e internalización por vía endocítica de carbohidratos complejos presentes en bacterias, virus y hongos (Hernández L y Urcuqui I, 2012); los Receptores Tipo AIM-2 (*Absent In Melanoma 2*) cuya función radica en la identificación de ADN viral (Rathinam *et al.*, 2010); los Receptores Tipo RIG-I (RLR), implicados básicamente en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales (Chang *et al.*, 2011); los Receptores Tipo NOD (NLR), algunos de los cuales se encargan del reconocimiento de componentes microbianos intracelulares, y los Receptores Tipo Toll (TLR), siendo esta última familia la primera en ser descubierta y la más estudiada en la actualidad (Figura 2).

5 RECEPTORES TIPO TOLL (TLR).

Los TLR son glicoproteínas transmembranarias de tipo 1, localizadas tanto a nivel extracelular (TLR1, 2, 3, 4-6, 10-13) como intracelular (TLR3, 7-9), principalmente a nivel de retículo endoplásmico y en compartimentos endosomales-lisomales (Manavalan *et al.*, 2011). Estructuralmente, los TLR se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular (DEC), seguido por una hélice transmembranaria simple y un dominio intracelular TIR, similar al dominio intracelular de los receptores de IL-1 (Bowie y O'Neill, 2000). El dominio DEC, esencial para el reconocimiento de patrones moleculares, contiene múltiples bloques de Repeticiones Ricas en Leucina (LRR: "LxxLxLxxNxL") plegados en forma de herradura y protegidos por regiones ricas en cisteína que forman una capucha en los extremos N y C-terminales (Kruithof *et al.*, 2007). La conformación de los motivos LRR es muy divergente entre los TLR, lo que explicaría en parte su capacidad para unirse a diferentes ligandos (Anderson, 2000).

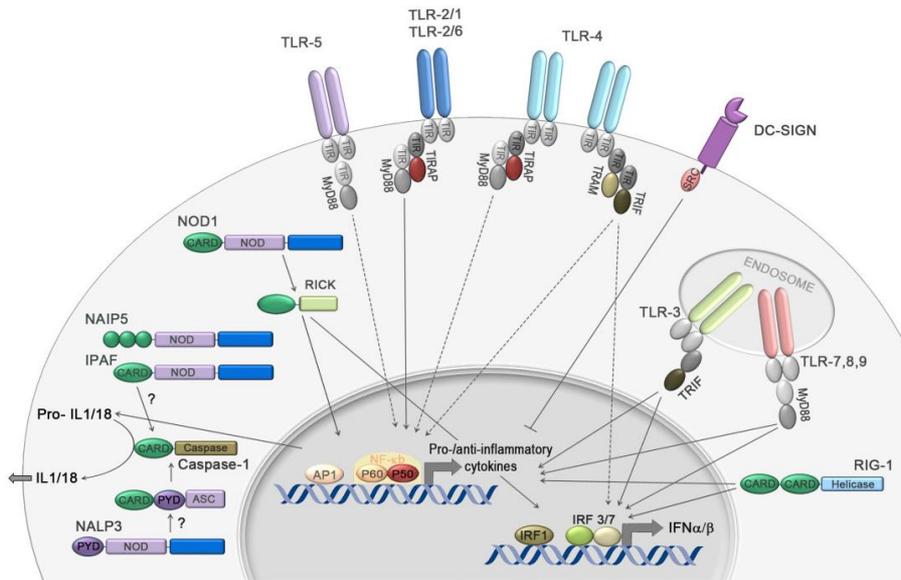


Figura 2. Familias de PRR presentes en células de mamífero. En la imagen se muestran algunos miembros de las familias TLR, NLR, RLR y CLR, su localización celular y la redes de señalización generadas por cada receptor (Muller et al., 2011)

Una de las características más sobresalientes del reconocimiento mediado por TLR, es la capacidad que tienen algunos de ellos, principalmente TLR2, para detectar una gran variedad de ligandos microbianos que no presentan nada en común en términos de estructura, (Medzhitov et al., 1997). Exceptuando TLR12 y TLR13, en los once TLR restantes se han logrado identificar sus ligandos naturales específicos (Tabla 1).

Análisis transcripcionales han confirmado la expresión de TLR en una gran variedad de tipos celulares, tanto inmunitarios: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T gamma/delta, como no inmunitarios: fibroblastos, miocitos cardiacos, células del endotelio vascular y células epiteliales (Takeuchi y Akira, 2001, Kumar et al., 2013, Muneta et al., 2003). Sin embargo, los patrones de expresión de TLR varían dependiendo del tipo celular, la especie y el patógeno involucrado (Uddin et al., 2012).

Tabla 1. Principales PAMP reconocidos por los TLR. (Adaptado de: Lee y Kim, 2007, Mogensen, 2009).

<i>Receptor</i>	<i>Localización</i>	<i>PAMP</i>	<i>Origen</i>
TLR1/TLR2	Superficie celular	Triacil lipopéptidos	Bacterias / Mycobacteria
TLR2/TLR6	Superficie celular	Diacil lipopéptidos Ácido lipoteicoico	<i>Mycoplasma</i> Bacterias Gram+
TLR2	Superficie celular	Lipoproteínas Peptidoglicano Lipoarabinomanano Ácido lipoteicoico Porinas Glicoproteínas de envoltura GPI-Mucina Fosfolipomanano Zymosan β-Glicano	Varios patógenos Bacterias Gram+/- Mycobacteria Bacterias Gram+ <i>Neisseria</i> Virus Protozoarios <i>Candida</i> Hongos Hongos
TLR3	Superficie celular/Endosoma	ARN de doble cadena	Virus
TLR4	Superficie celular	Lipopolisacárido Glicoproteínas de envoltura Glicoinositolfosfolípidos Manano	Bacterias Gram- Virus Protozoarios <i>Candida</i>
TLR5	Superficie celular	Flagelina	Bacterias
TLR7/TLR8	Endosoma	ARN de cadena simple	Virus ARN
TLR9	Endosoma	ADN CpG Hemozoina	Virus, bacterias, protozoarios <i>Plasmodium</i>
TLR10/TLR2	Superficie celular	Lipopéptidos	Bacterias
TLR11	Superficie celular	Molécula tipo profilina	<i>Toxoplasma</i>

Finalmente, se ha demostrado que los macrófagos y las células dendríticas utilizan los receptores TLR para clasificar a los patógenos invasores y generar una respuesta especializada (Moreno y Sanchez-Ibarrola, 2003).

5.1 Receptor TLR2.

Bajo condiciones normales, TLR2 es reconocido como el mayor PRR involucrado en la detección de componentes de la pared celular bacteriana. Aunque reconoce principalmente diacil y triacil lipopéptidos bacterianos, su capacidad de detección de PAMP no se limita solamente a estos componentes, ya que se ha demostrado que TLR2 utiliza una amplia gama de estructuras microbianas como ligandos (Lee y Kim, 2007) (Tabla 1). Esta capacidad se ha justificado por la capacidad de TLR2 de formar heterodímeros con otros TLR, principalmente TLR1, TLR6 y TLR10, ampliando su espectro de reconocimiento de ligandos de la superficie de bacterias Gram- y Gram+, así como de micobacterias y hongos (Farhat *et al.*, 2008, Kawai y Akira, 2010).

TLR2 se expresa en células del sistema inmune innato, sin embargo, también ha sido observado en linfocitos T y B (Farhat *et al.*, 2008). Cuando TLR2 se une a un ligando, induce la maduración de células dendríticas con la regulación positiva de moléculas MHC de clase II, CD80 y CD86, así como la secreción de IL-12 por parte de monocitos y células dendríticas (Hertz *et al.*, 2001, Michelsen *et al.*, 2001), además de la inducción de otras citoquinas como TNF α , IL-2 e IL-6 que resultan esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune tanto innata como adquirida (Tohno *et al.*, 2005).

5.2 Receptor TLR4.

El receptor TLR4 fue el primer miembro de la familia de los TLR identificado y el mejor caracterizado hasta la fecha. Su principal función es el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS), un factor de virulencia y PAMP inmunopotenciador presente en la pared celular de las bacterias Gram- (Guha y Mackman, 2001). Ha sido sugerido que la participación de TLR4 en el reconocimiento y respuesta frente a las infecciones sistémicas bacterianas,

principalmente las originadas por bacterias Gram-, es crucial para el desenlace de la enfermedad (Gerold *et al.*, 2007). Por otro lado, también se ha descrito que TLR4 es capaz de reconocer otros componentes microbianos como proteínas de fusión y de la capsula en algunos tipos de virus (Werling y Jungi, 2003).

A diferencia de otros TLR, TLR4 es incapaz de reconocer por sí solo a su ligando, requiriendo la formación de un complejo de reconocimiento para poder llevar a cabo su función (Poltorak *et al.*, 1998). Este complejo incluye dos proteínas accesorias: CD14 (cluster de diferenciación 14) y LBP (proteína de unión al lipopolisacárido), además de la proteína de señalización MD-2 (proteína de diferenciación mieloides 2). CD14 y LBP se encuentran ancladas a la membrana celular pero carecen de dominio citoplasmático, por lo que son incapaces de transducir señal alguna al interior celular tras el reconocimiento del ligando. La función de estas moléculas consiste en presentar el LPS bacteriano a MD-2, que a su vez se une a TLR4. Los mecanismos moleculares bajo los cuales el LPS es transferido desde CD14 a MD-2 no han sido completamente esclarecidos, habiéndose sugerido incluso que la participación de CD14 no es necesariamente requerida para que tenga lugar la interacción de MD-2 con el LPS y la posterior señalización de TLR4 (Miyake, 2004). Lo contrario sucedería con MD-2, una molécula necesaria en la respuesta frente al LPS bacteriano ya que su ausencia dentro del complejo tiene como consecuencia el no reconocimiento de este ligando por parte de TLR4 (Shimazu *et al.*, 1999).

5.3 Receptor TLR5.

TLR5 es el receptor de la proteína flagelina, la subunidad molecular del flagelo bacteriano, presente tanto en bacterias Gram- como Gram+. Por esta razón, se ha sugerido que TLR5 ha evolucionado para servir únicamente como sensor específico de microorganismos patógenos flagelados (Hayashi *et al.*, 2001, Gewirtz *et al.*, 2006).

TLR5 desempeña una función fundamental en aquellos tejidos que tienen una capacidad reducida para reconocer al LPS, como es el caso de las líneas celulares del epitelio pulmonar (Hawn *et al.*, 2003), o las células del epitelio intestinal, que debido a su contacto permanente con microorganismos comensales, requieren de un receptor que no sea activado de manera excesiva (Yu *et al.*, 2006).

La razón por la cual TLR5 evita la activación excesiva de la respuesta inflamatoria frente a microorganismos comensales a nivel de epitelio intestinal, es que TLR5 solo se expresa en la superficie basolateral y no en la apical de las células, por lo que su activación únicamente se lleva a cabo si la flagelina logra atravesar el epitelio intestinal y hacer contacto con la membrana basolateral (Akira, 2003).

El papel de TLR5 en las infecciones bacterianas no ha quedado completamente esclarecido, ya que se ha observado que su actividad en infecciones por *Salmonella* puede ser contraproducente para el organismo hospedador, debido a que facilita la migración de la bacteria desde el tracto intestinal hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (Gerold *et al.*, 2007).

5.4 Otros miembros de la familia TLR.

En total, han sido identificados 13 miembros en la familia TLR (Manavalan *et al.*, 2011), 10 de ellos caracterizados a nivel molecular en la especie porcina (Uddin *et al.*, 2012). TLR1, TLR6 y TLR10 presentan la misma localización cromosómica que TLR2, formando una subfamilia teóricamente generada a partir de la duplicación de un mismo gen ancestral (Shinkai *et al.*, 2006). Esta circunstancia podría ser la razón por la cual TLR1, TLR6 y TLR10 pueden interactuar y formar heterodímeros de reconocimiento de PAMP con TLR2 (Bergman *et al.*, 2010).

Por otro lado, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están estrechamente relacionados debido a su ubicación intracelular y a su capacidad para reconocer ácidos nucleicos de origen microbiano. TLR7 y TLR8 reconocen los mismos ligandos, se localizan en compartimentos del retículo endoplásmico y requieren de igual manera de la maduración endosomal/lisosomal para su activación (Zhu *et al.*, 2008, Toka *et al.*, 2009). Sin embargo, la diferencia entre TLR7 y TLR8 radica en que TLR7 se presenta en forma de dímero preformado mientras que TLR8 forma dímeros en el momento de la unión al ligando (Govindaraj *et al.*, 2011).

6 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLR.

Gracias a la caracterización genética y bioquímica de las vías de señalización mediadas por TLR, se han logrado identificar la mayoría de los componentes que las conforman, así como sus interacciones (Figura 3). De todos los componentes identificados, la molécula adaptadora MyD88 (Factor de Diferenciación Mieloide 88) representa un factor esencial en la activación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR. MyD88 actúa como punto de inicio de una ruta de señalización común a todos los TLR. Sin embargo, se ha demostrado que en algunos casos es posible desencadenar una vía de señalización alternativa e independiente del MyD88 representada por la molécula adaptadora TRIF (Takeda y Akira, 2004).

La consecuencia final de la inducción de cualquiera de estas dos rutas de señalización, es la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras antimicrobianas y antivirales, así como de moléculas co-estimuladoras de macrófagos, células dendríticas y células “*Natural killer*” con la subsecuente influencia sobre la organización de la respuesta inmune adaptativa (Toka *et al.*, 2009).

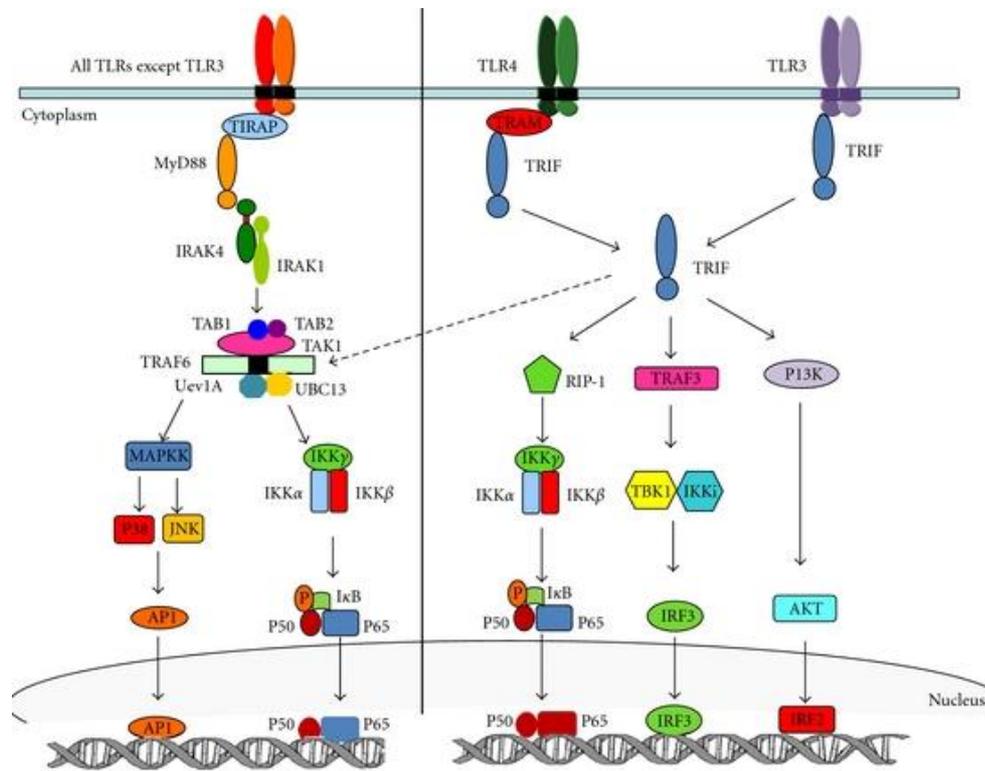


Figura 3. Vías de señalización intracelular dependientes de TLR. A) Vía de señalización dependiente de MyD88. B) Vía de señalización independiente de MyD88, regulada por la molécula adaptadora TRIF (Patel et al., 2012).

6.1 Señalización dependiente de MyD88.

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88, esta proteína se recluta y asocia con los TLR a través de los dominios TIR de ambas moléculas (Govindaraj et al., 2011). Este evento permite que MyD88 se una a IRAK-4 (Quinasa 4 asociada al receptor de IL-1) a través de su dominio intermedio y a IRAK-1 mediante su dominio de muerte (Takeda y Akira, 2004). La proximidad entre ambas quinasas provoca que IRAK-4 fosforile a IRAK-1. IRAK-1 fosforilado se une a la proteína TRAF-6 (Factor asociado al receptor de TNF), ambos se disocian del complejo del receptor e interactúan con otro grupo proteico formado

por TAK1 (Quinasa activada de TGF) y TAB1 y 2 (Proteínas de unión a TAK1) (Philpott y Girardin, 2004, Takeda y Akira, 2004).

Una vez formado este complejo proteico surgen dos vías independientes de señalización: una que lleva a la activación de las MAP quinasas y otra que conduce a la activación del sistema NFκB. En la primera ruta, la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAPK quinasas (ERK, JNK y p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1. En la segunda ruta, TAK 1 fosforila el complejo de quinasas de Iκβ (IKK) marcándolo para su ubiquitinación y subsecuente destrucción por el proteasoma. El dímero NFκB (p50, p65) se transloca al núcleo y se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes diana (Foster y Medzhitov, 2009).

6.2 Señalización independiente de MyD88.

La vía independiente de MyD88 sólo es empleada por TLR3 y TLR4. Ambos receptores señalizan a través de la proteína TRIF (Adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN-β) y sólo TLR4 ocupa a la proteína TRAM (Molécula adaptadora asociada a TRIF). La señalización de la vía independiente a MyD88 abarca la siguiente secuencia: la proteína acopladora TRIF recluta al complejo proteico TRAF6-TAK1-TAB2 que activa a las IKK permitiendo la liberación de NFκB. A través de otra ruta, la molécula TRIF interactúa con el dímero TBK1/IKK ocasionando la translocación del factor nuclear IRF-3 (Factor regulador de IFN-3), provocando la síntesis de interferón tipo I (IFNα/β) (Patel *et al.*, 2012).

7 RECEPTORES TIPO NOD (NLR).

La familia de Receptores Tipo NOD (NLR) está conformada por una serie de proteínas intracelulares, ortólogas de los genes R encargados de la respuesta antimicrobiana en plantas (Shaw *et al.*, 2008). Dentro de esta familia se incluyen las

proteínas: CIITA (Transactivador de MHC clase II), NAIP (Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal), NALP (NLR conteniendo un dominio pirina), IPAF (Factor de activación de las proteasas tipo ICE) y NOD (Dominio de oligomerización de nucleótidos) (Philpott y Girardin, 2004, Martinon *et al.*, 2007).

Los NLR son considerados como una segunda línea de defensa frente a los microorganismos invasores, debido a su localización intracelular. Además, su intervención es crítica en aquellos tejidos donde los TLR requieren ser subexpresados, como en el caso del epitelio intestinal.

Estructuralmente, los NLR comparten una base similar compuesta por tres dominios: un dominio central de unión a nucleótidos NOD ó NACHT, un dominio C-terminal con repeticiones ricas en leucina, presente en todos los miembros de la familia y responsable del reconocimientos de los PAMP, y un dominio N-terminal de reclutamiento de moléculas efectoras que determina la clasificación de los distintos NLR, y que puede ser de tipo PYD (Dominio pirina), DEATH (Dominio de muerte), CARD (Dominio de reclutamiento de caspasas) ó BIR (repetición del dominio IAP de baculovirus) (Lange *et al.*, 2011).

En los vertebrados, los receptores NLR pueden encontrarse formando dos tipos de complejos multiprotéicos (Figura 4). El primero de ellos, denominado genéricamente “inflamiasoma”, puede estar constituido por diferentes NALP, o IPAF que se encargan de mediar la maduración de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-18 y posiblemente IL-33 mediante el control de la activación de las caspasas inflamatorias 1 y 5 (Martinon *et al.*, 2007, Rathinam *et al.*, 2010, Lange *et al.*, 2011). Por otra parte, el segundo complejo, denominado “NODosoma”, está constituido por grupos de proteínas NOD1 y NOD2, encargadas de la activación de moléculas proinflamatorias a través de la ruta canónica RIP2/IKK/NF κ B (Lange *et al.*, 2011). De todos los miembros que componen la familia de los NLR, son las

proteínas NOD1 y NOD2 las que han despertado un mayor interés en la actualidad.

7.1 Receptor NOD1.

NOD1 también conocido como CARD4 (Dominio de reclutamiento de caspasas 4) se expresa de forma ubicua en tejidos adultos. NOD1 detecta la estructura mínima del PGN, el dipéptido D-Glu-meso-DAP o iE-DAP (Ácido diaminopimélico), presente normalmente en bacterias Gram-, por lo que la capacidad de NOD1 para detectar este compuesto representa una ventaja en casos donde los patógenos Gram- simbolizan la principal amenaza, como ocurre en la mucosa intestinal (Girardin *et al.*, 2003, Philpott y Girardin, 2004).

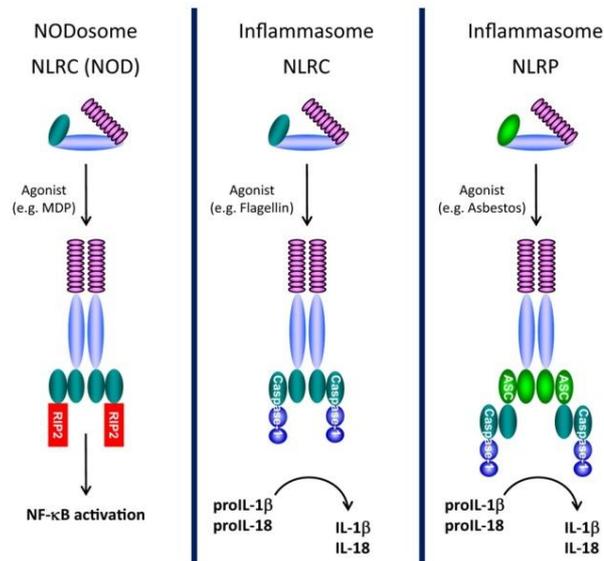


Figura 4. Complejos multiproteicos formados por los NLR. En la parte superior de cada complejo se observa la conformación plegada de los receptores NLR en estado inactivado, con la posterior oligomerización con otro NLR al reconocer su agonista, generando una respuesta frente al estímulo (Le y Harton, 2013).

NOD1 reconoce al ácido diaminopimélico al ser liberado en el citosol, ya sea durante la división celular de bacterias intracelulares en el interior de la célula infectada, o bien como producto de degradación de bacterias fagocitadas (Shaw *et al.*, 2010). NOD1 detecta también patógenos extracelulares como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, gracias a que estas bacterias cuentan con un sistema de secreción tipo IV que les permite transferir proteínas efectoras al interior de la célula, transfiriendo además PGN, que al ser reconocido por NOD1 genera una respuesta inflamatoria (Philpott y Girardin, 2004).

Estudios a nivel transcripcional han permitido identificar los principales sitios de expresión de NOD1 en porcinos, detectándose principalmente en tejidos del tracto digestivo como el esófago, duodeno, yeyuno, ileon, placas de Peyer, colon, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (Tohno *et al.*, 2008a).

7.2 Receptor NOD2.

NOD2 también llamado CARD15, presenta dos dominios CARD en su región N-Terminal, frente a un único dominio CARD presente en NOD1. Al igual que este último, NOD2 presenta una mayor expresión a lo largo del tracto digestivo, encontrándose la presencia de transcritos de este gen en esófago, duodeno, yeyuno, ileon, placas de Peyer, colon, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (Tohno *et al.*, 2008b).

Análisis bioquímicos y funcionales han identificado al componente MurNAc-L-Ala-D-isoGln (Muramil Dipéptido), derivado del PGN, como la estructura mínima reconocida por NOD2. Este compuesto está presente en bacterias tanto Gram+ como Gram-, lo que otorga a NOD2 un mayor rango en la detección de agentes bacterianos con respecto a NOD1 (Philpott y Girardin, 2004).

NOD2 es capaz de detectar al muramil dipéptido (MDP) en el citosol una vez que los fagolisosomas de los macrófagos producen la degradación del PGN (Martinon *et al.*, 2007), aunque como se mencionó previamente, al igual que con el ácido diaminopimélico, pueden existir otros mecanismos que provoquen la liberación del MDP al interior de la célula (Hugot *et al.*, 2001). En células epiteliales intestinales se ha observado que NOD2 está involucrado en la destrucción de *Salmonella* a nivel intracelular (Athman y Philpott, 2004).

8 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOD1 Y NOD2.

Tras la detección e interacción con sus respectivos ligandos, tanto NOD1 como NOD2 oligomerizan para llevar a cabo el reclutamiento de la serina/treonina quinasa RIP2 mediante interacción homotípica de dominios CARD, en un mecanismo de reclutamiento conocido como “proximidad inducida” (Inohara *et al.*, 2000, Kobayashi *et al.*, 2002). Después de su activación, RIP2 recluta a IRAK2, TRAF6, TAB2 y TAK1 para la activación del complejo IKK, produciendo la subsiguiente fosforilación de I κ B α (Quinasa I κ B subunidad alfa) y en consecuencia, focaliza esta proteína para su degradación por el proteosoma (Shaw *et al.*, 2010).

La degradación de I κ B α produce la liberación del factor de transcripción NF κ B, que puede dirigirse al núcleo y mediar la transcripción de una gran variedad de genes pro-inflamatorios (Figura 5). Además de NF κ B, también se ha observado la activación de JNK (Quinasas C-Jun-N-terminal) por NOD en respuesta a bacterias invasivas (Girardin *et al.*, 2001, Martinon *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas en ratones RIP2 deficientes, enfrentados a PGN, LPS y ARN de doble cadena, sugieren que RIP2 participa también en la ruta de señalización de los TLR (TLR2, TLR4 y TLR3), al observarse una disminución en los niveles de producción de citoquinas pro-inflamatorias tras la infección. Este

descubrimiento sugiere la existencia de una posible comunicación entre los TLR intracelulares y los NOD a través de RIP2 (Philpott y Girardin, 2004).

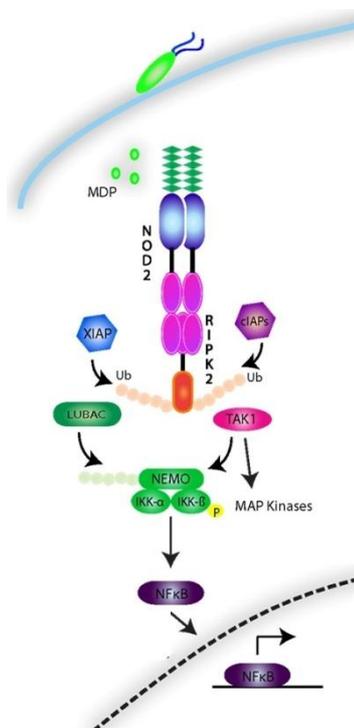


Figura 5. Ruta de señalización de los NOD. En la imagen se muestra la cascada de señalización activada por NOD2 frente al muramil dipéptido. NOD1 desencadena similar cascada de señalización en respuesta al ácido diaminopimélico (Zhong et al., 2013).

9 VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA.

El proceso adaptativo al que han sido sometidos los organismos superiores a lo largo de la evolución, ha traído consigo cambios a nivel genómico, que han dado origen a una extensa colección de variaciones genéticas con consecuencias beneficiosas en algunos casos y perjudiciales en otros sobre el fenotipo de cada individuo.

La variación en el genoma puede presentarse de diferentes formas, ya sea como polimorfismos de un solo nucleótido, inserciones o deleciones de nucleótidos, reordenamiento de genes o cromosomas enteros, duplicación de secuencias, repeticiones en tándem, variaciones en el número de copias y presencia o ausencia de elementos transponibles. Los SNP constituyen el tipo de variación polimórfica más frecuente dentro del genoma (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008, Wu y Zeng, 2012).

Cuando estas variaciones se presentan en genes con una función relevante en la respuesta inmune innata, pueden estar en la base de la existencia de patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades producidas por microorganismos patógenos.

10 POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP).

Como lo indica su acrónimo, un SNP es el cambio de una sola base en una secuencia de ADN. En general los SNP pueden clasificarse en dos tipos: SNP no funcionales, que no presentan ninguna relación con la regulación de la expresión de proteínas y los SNP funcionales, capaces de alterar una secuencia de aminoácidos o un elemento ligado a un factor de transcripción (Gray *et al.*, 2000).

Los SNP funcionales pueden modificar la función o expresión de los genes y por lo tanto ser los causantes de situaciones indeseables para el organismo (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008). Sin embargo, es imprescindible determinar su funcionalidad para poder llevar a cabo estudios de asociación con alteraciones patológicas y evitar de esta forma los problemas relacionados con el uso de SNP no funcionales (Wu y Zeng, 2012).

Por este motivo, la identificación y análisis funcional del polimorfismo en secuencias reguladoras y codificantes de los genes que intervienen en la respuesta a

los patógenos es indispensable para explicar la base molecular de la resistencia/susceptibilidad a las enfermedades de origen infeccioso, ya que la más mínima variación en las secuencias que regulan y codifican estas proteínas, puede llegar a tener un impacto desmedido en la respuesta final a las enfermedades, pudiendo en algunos casos ser decisiva para la supervivencia del organismo.

11 POLIMORFISMOS EN LOS GENES PRR.

La observación de que la presencia de una mutación en el gen *TLR4* en ratones ocasionaba una alteración en la respuesta al lipopolisacárido (Takeda y Akira, 2004), despertó el interés por el estudio de los receptores de reconocimiento de patrones, su variación genómica y su interacción con los agentes patógenos.

En la actualidad, se han desarrollado un gran número de investigaciones, principalmente en humanos, enfocadas al estudio de variaciones polimórficas en genes que codifican para receptores inmunes innatos y su relación con los procesos patológicos, como la sepsis, enfermedades autoinmunes, desordenes de tipo alérgico y diferentes tipos de cáncer (Athman y Philpott, 2004, Krasznai *et al.*, 2011, Theodoropoulos *et al.*, 2012).

En este sentido, se ha observado que la presencia de dos polimorfismos no sinónimos ubicados en la región codificante del gen *TLR4* humano (D299G y T399I) alteran la función de reconocimiento de este receptor hacia el LPS por vía aerógena, afectando la ruta de señalización del factor NFκB con el subsecuente descenso en la expresión de citoquinas inflamatorias (Arbour *et al.*, 2000).

La presencia de estos polimorfismos se ha asociado al desarrollo de procesos patológicos como el asma y las enfermedades atópicas (Kang *et al.*, 2010), así como al desarrollo de síntomas clínicos severos en pacientes con rinitis alérgica estacional, cuando se presentan en compañía de polimorfismos en la región promotora del gen

TNF α (-238A, -308G) (Krasznai *et al.*, 2011), o bien a desarrollar susceptibilidad a la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa en presencia de polimorfismos en la secuencia codificante del gen *NOD2* (R702W, G908R y L1007fsinsC) y la región promotora del gen *CD14* (-159T→C) (Gazouli *et al.*, 2005). La mutación D299G del gen *TLR4* humano también se ha asociado al incremento en la susceptibilidad a padecer cáncer de mama (Theodoropoulos *et al.*, 2012).

De igual forma, se ha reportado que la presencia de polimorfismos en la región promotora del gen *TLR4* humano puede influir en la respuesta inflamatoria a nivel de mucosas frente a la infección con *E. coli* uropatógena (Ragnarsdóttir *et al.*, 2010). En bovinos se ha observado una asociación entre un SNP en la región promotora y dos SNP en la secuencia codificante del gen *TLR4* con la susceptibilidad a padecer mastitis infecciosa por persistencia en la lactación (Sharma *et al.*, 2006).

También se ha descrito que la presencia de dos polimorfismos no sinónimos del gen *TLR2* humano (R753Q, P631H), en combinación con la presencia de variaciones en el gen *NOD2* ocasionan un incremento en la susceptibilidad a padecer procesos infecciosos por bacterias oportunistas, como se observó en pacientes que desarrollaron peritonitis bacteriana espontánea derivada de un cuadro clínico de cirrosis y ascitis (Nischalke *et al.*, 2011). La presencia de polimorfismos en el gen *TLR2* humano también se ha asociado a las primeras etapas de desarrollo de problemas de tipo asmático en niños (Eder *et al.*, 2004). De igual manera, una delección de 22 nucleótidos de la región promotora del gen *TLR2* humano (-196 a -174) provoca una disminución en la actividad de *TLR2*, asociada con la susceptibilidad a padecer cáncer, asociado a una falla en el reconocimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* (Zeng *et al.*, 2011).

Por otro lado, existen estudios que demuestran una relación entre la presencia de polimorfismos en el gen *TLR5* con la susceptibilidad a padecer enfermedades inflamatorias intestinales tanto en humanos como en modelos animales. En perros, la presencia de tres polimorfismos no sinónimos en la secuencia codificante del gen *TLR5* está asociada significativamente al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (Kathrani *et al.*, 2010).

Otros autores han reportado una asociación entre la presencia de polimorfismos en los receptores intracelulares NOD1 y NOD2 con la susceptibilidad a presentar patologías de tipo cancerígeno, básicamente a nivel gástrico, debido a alteraciones en el reconocimiento del patógeno *Helicobacter pylori* (Wang *et al.*, 2012). En el caso del gen *NOD1* humano en particular, se ha logrado determinar con exactitud que la presencia de un SNP no sinónimo (E266K) está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico asociado a procesos de tipo inflamatorio a nivel de mucosa, debido a la infección por *Helicobacter pylori* (Kim *et al.*, 2013). Por otra parte, tres mutaciones en el gen *NOD2* (R334Q, R334W and L469F) se han asociado con un incremento en la susceptibilidad a padecer sarcoidosis y síndrome de Blau. Finalmente, la inserción de una base en el marco de lectura del gen *NOD2* (23020insC) ha sido muy estudiada debido a que su presencia desencadena el desarrollo de la enfermedad de Crohn, aunque otras dos variaciones alélicas en dicho gen (R702W, G908R) también se han asociado con el desarrollo de dicha enfermedad en humanos (Vignal *et al.*, 2002).

12 EL POLIMORFISMO COMO HERRAMIENTA EN EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES.

Las investigaciones previamente descritas, demuestran la importancia de la identificación y caracterización de los polimorfismos presentes en genes que

codifican para receptores de patógenos, como una herramienta potencial para el control de las enfermedades infecciosas.

La opción de explotar la resistencia genética como herramienta para el control de las enfermedades, se ha convertido en una alternativa importante, debido a los inconvenientes generados por los métodos tradicionales de control y erradicación de patógenos, como las vacunaciones, el uso de agentes químicos para el control de patógenos en el medio ambiente y el empleo desmedido de antibióticos. Estas acciones han ocasionado un incremento de la resistencia de los microorganismos a las drogas quimioterapéuticas y profilácticas, sin olvidar la contaminación generada en el medio ambiente y los productos derivados de animales por los residuos químicos.

El estudio funcional de los polimorfismos en genes de la respuesta inmune innata, como son los *TLR* y *NLR*, representa la base para el establecimiento de futuras estrategias para el control, prevención y tratamiento de las enfermedades de forma segura y respetable con el medio ambiente. Es por esta razón que resulta indispensable generar más información que nos permita comprender el complejo proceso hospedador-patógeno y determinar los factores que intervienen en los procesos de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades, teniendo en cuenta que la efectiva eliminación de las enfermedades en los sistemas de producción debe estar respaldada por el conocimiento de los genes, las mutaciones causales y las interacciones con otros factores que pueden otorgar resistencia frente a los patógenos (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

La cascada de señalización intracelular generada por la interacción de los receptores del sistema inmune innato con los agentes patógenos invasores, es crucial para que tenga lugar una respuesta inmune rápida y eficaz frente a los microorganismos, evitando su diseminación excesiva y promoviendo una adecuada respuesta inmune adaptativa.

Estudios previos, principalmente en humanos, han demostrado que la presencia de polimorfismo en genes que codifican para PRR pueden alterar la función desempeñada por estas moléculas en el organismo, favoreciendo o afectando la respuesta frente a los procesos infecciosos.

Es por esta razón que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Identificar variaciones genéticas en las regiones promotoras y secuencias codificantes de los genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *NOD1* y *NOD2*.
- II. Analizar poblacionalmente los polimorfismos identificados a nivel de regiones promotoras, al igual que aquellos SNP no sinónimos identificados en las secuencias codificantes.
- III. Evaluar la funcionalidad de los polimorfismos de las regiones promotoras, localizados en sitios de unión a factores de transcripción relevantes en la regulación de la expresión génica.
- IV. Evaluar la funcionalidad de mutaciones no sinónimas presentes en las secuencias codificantes de los genes *PRR*, principalmente de aquellas que afecten dominios funcionales de las proteínas receptoras.

**MATERIALES Y
MÉTODOS**

1 ANIMALES, CÉLULAS Y ESTIRPES BACTERIANAS.

1.1 Animales.

El material biológico empleado en el presente trabajo incluyó muestras de sangre y pelo porcino, así como muestras de ADN_g y ADN_c pertenecientes a diferentes poblaciones porcinas (Landrace, Ibérico, Cruce Comercial Landrace x Large-White, Pelón Mexicano y Jabalí). Dicho material forma parte de los bancos de muestras tanto del Laboratorio de Genómica y Mejora Animal como del Laboratorio de Marcadores Genéticos Moleculares, ambos pertenecientes a la Universidad de Córdoba.

1.2 Líneas celulares.

Células CHO (*Chinese Hamster Ovary*): La línea celular CHO fue utilizada en los ensayos de transfección para el estudio funcional del polimorfismo en las regiones promotoras de los genes *TLR* y *NOD*. Esta línea se mantuvo a 37°C y 5 % de CO₂ en un incubador *Forma Direct Heat CO₂ Incubator* (Thermo Scientific), en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (PAA Laboratories GmbH) y 5 % de glutamina (Sigma).

Células HEK293T (*Human Embryonic Kidney*): La línea celular HEK293T se utilizó en los ensayos de transfección para el estudio funcional del polimorfismo en las secuencias codificantes de los genes *TLR*. Las células fueron mantenidas a 37°C y 5 % de CO₂ en medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado.

Congelación: Como primer paso, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 400 g; el pellet obtenido se resuspendió en medio de congelación [90 % suero fetal bovino inactivado y 10 % Dimetil-sulfóxido, DMSO (Sigma)]. Posteriormente, se dispuso 1 ml de esta suspensión por criovial, colocándose en

cajas de congelación durante un periodo mínimo de 2 horas a -80°C , finalmente las células fueron transferidas a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Descongelación: Este procedimiento se llevó a cabo mediante agitación suave del criovial en un baño a 37°C . Una vez descongeladas, las células fueron transferidas a un tubo estéril de 10 ml, al cual le fueron añadidos previamente 9 ml de medio de cultivo RPMI 1640 ó DMEM, dependiendo del tipo de línea celular utilizada. La suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 400 g, posteriormente el pellet celular se resuspendió a la concentración deseada transfiriéndose a botellas de cultivo.

1.3 Estirpe bacteriana.

La cepa receptora *XL1-Blue MRF'* con el genotipo: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$ fue la estirpe bacteriana usada en procesos de transformación genética para la amplificación y aislamiento de ADN plasmídico.

2 ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.1 Extracción de ADN genómico.

El ADN empleado durante los experimentos realizados en el presente trabajo se obtuvo a partir de muestras de sangre o pelo.

Extracción de ADN a partir de muestras de sangre: El ADN genómico procedente de células sanguíneas se extrajo utilizando el *kit* comercial ILUSTRA (GE Healthcare), a partir de 300 μl de sangre completa de cerdo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de ADN a partir de pelo: La extracción de ADN a partir de muestras de pelo se realizó mediante la técnica modificada de Dissing (1996), para

lo cual se cortaron y maceraron 8 folículos pilosos de cada animal. Posteriormente, se añadieron 10 μl de NaOH (100 mM) dejándose incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 90 μl de Tris HCl (20 mM). El producto obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Una vez aislado, el ADN genómico se cuantificó mediante espectrofotometría *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

2.2 Extracción de ARN.

Para el aislamiento y manejo del ARN se utilizaron únicamente materiales libres de ARNasas. La extracción del ARN se llevó a cabo usando el *kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante. El ARN obtenido fue resuspendido en agua DEPC, dietilenopirocarbonato (Sigma) esterilizada. La determinación de la concentración del ARN se realizó mediante espectrofotometría, *NanoDrop ND-1000*. Finalmente, la calidad del ARN extraído se evaluó en un gel de agarosa al 1%, almacenándose a -80°C hasta su uso.

2.3 Síntesis de ADN copia (ADNc).

La transcripción inversa se realizó mediante el empleo del sistema *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y el cebador aleatorio *pd(N)6-5'-PO3Na+Salt* (Pharmacia Biotech). El método consistió en la incubación de 1 μg de ARN total con 100 ng del cebador *pd(N)6* durante 3 minutos a 65°C , seguido de una incubación en hielo por 5 minutos.

A continuación, se añadieron al tubo de reacción: 0,5 μl de inhibidor de ARN (50 U/ μl) (Roche), 1 μl de la mezcla de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 20 mM cada uno, Pharmacia Biotech), 4 μl del tampón 5X de la

transcriptasa inversa, 2 μ l de 1,4-ditiotreitol (DTT) (0,1 M) y 1 μ l de la enzima (200 U/ μ l). La reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 1 hora a 42°C. Pasado este tiempo se desnaturalizó a 95°C durante 10 minutos y finalmente se llevó a un volumen final de 100 μ l con agua DEPC. La eficiencia de la reacción de retrotranscripción se estimó mediante la amplificación con los cebadores específicos de un fragmento de 422 pb de la secuencia que codifica para la subunidad ribosómica 18S (Tabla 1), cuyo ARN mensajero se sintetiza de forma constitutiva en todos los tejidos.

Tabla 1. Cebadores usados en la estimación de la eficiencia de la retrotranscripción.

Cebador	Secuencia	Producto	T _m (°C)
18S-F	5' - GAC TCA ACA CGG GAA ACC TCA C - 3'	422 pb	57
18S-R	5' - GCT TAT GAC CCG CAC TTA CTG G - 3'		

3 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).

Los fragmentos de ADN fueron amplificados empleando tres tipos de ADN polimerasa: *Tth* ADN polimerasa (Biotools), utilizada para la amplificación rutinaria de fragmentos de ADN. *Taq/Pwo* ADN polimerasa con actividad correctora capaz de amplificar grandes fragmentos de ADN (*MBLong PCR*, Dominion MBL) y el sistema *BD Advantage 2 PCR Enzyme System* (BD Biosciences Clontech) que contiene la ADN polimerasa *TITANIUM Taq*, compuesta por una mezcla de dos polimerasas (*Taq* ADN - *Taq* ADN plusTaqStart) que permite amplificar grandes fragmentos con una elevada precisión.

La reacción rutinaria de laboratorio con la ADN polimerasa *Tth* de *Biotools* se realizó siguiendo la siguiente pauta durante 35 ciclos de amplificación: ADN 20 ng, *Buffer* 10X 2.5 ml, Cl_2Mg 2.5 mM, dNTPs 2.5 mM, *Forward* 0.8 μ M, *Reverse* 0.8 μ M, Polimerasa 1U, H_2O hasta un volumen final de 25 ml. Las condiciones de

amplificación se muestran en la Figura 1. Para la polimerasa *Taq/Pwo* de MBL las condiciones variaron en: 40 ciclos de amplificación, 0.5 μ M de cebadores y 2 unidades de ADN polimerasa.

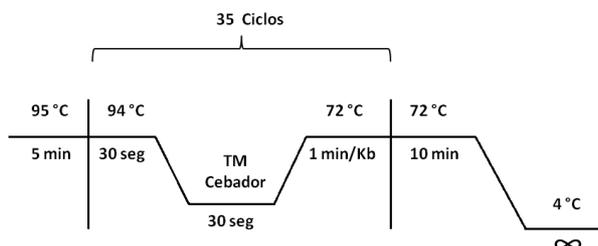


Figura 1. Condiciones de la reacción rutinaria de amplificación de fragmentos de ADN.

En el caso de la amplificación de fragmentos mediante el sistema *BD Advantage 2*, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: ADN 100 ng, Buffer 10X 5 ml, dNTPs 10 mM, Cebadores 10 mM, Polimerasa 1U, H₂O hasta 50 ml. La amplificación se llevó a cabo en 35 ciclos divididos de la siguiente forma; 5 ciclos de 94°C por 30 segundos y 72°C por 3 minutos; 5 ciclos de 94°C por 30 segundos - 70°C por 30 segundos - 72°C por 3 minutos y finalmente 25 ciclos de 94°C por 30 segundos - 68°C por 30 segundos - 72°C por 3 minutos.

4 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.

4.1 Purificación en geles de agarosa y reacción de PCR.

La purificación de los fragmentos de ADN se realizó usando el kit *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema se basa en el empleo de columnas que contienen una membrana de silica-gel que fija selectivamente el ADN de la muestra en presencia de elevadas concentraciones de sales caotrópicas, permitiendo el aislamiento de fragmentos de ADN desde 0,1 hasta 300 Kb.

4.2 Sistema de purificación de fragmentos *EXO-SAP*.

El sistema enzimático *EXO-SAP* se basa en la purificación de productos de PCR mediante la acción de dos enzimas hidrolíticas: La Exonucleasa I encargada de la degradación de los cebadores residuales y cualquier fragmento de ADN extraño de pequeño tamaño producido durante la PCR y la *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*SAP*) cuya acción radica en la desfosforilación de los dNTPs no empleados durante la amplificación. La reacción de purificación mediante este sistema se realizó elaborando una mezcla de Exonucleasa I (Roche) y *FASTap* (Fermentas) a una concentración final de 0,2U/ μ l de cada una de las enzimas. Se añadieron 0,75 μ l de esta mezcla a 2,5 μ l de la reacción de PCR, incubándose durante 15 minutos a 37°C. La reacción se inactivó mediante incubación a 80°C durante 20 minutos.

Los productos purificados mediante cualquiera de los dos métodos descritos se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

5 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS.

5.1 Mini-preps.

La extracción de plásmidos para la comprobación de los productos clonados se llevó a cabo mediante el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 5 %), el cual consistió en la inoculación de colonias bacterianas independientes, sembradas previamente en placas de agar LB (Luria Beltrani) con ampicilina en 2,5 ml de medio LB líquido con antibiótico (Ampicilina). Las colonias se incubaron una noche a 37°C en agitación. A la mañana siguiente se separaron 600 μ l del cultivo bacteriano para su almacenamiento a -80°C en medio de congelación (glicerol 40 %) y el resto fue centrifugado a 12000 rpm durante 2 minutos para obtener el pellet. La lisis celular del pellet bacteriano se realizó añadiendo 200 μ l de tampón STET (Sacarosa 8 %, Tritón 0,1 %, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH

8) suplementado con 4 µl de lisozima (Roche) a una concentración de 50 mg/ml, seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se colocaron en agua hirviendo durante 45 segundos seguidas de una centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. Los restos celulares resultantes se eliminaron y se añadieron 8 µl de la solución CTAB al sobrenadante para favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 300 µl de NaCl 1,2 M y 750 µl de etanol absoluto frío, mezclando por inversión. Después de esto, las muestras fueron centrifugadas una vez más durante 10 minutos a 12000 rpm, lavándose el pellet resultante en dos ocasiones con etanol al 70 %, seguido de centrifugaciones a 12000 rpm durante 5 minutos. Los restos de etanol fueron eliminados con ayuda de un *SpeedVac Concentrator Savant SPD111V* (Thermo Scientific). El ADN se resuspendió en 30 µl de agua *milli-Q* estéril. Finalmente, se añadió 1 µl de ARNasa (Roche) a una concentración de 10 ng/ml a cada muestra y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

5.2 Maxi-preps.

El sistema de extracción de ADN *Maxi-prep* fue empleado para el aislamiento de plásmidos a mayor escala. Para lo cual, se utilizó el kit *JETstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit* (Genomed, GmbH) con un paso previo que consistió en la inoculación de una colonia transformante en 250 ml de medio de cultivo LB líquido con ampicilina, incubándose durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm para obtener el *pellet* bacteriano, el cual fue utilizado para continuar con el protocolo de extracción de ADN establecido por el fabricante. El plásmido obtenido se resuspendió en 300 µl de agua *milli-Q* estéril y fue almacenado hasta su utilización a -20°C.

La determinación de la concentración del plásmido extraído bajo cualquiera de los dos sistemas se efectuó mediante espectrofotometría *NanoDrop* y la comprobación de la presencia del inserto dentro del vector mediante digestión con enzimas de restricción (el tipo de endonucleasa dependió del vector y del fragmento de ADN insertado).

6 BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Se realizó la búsqueda de las secuencias de ARNm de cada uno de los genes TLR y NLR analizados en el presente trabajo. Las secuencias fueron recogidas de la información contenida en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), seleccionándose las secuencias: *TLR2* (AB072190.1), *TLR4* (AY753179.1), *TLR5* (FJ754217.1), *NOD1* (AB187219.1) y *NOD2* (AB195466.1) como referencia para el estudio de las secuencias codificantes.

Para identificar las regiones 5' flanqueantes de los genes *TLR* y *NLR*, Las secuencias de referencia fueron comparadas mediante la herramienta *Blast/Blat* (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) con la información contenida en la base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>). En el caso del gen *NOD2*, la región 5' flanqueante del primer exón fue obtenida a partir de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome-euro.ucsc.edu/>).

6.1 Análisis de regiones promotoras y codificantes de los genes *TLR* y *NLR*.

El análisis *in silico* de las regiones 5' flanqueantes de cada uno de los genes, para la predicción de los elementos *cis*-reguladores presentes en las secuencias promotoras, se llevo a cabo utilizando las herramientas bio-informáticas *Gene Promoter Miner* (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>), *DiAlignTF*, *CommonTF* y *MatInspector* de la plataforma de análisis *Genomatix* (<http://www.genomatix.de>), *HCtata* (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html) y *Alibaba* 2.1

software (Grabe, 2002) de la plataforma de análisis TRANSFAC 4.0 (<http://www.gene-regulation.com>). Los posibles sitios de unión a factores de transcripción de relevancia en el sistema inmune, se determinaron mediante el programa MatInspector. Esta herramienta es capaz de predecir las posibles secuencias diana para factores de transcripción a través de una amplia biblioteca matrices descriptivas creadas a partir de unas breves secuencias altamente conservadas. El programa utiliza la información de esta biblioteca para analizar las secuencias de nucleótidos remitidas y crear una descripción de secuencias consenso de los posibles factores de transcripción identificados en dicha secuencia (Cartharius *et al.*, 2005).

El análisis de la estructura de las proteínas codificadas por los genes *TLR* y *NLR* se realizó con ayuda de los programas *PROSITE* de la plataforma *Expasy* (www.expasy.org) y *TMHMM Server v. 2.0* (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). La herramienta *PROSITE* fue utilizada para definir los dominios estructurales de las proteínas, mientras que el programa *TMHMM* (*Transmembrane Hidden Markov Model*) se utilizó para predecir los dominios transmembranarios de las proteínas. La información generada mediante este análisis fue contrastada con los datos reportados en las bases de datos *Ensembl* y *NCBI*. Para el diseño de la estructura 3D de las proteínas *TLR* se empleó el *software* *Phyre2* (Kelley y Sternberg, 2009). Los resultados obtenidos de la predicción de las estructuras 3D fueron editados utilizando el programa *Chimera 1.8* (Pettersen *et al.*, 2004).

7 IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS.

Como primer paso para la búsqueda de variación genética en las secuencias promotoras y codificantes, se diseñó un mapa de cada una de las regiones a estudiar con ayuda de los programas *EditSeq* y *SeqBuilder* del módulo *Lasergene* y el programa *GeneDoc* (editor) (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). La búsqueda de

polimorfismos se realizó sobre muestras de ADN genómico pertenecientes a ejemplares porcinos del cruce comercial Landrace x Large White. La estrategia seguida para la identificación de variaciones de ADN consistió en el método de PCR-SSCP-Secuenciación. La comparación de las secuencias obtenidas mediante este método se llevó a cabo utilizando los programas MegAlign (*Lasergene*) y *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

7.1 Diseño de cebadores para identificación de variaciones genéticas.

En el caso de las regiones promotoras, se diseñaron parejas de cebadores específicos solapantes, cubriendo una secuencia de ~1000 pb de la región 5' flanqueante del exón 1 de cada uno de los genes a evaluar, con excepción del promotor *NOD2* cuya región analizada comprendió únicamente un fragmento de ~500pb (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación de regiones promotoras.

Gen	Cebador	Secuencia	Producto	T _m (°C)
TLR2	TLR2 FP1	5' - GAC CGT TCA ACC AGG AAA GAT ACA - 3'	555pb	55
	TLR2 RP1	5' - CAC GGA AAC CTG TGA GGC ATG - 3'		
	TLR2 FP2	5' - CTC GGT CTG GGA AGG TCA GAT GT - 3'	548pb	60
	TLR2 RP2	5' - CTC CAT CCT TGG AAG CCG CAA C - 3'		
TLR4	TLR4 FP1	5' - TTC GTG GCT TGC ATC ATT T - 3'	574pb	60
	TLR4 RP1	5' - TGC TTC TCT CCT TGG CTT GT - 3'		
	TLR4 FP2	5' - CAA GCC AAG GAG AGA AGC AG - 3'	750pb	62
	TLR4 RP2	5' - AGA AGC AAG GCA AAG CTC AG - 3'		
TLR5	TLR5 FP1	5' - GTT TCA CCC CAG AGC GCC AAT CCA - 3'	539pb	61
	TLR5 RP1	5' - CAG CAC CTA GTG TCA AAG TCC CA - 3'		
	TLR5 FP2	5' - GAG GTT TGG CGT GGG GGA AGG - 3'	553pb	64
	TLR5 RP2	5' - TCC TCC CCG CCA CCG AAG TAG - 3'		
NOD1	NOD1 FP1	5' - GAT GAT TGG AAC CGC AGA ACT - 3'	641pb	57
	NOD1 RP1	5' - CTG GGC ACG CTG GAG AAA CTC - 3'		
	NOD1 FP2	5' - CTG CCA AGA ACG GAT TTA AGG ACA AGG - 3'	656pb	63
	NOD1 RP2	5' - GAG GTG TGC AGA CCT CGC AGA - 3'		
NOD2	NOD2 FP1	5' - CAC TGA GCC ACG ACA GGA ACT C - 3'	507pb	65
NOD2 RP1	5' - CAC AGA CTC CAC CTC TCT CCT G - 3'			

Tabla 3. Cebadores diseñados para amplificar las secuencias codificantes.

Gen	Cebador	Secuencia	Producto	T _m (°C)
TLR2	TLR2 FW1	5' - CAC AGT CAC TCA CTT GCA CCT - 3'	618pb	57
	TLR2 RW1	5' - ACC TCT GCA GAT GTG AGG CAC - 3'		
	TLR2 FW2	5' - TCA GGC CAA GGA TTT CCA GGG - 3'	662pb	57
	TLR2 RW2	5' - AGG CAT GCT CAC AGG CTG AGT - 3'		
	TLR2 FW3	5' - CTG GTT CCC TGT TCC CTT TCA - 3'	712pb	57
	TLR2 RW3	5' - TGT GGC ACT CAG TGA GCG AGA - 3'		
	TLR2 FW4	5' - GCC GGA GAA CTA CCT GTG TGA - 3'	703pb	58
	TLR2 RW4	5' - ACT GGC CTT TCA CGA AGG AAC - 3'		
TLR4	TLR4 FW1	5' - CCC AGG CAG TTA GTC ACA CA - 3'	545pb	61
	TLR4 RW1	5' - GGC AGA GAG CAG TTT TTC AGA - 3'		
	TLR4 FW2	5' - CCC CTG TGC CTA TAC CAG TG - 3'	400pb	60
	TLR4 RW2	5' - TGA ATG AAT GAA TAA GTG AAT GAA GA - 3'		
	TLR4 FW3	5' - ATG CCA CGT CTG TGT GAA GA - 3'	1039pb	58
	TLR4 RW3	5' - TGG TTG TCC CAA ATT CAT TG - 3'		
	TLR4 FW4	5' - TGA GTC TGA ATT TGC GTG GT - 3'	997pb	60
	TLR4 RW4	5' - GCC ACA GAT ACC AGG AGG AA - 3'		
	TLR4 FW5	5' - TAA GCG AGG CCG TCA TTA GT - 3'	717pb	60
	TLR4 RW5	5' - TGG CAT GTT GCA GGA TTT AG - 3'		
TLR5	TLR5 FW1	5' - CTC CAT AGG ATC ATG GGA GAC - 3'	654pb	57
	TLR5 RW1	5' - ATC CAC CGA GAC CCT ACT GTA - 3'		
	TLR5 FW2	5' - CAG ATA CCC CTT GTG TGC GAG - 3'	729pb	57
	TLR5 RW2	5' - AGC CTG ATG TTT GGC AAA GTC - 3'		
	TLR5 FW3	5' - GGA CTG CCT AAG CTC GCT TAT - 3'	802pb	57
	TLR5 RW3	5' - AAA CGG TGT TGA GGG GAC TCC - 3'		
	TLR5 FW4	5' - CCA ATG TCA CGA TAT TTG GGT - 3'	829pb	56
	TLR5 RW4	5' - TGA GTT CTC TGT GAC TTG GGA - 3'		
NOD1	NOD1 EX3F1	5' - GGT GGT TCT GTT CGT CTC TTC - 3'	424pb	58
	NOD1 EX3R1	5' - CCC AAG GTA CTG AAC TCC CAA - 3'		
	NOD1 EX5F1	5' - TTG TGT GGT TGC TTC GCC ACT - 3'	784pb	61
	NOD1 EX5R1	5' - CAC CTT CTT CCA GAG GAG CTG - 3'		
	NOD1 EX5F2	5' - TGC ACT CGG ACT TCG ACC TGA - 3'	704pb	63
	NOD1 EX5R2	5' - GAA GGC CTG AAG GGT GAG ATG - 3'		
	NOD1 EX5F3	5' - TTC AAC CAG GAG GAG GTG CAG - 3'	848pb	60
	NOD1 EX5R3	5' - CAG GAT CAT CCA GGA GAC CCT - 3'		
NOD2	NOD2 EX1F1	5' - TCC TGA GAA GCC CTG CAC TGA - 3'	596pb	60
	NOD2 EX1R1	5' - CGG GAC TGC TTA AGG ATG GAG - 3'		
	NOD2 EX3F1	5' - CAT ACC ACT GGG CAA CCC ACC - 3'	672pb	61
	NOD2 EX3R1	5' - CCT GCA GGA GGT TGA AGA GGA - 3'		
	NOD2 EX3F2	5' - GAT CAC GAG CGT CAC TGC TGT - 3'	725pb	61
	NOD2 EX3R2	5' - TGG AAG AGG TGT CTG AGG GAT - 3'		
	NOD2 EX3F3	5' - TGC ACG TCA CAT TCC AGT GCT - 3'	703pb	62
	NOD2 EX3R3	5' - TGC CAT TCC CAC CAT GCC CAA - 3'		

Por su parte, en las secuencias codificantes, los cebadores fueron diseñados abarcando la totalidad del marco de lectura en los genes *TLR2*, *TLR4* y *TLR5* (Tabla 3). En los genes *NOD1* y *NOD2* se analizaron únicamente dos exones codificantes (*NOD1* exones 3 y 5 / *NOD2* exones 1 y 3).

Los cebadores específicos se diseñaron con ayuda del programa *Oligo 7* (MBI). Este programa permite elaborar PCRs virtuales con las parejas de cebadores seleccionadas, así como predecir la formación de posibles estructuras que podrían disminuir la eficiencia de la reacción, como son las horquillas o los dímeros entre cebadores.

8 PCR-SSCP (POLIMORFISMO DE CONFORMACIÓN DE CADENA SIMPLE).

Como se mencionó previamente, la técnica de PCR-SSCP fue elegida para la búsqueda de variación genética en las secuencias promotoras y codificantes de los genes *TLR* y *NLR* (Figura 2). Esta técnica se basa en el supuesto de que el cambio de un solo nucleótido en la secuencia de un producto de PCR afecta la conformación espacial de las hebras sencillas, repercutiendo en su movilidad electroforética, con lo cual, al realizar una electroforesis bajo condiciones desnaturizantes las hebras migrarán de forma diferente de acuerdo a la presencia o ausencia de cambios en su secuencia nucleotídica (Hayashi, 1991).

El procedimiento establecido para la ejecución de la técnica fue el siguiente: Una vez realizada la amplificación de los fragmentos de cada uno de los genes mediante PCR convencional, a partir de muestras de ADN genómico, se procedió a su análisis electroforético en una unidad *GenePhor* (Amersham Pharmacia) bajo condiciones desnaturizantes, utilizando geles de poliacrilamida *precast GeneGel Excel 12.5/24* (Amersham Pharmacia). Para esto, se mezclaron 2 µl del producto de PCR con 8 µl de tampón de carga desnaturizante (99 % formamida, 1 %

xilencianol, azul de bromofenol), seguido de una incubación a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron colocadas rápidamente en hielo para evitar la renaturalización de los fragmentos de ADN. Finalmente, la mezcla fue sometida a electroforesis a voltaje constante de 600 V, con una intensidad de corriente de 25 mA y 5°C de temperatura durante 90 minutos. Una vez concluida la electroforesis, los fragmentos fueron visualizados mediante tinción de plata empleando el kit *DNA Silver Staining Kit* (Amersham Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras con un patrón electroforético diferenciado fueron secuenciadas para identificar el sitio exacto de variación nucleotídica.

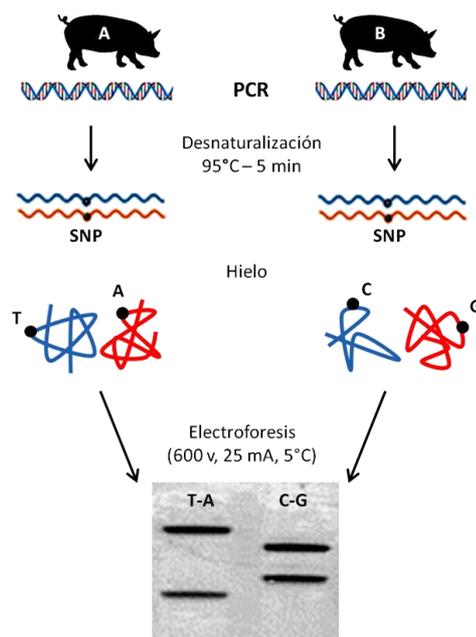


Figura 2. Esquematación de la técnica PCR-SSCP. En la imagen se representan dos ejemplares homocigotos para un SNP (A → C). Los fragmentos de ADN desnaturalizados de cada ejemplar adquieren conformaciones diferentes por lo que son fácilmente apreciables mediante electroforesis en un gel de acrilamida.

9 GENOTIPADO DE POBLACIONES PORCINAS.

El estudio poblacional de las variaciones genéticas detectadas en los genes PRR se realizó empleando la técnica de minisequenciación, con ayuda del kit *ABI PRISM SNaPshot Multiplex System* (Applied Biosystems).

Se utilizaron un total de 328 muestras de ADN genómico extraído a partir muestras de sangre o pelo, o bien pertenecientes al banco de muestras del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba. Se utilizaron cinco poblaciones porcinas (Landrace, Ibérico, Landrace x Large White, Pelón Mexicano y Jabalíes).

9.1 Minisequenciación.

El método de genotipado por minisequenciación se basa en la extensión de un solo nucleótido en un cebador diseñado para hibridarse específicamente en la secuencia adyacente al sitio de variación. La incorporación de un solo nucleótido al cebador se consigue mediante el empleo de didesoxinucleótidos terminales (ddNTPs).

Puesto que el cebador está diseñado para hibridarse exactamente en el sitio adyacente a la base de interés y se trabaja a partir de un producto purificado que no incluye dNTPs, el ddNTP incorporado definirá el alelo para cada polimorfismo (Fiorentino *et al.*, 2003), tal y como se representa en la Figura 3.

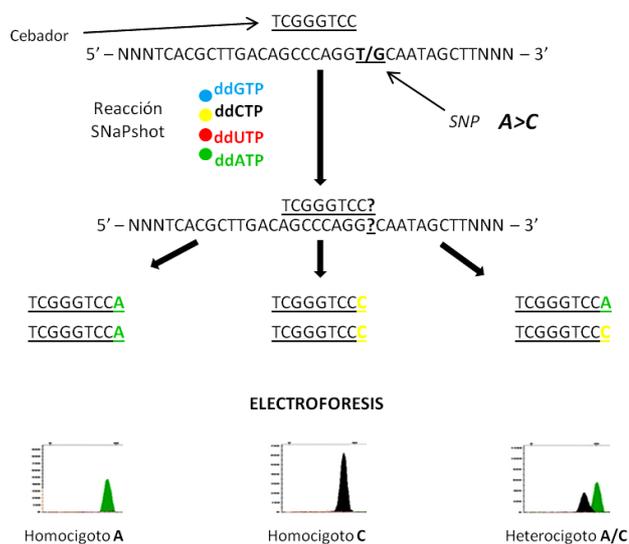


Figura 3. Método de genotipado por minisequenciación. La imagen ejemplifica los diferentes electroferogramas obtenidos para un SNP (A → C) obtenidos mediante la técnica de genotipado por minisequenciación.

Todas las variaciones genéticas detectadas en las secuencias promotoras, así como aquellos polimorfismos en las secuencias codificantes que dieron origen a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas TLR y NLR, fueron analizados poblacionalmente.

El primer paso para la realización de la técnica de minisequenciación consistió en la amplificación de cada uno de los fragmentos por PCR convencional empleando las parejas de cebadores específicos previamente diseñados para la búsqueda de polimorfismos (Tablas 2 y 3). Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el sistema enzimático EXO-SAP (descrito en el apartado de purificación de fragmentos de ADN).

Tabla 4. Cebadores diseñados para el genotipado en secuencias promotoras.

Rx	Locus	Secuencia	V.N.	O.
M1	TLR4-SNP 1P	5' - ACA ACA GAA ATT CAC CTT TAT - 3'	-963 T>C	R
	TLR4-SNP 2P	5' - (T ₆) TCC CAT TTT ACA GAC CAG AAA - 3'	-897 T>C	F
	TLR4-SNP 3P	5' - (T ₁₂) TCT TTT CCC AAT ATT CTT GTA - 3'	-781 C>T	F
	TLR4-SNP 4P	5' - (T ₁₈) TGA GAG TGG GTC TTT ACA ACA - 3'	-595 G>A	F
	TLR4-SNP 5P	5' - (T ₂₄) ATG TAG TGA CCT CCT TTT ACC - 3'	-588 A>G	R
M2	TLR4-SNP 6P	5' - (T ₆) GAC ACC TTG ACT ACA GAC TTC - 3'	-400 C>T	F
	TLR5 SNP 1P	5' - (T ₃₁) TCC AGC CAC AGC AGT GAC CA - 3'	-834 A>C	F
	TLR5 SNP 2P	5' - (T ₂₄) AGA AAG TGG TGG AGC ATT CCT - 3'	-806 G>A	R
	TLR5 SNP 5P	5' - (T ₉) TGC CCT GCC TTC TCT TTT CTT TTT - 3'	-673 A>G	R
	TLR5 SNP 6P	5' - (T ₁) AGG TTT GGC GTG GGG GAA GG - 3'	-495 C>A	F
M3	TLR5 SNP 3P	5' - CCA AAG GGT TAA AGA GAG GTG - 3'	-779 T>G	R
	TLR5 SNP 4P	5' - (T ₈) CAA TGG AGG AGG TGG GGG G - 3'	-674 G>A	F
	TLR5 SNP 7P	5' - (T ₁₄) GGA ACT CGG CCC CTG CTC T - 3'	-431 G>C	R
	TLR5 INS 1	5' - (T ₃₆) CAT CCT CGA ACC ACG CTA GCT - 3'	-581 C>T	F
	TLR5 INS 2	5' - (T ₂₄) AAG AAA GGG TTAC CTG GGC TG - 3'	-87 T>C	F
M4	TLR2 SNP 2P	5' - (T ⁹) GAT TGG TGA GTT ATT TTA ATA CAG GAG AAC - 3'	-133 A>G	F
	TLR2 SNP 3P	5' - (T ²¹) TGG TGA GTT ATT TTA ATA CAG GAG AAC ATA - 3'	-130 G>A	F
	TLR2 SNP 4P	5' - CGC TGT TCA GGG ATC AAT TGT - 3'	-103 G>A	R
	TLR2 SNP 1P	5' - (T ¹²) AGA CGG CTG GCG AAG AAT GGT - 3'	-784 C>T	F
	TLR2 SNP 5P	5' - (T ²⁵) ATC CCT GAA CAG CGT GGA AAA - 3'	-74 A>G	F
M5	NOD1 SNP 1P	5' - (T ²⁰) AAT ATG GGA GTA AGA GAA TCC TAG AA - 3'	-920 G>A	F
	NOD1 SNP 2P	5' - (T ¹⁰) CTC ATC CTA TCC CAT CAA TTT TAC - 3'	-796 G>A	F
	NOD2 SNP 1P	5' - (T ⁷) TGG GAG GAC AGA GGG CCA AGC - 3'	-1876 C>T	F
	NOD2 SNP 2P	5' - (T ¹⁹) ATC TAT ACC GAG AGA AGC CAC - 3'	-1698 G>A	R
	NOD2 SNP 3P	5' - CTC GGT GGC TTC TCT CGG TAT A - 3'	-1679 G>A	F
M6	NOD1-SNP 3P	5' - (T ⁶) GGA CAA GGA GAA AAG CTT AGA - 3'	-495 C>T	F
	NOD1-SNP 4P	5' - TAT GCT CTG CTA TAA AGG TTT - 3'	-450 G>A	F
	NOD1-SNP 5P	5' - (T ¹⁹) ACC AAC CCA CCA TCC GCA AC - 3'	-366 G>A	R
	NOD1-SNP 6P	5' - (T ²⁵) GTC TCG GCC TCC ACG CAG CA - 3'	-73 C>A	F

Rx: Reacción múltiple; V.N: Variación nucleotídica; O: Orientación del cebador dentro de la secuencia.

Posteriormente, se diseñaron nuevos cebadores específicos ubicados en las regiones flanqueantes de cada uno de los polimorfismos de interés, utilizando el

programa *Oligo 7* (Tablas 4 y 5). Para el diseño final de los cebadores se tomó en cuenta la adición de una cola de poli T de diferentes longitudes en el extremo 5', para diferenciarlos electroforéticamente mediante reacciones múltiples.

Tabla 5. Cebadores diseñados para el genotipado en secuencias codificantes.

Rx	Locus	Secuencia	V.N.	Aa.	O.
M1	N2E3F1SNP1	5' - GTC CGG ACA GAG GGG GGC ATG - 3'	+1452 A>G	T239A	F
	N2E3F1-SNP1	5' - (T ₉) CCG CCC AGC ATC TGG GAC CTG - 3'	+2269 A>G	D511G	F
	N2E3F2-SNP2	5' - (T ₁₈) CCA CCC TGC TGC ATC TCG GTC - 3'	+2311 A>G	H525R	F
M2	T2F1-SNP1	5' - TTT CCC CGA GTG TTT TGT AAG - 3'	+561 C>G	P136A	R
	T2F2-SNP1	5' - (T ₉) AGT ATA TAT TCA CTC ACA GGA - 3'	+1167 G>A	A338T	F
	T2F3-SNP1	5' - (T ₁₈) TCC TTT CTA CCC ATG TTG TCA - 3'	+1665 G>C	V504L	F
M3	T5F2-SNP2	5' - AAG AAG AGA GTA GGT ATG CTC - 3'	+1272 C>T	P402L	R
	T5F2-SNP1	5' - (T ₉) TAA CAT CAA AGA TCC TGA CCA - 3'	+901 T>G	H278Q	F
	T5F3-SNP1	5' - (T ₁₈) TTG GGC GGC AAT AAA CTG GTG - 3'	+1313 A>T	T416S	F
M4	N1EF1-SNP1	5' - GCA GTG AGA TGG AAG TAG CCC - 3'	+372 C>T	P13L	F
	T4F1-SNP1	5' - (T ₆) GCA AGT GTT CAT GAT AAA TAT - 3'	+565 A>C	N189H	R

Rx: Reacción múltiple; V.N: Variación nucleotídica; Aa: Cambio de aminoácido; O: Orientación del cebador.

La mezcla de reacción consistió en 2 µl de producto de PCR purificado, 1 µl de *Big Dye Terminator 5X Sequencing Buffer* (Applied Biosystems), 0,6 µl del reactivo *SNaPshot Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems), mezcla de cebadores a 1 µM y agua *milli-Q* hasta un volumen final de 10 µl. Las condiciones de extensión fueron las siguientes: 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos. Una vez finalizado el proceso de extensión se purificó el producto obtenido con el fin de eliminar todos aquellos ddNTPs no incorporados, la purificación consistió en la incubación con 1U de *SAP* a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación a 80°C durante 20 minutos para inactivar la enzima.

Finalmente, se preparó la mezcla de carga añadiendo el marcador de peso molecular *GeneScan 120 LIZ* (Applied Biosystems) a cada una de las muestras. La mezcla fue procesada en un secuenciador *ABIPrism 377* (Applied Biosystems), el

análisis de fragmentos se realizó con el *software* GeneScan Analysis 2.0.2 (Applied Biosystems) y la tipificación alélica mediante el *software* Genotyper 3.7 (Applied Biosystems).

10 CLONACIÓN GÉNICA.

10.1 Diseño de construcciones de ADN recombinante.

Para llevar a cabo el estudio funcional del polimorfismo, se diseñaron construcciones de ADN recombinante utilizando los vectores pGL4.17 (Promega) y pcDNA3.1+ (Invitrogen). Las variaciones genéticas analizadas funcionalmente fueron seleccionadas en base a su localización, afectando posibles sitios de regulación transcripcional, en el caso de las secuencias promotoras, o bien afectando regiones implicadas en la funcionalidad de las proteínas receptoras, en el caso de las secuencias codificantes.

Como primer paso para la elaboración de las construcciones de ADN, todos aquellos fragmentos a analizar fueron amplificados y clonados en el vector pGEMT (Promega) para facilitar la obtención de cantidades suficientes de ADN, necesarias para los procedimientos posteriores.

En el caso del análisis funcional del polimorfismo a nivel de regiones promotoras, los fragmentos de ADN empleados en la generación de construcciones de ADN recombinante, se obtuvieron a partir de parejas de cebadores específicos diseñados para facilitar la inserción del fragmento en el vector pGL4.17, contando con un sitio de corte para un enzima de restricción en su extremo 5', precedido de una secuencia de tres bases (CCA) para estabilizar la zona de corte (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores usados para el diseño de construcciones en el vector pGL4.17.

Construcción	Secuencia	Sentido
TLR2-pGL4	5' - CCA <u>GAT ATC</u> (EcoRV) CTC GGT CTG GGA AGG TCA GAT GT - 3'	Forward
	5' - CCA <u>AAG CTT</u> (HindIII) CTC CAT CCT TGG AAG CCG CAA C - 3'	Reverse
TLR4-pGL4	5' - CCA <u>CTC GAG</u> (XhoI) CAA GCC AAG GAG AGA AGC AG - 3'	Forward
	5' - CCA <u>CTC GAG</u> (XhoI) CCT GGC ATT TTC CGT GAA CAG A - 3'	Reverse
TLR5-pGL4-P1	5' - CCA <u>GAT ATC</u> (EcoRV) GTT TCA CCC CAG AGC GCC AAT CCA - 3'	Forward
	5' - CCA <u>AAG CTT</u> (HindIII) CAG CAC CTA GTG TCA AAG TCC CA - 3'	Reverse
TLR5-pGL4-P2	5' - CCA <u>GAT ATC</u> (EcoRV) GAG GTT TGG CGT GGG GGA AGG - 3'	Forward
	5' - CCA <u>AAG CTT</u> (HindIII) TCC TCC CCG CCA CCG AAG TAG - 3'	Reverse
NOD1-pGL4	5' - CCA <u>CTC GAG</u> (XhoI) GAT GAT TGG AAC CGC AGA ACT - 3'	Forward
	5' - CCA <u>CTC GAG</u> (XhoI) CTG GGC ACG CTG GAG AAA CTC - 3'	Reverse
NOD2-pGL4	5' - CCA <u>GAT ATC</u> (EcoRV) CAC TGA GCC ACG ACA GGA ACT C - 3'	Forward
	5' - CCA <u>AAG CTT</u> (HindIII) CAC AGA CTC CAC CTC TCT CCT G - 3'	Reverse

Las bases subrayadas representan los sitios de corte para enzimas de restricción (escritas entre paréntesis).

Con respecto al estudio funcional del polimorfismo en las secuencias codificantes. El diseño de las construcciones recombinantes se realizó mediante la inserción del marco abierto de lectura de los genes *TLR2*, *TLR4* y *TLR5* en el vector de expresión pcDNA3.1+.

La amplificación de las secuencias codificantes se llevó a cabo mediante cebadores hibridados en las zonas adyacentes a los codones de inicio y fin de mensaje, a partir de muestras de ADNc obtenido a partir de ARN de macrófagos alveolares. Como norma general, los cebadores fueron diseñados con el sitio de corte HindIII en el extremo 5' del *forward* y el sitio de corte BamHI en el extremo 5' del *reverse*, con el objetivo de direccionar la inserción del gen dentro del vector. De igual forma, el cebador *forward* incluyó la secuencia *kozak* para facilitar el reconocimiento del codón de inicio de la traducción en cada gen (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores empleados para el diseño de construcciones en el vector pcDNA3.1+.

Construcción	Secuencia (BamHI - HindIII)	Producto	Sentido
T2COD-	5' - CCA <u>AAG CTT</u> ACC ATG GCA TGT GCT TTG TGG A - 3'	2361pb	Fw
pCDNA3.1+	5' - CCA <u>GGA TCC</u> CTA GGA CTT GAT CGC AGC TCT - 3'		Rw
T4COD-	5' - CCA <u>AAG CTT</u> ACC ATG GTT CCT CGC ATC CGC CTG GCT GTG - 3'	2582pb	Fw
pCDNA3.1+	5' - CCA <u>GGA TCC</u> AGC TGA CCA AGG GAC ACG TTG GGA GTT TTC - 3'		Rw
T5COD-	5' - CCA <u>AAG CTT</u> ATC ATG GGA GAC TGC CTG GTC - 3'	2574pb	Fw
pCDNA3.1+	5' - CCA <u>GGA TCC</u> CTA GGA GAT GGT CAC GCT TTG - 3'		Rw
MD-2COD-	5' - CCA <u>AAG CTT</u> GAA CCA TGG TTC CAT TTA TGC TGT - 3'	497pb	Fw
pCDNA3.1+	5' - CCA <u>GGA TCC</u> TGA TTT ATT CTA ATT TAA ACT GGA GTA ATG - 3'		Rw

Las bases marcadas en negritas representan el codón de inicio de la traducción integrado a la secuencia *kozak*. Los sitios de corte para las enzimas de restricción se muestran mediante las bases subrayadas.

Debido a que TLR4 requiere de la formación de un complejo receptor con la molécula MD-2 para poder reconocer al lipopolisacrido, se elaboró también una construcción recombinante de MD-2 en el vector pcDNA3.1+. Los cebadores diseñados para este fin se incluyen en la Tabla 8. La secuencia codificante del gen MD-2 se obtuvo a partir de ADNc de células del bazo.

10.2 Endonucleasas de restricción.

El uso de endonucleasas de restricción para reacciones de digestión se realizó con dos finalidades, en primer lugar, para comprobar la correcta inserción de los fragmentos de ADN en los vectores de clonación y expresión utilizados en el presente trabajo (Tabla 8) y en segundo lugar, para extraer los insertos de ADN a partir del vector de clonación que posteriormente fueron reinsertados en un vector de expresión. Las endonucleasas utilizadas en el presente trabajo incluyeron las siguientes: EcoRI (digestiones en pGEM-T), XhoI, EcoRV, HindIII (digestiones en pGL4.17), BamHI y HindIII (digestiones en pcDNA3.1+). La reacción de digestión para comprobar la inserción de los fragmentos en los vectores pGEMT, pGL4.17 y pcDNA3.1+, consistió en la incubación de 500 ng del producto clonado en un

volumen de reacción de 10 µl a una temperatura de 37°C durante 1 hora, empleando 0,5U de enzima de restricción. En lo referente a las reacciones de digestión realizadas para la extracción y re inserción de los fragmentos de ADN en los vectores de expresión pGL4.17 y pcDNA3.1+, la reacción se llevó a cabo en volúmenes mayores, partiendo de una concentración de 5 µg del producto a digerir, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (37°C/1 hora).

Tabla 8. Vectores utilizados en los ensayos funcionales del polimorfismo.

Vector	Ensayo	Características
pGEM-T	-	Vector del tipo <i>TA-cloning</i> para la clonación de productos de PCR.
pGL4.17 (<i>luc2/Neo</i>)	Promotor	Vector de expresión que carece de región promotora pero contiene el gen reportero de luciferasa
pGL4.74 (<i>hRluc/TK</i>)	Promotor Codificante	Vector empleado como control de normalización de la expresión del gen reportero (<i>luc2/Neo</i>) y de la eficiencia de la co-transfección. Este vector posee un promotor constitutivo (<i>TK</i>) que da lugar a una expresión constante de la luciferasa de <i>Renilla</i> .
pcDNA3.1+	Codificante	Vector de expresión empleado en el análisis funcional del polimorfismo en secuencias codificantes. El vector pcDNA3.1+ carece de secuencia codificante, conteniendo únicamente la secuencia promotora del citomegalovirus humano, que permite un elevado nivel de expresión estable y transitoria en un amplio rango de células de mamíferos.
pGL4.17- ELAM/NFκB dependiente (<i>luc2/Neo</i>)	Codificante	Vector modificado para los estudios funcionales a nivel de secuencias codificantes de los genes <i>TLR</i> . Esta construcción cuenta con una secuencia de cinco sitios de unión al factor NFκB (GGGACTTTCC x 5) seguida de un fragmento del promotor de la molécula de adhesión a leucocitos de células endoteliales 1 (ELAM-1) más el gen reportero luciferasa, que permite obtener una medida de actividad génica por luminiscencia

10.3 Ligación.

Los fragmentos de ADN clonados en el vector pGEMT y extraídos mediante digestión con enzimas de restricción, fueron sub-clonados en los vectores de expresión mediante ligación con T4 DNA ligasa (Roche). La reacción de ligación se realizó en un baño María a 4°C durante toda la noche.

Las proporciones vector/inserto fueron calculadas mediante la ecuación:

$$\text{ng inserto} = \frac{(\text{ng vector}) (\text{Kb inserto})}{\text{Kb vector}} \times \text{Ratio} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$$

Cuando se empleó el sistema *pGEM-T Vector System* (Promega), se utilizaron 50ng del vector y una relación inserto/vector de 1/1 ó 3/1. Para los sistemas *pGL4 Luciferase Reporter Vectors* y *pcDNA3.1+*, se emplearon 50 ng de vector con un ratio inserto/vector de 10/1.

10.4 Desfosforilación.

La desfosforilación, necesaria para la eliminación de grupos fosfato del extremo 5' en vectores linearizados con enzimas de restricción, se llevó a cabo mediante la incubación de la reacción de digestión con 1U de *SAP* durante 30 minutos a 37°C. Tras la reacción de desfosforilación, la enzima se inactivó mediante incubación durante 15 minutos a 70°C.

10.5 Obtención de células competentes.

Las células competentes requeridas para los procedimientos de clonación se obtuvieron a partir de *stocks* de bacterias de la estirpe de *E. coli XL1 Blue MRF'* almacenadas a -80°C en glicerol. Las bacterias fueron sembradas en placas de medio PSI-a y se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente se aisló una colonia y se inoculó en 5 ml de medio PSI-b en un matraz de Erlenmeyer estéril de 125 ml, cultivándose durante una noche a 37°C en agitación. A la mañana siguiente las bacterias resultantes fueron subcultivadas en 100 ml de medio PSI-b a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO₅₅₀) de 0,48±0,02. Una vez alcanzada la DO₅₅₀, se colocó el matraz en hielo durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó el cultivo bacteriano a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 40 ml de medio Tfb-1 frío y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó nuevamente a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C,

resuspendiendo el *pellet* resultante en 4 ml de medio TFB-2 frío, incubándose posteriormente en hielo por 15 minutos. Finalmente, las bacterias competentes se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

10.6 Transformación bacteriana.

Una vez descongeladas en hielo, las células competentes fueron tratadas con una solución de β -mercaptoetanol al 1,8 % a una proporción de 1/10 y se dejaron reposar durante 10 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se tomaron 50 μl de células competentes y 2-5 μl de la mezcla de ligación (~ 25 ng de ADN), incubándose durante 30 minutos en hielo. La transformación tuvo lugar mediante choque térmico a 37°C durante 3 minutos y enfriando rápidamente en hielo. Inmediatamente, se añadieron 500 μl de medio LB y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. A continuación, el cultivo transformado se dispuso en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado y se dejaron crecer durante una noche a 37°C .

Para las células XL1Blue MRF⁻ se añadieron 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina (Roche), IPTG (0.25 M, Sigma) y X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma). Se seleccionaron las colonias que contenían el plásmido con el inserto (blancas) y se sembraron en cultivos líquidos de 2,5 ml de LB con ampicilina. Estos cultivos se mantuvieron una noche a 37°C en agitación para la posterior extracción del ADN plasmídico.

10.7 Determinación de la orientación de los insertos.

Para confirmar la orientación del fragmento insertado en los vectores pGL4.17 y pcDNA3.1+, se realizó una reacción de PCR sobre las bacterias transformantes. Para ello, con ayuda de un asa de siembra, se dispuso una porción de la colonia en 10 μl de agua *milli-Q* estéril, se incubó durante 10 minutos a

100°C y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. La reacción de PCR se realizó empleando parejas de cebadores constituidas por un cebador (*forward*) universal del vector y un cebador específico del gen (*reverse*). El producto obtenido de la reacción de PCR se visualizó en un gel de agarosa.

10.8 Secuenciación.

Las muestras destinadas para secuenciación se enviaron al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Las muestras fueron secuenciadas por el método Sanger en un secuenciador capilar *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Para verificar la calidad de los electroferogramas obtenidos se utilizó el programa *Chromas Lite 2.01* (www.technelysium.com.au).

11 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Las variantes alélicas de cada uno de los polimorfismos seleccionados para su estudio funcional, fueron generadas utilizando el sistema *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Este sistema permite la obtención de construcciones recombinantes mutantes a partir de cualquier plásmido de doble cadena, mediante la inserción dirigida de puntos específicos de mutación a través de cebadores especialmente diseñados para este fin (Figura 4). Dichos cebadores se crean con la base mutante deseada dentro de su secuencia y mediante amplificación por PCR se logra la inserción del punto de variación en el plásmido molde.

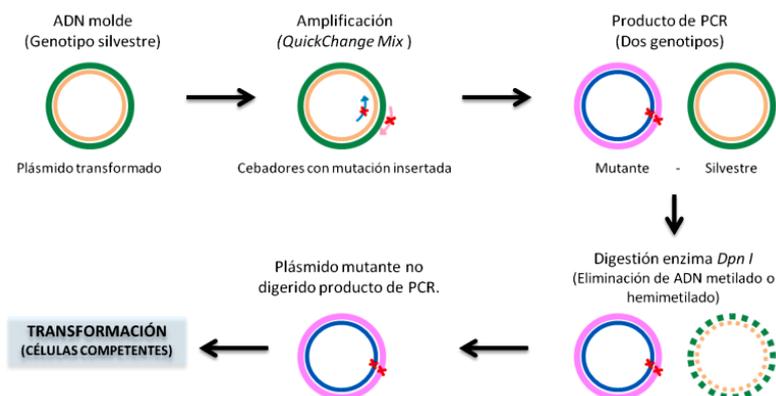


Figura 4. Obtención de variantes alélicas mediante la técnica de mutagénesis dirigida. Las variantes mutantes se obtienen a partir de una construcción previamente diseñada sobre un vector de expresión, conteniendo la variante alélica mayoritaria para cada polimorfismo.

La eliminación del ADN molde se consigue mediante digestión con la enzima de restricción DpnI (Stratagene), gracias a que dicha enzima actúa únicamente sobre el ADN metilado o hemimetilado. El plásmido molde aislado a partir de una cepa *E.coli* (*dam*⁺) es susceptible a la acción de la enzima DpnI y puede ser eliminado dejando únicamente el producto mutado, el cual puede ser transformado nuevamente para su amplificación.

Para el diseño de los cebadores utilizados en la creación de las variantes alélicas específicas de cada polimorfismo, se empleó el *software* *QuikChange Primer Design* (<http://labtools.stratagene.com/QC>), tomando en cuenta los requerimientos básicos establecidos por el fabricante ($T_m \geq 75^\circ\text{C}$, longitud 25 - 45 nucleótidos, GC 40%). La lista de cebadores utilizados se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Cebadores diseñados para generar las variantes alélicas mediante mutagénesis dirigida.

Región	Gen	Cebador	Secuencia	Variación	
				Nt	Aa
TLR2	TLR2	T2-Mur-Pro Sen	5' - GTG GAG GTG GAC CCC AGA <u>AA</u> C AAT TGA TCC CT - 3'		
		T2-Mur-Pro Ant	5' - AGG GAT CAA TTG <u>TT</u> T CTG GGG TCC ACC TCC AC - 3'	-103 G>A	
TLR4	TLR4	T4-Mur-Pro Sen	5' - CCT TGA CTA CAG ACT T <u>CT</u> AGC CTC TGG AAC TTT GT - 3'		
		T4-Mur-Pro Ant	5' - ACA AAG TTC CAG AGG C <u>TA</u> GAA GTC TGT AGT CAA GG - 3'	-400 C>T	
Promotor	TLR5	T5-Mur-Pro Sen	5' - CGC TGC TGC GGG AGT C <u>AG</u> AGA GCA GGG - 3'		
		T5-Mur-Pro Ant	5' - CCC TGC T <u>CT</u> <u>CT</u> G ACT CCC GCA GCA GCG - 3'	-495 A>G	
NOD1	NOD1	N1-Mur-Pro Sen	5' - AAA ATA TGG GAG TAA GAG AAT CCT AGA <u>AAA</u> AAA GAA AAA ATT CAT AAT TTT TCT ACC A - 3'		
		N1-Mur-Pro Ant	5' - TGG TAG AAAAAT TAT GAA TTT TTT CTT T <u>TT</u> TTC TAG GAT TCT CTT ACT CCC ATA TTT T - 3'	-920 G>A	
NOD2	NOD2	N2-Mur-Pro Sen	5' - TGG CTT CTC TCG GTA <u>TAA</u> ATA ATG GAG GCA GAA GG - 3'		
		N2-Mur-Pro Ant	5' - CCT TCT GCC TCC ATT A <u>TT</u> TAT ACC GAG AGA AGC CA - 3'	-1679 G>A	
TLR2	TLR2	T2CodMur Sen	5' - CTT AAA CTT ACT GGG AAA <u>TG</u> C TTA CAA AAC ACT CGG GG - 3'		
		T2CodMur Ant	5' - CCC CGA GTG TTT TGT AAG <u>CA</u> T TTC CCA GTA AGT TTA AG - 3'	+561 C>G	P136A
TLR4	TLR4	T4CodMur Sen	5' - GAT CTT TCT AAG AAC AAA ATC GAA <u>CA</u> T ATT TAT CAT GAA CAC TTG CAG G - 3'		
		T4CodMur Ant	5' - CCT GCA AGT GTT CAT GAT AAA TAT <u>GT</u> T CGA TTT TGT TCT TAG AAA GAT C - 3'	+565 A>C	N189H
TLR5	TLR5	T5CodMur Sen	5' - TCT TAA AAC AAT TCA GTT TAT T <u>CT</u> GAG CAT ACC TAC TCT CTT GG - 3'		
		T5CodMur Ant	5' - CCA AGA AGA GAG TAG GTA TGC T <u>CA</u> GAA TAA ACT GAA TTG TTT TAA GA - 3'	+1272 C>T	P402L

Nt= nucleótido; Aa= aminoácido. "Sen" y "Ant" representan la orientación de los cebadores en la hebra molde (Sentido y Antisentido). Las bases mutadas se muestran en negritas y subrayadas.

12 CO-TRANSFECCIÓN CELULAR.

Las líneas celulares CHO y HEK293T fueron co-transfectadas mediante el sistema de lipofección, esto es, la incorporación de liposomas a la membrana celular generados mediante el reactivo *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Como norma general, las células CHO y HEK293T fueron cultivadas hasta el pase 3 en placas de 24 pocillos (200 000 cel/pocillo), hasta observar una confluencia del 85% en el caso de las células CHO y del 60% para las células HEK293T.

En el momento de la co-transfección, el medio de cultivo fue sustituido por *Opti-MEM I* sin suero (Gibco-Invitrogen) con la finalidad de aumentar la eficiencia de la co-transfección. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó una mezcla de ADN (construcciones recombinantes) con lipofectamina (2 μ l) en medio *Opti-MEM I* en un volumen final de 100 μ l por pocillo. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos lípido-ADN. Las concentraciones de ADN y plásmidos utilizados dependieron del tipo de ensayo a realizar, empleando en ambos casos dos vectores reporteros optimizados para la expresión del gen reportero de luciferasa, ya sea *luc2* (*Photinus pyralis*) o *hRluc* (*Renilla reniformis*) en células de mamífero.

Regiones promotoras: La mezcla de ADN control consistió en 600 ng (ratio 1:1) de los vectores pGL4.74 y pGL4.17. En el caso de las variaciones alélicas a evaluar, la mezcla de ADN consistió en 600 ng del vector pGL4.74 y 600 ng del vector pGL4.17 conteniendo cada una de las variantes alélicas de la región promotora a analizar.

Secuencias codificantes: En este caso, la mezcla de ADN control consistió en 60 ng del vector pGL4.74, 600 ng del vector pGL4.17-ELAM, y 600 ng del vector de expresión pcDNA3.1+ (ratio 1:10:10). En el caso de los polimorfismos a evaluar, la mezcla de ADN consistió en 60 ng del vector pGL4.74 y 600 ng del

vector pGL4.17-ELAM y 600 ng de la construcción pcDNA3.1+/TLR conteniendo cada una de las variantes alélicas.

Una vez formados los complejos lípido-ADN, se añadieron 100 μ l de reacción a las células, dispuestas en la placa de 24 pocillos y se incubaron durante 6 horas a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂. Una vez transcurridas las 6 horas, se retiró el medio transfectante y se sustituyó por medio de cultivo RPMI 1640 ó DMEM, según fuera el caso, dejándose incubar por 18 horas más a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂. En el caso de los ensayos funcionales del polimorfismo en secuencias codificantes, las células transfectadas fueron estimuladas empleando la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada y ligandos específicos para cada uno de los TLR. Cada co-transfección fue realizada por cuadruplicado dentro del mismo ensayo y cada ensayo individual fue realizado por triplicado y en 3 días diferentes para confirmar su reproducibilidad.

Debido a la variabilidad inherente a la técnica, el vector pGL4.74 fue empleado como control interno de transfección y de esta manera los datos obtenidos en los diferentes ensayos pudieron ser comparados entre sí. La expresión normalizada se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Expresión normalizada} = \frac{\text{RLU } luc2}{\text{RLU } hRluc}$$

13 ESTIMULACIÓN CELULAR.

13.1 Estimulación con LPS, PAM3CSK4 y Flagelina.

Estimulación con lipopolisacárido (LPS): Las células HEK293T transfectadas con las construcciones TLR4-pcDNA3.1+ conteniendo cada una de las variantes alélicas, fueron estimuladas con LPS procedente de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (Alexis Biochemicals). Para ello, fueron

incubadas durante 24 horas en presencia de 100 ng/ml de LPS a una temperatura de 37°C.

Estimulación con Pam3CSK4: El lipopéptido sintético *Pam3CSK4* (InvivoGen) contiene un grupo cisteína tri-acilo que simula las propiedades pro-inflamatorias de las lipoproteínas de bacterias Gram+. Las células HEK293T transfectadas con la construcción *TLR2*-pcDNA3.1+ y su variante alélica, fueron estimuladas con 300 ng/ml de *Pam3CSK4* durante 24 horas a 37°C.

Estimulación con Flagelina: En el caso de las células HEK293T transfectadas con la construcción *TLR5*-pcDNA3.1+ y su variante alélica, estas fueron estimuladas con el ligando flagelina (*FLA-ST*) de *S. typhimurium* (InvivoGen) a una concentración de 200 ng/ml, incubándose a 37°C durante 24 horas.

13.2 Estimulación con *Salmonella typhimurium* inactivada.

La cepa bacteriana de *Salmonella typhimurium* DT 104 se utilizó para la estimulación de las células HEK293T transfectadas con las construcciones de ADN recombinantes conteniendo las secuencias codificantes de los genes *TLR* y sus variantes alélicas. Para esto, la bacteria almacenada a -80°C en medio de congelación (glicerol 40%) fue descongelada y estriada en una placa de medio TSA, dejándose en incubación durante una noche a 37°C. Al día siguiente, se aisló una colonia y se incubó durante una noche en 10 ml de medio LB a 37°C en un incubador *Orbital Incubator SI500* (Stuart). A la mañana siguiente, se hizo una dilución 1:50 del cultivo bacteriano obtenido en medio LB y se monitoreó su crecimiento con ayuda de un espectrofotómetro *SmartSpec 3000* (Bio-Rad) hasta lograr una densidad óptica (DO_{600}) igual a 0.8-1, equivalente a una concentración bacteriana de 10^8 UFC/ml. Una vez alcanzada la DO_{600} deseada, se tomaron 20 ml del cultivo y se centrifugaron a 12000 x g por 10 minutos, utilizando para esto una

centrífuga J2-21 *Centrifuge* (Beckman Coulter). El *pellet* obtenido se resuspendió en 20 ml de PBS (10^8 UFC/ml), manteniéndolo en hielo hasta su inactivación.

Inactivación bacteriana: Al *pellet* lavado y resuspendió en PBS (10^8 UFC/ml), se le añadió formaldehído a una concentración del 1% del volumen final y se dejó en incubación durante 2 horas a 37°C. Una vez terminado el proceso de incubación se realizaron lavados con PBS y se hicieron alícuotas de 1 ml, almacenadas a 4°C. Finalmente se estrió una alícuota en una placa de cultivo TSA que se mantuvo a 37°C durante una noche para verificar la inactivación bacteriana.

El procedimiento de estimulación fue llevado a cabo de la siguiente manera: En primer lugar se realizó el conteo celular de los pocillos a infectar, para esto, se contaron las células de una columna de la placa de 24 pocillos, utilizando una cámara de Neubauer y se estimó el promedio de células por pocillo. Una vez conocida la cantidad de células a infectar, se determinó la cantidad necesaria de *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada resuspendida en PBS, teniendo como base un MOI (*Multiplicity of infection*) 1:10. Las alícuotas necesarias para el ensayo se centrifugaron por 2 minutos a 12 000 rpm, resuspendiendo el *pellet* resultante en medio *Opti-MEM I*. Finalmente, se inoculó la suspensión bacteriana a cada pocillo y se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Pasado el periodo de incubación se continuó con el ensayo luciferasa.

14 ENSAYO LUCIFERASA.

Las células fueron despegadas y contadas con ayuda de una cámara de Neubauer utilizando una solución de eosina 1:10 (0.25% de eosina, 0,02 NaN₃ en tampón fosfato salino PBS) como colorante vital. Se colocaron un total de 50 000 cel/pocillo sobre una placa de lectura para luminiscencia. El ensayo luciferasa consistió en la adición de 75 µl del reactivo *Dual-Glo Luciferase reagent* (Promega) a cada uno de los pocillos, incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Este reactivo induce la lisis celular y actúa como sustrato de la luciferasa de *P. pyralis*. A continuación se midió la señal luminiscente emitida por el gen reportero *luc2* del vector pGL4.17. Para medir la señal luminiscente del gen *hRluc* contenido en el vector reportero pGL4.74 se añadieron 75 µl de *Dual-Glo Stop & Glo reagent* (Promega), incubándose 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se midió la señal luminosa emitida (Figura 5). El reactivo *Dual-Glo™ Stop & Glo reagent* inhibe la luminiscencia de la luciferasa de *P. pyralis* y sirve a su vez como sustrato para la luciferasa de *R. reniformis*.

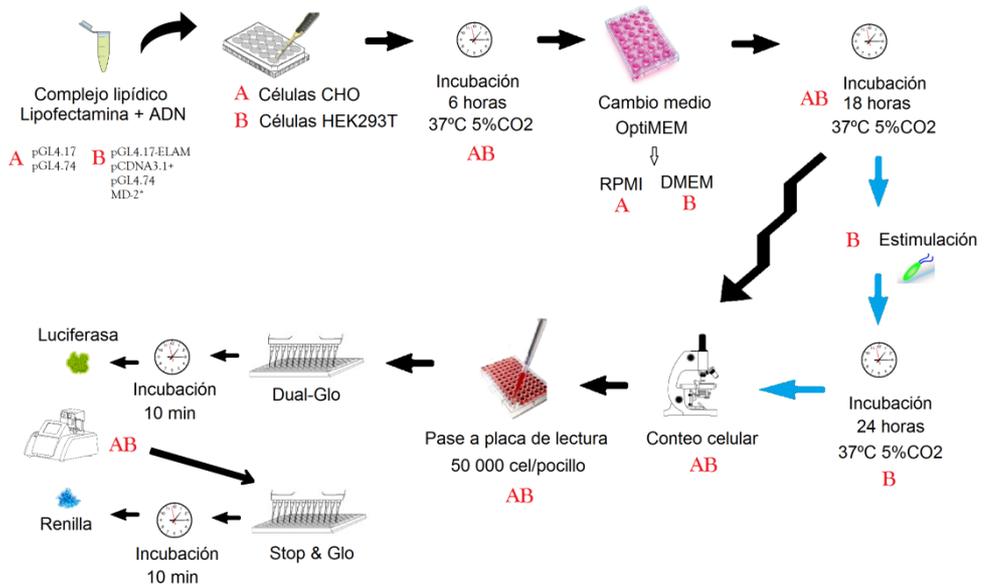


Figura 5. Ensayo luciferasa. En la figura se muestra la metodología seguida para llevar a cabo los ensayos funcionales con el gen reportero luciferasa, tanto para el análisis de los polimorfismos en las regiones promotoras (A), como para el análisis funcional de los polimorfismos no sinónimos en las secuencias codificantes (B). Los pasos comunes del ensayo se indican con las letras AB.

14.1 Medida de luminiscencia.

La medida de la luminiscencia realizó en un *SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader* (Bio-Tek) con la sensibilidad ajustada de forma experimental a 130 (medida en moles de ATP, destellos). Con las medidas de luminiscencia obtenidas (en unidades relativas de luz, RLU) se calculó el ratio de luminiscencia para cada construcción.

15 PCR DE COMPROBACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN.

Con el fin de comprobar la correcta transfección de las células HEK293T y verificar la presencia del ARNm de los genes *TLR* en dichas células, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR convencional de un fragmento de la secuencia codificante transfectada. Para esto, una vez terminado el ensayo luciferasa se extrajo ARN total a partir de las células transfectadas. Se llevó a cabo la retrotranscripción del material y se amplificó un fragmento del gen en cuestión. Los cebadores utilizados para este fin fueron diseñados para amplificar una secuencia altamente específica de aproximadamente 100 pb, ubicada entre dos exones de las secuencias codificantes de los genes *TLR* porcinos (Tabla 10).

Tabla 10. Cebadores diseñados para comprobar la transfección en células HEK293T.

Gen	Acceso GenBank	Sentido	Secuencia	Producto
<i>TLR2</i>	AB085935	FW	5' - TCA CTT GTC TAA CTT ATC ATC CTC TTG - 3'	162pb
		RW	5' - TCA GCG AAG GTG TCA TTA TTG C - 3'	
<i>TLR4</i>	AB188301	FW	5' - GCC ATC GCT GCT AAC ATC ATC - 3'	108pb
		RW	5' - CTC ATA CTC AAA GAT ACA CCA TCG G - 3'	
<i>TLR5</i>	NM_001123202	FW	5' - CAG CGA CCA AAA CAG ATT GA - 3'	122pb
		RW	5' - TGC TCA CCA GAC AGA CAA CC - 3'	

16 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Con los datos obtenidos en el genotipado de las poblaciones porcinas se calcularon los principales parámetros estadísticos de variabilidad genética. Las frecuencias alélicas, así como los valores de heterocigosidad esperada y observada para cada uno de los polimorfismos identificados, fueron calculados utilizando los programas Popgene v 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) y MSTools para Excel (Genetics Dept, TCD, Ireland). El cálculo del estadístico F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984), la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg y el análisis de varianza molecular (AMOVA), fueron realizados con los programas Arlequin v 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) y GenAlex (Peakall y Smouse, 2012). La determinación de las combinaciones alélicas (haplotipos), así como el cálculo de las frecuencias y bloques de haplotipos (Gabriel *et al.*, 2002) se llevo a cabo con programa Haploview (Barrett *et al.*, 2005).

Por otra parte, en el ensayo funcional de los polimorfismos, tanto en las regiones promotoras como codificantes de los genes *PRR* estudiados, se realizó el cálculo de la media y error estándar de los ratios de actividad luciferasa observados para cada variante alélica con ayuda del programa GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Se realizó la prueba de T de Student-Welch para determinar diferencias estadísticas significativas entre las variantes alélicas y una prueba ANOVA de una vía para comparar las variantes con el grupo control. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

1 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN EL GEN *TLR2* PORCINO

1.1 Caracterización del promotor *TLR2* porcino y búsqueda de variaciones genéticas.

El análisis de alineamiento mediante la herramienta *BLAST* de las secuencias de ARNm reportadas en la base de datos del NCBI con la información contenida en la base de datos *Ensembl*, permitió definir la localización genómica del gen *TLR2* porcino, hallándose en el cromosoma 8, entre las coordenadas 79824541 – 79834592, en sentido inverso (*reverse strand*). En la Figura 1 se esquematiza la estructura del gen *TLR2* porcino, así como su localización genómica. Las 957 pb de la región 5' flanqueante del primer exón, analizadas en el presente trabajo, se ubicaron entre las coordenadas cromosómicas 79834593 – 79835550, a una distancia de 7,5 Kb del codón de inicio de la traducción (ATG).

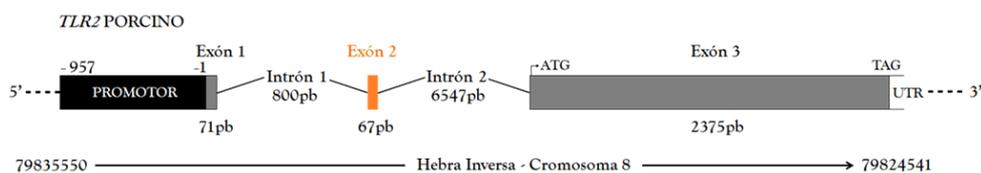


Figura 1. Estructura del gen *TLR2* porcino (referencia *Ensembl*: ENSSSCG00000009002). La zona de color negro representa la región 5' analizada. Los exones se muestran en color gris. El exón 2 presente únicamente en una variante transcripcional se señala en color naranja.

El análisis bio-informático del fragmento de 957 pb de la región 5' flanqueante del primer exón permitió identificar los elementos reguladores presentes en la zona y confirmar su función como promotor del gen *TLR2* porcino. Dentro de los principales elementos *cis*-reguladores identificados, se observaron seis motivos *GC-Box*, así como un motivo *CAAT-Box* (-517/-522). Por otro lado, en el caso de la secuencia *TATA-Box*, a pesar de sugerirse cuatro posibles sitios para su localización, todos ellos se encontraron a más de 500 pb del inicio del primer exón

(-825/-816,-745/-736,-702/-693,-556/-547), por lo que no pudieron considerarse sitios TATA-Box funcionales.

No se detectó ninguna isla de regulación CpG, usualmente presente en los promotores carentes de TATA-Box, lo cual se correspondió con el bajo contenido de GC (46%) observado en la secuencia analizada. Sin embargo, también se observó que el porcentaje de GC mostró un incremento importante en la región comprendida entre las -1 a -100 pb cercanas al primer exón (GC= 68%).

El alineamiento de la región promotora del gen *TLR2* porcino con sus secuencias homólogas en otras especies, incluyendo al humano, indicó que el mayor porcentaje de homología se presenta con las secuencias bovina (53,7% de identidad nucleotídica) y humana (46,4% de identidad nucleotídica).

Por otra parte, el análisis predictivo de los posibles sitios de unión a factores de transcripción localizados en la región promotora, reveló la existencia de múltiples sitios diana para factores implicados en la regulación transcripcional basal, entre los que se encuentran, los factores CEBP (-354, -371, -488, -826, -859), AP1 (-154, -363, -858), AP2 (-196), TBP (-818), SP1 (-19, -24, -38, -51, -621) y KLF (-21, -40, -48, -55, -70, -325, -668, -884), destacando la presencia de un elevado número de sitios de unión a los factores SP1 y KLF cercanos al inicio del primer exón.

Además de los elementos anteriores, se logró asimismo determinar la presencia de sitios de unión a factores transcripcionales asociados a la regulación del sistema inmune, entre los cuales se encontraron los sitios de unión para NFκB, IKRS, HOXF, HOXC, ETSF, ZF02 y STAT, algunos de los cuales se encontraron altamente conservados entre los promotores porcino y humano (Figura 2).

PROMOTOR TLR2 PORCINO

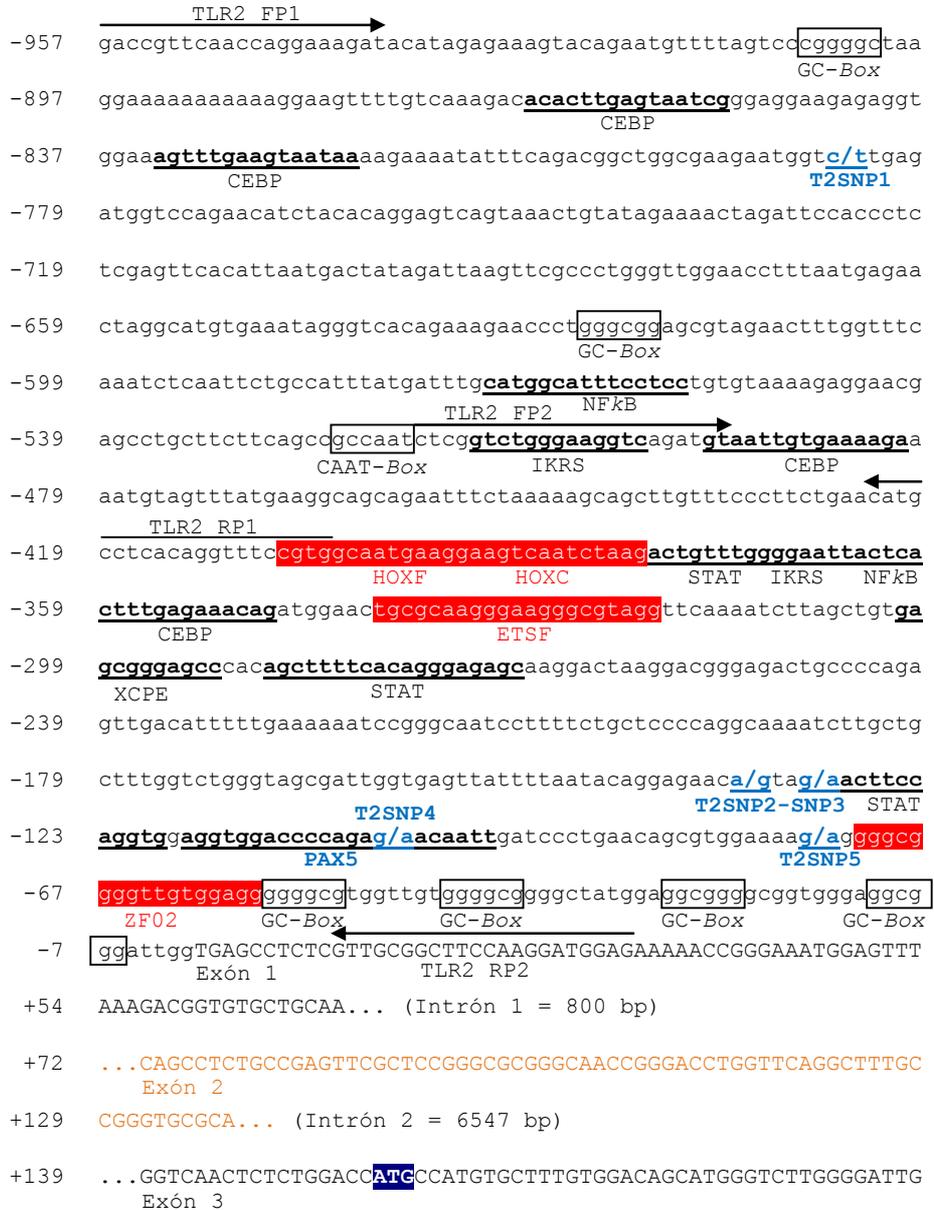


Figura 2. Región promotora del gen TLR2 porcino. Los cebadores diseñados para amplificar la secuencia de la región promotora están representados por flechas. Los principales elementos cis reguladores se muestran en negritas y subrayados. Los elementos GC-Box y CAAT-Box se indican mediante recuadros. En rojo se señalan aquellos posibles sitios de unión a factores de transcripción con

relevancia en el sistema inmune conservados entre los promotores humano y porcino. El codón de inicio de la traducción (ATG) del gen *TLR2* porcino se muestra dentro del recuadro azul. El segundo exón (presente únicamente en la variante transcripcional *TLR2-002 ENSSSCT00000033729*) se muestra en color naranja. Finalmente, los SNP identificados en la región se indican en azul y subrayados.

La búsqueda de variación genética en la región promotora del gen *TLR2*, fue realizada utilizando material genético procedente de 10 cerdos Landrace x Large White sin relación parental alguna y permitió la identificación de un total de 5 variaciones de tipo SNP (SNP1 -784C→T, SNP2 -133A→G, SNP3 -130G→A, SNP4 -103G→A, SNP5 -74G→A) ubicadas en su mayor parte dentro de la porción más cercana al inicio del primer exón (-74/-133 pb). En todos los casos, las variaciones correspondieron a transiciones de nucleótidos (Figura 2).

De los 5 SNP identificados, el SNP4, localizado en la posición -103 de la región promotora de *TLR2*, se localizó dentro de una secuencia diana para el factor transcripcional PAX5, relacionado con la regulación del sistema inmune.

1.2 Identificación de polimorfismos en la secuencia codificante del gen *TLR2* porcino.

La búsqueda de variación genética en la región codificante del gen *TLR2* se realizó sobre la secuencia nucleotídica reportada en la base de datos *Ensembl* (Referencia: ENSSSCG00000009002), la secuencia codificante del gen *TLR2* porcino se localiza en el tercer exón y comprende un total de 2358 pb que codifican para una proteína de 785 aminoácidos. El análisis del ADN de 10 cerdos Landrace x Large White no relacionados permitió identificar 3 SNP, todos ellos ubicados en la porción genómica que codifica para el dominio extracelular de la proteína *TLR2* (Tabla 1).

Tabla 1. Polimorfismos identificados en la secuencia codificante de *TLR2*.

Locus	Ubicación	Posición	Variación		Tipo
			Nucleótido	Aminoácido	
TLR2 SNP COD1	Exón 3	+561	C/G	P136A	Transversión
TLR2 SNP COD2	Exón 3	+1167	G/A	A338T	Transición
TLR2 SNP COD3	Exón 3	+1665	G/C	V504L	Transversión

Las tres variaciones detectadas correspondieron a SNP no sinónimos, de los cuales, dos originan un cambio de aminoácido a nivel de regiones LRR4 y LRR11, encargadas del reconocimiento de patrones moleculares de origen patógeno. En la Figura 3 se representa la estructura de la proteína codificada por el gen *TLR2* porcino, así como la localización de las variaciones detectadas durante la búsqueda de polimorfismos.

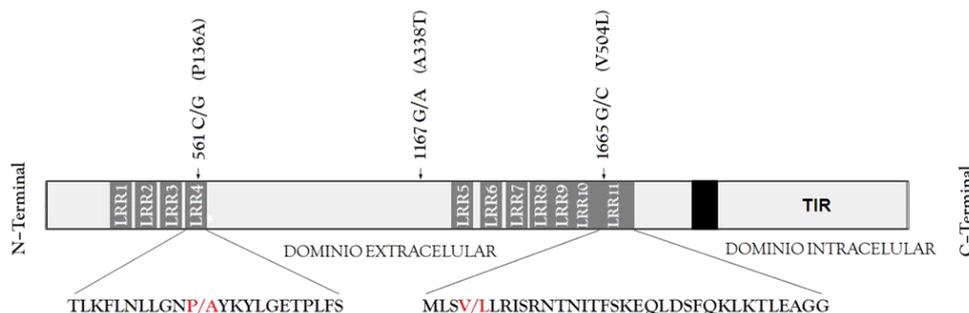


Figura 3. Localización de los SNP identificados en la secuencia codificante del gen *TLR2*. La imagen corresponde a la proteína codificada con los sitios de variación y el cambio de aminoácido generado. El área negra representa la región transmembranaria. Las siglas LRR corresponden a las repeticiones ricas en leucina, encargadas del reconocimiento de patrones. En la parte inferior se describe la secuencia de aquellas LRR afectadas por un SNP no sinónimo.

1.3 Estudio poblacional de las variaciones genéticas detectadas en el gen *TLR2*.

El estudio poblacional de las variaciones genéticas descubiertas en la región promotora y la secuencia codificante del gen *TLR2* porcino, se llevó a cabo sobre el ADN procedente de un total de 128 (promotor) y 100 (secuencia codificante) ejemplares porcinos no relacionados parentalmente, pertenecientes a 5 diferentes poblaciones porcinas. Los cerdos genotipados fueron evaluados de forma global (incluyendo jabalíes y domésticos como una sola población) y divididos en dos grupos poblacionales: 88 Domésticos (35 Landrace x Large White, 25 Ibéricos, 13 Cerdos Pelón Mexicano, 15 Landrace) y 40 Jabalíes; en el caso del estudio del polimorfismo en la región promotora y 60 Domésticos (20 Landrace x Large White, 20 Ibéricos, 20 Cerdos Pelón Mexicano) y 40 Jabalíes, en el estudio del polimorfismo en la secuencia codificante.

Todos los SNP identificados, tanto en la región promotora como en la secuencia codificante, mostraron variación polimórfica en al menos el 1% de los ejemplares analizados. Las frecuencias alélicas estimadas para cada uno de los *loci* SNP en los grupos poblacionales se muestran en la Tabla 2. Del total de *loci* testados, el SNP2, ubicado en la posición -133(A→G) de la región promotora, mostró un grado elevado de variabilidad en ambos grupos poblacionales, con una frecuencia del alelo menor de 0,464 en el análisis global, llegando a un número efectivo de alelos de 1,93 en los cerdos domésticos y de 1,99 en los jabalíes. Por el contrario, las tres variaciones identificadas en la secuencia codificante, mostraron frecuencias muy bajas para el alelo menor, tanto en el análisis global como en el de grupos poblacionales.

En cuanto a la identificación de alelos privados (definido en el presente estudio como la presencia exclusiva de un SNP en una determinada población o grupo poblacional), las variantes alélicas menores de los tres SNP detectados en la

secuencia codificante fueron exclusivas de la población de cerdos domésticos, dos de ellos específicamente de los cerdos Landrace x Large White (SNP COD2) y cerdos Pelón Mexicano (SNP COD3). En cuanto al análisis de equilibrio mediante la prueba de Hardy-Weinberg, esta reveló que solamente las variaciones SNP3 y SNP COD1 se encontraron en desequilibrio ($p < 0,05$).

Tabla 2. Frecuencias alélicas para cada *locus* analizado en el gen *TLR2*.

Región	Locus	Alelo menor	Frecuencia del alelo menor		
			Global	Jabalí	Domésticos
Promotor	SNP 1	T	0,250	0,238	0,257
	SNP 2	G	0,464	0,513	0,441
	SNP 3*	A	0,184	0,109	0,213
	SNP 4	A	0,069	0,028	0,088
	SNP 5	A	0,052	0,141	0,012
Sec. Codificante	SNP COD1*	G	0,032	0,000	0,054
	SNP COD2	A	0,010	0,000	0,018
	SNP COD3	C	0,021	0,000	0,035

*= Loci en desequilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

Los valores de heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) y número efectivo de alelos (N_e) por *locus* en cada uno de los dos grupos poblacionales se muestran en la Tabla 3. El valor de H_e en los cerdos domésticos varió de 0,023 (SNP5) a 0,493 (SNP2), mientras que en los jabalíes la H_e varió de 0 (SNP COD1, 2 y 3) a 0,500 (SNP2). En el caso de los cerdos domésticos el valor medio de H_e fue escasamente inferior al valor medio de H_o ($H_e = 0,200 \pm 0,063 / H_o = 0,205 \pm 0,066$), caso contrario a lo observado en la población de jabalíes, donde el valor medio de H_e fue superior al de H_o ($H_e = 0,169 \pm 0,067 / H_o = 0,145 \pm 0,055$).

En lo que respecta al valor promedio de F_{ST} entre el grupo de cerdos domésticos y la población de jabalíes, este fue de $0,019 \pm 0,007$, mientras que, los porcentajes de varianza molecular obtenidos mediante AMOVA fueron del 2% entre las poblaciones, 2% entre los individuos en las regiones promotoras y de 2% entre poblaciones, 13% entre individuos en las secuencias codificantes.

Tabla 3. Valores de heterocigosidad, número efectivo de alelos y F_{ST} (TLR2). Comparación entre cerdos domésticos y jabalíes.

Locus	Domésticos			Jabalí			F_{ST}
	N_e	H_o	H_e	N_e	H_o	H_e	
TLR2 SNP1	1,617	0,405	0,382	1,568	0,225	0,362	0,000
TLR2 SNP2	1,973	0,435	0,493	1,999	0,425	0,500	0,005
TLR2 SNP3	1,505	0,427	0,336	1,242	0,219	0,195	0,020
TLR2 SNP4	1,190	0,175	0,160	1,057	0,056	0,054	0,016
TLR2 SNP5	1,024	0,024	0,023	1,320	0,231	0,242	0,059
TLR2 SNP COD1	1,113	0,071	0,101	1,000	0,000	0,000	0,028
TLR2 SNP COD2	1,036	0,035	0,034	1,000	0,000	0,000	0,009
TLR2 SNP COD3	1,073	0,070	0,068	1,000	0,000	0,000	0,018

N_e = Número efectivo de alelos. H_o = Heterocigosidad observada. H_e = Heterocigosidad esperada.

Finalmente, el cálculo de frecuencias haplotípicas permitió identificar un total de 12 haplotipos en la región promotora y 4 en la secuencia codificante del gen *TLR2*. La frecuencia de cada una de las diferentes combinaciones alélicas observadas entre los grupos poblacionales se muestran en la Tabla 4.

De los 12 haplotipos observados en la región promotora, 4 de ellos se presentaron únicamente en la población de jabalíes (CGGGA, TAGGG, TGGAG, CAGGA), mientras que en los cerdos domésticos únicamente se observó un haplotipo propio (TAAAG). Por otro lado, en el caso de los polimorfismos en la secuencia codificante, al no observarse variación nucleotídica en los jabalíes, se consideró solamente la combinación alélica CGG como haplotipo único para esta población. La prueba de desequilibrio de ligamiento, realizada mediante el método de intervalo de confianza de Gabriel *et al* (2002), no arrojó valores significativos entre los alelos ($p < 0,05$), tanto a nivel de promotor como de secuencia codificante, indicando un equilibrio de ligamiento entre los *loci* SNP.

Tabla 4. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en *TLR2*.

Región	Haplotipo	Frecuencia Global	Frecuencia	
			Jabalíes	Domésticos
Promotor	CAGGG	0,415	0,402	0,361
	CGGGG	0,231	0,103	0,301
	TGGGG	0,111	0,145	0,101
	TAAAG	0,050	-	0,069
	CGAGG	0,049	0,092	0,021
	TAAGG	0,038	0,020	0,054
	CAAGG	0,034	0,018	0,064
	CGGGA	0,025	0,124	-
	TAGGG	0,017	0,043	-
	TGGGA	0,013	-	-
	TGGAG	-	0,036	-
CAGGA	-	0,017	-	
Secuencia codificante	CGG	0,948	1,000	0,912
	GGG	0,021	-	0,035
	CGC	0,021	-	0,035
	GAG	0,010	-	0,018

1.4 Análisis funcional del polimorfismo en el promotor del gen *TLR2* porcino.

Para examinar el posible efecto de la presencia de polimorfismo sobre la regulación de la transcripción del gen *TLR2* porcino, se midió la actividad promotora en células CHO transfectadas de forma transitoria con construcciones de ADN recombinante diseñadas en el vector pGL4.17, conteniendo cada una de las variantes alélicas del SNP4 -103G→A, seleccionado por su localización dentro de un sitio de unión al factor transcripcional PAX5.

Como se puede observar en la Figura 4, los resultados del estudio funcional del SNP4 en la región promotora del gen *TLR2*, revelaron que aquellas células transfectadas con la variante alélica mayoritaria (-103G) mostraron un incremento altamente significativo ($p=0,0024$) de la actividad luciferasa relativa ($35,76 \pm 1,26$), comparado con los valores mostrados en aquellas células transfectadas con la variante alélica minoritaria -103A ($24,21 \pm 1,12$).

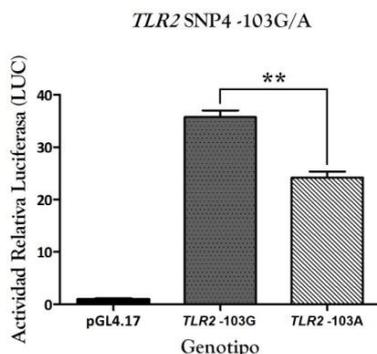


Figura 4. Ensayo funcional del polimorfismo TLR2 SNP4 -103G →A. Comparación de los valores de actividad luciferasa relativa observadas en las células transfectadas con las variantes alélicas del SNP4 -103G →A. Cada columna representa la media y el error estándar para cada construcción analizada. La primera columna corresponde a la actividad luciferasa de las células transfectadas con el vector control pGL4.17 (** $p < 0,005$).

1.5 Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen *TLR2* porcino.

Como parte final del estudio funcional del polimorfismo en el gen *TLR2* porcino, se examinó el efecto de la variación genética no sinónima SNP COD1 +561C→G (P136A) sobre la función del receptor TLR2. Para observar el efecto del polimorfismo localizado dentro de una secuencia que codifica para el dominio LRR4, células HEK293T fueron transfectadas de forma transitoria con las construcciones recombinantes diseñadas en el vector de expresión pcDNA3.1+, conteniendo las variantes alélicas del SNP +561C→G. Posteriormente, las células HEK293T fueron estimuladas empleando el lipopéptido triacilado sintético Pam3CSK4, el cual actúa como ligando de TLR2 imitando el extremo amino terminal acetilado de las lipoproteínas bacterianas. De igual forma, para observar el efecto de la variación genética sobre la actividad receptora de TLR2 al ser enfrentado a un patógeno, las células fueron estimuladas con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada. Por otro lado, con el fin de estudiar una

posible función de reconocimiento no descrita de TLR2 al LPS bacteriano, las células fueron estimuladas con dicho ligando.

En primer lugar, se evaluó la funcionalidad del SNP COD1 +561C→G (TLR2 P136A), mediante la estimulación de las células transfectadas con el ligando sintético Pam3CSK4 (Figura 5). Los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad de reconocimiento efectuada por la proteína TLR2 hacia el ligando sintético Pam3CSK4, mostrando además una reducción significativa de la actividad luciferasa relativa ($p=0,0373$) en aquellas células transfectadas con la variante TLR2 136A ($280,4 \pm 11,01$) con respecto a la actividad luciferasa relativa mostrada por las células transfectadas con la variante alélica TLR2 136P ($321,1 \pm 7,34$).

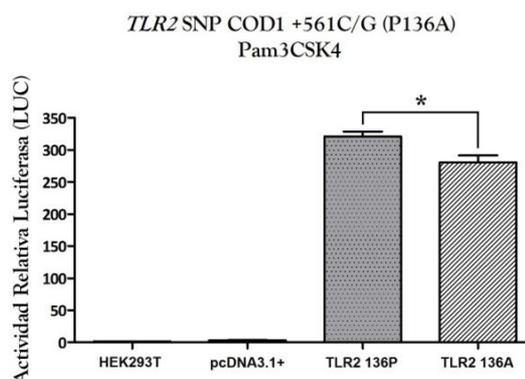


Figura 5. Ensayo funcional del polimorfismo TLR2 SNP COD1 +561C→G (Pam3CSK4). Valores de actividad luciferasa relativa generados por las variantes alélicas del SNP COD1 +561C→G, mediante estimulación con el ligando sintético Pam3CSK4 (* $p<0,05$).

El estudio de la posible función de reconocimiento no descrita del TLR2 al ligando LPS, reveló que el empleo de dicho ligando produce ratios de actividad luciferasa relativa extremadamente bajos: $7,66 \pm 0,53$ (TLR2 136P) y $6,49 \pm 0,67$ (TLR2 136A). Tal como puede observarse en la Figura 6, no observándose diferencias significativas entre ambas variantes ($p=0,2436$).

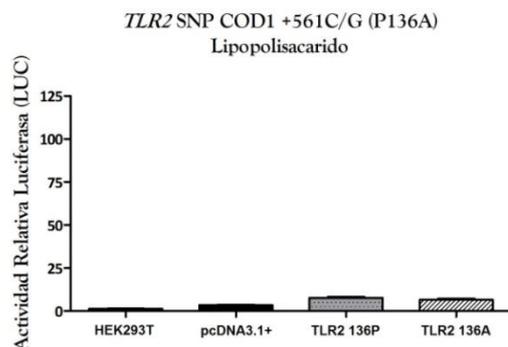


Figura 6. Ensayo funcional del polimorfismo *TLR2* SNP COD1 +561C→G (LPS). Actividad relativa luciferasa observada en las células HEK293T transfectadas con las variantes alélicas del SNP COD1 +561C→G, estimuladas con el ligando LPS.

Por último, los resultados de la estimulación de las células HEK293T con la cepa bacteriana de *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada (Figura 7), revelaron cambios significativos ($p=0,0283$) entre las dos variantes, observándose una disminución de la actividad luciferasa en la variante TLR2 136A ($76,08 \pm 3,65$) con respecto a la actividad mostrada por la variante TLR2 136P ($90,56 \pm 2,29$).

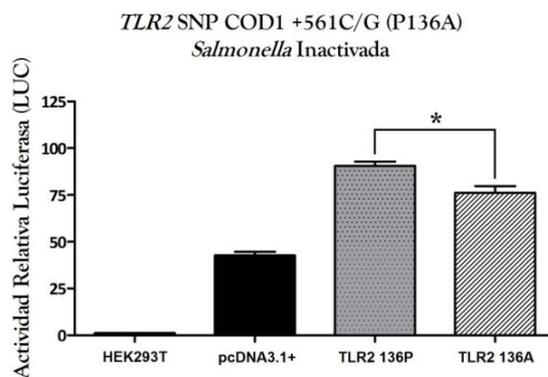


Figura 7. Ensayo funcional del polimorfismo *TLR2* SNP COD1 +561C→G (*Salmonella typhimurium* inactivada). Comparación de los valores de actividad luciferasa relativa observados en las células HEK293T transfectadas con las variantes alélicas del SNP COD1 +561C→G, estimuladas con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada (* $p<0,05$).

2 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN EL GEN TLR4 PORCINO

2.1 Identificación de elementos reguladores en el promotor de *TLR4* porcino.

Como parte inicial del estudio del polimorfismo en el gen *TLR4* porcino, se llevó a cabo la identificación de todos aquellos elementos potencialmente involucrados en su maquinaria transcripcional. Para esto, se analizó un fragmento de 887 pb de la región 5' flanqueante del primer exón, identificado como el promotor de *TLR4* mediante las herramientas bio-informáticas descritas en la metodología. El fragmento analizado se ubicó a una distancia de 243 pb del codón ATG, en el cromosoma 1 porcino.

En el presente estudio no se detectó la presencia de una secuencia consenso TATA-*Box* cercana al sitio de inicio de la transcripción (+1). Sin embargo, se identificó una atípica secuencia TBP/TFIID (proteína de unión a TATA-*Box*), localizada a una distancia de -53/-58 pb del inicio del primer exón, además de un motivo AP2 entre las bases -134 a -148.

Entre los demás elementos de *cis*-regulación basal, presentes en la secuencia analizada, se observaron dos motivos CAAT-*Box*, un motivo AP1 (-568), así como múltiples secuencias diana para el factor OCT1 (-873, -709, -468, -465). Dichos elementos fueron identificados en una zona comprendida entre las -560 a -880 pb río arriba del inicio del primer exón. El análisis predictivo de elementos *cis*-reguladores, reveló también la presencia de tres sitios de unión a CEBP (Figura 8). Por otra parte, se observó una ausencia de motivos GC-*Box*, e islas CpG. La carencia de alguna isla de regulación CpG o motivos GC-*Box* dentro de la región está en consonancia con el bajo porcentaje de GC detectado en la secuencia (40,8%).

PROMOTOR TLR4 PORCINO

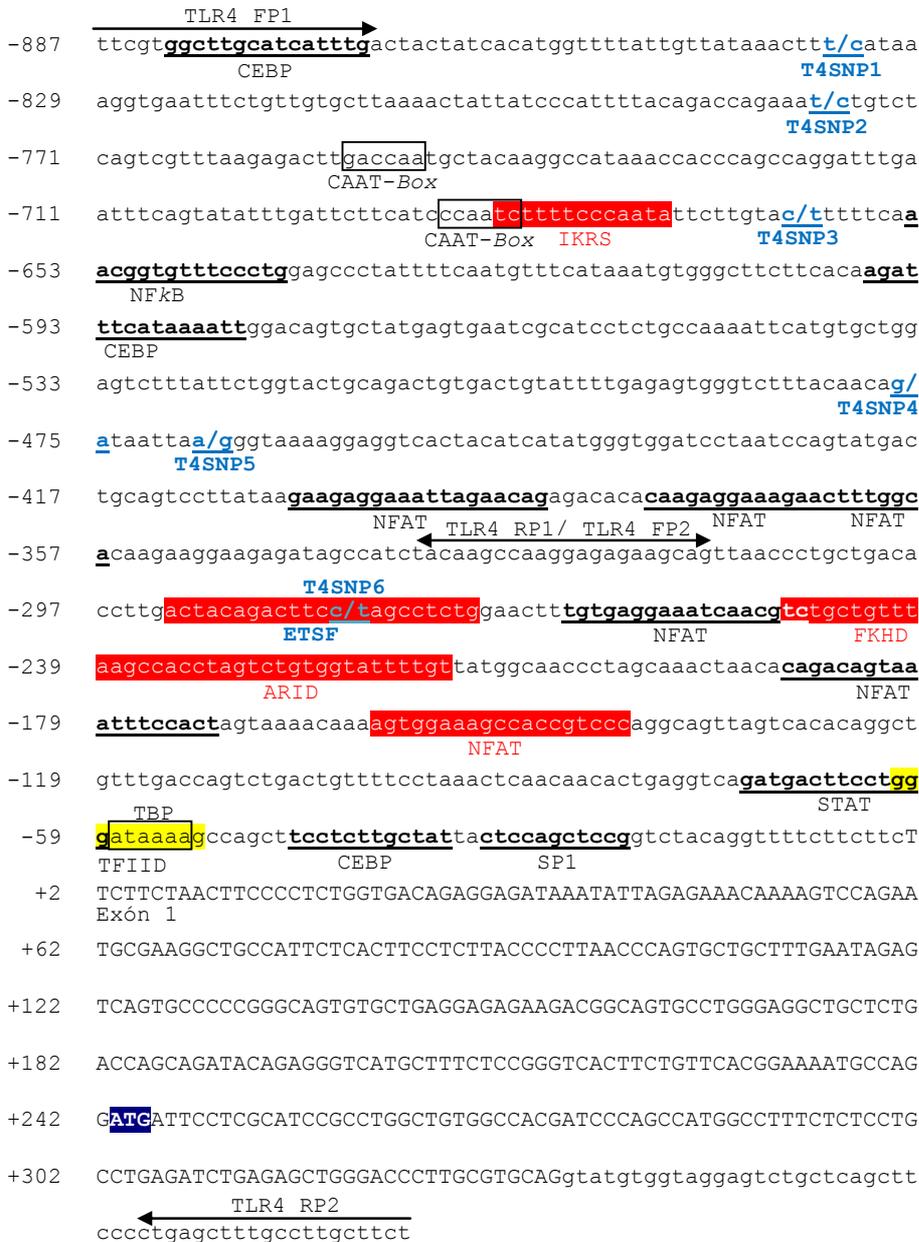


Figura 8. Región promotora del gen TLR4 porcino. El sitio de unión TBP se muestra dentro del recuadro, unido a la secuencia TFIID (amarillo) identificado. Los cebadores diseñados para amplificar la secuencia de la región promotora están representados por flechas. Los principales elementos cis-

reguladores identificados en la región se muestran en negritas y subrayados. Los elementos CAAT-Box se señalan dentro de los recuadros. En rojo se indican aquellos posibles sitios de unión a factores de transcripción con relevancia en el sistema inmune, conservados entre los promotores humano y porcino. El codón de inicio de la traducción (ATG) se muestra dentro del recuadro azul. Los SNP identificados en la región promotora se muestran en azul y subrayados.

En lo que respecta a la detección de posibles sitios de unión a factores de transcripción con relevancia en el sistema inmune, es interesante resaltar la presencia de múltiples sitios NFAT y STAT, así como un potencial sitio de unión a NFκB ubicado a una distancia aproximada de -650 pb del inicio de la transcripción.

Por último, la región promotora del gen *TLR4* porcino fue sometida a un análisis de alineamiento con las regiones homologas de otras especies, observándose el mayor porcentaje de identidad con la secuencia promotora humana (72% de identidad nucleotídica). La búsqueda de elementos de *cis*-regulación conservados entre las regiones promotoras humana y porcina, permitió identificar varios sitios de unión a factores transcripcionales como son IKRS, ETSF, FKHD, ARID y NFAT, los cuales están fuertemente relacionados con la regulación de la expresión génica en el sistema inmune.

2.2 Identificación de polimorfismos en la región promotora y secuencia codificante del gen *TLR4*.

La secuencia de referencia *TLR4*-001 ENSSTCT00000006051, reportada en la base de datos *Ensembl*, fue utilizada para la búsqueda de polimorfismos en el gen *TLR4* tanto a nivel de promotor como de región codificante. En la Figura 9 se muestra la estructura y localización genómica de la secuencia utilizada.

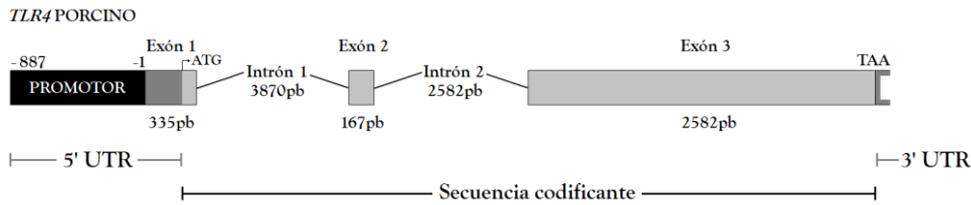


Figura 9. Estructura del gen *TLR4* porcino (referencia Ensembl: ENSSSCG00000005503). El gen *TLR4* se localizó en el cromosoma 1, entre las coordenadas 289774935 – 289785847. La secuencia codificante se sitúa entre los exones 1 al 3, representando un fragmento de 2526 pb que codifica para una proteína de 841 aminoácidos.

Al examinar la región promotora del gen *TLR4*, se lograron identificar 6 variaciones de tipo SNP distribuidas de manera uniforme a lo largo de las 887 pb de la región secuencia analizada (SNP1 -834T→C, SNP2 -777T→C, SNP3 -661C→T, SNP4 -475G→A, SNP5 -468A→G, SNP6 -280C→T). Todas las variaciones detectadas correspondieron a transiciones de nucleótidos.

En lo que respecta a la búsqueda de variación genética en la secuencia codificante, se observó una escasa variabilidad, detectándose únicamente un SNP no sinónimo en la posición +807, correspondiendo a la transversion del nucleótido adenina por citosina (+807A→C), provocando la sustitución del aminoácido asparragina por el aminoácido histidina en la posición 189 del receptor *TLR4*, dentro del dominio LRR5 (NLEHLDSKNKIEN/HIYHEHLQV).

2.3 Estudio poblacional del polimorfismo identificado en el gen *TLR4* porcino.

El estudio poblacional de los siete polimorfismos detectados en el gen *TLR4*, se realizó utilizando un total de 128 cerdos no emparentados, analizados de forma global y divididos en dos grupos poblacionales: 40 Jabalíes y 88 Domésticos (25 Ibéricos, 13 Cerdos Pelón Mexicano, 35 Landrace x Large White y 15 Landrace).

Los resultados del análisis mostraron variaciones notorias en la frecuencia del alelo menor entre cada uno de los SNP y a su vez, entre los dos grupos poblacionales estudiados (Figura 10). La frecuencia más elevada para el alelo menor se observó en los *loci* SNP3 y SNP6, tanto en el análisis global (SNP3 0,141/SNP6 0,141) como en los jabalíes en el análisis comparativo, con unos valores de 0,177 y 0,181 para el SNP3 y SNP6, respectivamente. En el caso de los cerdos domésticos, los *loci* SNP1 (0,098) y SNP6 (0,088) presentaron las frecuencias de alelo menor más elevadas.

Por otra parte, contrario a lo observado en los SNP de la región promotora, el resultado de la frecuencia del único polimorfismo de la secuencia codificante (SNP COD1) fue extremadamente bajo, tanto en el estudio global como en el estudio comparativo de las poblaciones doméstica y jabalí, detectándose únicamente en un cerdo doméstico (Landrace x Large White) y en forma de heterocigoto. El resultado del cálculo de las frecuencias alélicas para cada *loci* SNP se muestra en la Figura 10. El test de equilibrio Hardy-Weinberg presentó valores significativos ($p < 0,05$) para los *loci* SNP3, SNP5 y SNP6. Por otra parte, la búsqueda de alelos privados no arrojó evidencia de SNP únicos para alguna de las poblacionales estudiadas.

La observación de los datos generados mediante el cálculo de las frecuencias alélicas evidenció la notoria diferencia de variabilidad genética de *TLR4* entre los dos grupos poblacionales (Figura 10), observándose valores más altos de diversidad genética en la población de jabalíes, representados tanto por las frecuencias del alelo menor en cada uno de los *loci*, exceptuando al SNP COD1, como por los valores de heterocigosidad y el número efectivo de alelos.

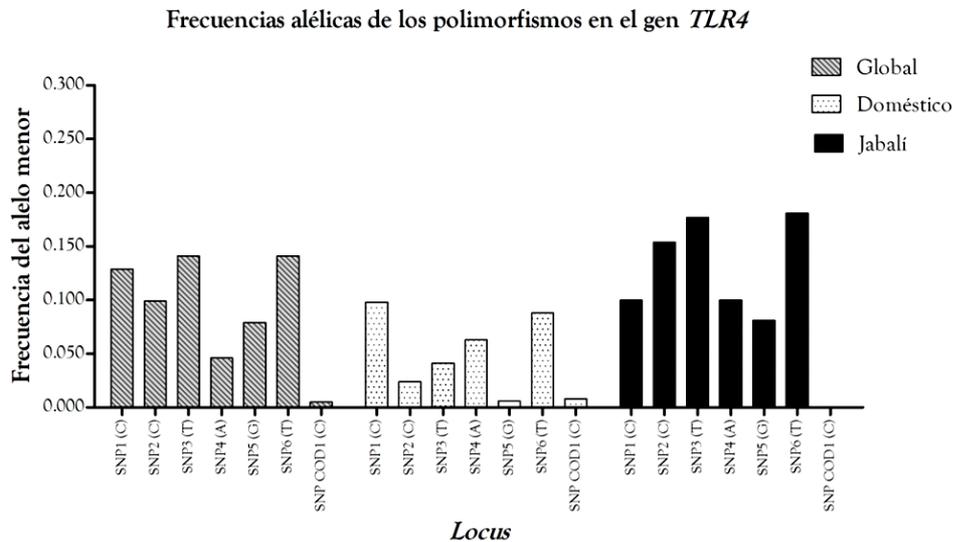


Figura 10. Frecuencias alélicas de las variaciones polimórficas en el gen *TLR4*. Cada columna representa la frecuencia alélica para cada locus evaluado, obtenida mediante el estudio poblacional.

Al comparar los valores de heterocigosidad esperada y observada en los siete loci SNP, entre los cerdos domésticos y jabalíes, se observó que los valores de H_e y H_o fueron notablemente superiores en la población de jabalíes ($H_o = 0,158 \pm 0,037 / H_e = 0,194 \pm 0,039$) con respecto a los valores calculados en los cerdos domésticos ($H_o = 0,068 \pm 0,021 / H_e = 0,087 \pm 0,025$). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,1908$).

En la Figura 11 se muestran los valores de heterocigosidad calculados en cada uno de los loci SNP, en la cual se puede observar claramente la diferencia entre las dos poblaciones.

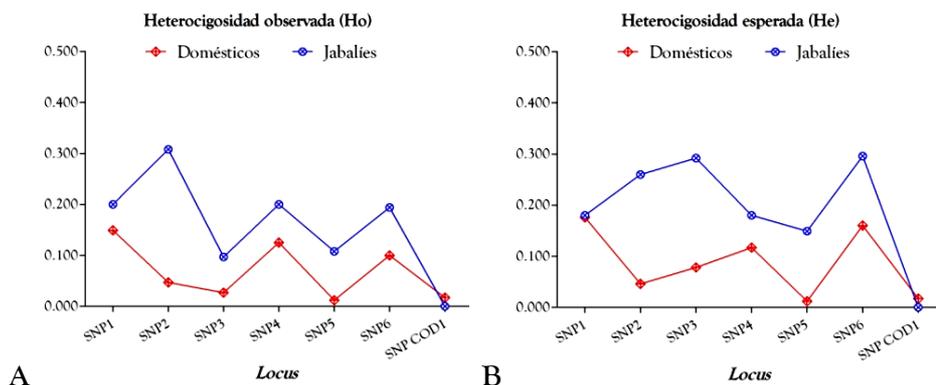


Figura 11. Valores de heterocigosidad observada (A) y esperada (B) para cada uno de los loci analizados en el gen *TLR4*. Comparación entre cerdos domésticos y jabalies.

La misma tendencia fue observada en los resultados del cálculo del número efectivo de alelos, tal como puede apreciarse en la Figura 12A. Por otra parte, el resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que del 100% de la variación detectada, el 5% correspondió a la diversidad entre-poblaciones y el 17% a la diversidad entre-individuos (Figura 12B). Finalmente, el cálculo del estadístico F_{ST} arrojó un valor promedio de F_{ST} de 0,047.

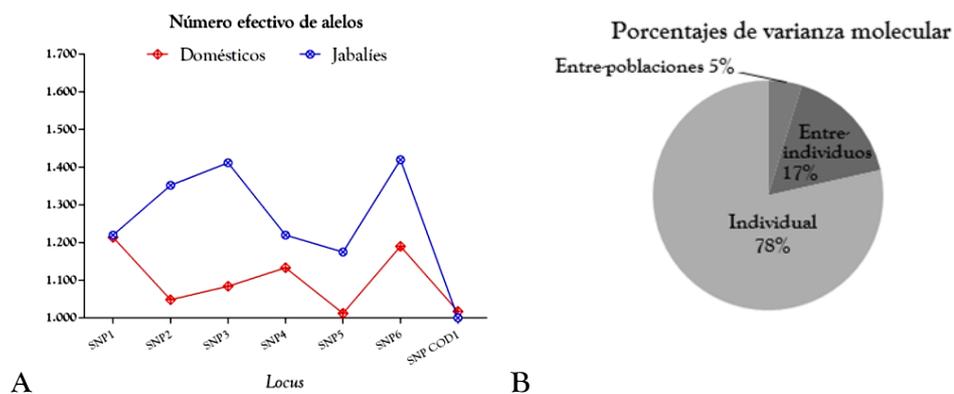


Figura 12. Diversidad genética en *TLR4* de cerdos domésticos y jabalies. (A) Número efectivo de alelos por locus SNP. (B) Resultado de la prueba de AMOVA realizada entre los dos grupos poblacionales.

Como última parte del estudio poblacional, se realizó la estimación de los haplotipos y sus frecuencias entre los individuos estudiados. En total, se calcularon 16 diferentes haplotipos, revelando una elevada variabilidad en las combinaciones alélicas detectadas. Cabe mencionar que el SNP COD1 fue excluido del análisis de haplotipos debido a su casi nula presencia entre las poblaciones.

El haplotipo con la frecuencia más alta correspondió a la combinación TTCGAC, siendo mayoritario tanto en el grupo de cerdos domésticos como en los jabalíes. Por otro lado, el cálculo de haplotipos también evidenció una marcada diferencia en la presentación de las combinaciones de alelos entre los grupos poblacionales, observándose que de los 16 haplotipos detectados, 6 se presentaron de forma exclusiva en los jabalíes y 6 más lo hicieron en los cerdos domésticos, con lo cual, además del haplotipo mayoritario TTCGAC, únicamente los haplotipos TTCGAT, CTCGAT y TTCAAC se compartieron entre los dos grupos poblacionales, tal como se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Haplotipos y frecuencias haplotípicas globales y por poblaciones (TLR4).

Región	Haplotipo	Frecuencia Global	Frecuencia	
			Jabalíes	Domésticos
Promotor	TTCGAC	0,781	0,658	0,836
	TTCGAT	0,031	0,041	0,027
	TTGGC	0,024	0,081	-
	CTCGAT	0,021	0,025	0,020
	TCCGAT	0,019	0,062	-
	CCTAAT	0,018	0,050	-
	TTCAAC	0,016	0,013	0,018
	CTTAAC	0,014	-	0,018
	TTTGAC	0,014	0,031	-
	CTCGAC	0,012	-	0,018
	CCCAAC	-	0,013	-
	CCTAAC	-	0,012	-
	CTTGAT	-	-	0,015
	CCCGAT	-	-	0,013
	CCCAAT	-	-	0,011
	TTTAAC	-	-	0,010

Finalmente, al realizar la prueba de desequilibrio de ligamiento, no se observaron valores significativos entre los alelos ($p < 0,05$), indicando una ausencia de desequilibrio entre *loci* y como consecuencia una ausencia de bloques haplotípicos.

2.4 Análisis funcional del polimorfismo en el promotor del gen *TLR4* porcino.

El SNP6 -280C→T localizado dentro de una secuencia diana altamente conservada entre los promotores porcino y humano para el factor transcripcional ETSF fue analizado funcionalmente para determinar si la presencia de alguna de sus variantes alélicas tiene el potencial suficiente para modificar su actividad transcripcional del gen *TLR4*.

El resultado reveló que en aquellas células transfectadas con la variante alélica minoritaria -280T (13.22 ± 1.344) hubo una disminución altamente significativamente ($p = 0,0092$) en el ratio de actividad luciferasa relativa, observándose hasta un 44% de reducción de la actividad promotora, con relación a los resultados observados en las células transfectadas con la variante alélica mayoritaria -280C (23.19 ± 1.628). En la Figura 13 se ilustra el resultado del análisis funcional del polimorfismo en el promotor *TLR4* porcino.

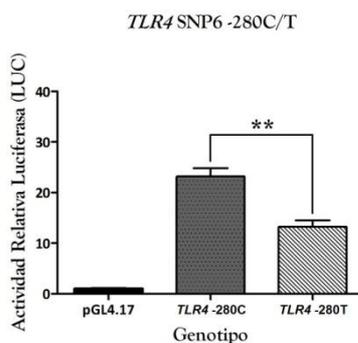


Figura 13. Ensayo funcional del polimorfismo *TLR4* SNP6 -280C→T. Ratios de actividad luciferasa relativa obtenidos a partir de las células CHO transfectadas con las variantes alélicas del SNP6 -280C→T (** $p < 0,01$).

2.5 Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen *TLR4*.

La única variación genética detectada en la secuencia codificante del gen *TLR4* porcino fue analizada mediante ensayos funcionales con el gen reportero luciferasa para determinar su posible influencia sobre la función de reconocimiento de patógenos desarrollada por la proteína TLR4. El SNP COD1 +807A→C induce un cambio de aminoácido en la posición 189 de TLR4 (asparragina por histidina), afectando el dominio LRR5.

Debido a los reportes que demuestran que TLR4 requiere de la proteína MD-2 para formar el complejo receptor al LPS, células HEK293T fueron transfectadas con dos construcciones recombinantes diseñadas en el vector de expresión pcDNA3.1+, la primera de ellas conteniendo la secuencia codificante completa del gen MD-2 y la segunda conteniendo la secuencia codificante del gen *TLR4* con cada variante alélica del SNP COD1 (*TLR4* N189H). Las células transfectadas fueron estimuladas con LPS bacteriano y con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada.

Los resultados obtenidos en el ensayo funcional mostraron una disminución significativa ($p=0,0181$) en los valores de actividad luciferasa relativa generados por las células transfectadas con la construcción *TLR4* 189H (26.50 ± 2.308), con relación a los valores de actividad luciferasa relativa mostrados por las células transfectadas con la construcción *TLR4* 189N conteniendo la variante alélica +807A (36.45 ± 1.150). La Figura 14 representa gráficamente los valores obtenidos mediante el ensayo de estimulación con LPS.

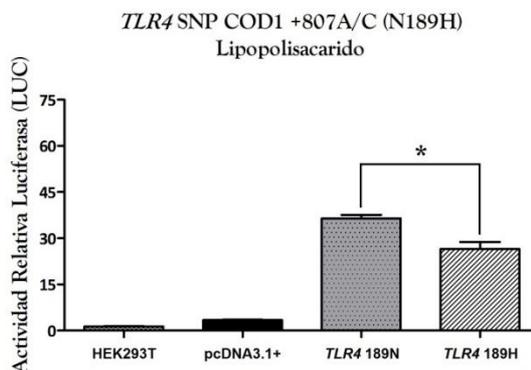


Figura 14. Ensayo funcional del polimorfismo *TLR4* SNP COD1 +807A→C (LPS). Ratios de actividad luciferasa relativa observada en las células HEK293T transfectadas con las variantes alélicas del SNP COD1, estimuladas con LPS (* $p < 0,05$).

Tal como se puede observar en la Figura 15, un resultado similar se obtuvo cuando las células HEK293T transfectadas con ambas variantes alélicas del SNP COD1 +807A→C fueron estimuladas con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada. Aquellas células transfectadas con la variante +807C (*TLR4* 189H) mostraron un ratio significativamente menor ($p = 0,0441$) de actividad luciferasa relativa (91.80 ± 6.802) con respecto al ratio mostrado por las células transfectadas con la variante +807A (*TLR4* 189H), el cual fue de 117.8 ± 5.856 .

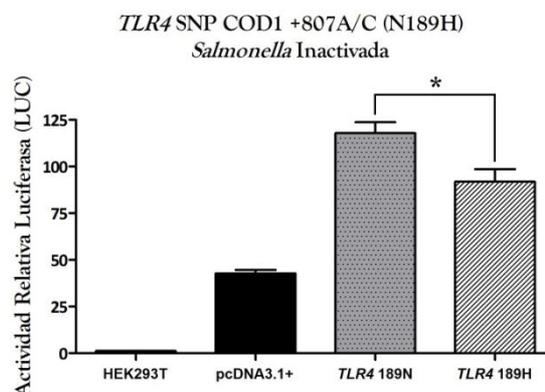


Figura 15. Ensayo funcional del polimorfismo *TLR4* SNP COD1 +807A→C (*Salmonella typhimurium* inactivada). Resultado de la comparación de ratios de actividad luciferasa relativa entre

las variantes alélicas del SNP COD1, estimuladas con la cepa *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada (* $p < 0,05$).

3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN EL GEN *TLR5* PORCINO

3.1 Análisis de la región promotora del gen *TLR5* porcino.

El gen *TLR5* porcino presenta una estructura génica constituida por dos exones separados por una región intrónica de 19,47 Kb (Figura 16). La totalidad de la secuencia codificante para la proteína TLR5 se ubica en el exón 2. En cuanto a su situación dentro del genoma, el gen *TLR5* porcino se encuentra entre las coordenadas 21886309 - 21905776 del cromosoma 10, en sentido inverso (*reverse strand*).

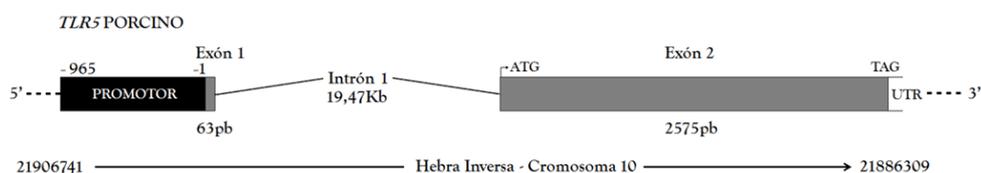


Figura 16. Estructura del gen *TLR5* porcino (referencia Ensembl: ENSSSCG00000010885). La zona de color negro muestra la ubicación de la región promotora del gen *TLR5* analizada en el presente estudio.

Como primera parte del estudio, se identificó la secuencia promotora dentro de la región 5' flanqueante del primer exón, entre las coordenadas cromosómicas 21906741 - 21905777. Dicha región fue sometida a un análisis bioinformático para identificar los motivos reguladores presentes en la zona y determinar el mecanismo de regulación transcripcional.

Se analizó un fragmento de 965 pb de la región 5' flanqueante del primer exón (Figura 17), observándose un alto contenido de GC (61%) en la totalidad del fragmento, así como la presencia de una isla CpG (contenido de GC= 61% / Tamaño= 500 pb) localizada en la región comprendida entre las bases -166 a -666, representando un sitio potencial de regulación epigenética.

porcino se encuentra dentro del recuadro azul. Los polimorfismos identificados se indican en azul (SNP) o en negro con letras blancas (Indel).

No se observó ninguna evidencia que confirmara la presencia de una típica secuencia TATA-Box próxima al inicio del primer exón. Sin embargo, se logró predecir una gran variedad de elementos *cis*-reguladores usuales en promotores carentes de TATA-Box, entre los que se encuentran, múltiples motivos CAAT y GC-Box flanqueando la isla de regulación CpG, así como diversos sitios diana para SP1 (-14, -38, -54, -72, -77, -672 pb) y para el elemento XCPE asociado a TBP (-36, -52, -70 pb), cercanos al sitio de inicio del primer exón.

De igual forma, fueron identificados diversos sitios de unión a factores de transcripción asociados a funciones inmunológicas, entre los que se hallan, los factores NFkB, STAT, CEBP, NFAT, ZF02 y ETSF. El análisis comparativo mediante el alineamiento de la secuencia promotora del gen *TLR5* con otros promotores homólogos de diversas especies, reveló la existencia de un alto grado de homología entre las secuencias promotoras porcina y humana, observándose un 63,4% de identidad nucleotídica. El análisis de alineamiento realizado entre ambas secuencias permitió detectar posibles sitios de unión altamente conservados, resaltándose los sitios IRFF, STAT, EVI1, ZF02 y XBBF estrechamente vinculados con la regulación de la respuesta inmune.

3.2 Identificación de variaciones genéticas en la región promotora de *TLR5* porcino.

Un total de 9 variaciones polimórficas fueron detectadas en el promotor *TLR5* porcino, evidenciando la alta variabilidad genética de la región. Siete de los nueve polimorfismos identificados correspondieron a variaciones de tipo SNP (SNP1 -834A→C, SNP2 -806G→A, SNP3 -779T→G, SNP4 -674G→A, SNP5 -

673A→G, SNP6 -495A→G, SNP7 -431G→C) y los dos restantes a variaciones de tipo Indel (Indel1 23 pb, Indel2 5 pb).

Las dos variaciones Indel detectadas, ocasionaron cambios en el patrón de elementos transcripcionales presentes en el promotor *TLR5*. En el caso del Indel1, la inserción de 23 pb entre los nucleótidos -581 a -559, generó un sitio de unión al factor STAT y a su vez provocó la pérdida de un sitio de unión al factor PTF1. En lo que respecta al Indel2, la inserción de 5 pb cercanas al inicio del primer exón, entre los nucleótidos -87 a -83, creó un nuevo sitio de unión al factor ZF02, eliminando a su vez un sitio de unión a GCMF. Por otro lado, en relación a las variaciones de tipo SNP, se observó que el SNP6 -495A→G afectó un posible sitio de unión al factor de transcripción PPAR, alterando la secuencia de bases altamente conservadas para dicho factor, tal como muestra en la Figura 17.

3.3 Identificación de polimorfismos en la secuencia codificante del gen *TLR5* porcino.

La identificación de polimorfismos a nivel de secuencia codificante, arrojó un resultado similar al observado en la región promotora, encontrándose una gran variabilidad genética en la secuencia analizada, específicamente en la región que codifica para el dominio extracelular de la proteína TLR5 (Figura 18). En total se detectaron 7 polimorfismos de tipo SNP, cuatro de los cuales correspondieron a mutaciones sinónimas y los tres restantes a SNP no sinónimos: SNP COD2 +901T→G (H278Q), SNP COD3 +1272C→T (P402L) y SNP COD4 +1313A→T (T416S). En el caso de los tres SNP no sinónimos identificados, únicamente el SNP COD3, se observó dentro del dominio LRR7 de reconocimiento de patógenos. Una representación esquemática de la variabilidad de la proteína TLR5 puede observarse en la Figura 18.

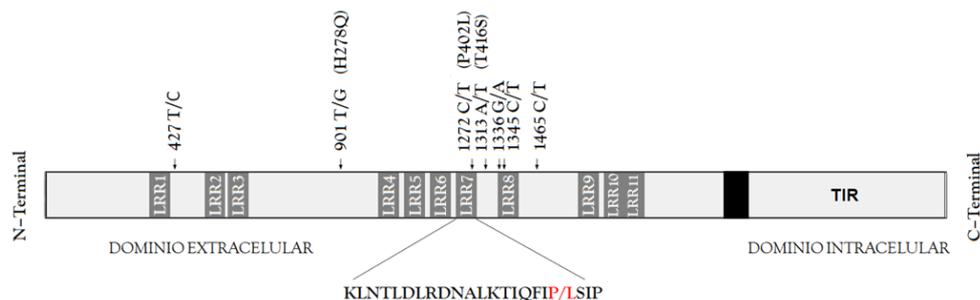


Figura 18. Localización de los polimorfismos identificados en la secuencia codificante de *TLR5*. La imagen corresponde a la estructura de la proteína codificada, con los sitios de variación y el cambio de aminoácido generado. El área de color negro representa la región transmembranaria.

Los dos SNP no sinónimos restantes (SNP COD1 y SNP COD2), a pesar de localizarse dentro de la región extracelular de la proteína, no afectaron zonas descritas como áreas de reconocimiento de patógenos. En la Tabla 6 se detalla la localización y características de las variaciones polimórficas detectadas en la secuencia codificante del gen *TLR5*.

Tabla 6. Polimorfismos identificados en la secuencia codificante del gen *TLR5* porcino.

Locus	Ubicación	Posición	Variación		Tipo
			Nucleótido	Aminoácido	
<i>TLR5</i> SNP COD1	Exón 2	+427	T/C	L136L	Transición
<i>TLR5</i> SNP COD2	Exón 2	+901	T/G	H278Q	Transversión
<i>TLR5</i> SNP COD3	Exón 2	+1272	C/T	P402L	Transición
<i>TLR5</i> SNP COD4	Exón 2	+1313	A/T	T416S	Transversión
<i>TLR5</i> SNP COD5	Exón 2	+1336	G/A	T423T	Transición
<i>TLR5</i> SNP COD6	Exón 2	+1345	C/T	F426F	Transición
<i>TLR5</i> SNP COD7	Exón 2	+1465	C/T	H466H	Transición

En negritas se indican los polimorfismos que inducen un cambio de aminoácido en la secuencia proteica de *TLR5*.

3.4 Estudio poblacional del polimorfismo en *TLR5* porcino.

Las variaciones genéticas detectadas en la región promotora se analizaron utilizando 128 muestras de ADN procedentes de cerdos no emparentados, pertenecientes a cuatro poblaciones de cerdos domésticos (35 Landrace x Large

White, 25 Ibéricos, 13 Cerdos Pelón Mexicano, 15 Landrace) y una población de jabalíes (40). En el caso del análisis de las variaciones genéticas ubicadas en la secuencia codificante, el número de cerdos se redujo a 100 ejemplares (40 jabalíes, 20 Landrace x Large White, 20 Ibéricos, 20 Cerdos Pelón Mexicano). En ambos casos, el estudio se desarrolló de forma global y separando a los individuos en dos grupos (Domésticos y Jabalíes).

Los resultados obtenidos en el estudio poblacional confirmaron la elevada variabilidad del gen *TLR5*, observándose altos niveles de polimorfismo tanto en el grupo de cerdos domésticos como en el grupo de jabalíes. Como puede apreciarse en la Figura 19, los datos obtenidos en el cálculo de las frecuencias alélicas para cada locus reveló que, con excepción del SNP2 y el SNP7, el resto de polimorfismos mostró frecuencias elevadas para su alelo menor, principalmente en aquellos localizados en la región promotora.

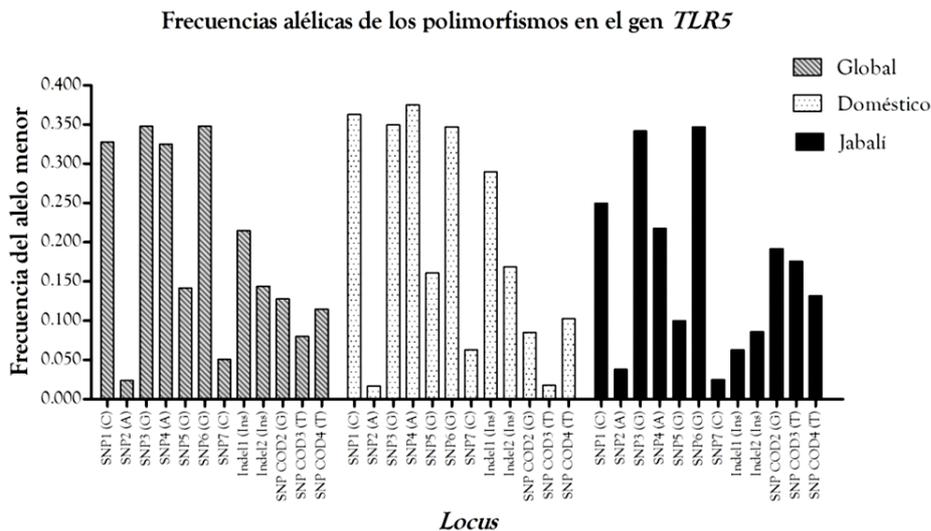


Figura 19. Frecuencias alélicas de las variaciones genéticas identificados en *TLR5*. La figura muestra el resultado del análisis global del cálculo de frecuencias, así como la comparación entre los grupos poblacionales. Entre paréntesis se muestra el alelo menor para cada polimorfismo.

De los resultados mostrados en la Figura 19 se deduce que las frecuencias del alelo menor en los SNP de la secuencia codificantes muestran un ligero incremento con respecto a las frecuencias observados en los cerdos domésticos. No se determinó en ningún caso la presencia de variaciones polimórficas exclusivas para alguna de las poblaciones estudiadas, tanto a nivel de variaciones promotoras como codificantes. En la Figura 19 se muestran los valores de frecuencias alélicas para cada uno de los polimorfismos analizados.

Los resultados del cálculo de frecuencias alélicas también permitieron determinar que en ambos Indel, las variantes menores correspondieron a la inserción de nucleótidos. Ambas inserciones fueron detectadas tanto en jabalíes como en el grupo de cerdos domésticos, con una mayor frecuencia en este último grupo. La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg indicó que los polimorfismos SNP1, SNP3 y SNP4 se encontraron en desequilibrio de ligamiento ($p < 0,05$).

Tabla 7. Valores de H_e , H_o , N_e y F_{ST} calculados en las poblaciones de cerdos domésticos y jabalíes (TLR5).

Locus	Domésticos			Jabalí			F_{ST}
	N_e	H_o	H_e	N_e	H_o	H_e	
TLR5 SNP1	1,861	0,345	0,463	1,600	0,395	0,375	0,015
TLR5 SNP2	1,035	0,035	0,034	1,078	0,075	0,072	0,004
TLR5 SNP3	1,835	0,350	0,455	1,819	0,263	0,450	0,000
TLR5 SNP4	1,882	0,369	0,469	1,517	0,333	0,341	0,030
TLR5 SNP5	1,370	0,230	0,270	1,220	0,200	0,180	0,008
TLR5 SNP6	1,829	0,435	0,453	1,835	0,400	0,455	0,000
TLR5 SNP7	1,133	0,125	0,117	1,051	0,050	0,049	0,008
Indel1	1,700	0,383	0,412	1,133	0,125	0,117	0,089
Indel2	1,391	0,191	0,281	1,187	0,103	0,158	0,015
TLR5 SNP COD2	1,184	0,169	0,155	1,451	0,385	0,311	0,024
TLR5 SNP COD3	1,036	0,035	0,034	1,408	0,243	0,290	0,072
TLR5 SNP COD4	1,228	0,207	0,185	1,296	0,263	0,229	0,002

N_e = Número efectivo de alelos. H_o = Heterocigosidad observada. H_e = Heterocigosidad esperada.

Los valores de heterocigosidad para cada uno de los loci, calculados en el estudio poblacional se muestran en la Tabla 7. Al comparar los promedios de H_e y

Ho entre los jabalíes y los cerdos domésticos no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (He $p=0,521$ /Ho $p=0,952$).

La población de jabalíes presentó un promedio de He= $0,252 \pm 0,040$ y de Ho= 0.2363 ± 0.03663 , mientras que el grupo de cerdos domésticos mostró un promedio de He= $0,277 \pm 0,049$ y Ho= 0.2395 ± 0.03933 . El valor promedio de F_{ST} entre los jabalíes y el grupo de cerdos domésticos fue de 0.022 ± 0.0084 , mientras que los porcentajes de varianza molecular obtenidos mediante la prueba AMOVA fueron de un 2% entre las poblaciones y 2% entre los individuos.

Como última parte del análisis poblacional, se realizó el cálculo de las diferentes combinaciones alélicas, detectándose un total de 24 diferentes haplotipos en la región promotora y 7 en la secuencia codificante, confirmando la alta variabilidad del gen TLR5 porcino. Tal como se puede observar en la Tabla 8, de los 24 haplotipos calculados en la región promotora, cinco se presentaron únicamente en la población de jabalíes y solo uno fue exclusivo del grupo de cerdos domésticos (CGTAAG+G+).

Por otra parte, en el caso de los haplotipos calculados en la secuencia codificante, únicamente el haplotipo GCT fue exclusivo de los jabalíes. Asimismo, cabe mencionar que en ningún caso se observaron bloques de haplotipos en el presente estudio.

Tabla 8. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en el gen *TLR5* porcino.

Región	Haplotipo	Frecuencia Global	Frecuencia	
			Jabalíes	Domésticos
Promotor	AGTGAA-G-	0,401	0,501	0,351
	CGGAAG+G-	0,099	0,023	0,134
	AGTGGA-G-	0,093	0,015	0,130
	CGGAAG+G+	0,070	-	0,096
	AGTGAA-C-	0,036	0,013	0,046
	AGGGAG-G-	0,035	0,080	-
	CGGAAG-G+	0,028	0,014	0,028
	CGTAAA-G-	0,020	0,014	0,035
	CGGAAG-G-	0,018	0,061	-
	CGTAAG-G+	0,017	0,020	0,017
	CGTGAA-G-	0,017	-	0,019
	AGGGAA-G-	0,016	-	0,030
	CGGGAG-G+	0,016	0,039	-
	CGTAAG+G-	0,015	0,016	-
	AGTAAA-G-	0,015	0,029	-
	CGGGAG-G-	0,014	0,040	-
	AATGGA-G-	0,013	0,013	0,013
	AGGGGG-G-	0,012	0,031	-
	CGTAAG+G+	-	-	0,016
	AGGGGA-G-	-	0,029	-
	CGTAAA+G-	-	0,023	-
	AATGAA-C-	-	0,013	-
AAGGAG-G+	-	0,013	-	
CGTAGG-G-	-	0,012	-	
Secuencia codificante	TCA	0,749	0,618	0,829
	GCA	0,101	0,161	0,068
	TCT	0,060	0,020	0,083
	TTT	0,037	0,088	0,010
	TTA	0,033	0,086	-
	GTT	0,010	-	-
	GCT	-	0,067	-

3.5 Estudio funcional de variaciones genéticas del promotor *TLR5* porcino.

El efecto teórico de la variación SNP6 -495A→G sobre la actividad promotora del gen *TLR5* porcino se evaluó mediante ensayos con el gen reportero luciferasa. El SNP6 -495A→G se eligió para ser examinado en base a su localización dentro de una secuencia de unión al factor de transcripción PPAR. Por otra parte, los cambios producidos en el patrón transcripcional, por la presencia de las dos variaciones de tipo Indel halladas en la secuencia promotora del gen *TLR5*, fueron

estudiados funcionalmente. La inserción de 23 pb en el Indel 1, crea un sitio diana para el factor STAT, mientras que la inserción de 5 pb en el Indel 2 genera otro sitio de unión a ZF02.

Los valores de expresión del gen reportero luciferasa obtenidos mediante el análisis de los fragmentos de la región promotora conteniendo las variantes alélicas del SNP6 -495A→G, no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p=0,9616$) entre ambas variantes alélicas: -495A ($137,9 \pm 14,45$) y -495G ($137,0 \pm 11,84$). No obstante, en ambos casos, las células transfectadas generaron ratios elevados de actividad luciferasa relativa, tal como puede observarse en la Figura 20.

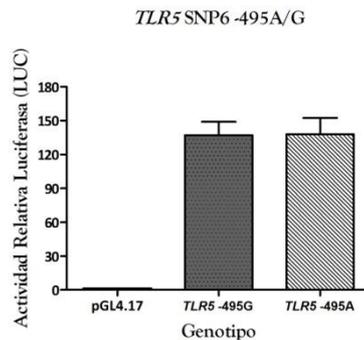


Figura 20. Análisis funcional del SNP6-495A→G (TLR5). Las columnas muestran la media y el error estándar de los valores de actividad luciferasa relativa para cada construcción.

Por otro lado, en lo que se refiere al estudio de las variaciones Indel, se observó que al comparar los ratios de expresión luciferasa obtenidos por cada una de las variantes alélicas del Indel 1, localizado en el fragmento promotor -965 a -427 (Figura 21), los valores presentaron un incremento altamente significativo ($p<0,0001$) en aquellas células transfectadas con la inserción de 23 nucleótidos (19.00 ± 0.4661) con respecto a aquellas células transfectadas con la delección de nucleótidos (9.253 ± 0.1732).

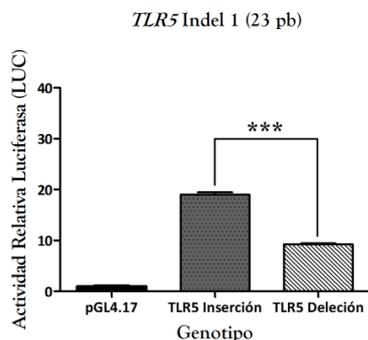


Figura 21. Análisis funcional de la variación *TLR5* Indel 1 (23pb). LA gráfica muestra los valores de actividad luciferasa generados por cada variante alélica del Indel 1, localizado en el fragmento comprendido entre las bases -965 a -427 de la región promotora del gen *TLR5* (***) $p < 0,0001$).

La Figura 22 muestra la media y el error estándar de los ratios de actividad luciferasa relativa obtenidos para cada variante del Indel 2. En ella se puede observar que el análisis funcional del Indel 2 arrojó un resultado similar a lo observado en el análisis del SNP6 -495A→G, ubicado dentro del mismo fragmento de la región promotora (-534 a +20). No observándose diferencias significativas ($p=0,8901$) en los niveles de actividad luciferasa relativa generados por la inserción de 5 pb (139.0 ± 6.682) con respecto a los niveles generados por la delección de 5 pb (137.0 ± 11.84),

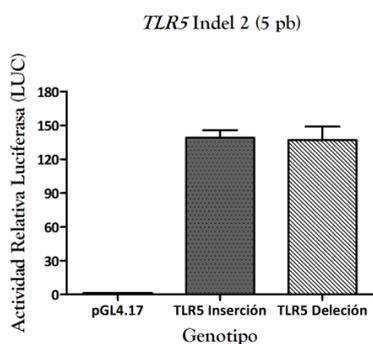


Figura 22. Análisis funcional de la variación *TLR5* Indel 2 (5 pb). La gráfica muestra los valores de actividad luciferasa relativa observadas en las células transfectadas con las variantes alélicas del Indel 2, localizado en el fragmento promotor -534 a +20 pb.

3.6 Análisis funcional del polimorfismo en la secuencia codificante del gen *TLR5*.

A fin de entender de qué forma interviene el polimorfismo sobre la función receptora de la proteína TLR5, se midió la actividad luciferasa generada por las cada una de variantes alélicas del SNP COD3 +1272C→T (TLR5 P402L). Para lograr esto, células HEK293T fueron transfectadas con construcciones recombinantes diseñadas en un vector de expresión pcDNA4.1+, conteniendo la secuencia codificante del gen *TLR5* con cada uno de los puntos de variación genómica. Posteriormente, las células transfectadas fueron estimuladas con el ligando natural de TLR5, la proteína flagelina, así como también con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada.

Los resultados obtenidos en el primer ensayo, utilizando el ligando flagelina, revelaron una diferencia significativa ($p=0,0186$) en los ratios de actividad luciferasa generados por las variantes alélicas del SNP COD3, observándose una disminución de la actividad luciferasa en aquellas células transfectadas con la variante TLR5 402L (80.50 ± 3.522) con respecto a las células transfectadas con la variante TLR5 402P (95.01 ± 1.404), como se muestra en la Figura 23.

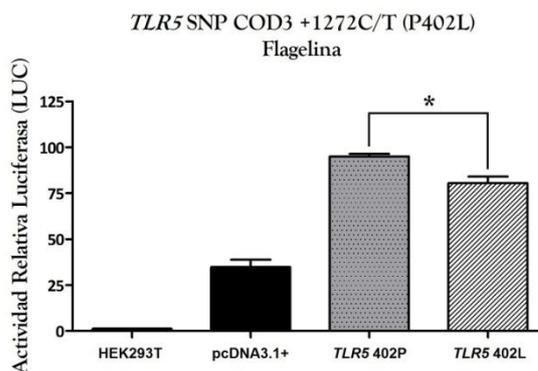


Figura 23. Ensayo funcional del polimorfismo TLR5 SNP COD3 +1272C→T (Flagelina). Ratios de actividad luciferasa relativa mostrados por las células HEK293T transfectadas con las variantes alélicas del SNP COD3 +1272C→T, estimuladas con flagelina.

Por otra parte, cuando las células transfectadas fueron estimuladas utilizando la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada, se observó un resultado similar al obtenido mediante el estímulo de las células transfectadas con el ligando flagelina. Tal como se muestra en la Figura 24, la presencia de la variante alélica TLR5 402L (+1272T), localizada en el dominio LRR7 del receptor TLR5, provoca una reducción significativa ($p= 0,0224$) de la actividad luciferasa relativa (77.63 ± 5.277) con respecto a la actividad generada en aquellas células transfectadas con la variante alélica +1272C (TLR5 402L), la cual mostró un valor de 103.8 ± 4.953 .

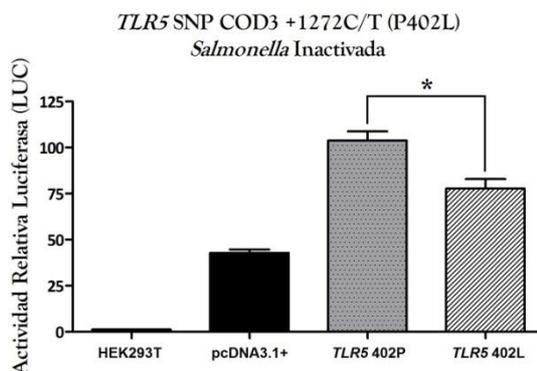


Figura 24. Ensayo funcional del polimorfismo TLR5 SNP COD3 +1272C→T (*Salmonella typhimurium* inactivada). Media y error estándar de la actividad luciferasa relativa mostrada por las células transfectadas con las variantes alélicas del SNP COD3 +1272C→T, estimuladas con la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* DT 104 inactivada.

4 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN GENES *NLR* PORCINOS

4.1 Análisis de las regiones promotoras de los genes *NOD1* y *NOD2*.

Un fragmento de cada región 5' flanqueante de los genes *NOD1* y *NOD2* porcinos fueron sometidas a su análisis mediante herramientas bio-informáticas, con la finalidad de identificar los mecanismos de regulación transcripcional, así como los elementos implicados en la actividad promotora de los genes *NOD1* y *NOD2*. Es importante mencionar que al momento de realizar el presente estudio, no se encontraron datos referentes a la ubicación cromosómica del gen *NOD2* porcino, siendo la secuencia genómica provisional GL896416-1 de la base de datos *USCS Genome Browser* la única referencia obtenida para el análisis *in silico*.

En *NOD1*, un total de 1018 pb de la región promotora fueron evaluadas, dicho fragmento se localizó entre las coordenadas 46955580 - 46956598 del cromosoma 18, inmediatamente superior al inicio del primer exón no codificante del gen *NOD1* y a una distancia aproximada de 32 Kb del codón de inicio de la traducción (referencia *Ensembl*: ENSSSCG00000016678). En el caso de *NOD2*, el fragmento de ADN estudiado en el presente trabajo, se determinó mediante el análisis de alineamiento con el promotor *NOD2* humano, obteniéndose un porcentaje de identidad nucleotídica entre las regiones porcina y humana del 67,2%. Las 507 pb de la región promotora del gen *NOD2* seleccionadas para su análisis bio-informático, se ubicaron entre las base -2268 a -2774 río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG).

El análisis de las secuencias reveló diferencias en el repertorio de elementos de *cis*-regulación entre los promotores de ambos genes. En el promotor *NOD1* se observó la presencia de una isla CpG (contenido de GC: 73,8% - Tamaño: 393 pb), localizada en la región comprendida entre los nucleótidos -44 a -436. Además, se detectaron múltiples motivos GC-Box dentro de la isla CpG predicha, así como un

sitio de unión al elemento de regulación TFIID en la posición -650 a -688, y tres sitios para el elemento TFIIIB en las posiciones -37 a -43 / -51 a -57 / -209 a -215. Por el contrario, el promotor *NOD2* mostró un reducido contenido de GC (54,6%), y la ausencia de posibles islas CpG, además de carecer de motivos GC-Box y sitios diana para elementos de regulación basal TFII.

Por otro lado, en ninguno de los dos promotores se encontraron evidencias de secuencias TATA-Box o CAAT-Box, a pesar de la relevancia de estos elementos en la activación de la transcripción.

Dentro de los hallazgos más relevantes observados mediante el análisis del promotor *NOD1*, se encuentra la identificación de un gran número de secuencias diana para factores estrechamente vinculados con la activación basal de la transcripción, localizados en la porción más cercana al inicio del primer exón, entre los que se destacan los siguientes: SP1, NRF, CEBP, E2FF and ETSF (Figura 25).

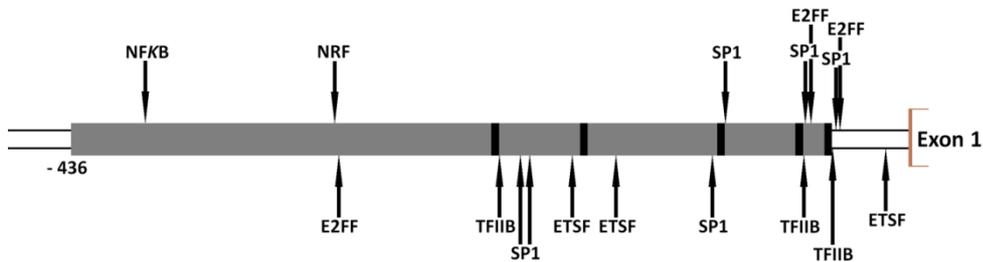


Figura 25. Isla CpG del promotor *NOD1*. Esquematización de la Isla CpG y los elementos de cis-regulación detectados en la región cercana al inicio del primer exón. Las áreas en color negro representan los motivos GC-Box identificados.

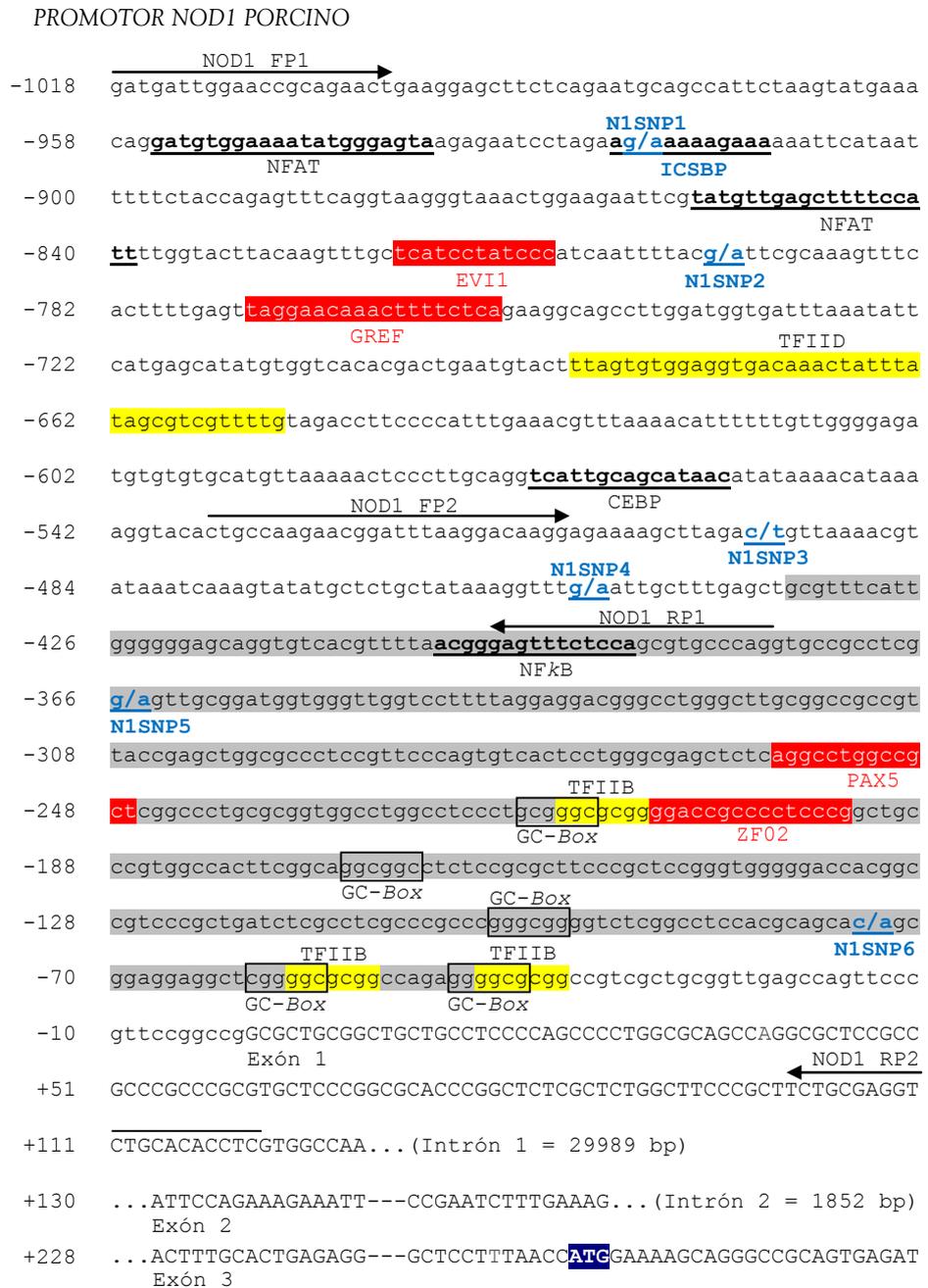


Figura 26. Región promotora del gen NOD1 porcino. Las flechas indican la localización de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia promotora. Los principales sitios de unión a factores de transcripción se muestran en negritas y subrayados. En rojo se señalan aquellos posibles sitios de

a factores transcripcionales altamente conservados entre los promotores humano y porcino. Los SNP identificados se señalan en letras azules.

Por otro lado, entre los posibles sitios de unión a factores transcripcionales involucrados en la función inmunológica presentes en el promotor *NOD1*, se encontraron los sitios de unión a NFκB, NFAT, EVI1, GREF, PAX5, ZF02 y MYBL, algunos de los cuales se encuentran conservados entre los promotores humano y porcino (Figura 26). Finalmente, el análisis comparativo de las regiones 5' flanqueantes de los genes *NOD1* porcino y humano reveló también un alto grado de homología entre ambas secuencias, observándose un porcentaje de identidad nucleotídica del 66,5%.

4.2 Identificación de variaciones polimórficas en los genes *NLR* porcinos.

Se encontraron 6 variaciones de tipo SNP en la secuencia promotora del gen *NOD1*, y 3 SNPs en el promotor *NOD2*. La representación esquemática de los puntos de variación polimórfica identificados en ambos genes se muestra en la Figura 28. En el caso de *NOD1*, de los seis polimorfismos detectados, cinco fueron transiciones y uno fue una transversion de nucleótidos. Adicionalmente, se observó que la presencia de la variante alélica -920A del SNP1 provoca la pérdida de un sitio de unión al factor de transcripción ICSBP (Figura 26).

Por otra parte, las tres variaciones detectadas en el promotor *NOD2* se trataron de transiciones de nucleótidos. Es importante mencionar que en este caso la nomenclatura usada para clasificar cada SNP se realizó tomando como referencia el primer nucleótido adyacente al codón de inicio de la traducción (ATG), identificándose como -1, debido a que no existen reportes del sitio exacto de inicio de la transcripción (Figura 28).

De los tres SNP detectados, se observó que el SNP3 -2393G→A crea un nuevo sitio de unión a CEBP a partir de un sitio de unión a GATA, tal como se indica en la Figura 27.

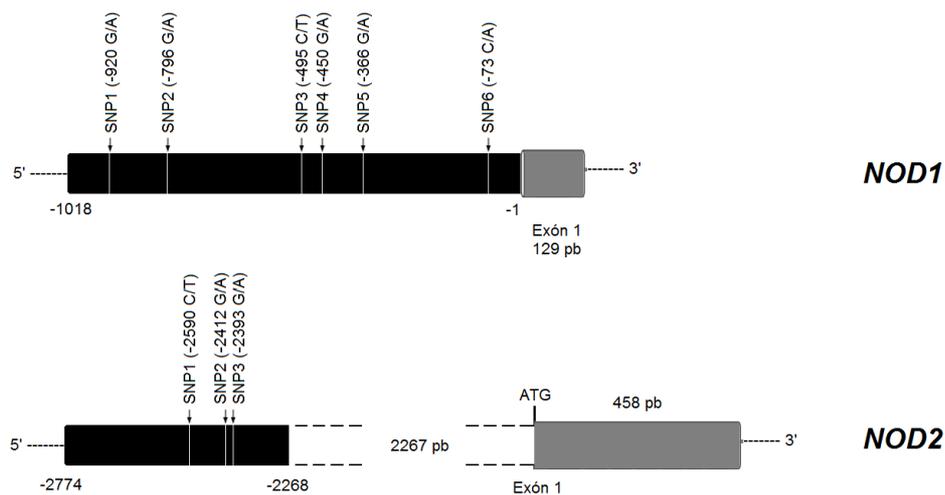


Figura 28. Representación esquemática de los promotores *NOD1* y *NOD2* porcinos, en ella se indican los puntos de variación polimórfica identificados en cada una de las secuencias.

En el caso de la identificación de polimorfismos en las secuencias codificantes, en el gen *NOD1* se lograron detectar únicamente dos polimorfismos, de los cuales uno correspondió a una transición de nucleótidos que ocasiona una mutación silenciosa SNP COD2 +475C→T (N47N), mientras que el otro, una transición en el nucleótido +372, produjo una mutación no sinónima (SNP COD1 +372C→T) que dio origen al cambio del aminoácido 13 prolina por leucina. No obstante, de acuerdo con el análisis predictivo de la proteína *NOD1*, este cambio de aminoácido ocurre fuera del dominio efector CARD.

La Figura 29 ilustra la estructura de la proteína *NOD1* y la localización de las variaciones encontradas.

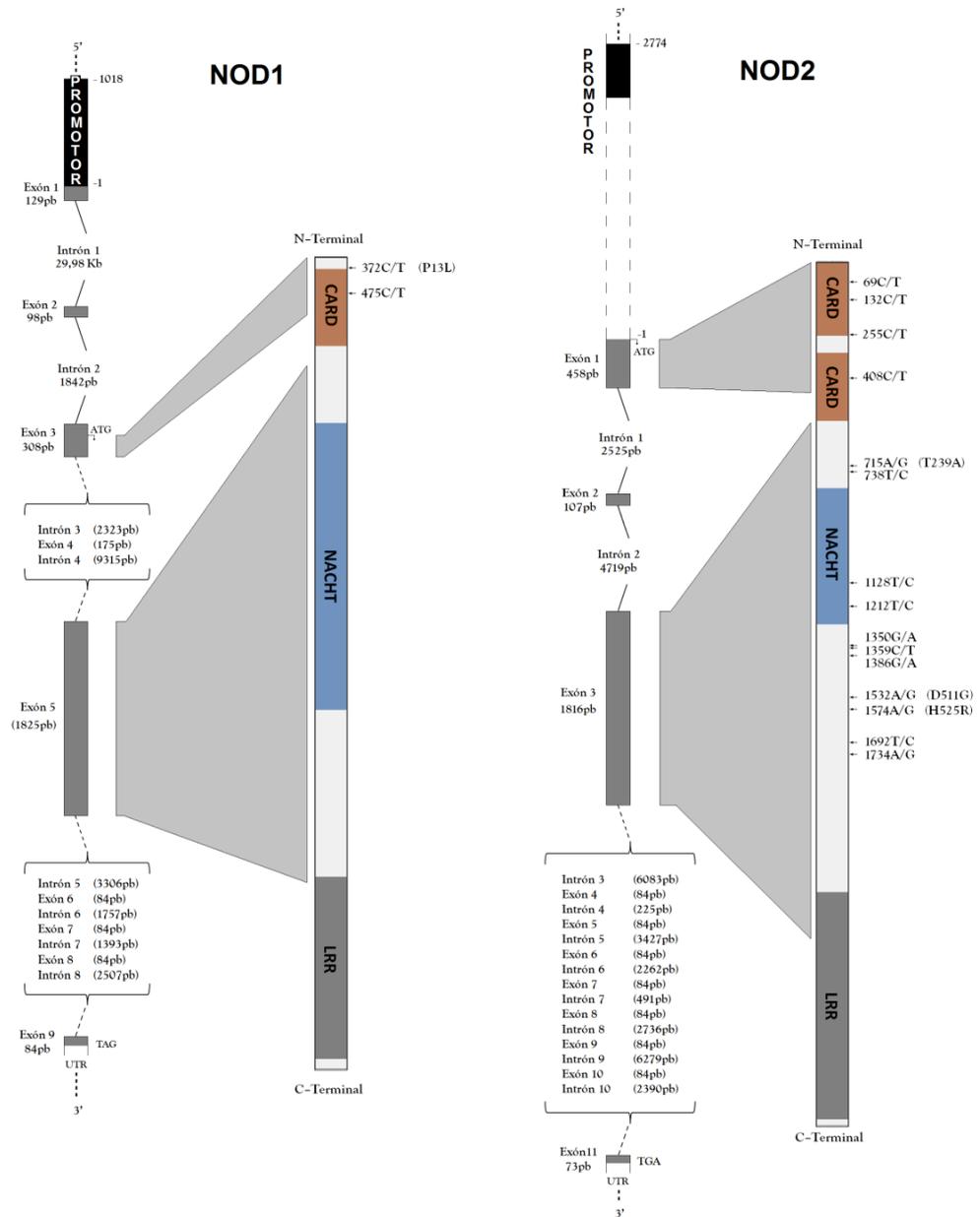


Figura 29. Representación esquemática de la estructura genómica y proteica de los receptores NOD1 y NOD2, en ella se muestra la localización de los polimorfismos detectados en las secuencias codificantes. El diagrama representa la estructura del gen con la zona codificada por cada exón estudiado. Los dominios efectores de reclutamiento de caspasas se muestran en color marrón. Los dominios de oligomerización de nucleótidos se señalan en azul y los dominios LRR en gris.

Por otra parte, el análisis de la secuencia codificante reveló la existencia de un alto nivel de variabilidad genética en el gen *NOD2* porcino, tal como puede observarse en la Figura 29, donde se muestra el diagrama estructural de la proteína codificada por el gen *NOD2* porcino, así como la localización de las variaciones identificadas dentro de la secuencia.

En total se detectaron 15 SNP, de los cuales tres correspondieron a mutaciones no sinónimas. No obstante, de acuerdo con el análisis *in silico*, ninguna de ellas se ubicó en zonas de relevancia funcional para el receptor *NOD2*. Cabe mencionar que en el presente estudio solo se analizaron las regiones correspondientes a los exones codificantes 3, 5 (*NOD1*) y 1, 3 (*NOD2*) debido a la escasa información reportada para estos genes.

4.3 Estudio poblacional del polimorfismo detectado en los genes *NLR*.

Para el estudio poblacional del polimorfismo, se utilizaron todas las variaciones identificadas en las regiones promotoras y en el caso de los polimorfismos hallados en las secuencias codificantes, únicamente las cuatro mutaciones no sinónimas detectadas en los genes *NOD1* (SNP COD1 P13L) y *NOD2* (SNP COD5 T239A, SNP COD12 D511G y SNP COD13 H525R), fueron empleadas para el estudio poblacional, debido a su capacidad para inducir un cambio de aminoácido dentro de la estructura de la proteína. En total, 104 muestras de ADN procedentes de animales pertenecientes a 5 poblaciones porcinas fueron utilizados para realizar el estudio poblacional, los animales se estudiaron de forma global y divididos en dos grupos poblacionales (30 Jabalíes/74 Domésticos).

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos del cálculo de frecuencias alélicas para cada uno de los *loci* SNP detectados en los genes *NOD1* y *NOD2*, donde se observa claramente la escasa variabilidad genética de los *NLR* en la población de jabalíes, detectándose solamente cuatro *loci* polimórficos de los trece

identificados. De manera general, los valores de las frecuencias obtenidas para el alelo menor en cada uno de los *loci* estudiados, revelaron un mayor grado de polimorfismo en la población de cerdos domésticos tanto a nivel de la región promotora como de la secuencia codificante de los genes *NLR*.

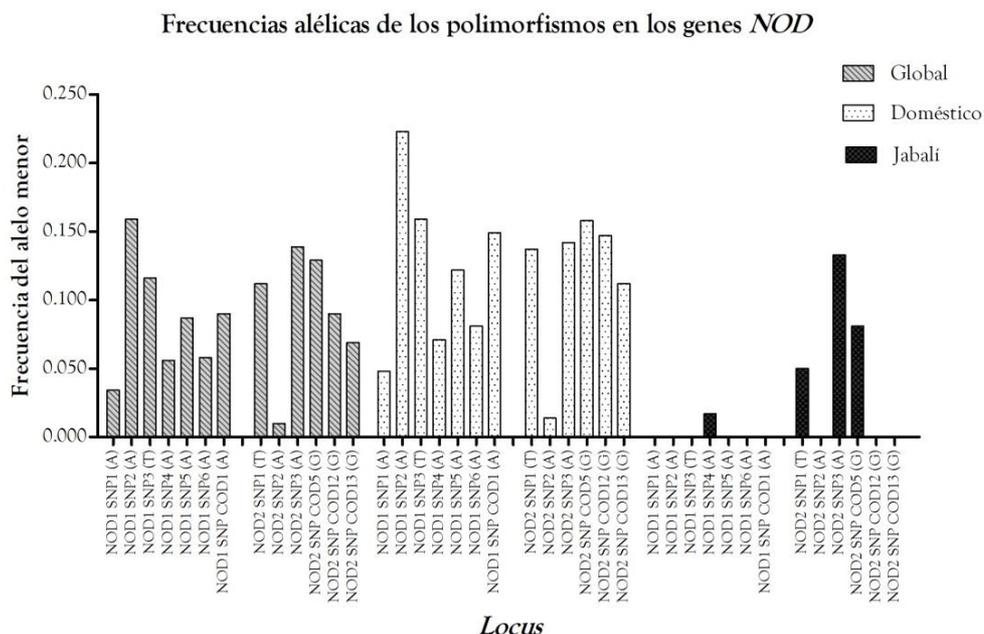


Figura 30. Frecuencia del alelo menor de los polimorfismos en los genes *NLR* porcinos. Los resultados mostrados corresponden al análisis global y a las frecuencias por grupos poblacionales.

La búsqueda de alelos privados indicó que las variaciones genéticas: *NOD1* (SNP1, SNP2, SNP3, SNP5, SNP6, SNP COD1) y *NOD2* (SNP2, SNP COD12, SNP COD13) son exclusivas de los cerdos domésticos. En el caso de la población de cerdos domésticos, las frecuencias del alelo menor fluctuaron entre 0,014 (*NOD2* SNP2) a 0,223 (*NOD1* SNP2), mientras que en el análisis global las frecuencias variaron entre 0,010 (*NOD2* SNP2) a 0,159 (*NOD1* SNP2).

La prueba de equilibrio Hardy-Weinberg reveló que a excepción de los SNPs: *NOD1* SNP2, *NOD2* SNP2, *NOD2* SNP3, *NOD2* SNP COD5 y *NOD2* SNP

COD12, el resto de *loci* mostraron valores significativos ($p < 0,05$) y por tanto se encontraron en desequilibrio.

En lo referente a los valores de heterocigosidad y número efectivo de alelos, se observaron marcadas diferencias entre las poblaciones de jabalíes y cerdos domésticos (Tabla 10), obviamente influenciadas por la casi escasa presencia de *loci* polimórficos en jabalíes. En los cerdos domésticos los valores promedio de H_e y H_o fueron de: $H_e = 0,208 \pm 0,034 / H_o = 0,141 \pm 0,043$ (NOD1) y $H_e = 0,204 \pm 0,0365 / H_o = 0,173 \pm 0,0370$ (NOD2), mientras que en los jabalíes los valores medios fueron bajos en todos los casos: $H_e = 0,004 \pm 0,004 / H_o = 0,004 \pm 0,004$ (NOD1) y $H_o = 0,077 \pm 0,046 / H_e = 0,079 \pm 0,040$ (NOD2).

Un resultado similar se observó en los valores medios del número efectivo de alelos, donde los cerdos domésticos presentaron valores de $N_e = 1,277 \pm 0,056$ (NOD1), $1,267 \pm 0,051$ (NOD2) y los jabalíes de $1,005 \pm 0,005$ en NOD1 y $1,097 \pm 0,0503$ en NOD2.

Los resultados del cálculo de heterocigosidad, número efectivo de alelos y F_{ST} en el total de individuos, así como en el análisis comparativo de los grupos poblacionales domésticos y jabalíes se muestran de forma detallada en la Tabla 9.

El valor de diferenciación genética expresado como F_{ST} para el total de los 7 *loci* analizados en el gen NOD1 fue de $0,060 \pm 0,017$, mientras que el valor medio de F_{ST} para el total de los 6 SNP analizados en el gen NOD2 fue de $0,030 \pm 0,0129$, resaltando que en el caso del SNP3, con una frecuencia superior a 0,130 en jabalíes y cerdos domésticos, mostró un F_{ST} de 0,0 entre ambos grupos poblacionales.

Tabla 9. Valores de H_e , H_o , N_e y F_{ST} entre los cerdos domésticos y jabalíes (*NOD1* y *NOD2*).

Gen	Locus	Domésticos			Jabalí			F_{ST}
		N_e	H_o	H_e	N_e	H_o	H_e	
<i>NOD1</i>	SNP1	1,100	0,041	0,091	1,000	0,000	0,000	0,025
	SNP2	1,530	0,365	0,347	1,000	0,000	0,000	0,125
	SNP3	1,366	0,087	0,268	1,000	0,000	0,000	0,087
	SNP4	1,153	0,057	0,133	1,035	0,034	0,034	0,017
	SNP5	1,272	0,162	0,214	1,000	0,000	0,000	0,065
	SNP6	1,175	0,081	0,149	1,000	0,000	0,000	0,042
	SNP COD1	1,340	0,193	0,254	1,000	0,000	0,000	0,081
<i>NOD2</i>	SNP1	1,310	0,164	0,236	1,105	0,033	0,095	0,022
	SNP2	1,027	0,027	0,027	1,000	0,000	0,000	0,007
	SNP3	1,322	0,284	0,244	1,301	0,267	0,231	0,000
	SNP COD5	1,363	0,217	0,267	1,175	0,162	0,149	0,014
	SNP COD12	1,334	0,224	0,250	1,000	0,000	0,000	0,079
	SNP COD13	1,248	0,121	0,199	1,000	0,000	0,000	0,059

N_e = Número efectivo de alelos. H_o = Heterocigosidad observada. H_e = Heterocigosidad esperada.

Por otro lado, el análisis de varianza (AMOVA), realizado sobre cada una de las regiones promotoras de los genes *NLR*, así como en la secuencia codificante del gen *NOD2* (Figura 31), indicó que el porcentaje de variación genética determinado por las diferencias entre las poblaciones correspondió al 9% en el promotor *NOD1*, disminuyendo hasta el 1% en el promotor *NOD2*, e incrementó hasta el 7% en la secuencia codificante de *NOD2*.

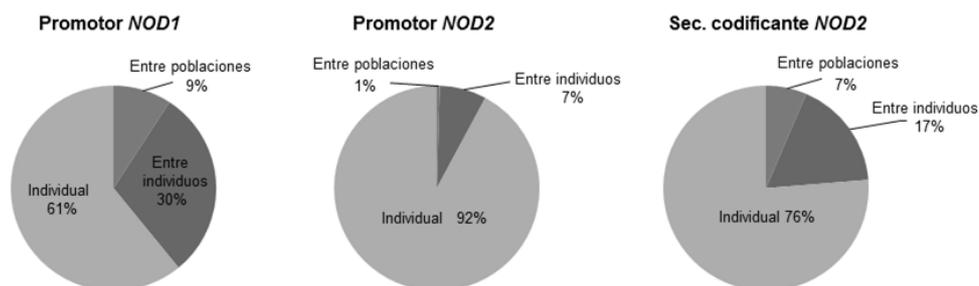


Figura 31. Análisis de varianza molecular entre cerdos domésticos y jabalíes (*NOD1* y *NOD2*). Resultado de la prueba de AMOVA realizada en cada región genómica estudiada entre los dos poblacionales.

Finalmente, el análisis poblacional reveló la existencia de 10 haplotipos en las región promotora de *NOD1* y 4 en el promotor *NOD2*, y un total de 6 diferentes haplotipos en la secuencia codificante del gen *NOD2*. En la Tabla 10 se pueden observar las combinaciones alélicas calculadas en cada caso, así como sus frecuencias en las poblaciones.

Tabla 10. Haplotipos y frecuencias haplotípicas en *NOD1* y *NOD2*.

Gen	Región	Haplotipo	Frecuencia Global	Frecuencia	
				Domésticos	Jabalíes
<i>NOD1</i>	Promotor	GGCGGC	0,401	0,592	0,983
		GACGGC	0,099	0,182	-
		GGTAAA	0,093	0,054	-
		GGTGCC	0,070	0,035	-
		GGCGAC	0,036	0,036	-
		AGCGGC	0,035	0,030	-
		GATAAA	0,028	0,020	-
		GGTAGC	0,020	-	-
		GATGGC	0,018	0,014	-
AGTGGC	0,017	0,014	-		
<i>NOD2</i>	Promotor	CGG	0,774	0,743	0,842
		CGA	0,121	0,120	0,115
		TGG	0,093	0,115	0,042
		TAA	-	0,014	-
	Secuencia codificante	AAA	0,838	0,791	0,919
		GAA	0,055	0,035	0,081
		GGG	0,047	0,077	-
		GGA	0,026	0,043	-
		AAG	0,016	0,027	-
		AGA	0,012	0,019	-

De los 10 diferentes haplotipos calculados en el promotor *NOD1*, la combinación GGCGGC fue la más frecuente entre los dos grupos poblacionales, mientras que de las nueve restantes, ocho fueron únicas para la población de cerdos domésticos, confirmando la elevada variabilidad del promotor *NOD1* en dichos ejemplares con relación a los jabalíes. En el caso de los haplotipos calculados en *NOD2*, solamente una de las combinaciones alélicas observadas en la región promotora se presentó de forma exclusiva en la población de cerdos domésticos

(TAA). Por otra parte, en la secuencia codificante, la población de jabalíes mostró únicamente dos haplotipos (AAA= 0,919/GAA= 0,081), mientras que en los cerdos domésticos el 79% de las frecuencias haplotípicas recayó en la combinación AAA, repartiéndose el 21% faltante entre las cinco combinaciones alélicas restantes (Tabla 10).

Por último, el análisis de desequilibrio de ligamiento arrojó valores significativos entre ninguno de los polimorfismos. Por consiguiente, no se lograron determinar bloques haplotípicos entre los SNP identificados. Aquellos haplotipos con una frecuencia menor al 1% fueron excluidos del presente estudio.

4.4 Análisis funcional de polimorfismo situado en las regiones promotoras de los genes *NOD1* y *NOD2* porcinos.

Se realizó el análisis funcional de dos polimorfismos identificados en las regiones promotoras de los genes *NOD1* y *NOD2*. Los SNP *NOD1* -920G→A y *NOD2* -2393G→A fueron seleccionados debido a que afectan la secuencia de unión a factores de transcripción en los promotores de dichos genes. Los niveles de actividad luciferasa generados por las células CHO transfectadas con construcciones de ADN recombinante conteniendo los fragmentos promotores con cada una de las variantes alélicas de los SNP seleccionados, fueron medidos y comparados para determinar la funcionalidad del polimorfismo.

Los resultados obtenidos en el análisis del SNP1 -920G→A, localizado en un sitio de unión al factor transcripcional ICSBP dentro del promotor *NOD1*, indicaron que la variante alélica -920A reduce significativamente ($p=0,0107$) la expresión del gen reportero luciferasa en las células CHO ($6,473 \pm 0,6906$), con respecto al valor de expresión observado en las células transfectadas con la variante alélica -920G ($10,32 \pm 0,4980$). En la Figura 32 se ilustran con más detalle los resultados obtenidos en el análisis funcional del SNP1 -920G→A.

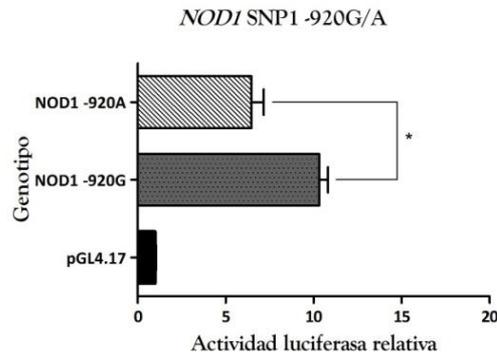


Figura 32. Análisis funcional de la variación *NOD1* SNP1 -920G→A. Comparación de los valores de actividad luciferasa relativa generados por las variantes alélicas del polimorfismo (* $p < 0,05$).

Por otro lado, en la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos en el análisis del efecto potencial del polimorfismo SNP3 -2393G→A sobre la actividad promotora del gen *NOD2* porcino. La variante alélica minoritaria -2393A, que genera un sitio de unión al factor transcripcional CEBP, ocasionó un incremento significativo ($p = 0,0201$) en la expresión del gen reportero luciferasa ($16,13 \pm 1,450$) en aquellas células transfectadas con dicha construcción, en relación con los niveles de expresión mostrados por las células transfectadas con la variante alélica mayoritaria -2393G ($10,36 \pm 0,5239$), la cual conserva el sitio de unión al factor de transcripción GATA.

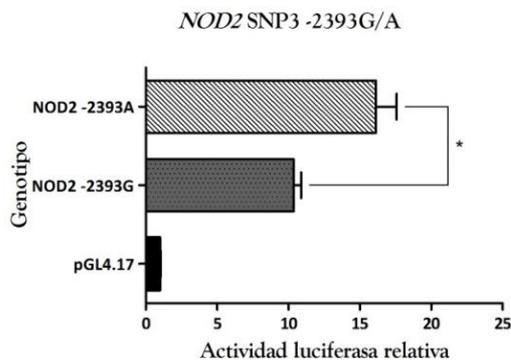


Figura 33. Análisis funcional de la variación *NOD2* SNP3 -2393G→A. Comparación de los valores de actividad luciferasa relativa generados por las variantes alélicas del SNP (* $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los receptores del sistema inmune innato desempeñan un papel vital dentro del organismo, al detectar de forma oportuna una gran variedad de componentes estructurales altamente conservados en los microorganismos patógenos, desencadenando una cascada de señalización intracelular que permite al organismo hospedador generar una respuesta antimicrobiana.

De los receptores inmunes innatos identificados en la actualidad, las moléculas TLR2, TLR4, TLR5, NOD1 y NOD2 resultan de gran interés debido a su capacidad para reconocer diversos patrones moleculares de la inmensa mayoría de bacterias Gram- y Gram+. Asimismo, gracias a su ubicación celular, los TLR y NLR establecen dos líneas de defensa antimicrobiana. La primera, de tipo extracelular está representada por los TLR 2, 4 y 5, mientras que la segunda línea de defensa está representada por los receptores intracelulares NOD1 y NOD2, permitiendo detectar cualquier patógeno aún cuando este sea capaz de evadir el reconocimiento extracelular. Es por esta razón que el análisis de las variaciones genéticas presentes en cada uno de los receptores inmunitarios innatos resulta esencial para comprender y determinar los patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades entre las poblaciones porcinas.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se llevó a cabo el análisis predictivo de las regiones promotoras de los genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *NOD1* y *NOD2*, indicándose los posibles mecanismos de regulación transcripcional. Posteriormente se realizó la búsqueda de variaciones genéticas en las regiones promotoras y secuencias codificantes de los genes *TLR* y *NLR*. Los polimorfismos identificados se analizaron poblacionalmente en cerdos domésticos y jabalíes con el objetivo de determinar las diferencias en los patrones de variabilidad genética entre ambos grupos poblacionales. Finalmente, se evaluó el efecto potencial de una serie de polimorfismos sobre la expresión génica y la función de reconocimiento de patógenos de las proteínas receptoras.

1 ELEMENTOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN LOS PRR.

Como parte inicial del estudio del polimorfismo en los genes *TLR* y *NLR*, se realizó el análisis predictivo de los elementos *cis*-reguladores presentes en las regiones promotoras de cada uno de los genes examinados, confirmando su funcionalidad como promotor de la expresión génica en cada caso.

Los resultados obtenidos en el análisis predictivo revelaron la presencia de elementos transcripcionales comunes entre las cinco regiones promotoras estudiadas, pero también, la existencia de elementos *cis*-reguladores particulares en cada uno de los genes, sugiriendo que la actividad transcripcional de cada gen está regulada mediante la formación de diferentes complejos transcripcionales, pero con algunos elementos de regulación inducibles comunes, involucrados en la respuesta inmune.

1.1 Regulación de *TLR2* porcino dependiente de SP1.

Entre los descubrimientos más relevantes realizados en la región promotora del gen *TLR2* porcino, resaltan los múltiples sitios de unión a factores SP1 (proteína estimuladora 1) y KLF (factor Krüppel) adyacentes a elementos GC-Box, todos ellos situados en la porción más cercana al inicio del primer exón, entre las bases -70 a -1. Esta porción del promotor *TLR2* porcino mostró además un incremento en el contenido de GC (68%: -100 a -1 pb) con respecto a lo observado en el resto de la secuencia promotora, lo que en conjunto sugiere que el núcleo de la región promotora del gen *TLR2* se localiza en esta zona rica en GC, siendo la regulación de la expresión génica de tipo dependiente de la activación por SP1 (Figura 1).

En este sentido, el mecanismo de regulación dependiente de la activación por SP1 ha sido reportado previamente en algunos genes como en el caso del gen *VEGF* (Vascular endothelial growth factor), un factor angiogénico cuya región

promotora proximal presenta múltiples sitios de unión a SP1 y en el cual se ha observado que sus niveles de expresión están altamente correlacionados con la expresión de SP1 a nivel celular (Shi *et al.*, 2001). Otros autores han reportado que el factor transcripcional ubicuo SP1 es capaz de estimular la transcripción de una amplia gama de genes en mamíferos (Lania *et al.*, 1997, Safe y Abdelrahim, 2005), como en el caso de las quinasas Ku70 y Ku80, cuya expresión constitutiva es regulada mediante el reconocimiento e interacción del factor transcripcional SP1 con las regiones promotoras proximales ricas en GC de dichos genes (Hosoi *et al.*, 2004).

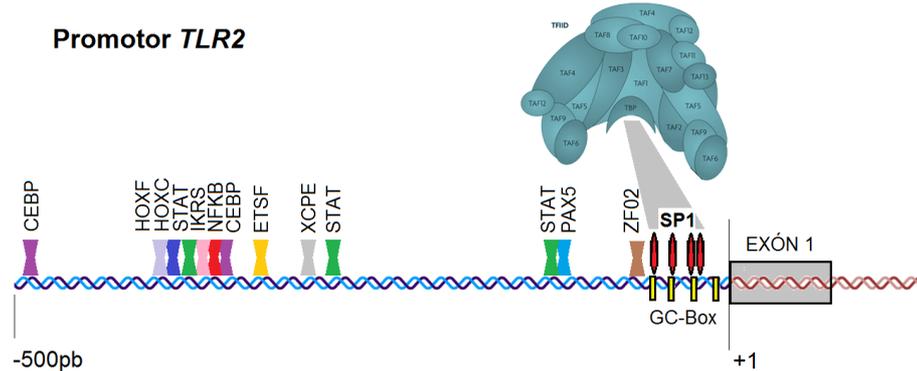


Figura 1. Regulación de la actividad transcripcional de *TLR2* porcino. En la figura se muestra el fragmento del promotor comprendido entre las bases -1 a -500 , en él se indica el sitio de unión sugerido para el completo transcripcional basal del promotor *TLR2* (zona gris), así como los diferentes elementos de regulación inducibles presentes en la región más cercana al inicio de la transcripción.

Otro dato revelador de la importancia del factor SP1 como activador de la expresión génica, radica en que SP1 es capaz de interactuar directamente con factores asociados a TBP (TAFs) y otros co-factores nucleares de transcripción basal (Safe y Abdelrahim, 2005), reclutando los componentes del complejo pre-iniciador de la transcripción. Por otro lado, la presencia de sitios de unión a KLF en la región promotora del gen *TLR2*, podría representar un mecanismo de regulación negativa, reprimiendo la expresión génica, ya sea mediante interacciones represoras proteína-

proteína, o bien al competir con el factor SP1 por los sitios diana (Manley *et al.*, 1996, Cao *et al.*, 2005).

La identificación de factores transcripcionales inducibles, relacionados con la respuesta inmune (STAT, CEBP, IKRS, PAX5, ETSF, HOXC, HOXF, ZF02, NFκB), sugiere que dichos factores representan elementos de regulación variable, debido a su naturaleza inducible y a su capacidad de interactuar funcionalmente con el complejo SP1/GC-*Box*/TAFs, como en el caso de la interacción SP1-NFκB rico en G, descrito en el gen CYP3A7 (Saito *et al.*, 2001), activando de forma sinérgica la transcripción de los genes diana, pudiendo variar dependiendo del factor que interactúe con el complejo (Bouwman y Philipsen, 2002), proporcionando flexibilidad a la expresión del génica.

1.2 El elemento TBP/TFIID como principal activador de la expresión del gen *TLR4*.

En lo referente al análisis predictivo de la región promotora del gen *TLR4* porcino, al resultado reveló un alto contenido de AT en la secuencia analizada, algo usual en genes regulados por la secuencia canónica TATA-*Box*. Sin embargo, al igual que en el promotor *TLR4* humano, donde se ha reportado la ausencia del elemento TATA-*Box* (Lichtinger *et al.*, 2007), el promotor *TLR4* porcino carece de dicho elemento. En cambio, cuenta con una atípica secuencia TBP asociada al factor transcripcional general TFIID, en la porción cercana al inicio del primer exón (-61 a -52), sugiriendo que las funciones del elemento TATA-*Box* en *TLR4* porcino son realizadas por esta atípica secuencia TBP relacionada con el factor TFIID.

La existencia de una secuencia TBP/TFIID cercana al inicio del primer exón sugiere que dicho elemento representa el componente principal para el reclutamiento de los elementos que componen la maquinaria de transcripción basal en la región promotora del gen *TLR4* porcino, ya que se ha reportado que la

presencia de una secuencia TBP cercana al sitio de inicio de la transcripción es suficiente para activar la maquinaria transcripcional mediante el reclutamiento de la proteína de unión a TATA y TAFs, en promotores carentes de TATA-Box (Manley *et al.*, 1996). La interacción de TBP/TFIID con la secuencia promotora provoca el reclutamiento de los elementos del complejo transcripcional TFIIB, TFIIF y la holoenzima ARN polimerasa II (Cooper, 2000), sugiriendo que la secuencia TBP/TFIID desempeña un papel fundamental en la activación de la transcripción del gen *TLR4* porcino (Figura 2).

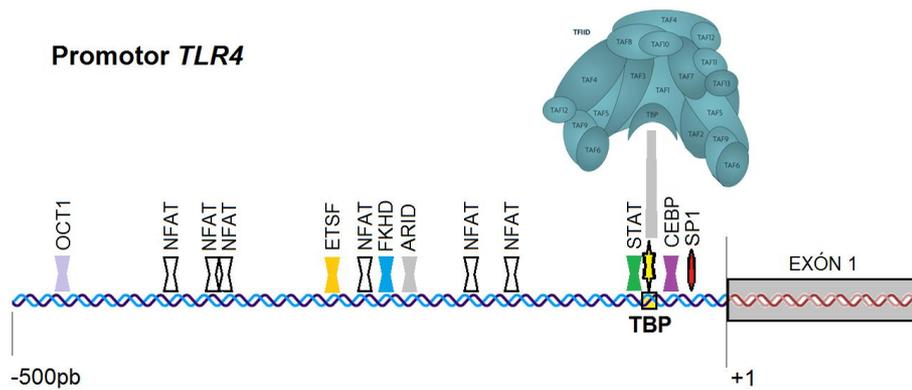


Figura 2. Regulación de la actividad transcripcional de *TLR4* porcino. La figura muestra la localización del elemento TBP/TFIID sugerido como el sitio de reclutamiento del complejo transcripcional basal externo al promotor *TLR4*.

Por otro lado, la identificación de sitios de unión a otros factores de transcripción específicos (NFAT, CEBP, STAT), cercanos a la secuencia TBP, además de las secuencia diana para factores relacionados con la regulación del sistema inmune (AP1, IKRS, ETSF, ARID, FKHD, NFκB), indican que estos elementos podrían ser los encargados de mediar la asociación de TBP al promotor, mediante su interacción con la secuencia de ADN y otros elementos reguladores, como en el caso del factor ETSF capaz de interactuar con AP1 para mediar la expresión génica (Sakurai *et al.*, 2013), o el factor NFAT, del cual se observaron un gran número de sitios diana, capaz de interactuar con otros factores tales como

OCT1, AP1 y CEBP para formar un complejo potenciador (enhancer) e incrementar la expresión génica (Chuvpilo *et al.*, 1993, Yang y Chow, 2003). Por otra parte, se ha observado que la supresión de algunos elementos como el factor NFAT en algunos promotores como el del gen *IL-4*, tiene un efecto dañino sobre la expresión génica (Klein-Hessling *et al.*, 1996).

1.3 *TLR5* porcino, regulación mediada por el complejo CpG-XCPE-SP1.

En el caso del análisis de la región promotora del gen *TLR5* porcino, la característica más relevante residió en la presencia de una isla CpG, a una distancia de 166 pb del sitio de inicio de la transcripción, la cual además de estar relacionada con la regulación epigenética de la expresión génica mediante la metilación de los residuos C' en regiones ricas en GC, también ha sido descrita como promotor de la actividad transcripcional en genes carentes de secuencia TATA-Box consenso (Deaton y Bird, 2011).

La identificación de las secuencias diana para SP1 y TFIID, el número elevado de sitios de unión a ZF02, incluyendo elementos ricos en GC, sugieren en gran medida que todos estos elementos se asocian con la isla CpG detectada, formando un complejo de regulación transcripcional en el gen *TLR5* porcino (Figura 3). No obstante, la presencia de elementos XCPE, generalmente observados en promotores carentes de TATA-Box. XCPE es capaz de inducir por sí solo un nivel basal de actividad transcripcional, pero en cooperación con otros activadores como NRF y SP1 es capaz de generar altos niveles de actividad transcripcional. Otra característica peculiar de XCPE es que, a diferencia de SP1, puede ejercer su actividad promotora independientemente de la ausencia o presencia de TFIID, reclutando directamente TBP libre o el complejo de inicio de la transcripción completo (Tokusumi *et al.*, 2007). Por lo que en conjunto, los elementos

identificados sugieren un mecanismo de regulación integrado por los elementos XCPE-SP1-CpG.

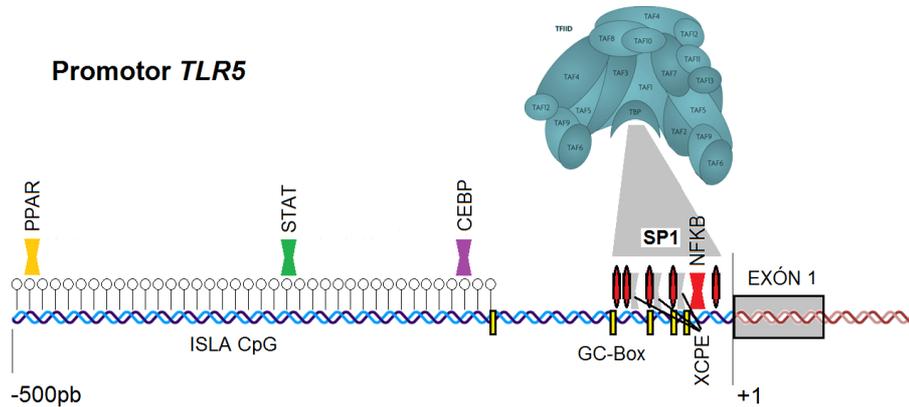


Figura 3. Principales elementos reguladores de la transcripción del gen *TLR5* porcino. En la figura se indica el posible sitio de reclutamiento del complejo transcripcional basal (zona gris).

Además de los elementos previamente mencionados, también fueron identificados posibles sitios de unión a factores de transcripción comúnmente encontrados en las regiones promotoras de genes involucrados en la respuesta inmune, sugiriendo una alta capacidad reguladora de esta región rica en GC, sobre la actividad transcripcional del gen *TLR5* porcino (Kielland y Carlsen, 2010, Walters *et al.*, 2013, Burke *et al.*, 2014).

1.4 Regulación de *NOD1* mediada por el elemento CpG.

En el caso del gen *NOD1* porcino, su región promotora mostró características similares a las observadas en el promotor *TLR5*, identificándose una isla de regulación epigenética CpG cercana al inicio del primer exón. La presencia de una isla CpG sumada al descubrimiento de múltiples sitios diana para SP1, NRF, ETSF y E2FF en la región próxima al primer exón, sugieren en gran medida que la isla CpG detectada desempeña una función promotora en la región 5' flanqueante del primer exón en el gen *NOD1*, ya que ha sido descrito que las islas CpG,

enriquecidas con los factores transcripcionales previamente mencionados, tienen la capacidad de llevar a cabo funciones promotoras en el genoma de los mamíferos (Deaton y Bird, 2011).

Aunado a lo anterior, la identificación de múltiples sitios diana para el factor transcripcional general SP1 en la porción más cercana al inicio del primer exón, sugiere que este factor podría actuar como un reclutador de TAFs en el promotor *NOD1* carente de TATA-Box y regular la expresión del gen. (Butler y Kadonaga, 2002, Singh *et al.*, 2012). La presencia de múltiples sitios de unión a SP1 relacionados con los elementos ricos GC, sugieren un mecanismo de activación similar al propuesto para el gen *TLR2*, con el factor SP1 dirigiendo la maquinaria basal para la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción, aunque la presencia de la isla CpG puede en este caso ser determinante en la regulación de final de la expresión del gen *NOD1* porcino (Smale y Kadonaga, 2003). La Figura 4 indica el mecanismo de activación transcripcional sugerido en el presente trabajo.

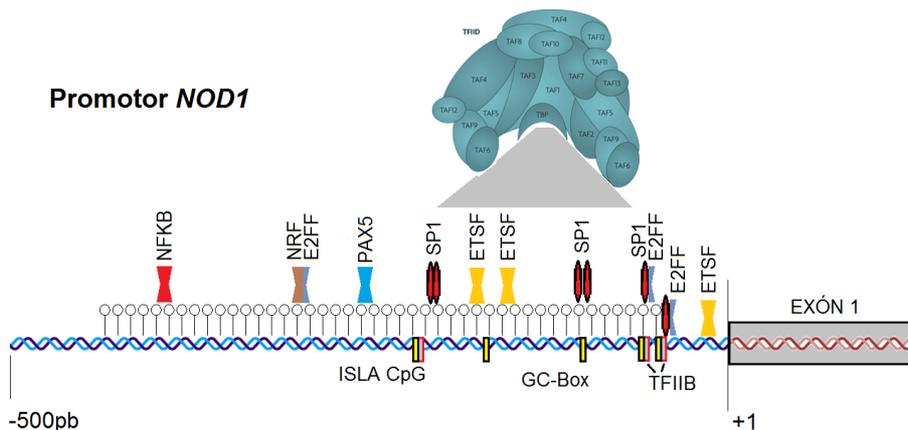


Figura 4. Esquematación de la regulación transcripcional del promotor *TLR5* porcino. Al igual que en el promotor *TLR5*, en el promotor *NOD1* destaca la presencia de la isla CpG cercana al sitio de inicio de la transcripción.

1.5 Regulación transcripcional NFκB–dependiente en *NOD2* porcino.

Finalmente, a diferencia de las regiones promotoras de los genes anteriormente discutidos, el promotor *NOD2* porcino no mostró la presencia de alguno de los elementos clave en la regulación de la expresión génica isla CpG, o motivos CEBP, TBP y TFII. Sin embargo, la identificación de un elevado número de sitios de unión al factor transcripcional NFκB, sugiere que dicho factor desempeña funciones críticas en la regulación del gen *NOD2* porcino. Esto es respaldado por el rol esencial que desempeña este factor transcripcional en la regulación de la transcripción del gen *NOD2* humano. Datos experimentales sugieren una regulación positiva entre el gen *NOD2* humano y el NFκB durante la respuesta a la invasión patogénica (Hu *et al.*, 2010).

A pesar de que se detectaron sitios de unión a SP1, se ha demostrado que el factor NFκB es capaz de regular la expresión génica, mediante la activación de la maquinaria promotora y el reclutamiento de los elementos que conforman el complejo transcripcional aún en ausencia del factor de transcripción SP1 (Amir-Zilberstein *et al.*, 2007). Por lo tanto, el análisis *in silico* sugiere que el NFκB simboliza el principal elemento regulador de la expresión del gen *NOD2* porcino (Figura 5).

Promotor *NOD2*

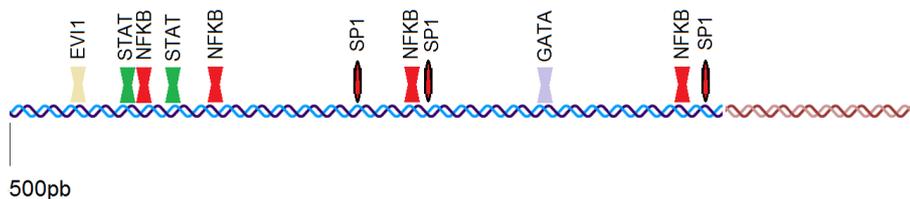


Figura 5. Regulación de la actividad promotora del gen *NOD2* porcino mediada por el elemento NFκB.

1.6 Funciones similares con diferentes mecanismos de regulación transcripcional.

Uno de los datos más relevantes observados en el análisis predictivo de las regiones promotoras fue la ausencia de secuencia TATA-Box consenso en los cinco genes examinados. Este hallazgo resulta hasta cierto punto comprensible dado que aproximadamente un 76% de los promotores de genes humanos carecen del elemento canónico TATA-Box, siendo además regiones promotoras con un alto contenido de GC, enriquecidas con sitios de unión al factor transcripcional SP1 (Yang *et al.*, 2007). La ausencia de TATA-Box, está vinculada con la expresión de genes constitutivos involucrados en procesos básicos del organismo, lo cual tendría relación con la función de vigilancia desarrollada por los receptores del sistema inmune innato. No obstante, la observación de sitios de unión a factores transcripcionales inducibles demuestra que a pesar de ser expresados de forma constitutiva, sus niveles de expresión pueden variar en función de estímulos externos, tal como sucede en genes que contienen TATA-Box.

Los resultados del análisis predictivo permitieron deducir que a pesar de observarse elementos de *cis*-regulación comunes entre cada uno de los genes, existen diferencias en el mecanismo de reclutamiento y activación de la maquinaria de transcripción basal, representadas por la presencia de elementos particulares en cada uno de los promotores.

De esta forma, los hallazgos realizados en las regiones promotoras sugieren que la activación transcripcional basal del gen *TLR2* es del tipo dependiente del factor SP1 (Figura 1), mientras que en los genes *TLR5* y *NOD1*, activados por XCPE y SP1, están fuertemente influenciados por la presencia de islas CpG (Figuras 3 y 4). La presencia de las islas de regulación epigenética CpG representa áreas potencialmente susceptibles a ser modificadas mediante metilación por condiciones medioambientales. Por otra parte, el gen *TLR4* presenta una región promotora

característica de genes regulados por el elemento TATA-Box, reemplazado por un elemento TBP/TFIID atípico (Figura 2). Por último, el gen *NOD2* porcino presenta una región reguladora caracterizada por la presencia de múltiples sitios de unión a NFκB y SP1 (Figura 5). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la función y localización de cada uno de los receptores, permitiéndole además a las células expresar receptores mediante diferentes mecanismos. Finalmente, la presencia de sitios de unión a factores de transcripción inducibles, relacionados con la respuesta inmune, capaces de asociarse a otros elementos reguladores le otorga una cierta flexibilidad a la actividad transcripcional de las regiones promotoras dependiendo de qué factores interactúen en dicho proceso.

2 IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Las secuencias codificantes y promotoras de los genes *TLR* y *NLR* mostraron una alta variabilidad genética. En total se detectaron 57 variaciones genéticas (*TLR2*= 8, *TLR4*= 7, *TLR5*= 16, *NOD1*= 8 y *NOD2*= 18), de las cuales 55 se trataron de variaciones tipo SNP y 2 de variaciones de tipo Indel.

La localización genómica de las variaciones genéticas detectadas indicó que de las 57 variaciones identificadas, 29 se presentaron a nivel de regiones promotoras (*TLR2*= 5, *TLR4*= 6, *TLR5*= 9, *NOD1*= 6 y *NOD2*= 3) y 28 en secuencias codificantes, de las cuales la gran mayoría se observaron en la secuencia codificante del gen *NOD2* (15).

Otro dato percibido mediante la identificación de polimorfismos fue el elevado número de mutaciones no sinónimas observadas, ya que de los 28 polimorfismos identificados en las secuencias codificantes, 11 correspondieron a SNP no sinónimos, de los cuales 4 afectaron dominios LRR involucrados en la función de reconocimiento de patógenos desarrollada por los TLR.

Este dato coincide con la información reportada en la base de datos de SNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), donde se puede observar que un gran número de las variaciones localizadas en las secuencias codificantes se corresponden a SNP no sinónimos. Cuando comparamos la distribución de las mutaciones no sinónimas dentro de la estructura de las proteínas TLR, se observó que todos los SNP no sinónimos se ubicaron en el dominio extracelular, no observándose variabilidad en los dominios intracelulares o transmembranarios, similar a lo reportado en la base de datos de SNP (Tabla 1).

Tabla 1. SNP reportados en la base de datos del NCBI (01/05/2014).

Gen	Especies (número de SNP reportados)	SNP reportados	SNP N/S	Dominio		
				DEC	TM	DIC (TIR)
TLR2	Ratón (41), Perro (3), Oveja (71), Cerdo (27).	142	63	48	1	14 (12)
TLR4	Bovino (32), Ratón (40), Perro (12), Oveja (87), Gallo (5), Cerdo (11), Rata (1).	188	89	79	1	10 (6)
TLR5	Perro (4), Oveja (52), Gallo (3), Cerdo (30)	89	39	33	1	5 (4)
				LRR	NACHT	CARD
NOD1	Bovino (18), Ratón (51), Oveja (18), Rata (30).	117	35	10	6	3
NOD2	Bovino (15), Perro (18), Oveja (32).	65	35	6	2	10

SNP N/S: SNP no sinónimos; DEC: Dominio extracelular; TM: Región transmembranaria; DIC: Dominio intracelular

En el caso de los polimorfismos de las secuencias codificantes de los genes NOD, Josaki y colaboradores (2009) identificaron un total de 11 polimorfismos no sinónimos en la secuencia codificante del gen NOD2 porcino, 1 de los cuales se ubicó en un dominio CARD, 3 en el dominio NACHT y 4 en dominios LRR, contrario a los resultados reportados en la base de datos del NCBI (Tabla 1) y a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, este hecho debe tomarse con cautela debido a que por la complejidad de la estructura de los genes, solo se

llevó a cabo la búsqueda de variaciones en dos de los nueve y once exones que conforman los genes *NOD1* y *NOD2* respectivamente, excluyendo una gran parte de los dominios LRR de dichos receptores.

La elevada variabilidad observada en los dominios extracelulares ha sido sugerida previamente en estudios realizados en genes *TLR* de mamíferos, en los cuales se ha observado que el mayor número de SNP no sinónimos identificados se presentan principalmente en los dominios de unión al ligando, mientras que los responsables de la dimerización y señalización (TIR), suelen ser más conservados (Shinkai *et al.*, 2006, Nakajima *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2008, Uenishi *et al.*, 2012), sugiriendo que la presencia de polimorfismos está estrechamente vinculada con la función realizada por cada uno de los dominios.

Por otro lado, la elevada tasa de variabilidad genética observada en las regiones promotoras pone de manifiesto el papel relevante de los polimorfismos sobre la regulación de la expresión génica. Estudios realizados en organismos simples han sugerido que las diferencias en la expresión génica producto de la variación en la regulación de la transcripción han jugado un rol trascendental en las enfermedades y la evolución de la diversidad molecular y morfológica de los organismos (Yan y Zhou, 2004).

Asimismo, la elevada variabilidad observada en las regiones promotoras y secuencias codificantes de los genes *PRR* podría ser el resultado de varios factores, incluyendo el enfrentamiento constante a los agentes patógenos a lo largo del tiempo, como una forma de selección evolutiva del fenotipo, y otros factores demográficos como la deriva genética y la formación de cuellos de botella, o bien factores socio-económicos como los cambios en los sistemas productivos y la introducción de poblaciones exóticas realizada por el ser humano.

3 ESTUDIO POBLACIONAL

Los datos obtenidos en el estudio poblacional de las variaciones genéticas identificadas en las regiones promotoras y los SNP no sinónimos de los genes *TLR* y *NLR*, revelaron un mayor nivel de variabilidad genética en los cerdos domésticos. A diferencia de la población de jabalíes la cual presentó un gran número de *loci* monomórficos, entre los que se encuentran los SNP de las secuencias codificantes de los genes *TLR2*, *TLR4* y *NOD1*, cinco de los seis SNP detectados en el promotor *NOD1* y cuatro de los seis SNP detectados en el gen *NOD2*, la población de cerdos domésticos presentó todas las variantes alélicas de cada una de las variaciones genéticas analizadas.

Al analizar detalladamente los resultados de las frecuencias alélicas de cada uno de los polimorfismos, se obtuvieron datos interesantes. Así, en el caso de la región promotora del gen *TLR4* y la secuencia codificante del gen *TLR5*, las frecuencias más altas para el alelo menor se observaron en la población de jabalíes, sugiriendo que la aparición de las variaciones genéticas en dichas regiones genómicas ocurrió previamente a la domesticación y han permanecido a lo largo del proceso evolutivo.

Por otro lado, con excepción del gen *TLR2*, en el cual no se observó un patrón definido en las frecuencias del alelo menor entre los dos grupos poblacionales, en el resto de las regiones promotoras y codificantes analizadas, las frecuencias del alelo menor fueron más altas para la población de cerdos domésticos. Este hecho, sumado a la presencia de alelos privados (variantes alélicas únicas en la población) en los cerdos domésticos podría ser explicado por la sugerencia de que la generación de nuevos alelos es el resultado de un proceso evolutivo, originado por las diversas condiciones medio ambientales bajo las cuales han vivido los cerdos y a la mezcla genética (*genetic admixture*) resultado del

intercambio de alelos ventajosos o no, a lo largo del tiempo (Uenishi *et al.*, 2012). Este material genético se han ido incorporando a las razas comerciales a través de cruzamientos con diferentes razas, convirtiendo a los cerdos domésticos en un mosaico de diferentes poblaciones (Ojeda *et al.*, 2006).

La diversidad genética entre los dos grupos poblacionales estudiados se determinó en términos de heterocigosidad esperada y observada. En este sentido, los valores de heterocigosidad esperada variaron en cada uno de los genes estudiados, observándose el valor medio más alto en el gen *TLR5*, tanto en cerdos domésticos como en jabalíes, mientras que el valor medio más bajo de heterocigosidad esperada se observó en el gen *NOD1* para la población de jabalíes, y en el gen *TLR4* en el caso de los cerdos domésticos.

Estas diferencias en los valores de heterocigosidad esperada podrían ser el efecto de las condiciones medio ambientales sobre las poblaciones porcinas. En particular, por los agentes patógenos que representan un posible factor de selección que mantiene la diversidad alélica, tal como se ha sugerido en un estudio realizado sobre la variabilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en lobos, donde se observó una relación entre la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes o infecciones parasitarias, con el nivel de heterocigosis en el MHC. En el caso del MHC, un elevado nivel de homocigosis ha sido asociado con un mayor riesgo a padecer enfermedades (Niskanen *et al.*, 2014). No obstante, es necesario realizar un estudio más amplio del nivel de heterocigosis en los PRR y la susceptibilidad a padecer procesos infecciosos para determinar su papel en las poblaciones porcinas.

El valor estimado de F_{ST} , como medida del grado de diferenciación entre poblaciones, varió entre 0,019 (*TLR2*) y 0,060 (*NOD1*), con una media global de 0,030. De acuerdo con la clasificación propuesta por (Barreiro *et al.*, 2008), los

niveles de diferenciación obtenidos a través de los valores de F_{ST} pueden considerarse de moderados a bajos. Sin embargo, la variación en los valores de F_{ST} por cada uno de los genes sugiere que los efectos medioambientales, posiblemente a través de los agentes patógenos, han ejercido una fuerte influencia en la diferenciación de las poblaciones domésticas y silvestres, haciendo que las diferencias varíen en función del tipo de receptor involucrado. De esta forma se puede inferir que la diversificación de las poblaciones porcinas también se ha desarrollado mediante una selección positiva en función del tipo de patógeno presente en el medio.

En cuanto a los valores del AMOVA, los porcentajes más altos de varianza molecular por regiones genómicas entre las poblaciones se observaron en los promotores *NOD1* y *TLR4*, así como en las regiones codificantes de los genes *TLR5* y *NOD2*. Por el contrario el menor nivel de varianza se presentó en las regiones promotora y codificante del gen *TLR2*, así como en el promotor *NOD1*, confirmando los datos obtenidos mediante el cálculo del estadístico F_{ST} .

Finalmente, el análisis poblacional mostró un equilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de cada región génica cuando se realizó el análisis de haplotipos. Esto podría estar indicando la existencia de una alta variabilidad entre las poblaciones porcinas sin el efecto producido por la selección hecha por el hombre, lo cual también fue confirmado al considerar cada haplotipo como una variante alélica, sumado a los valores de heterocigosidad y frecuencias alélicas observadas.

4 FUNCIONALIDAD DE LAS VARIACIONES GENÉTICAS EN LAS REGIONES PROMOTORAS

La funcionalidad de los polimorfismos en la regulación de la transcripción génica fue confirmada mediante un modelo in vitro, sobre aquellos polimorfismos que en el análisis predictivo demostraron modificar la secuencia de unión a algún

factor transcripcional de relevancia en la expresión de los genes *PRR*, o bien producir un cambio en el patrón transcripcional en el caso de las variaciones de tipo Indel. En total se seleccionaron 5 SNP (un SNP por cada promotor estudiado), así como las 2 Indel identificados en el promotor del gen *TLR5* porcino.

4.1 La presencia del SNP -103G→A reduce la actividad promotora de *TLR2* mediante la interrupción de la interacción PAX5-ADN.

De acuerdo con el análisis predictivo realizado sobre la región promotora del gen *TLR2* porcino, el SNP4 -103G→A se ubica dentro de una secuencia identificada como posible sitio de unión al factor transcripcional PAX5, localizada cerca de la zona rica en GC del promotor *TLR2* porcino, donde se localizan los principales elementos reclutadores del complejo de pre-iniciación de la transcripción (SP1/GC-Box/TAFs), lo cual sugiere que el factor PAX5 desempeña una función importante en la regulación de la formación del complejo transcripcional, ya que se ha descrito que PAX5 interactúa con proteínas de la maquinaria transcripcional basal, principalmente con la proteína de unión a TATA, para regular la transcripción génica (Cobaleda *et al.*, 2007).

PAX5 pertenece a una familia de factores de transcripción involucrados en el control de la diferenciación de tejidos y el desarrollo de órganos, principalmente en células del linaje B, donde cumple una función vital al controlar la identidad de los linfocitos B a lo largo de su desarrollo. PAX5 presenta un rol dual al funcionar como activador o represor transcripcional de diferentes genes diana responsables de la maduración y diferenciación fenotípica de las células B (Nera *et al.*, 2006, Feldman y Dogan, 2007, Fazio *et al.*, 2011).

Los datos anteriores sugieren que la disminución de la actividad luciferasa mostrada en las células transfectadas con el fragmento promotor del gen *TLR2* conteniendo el alelo -103A comparada con aquella observada utilizando la variante

alélica -103G, podría deberse a la pérdida de la secuencia de unión al PAX5, ya que como se ha mencionado previamente, PAX5 es capaz de interactuar con componentes de la maquinaria transcripcional basal, regulando la expresión génica. La expresión de *TLR2* en linfocitos T y B (Farhat *et al.*, 2008), demuestra que en el caso del gen *TLR2*, PAX5 no ejerce una función represora, con lo cual su implicación en la transcripción se da como elemento activador. La disminución de la expresión génica por la pérdida de interacción del factor PAX5 con el gen diana ha sido descrita previamente en diversos estudios (Nera *et al.*, 2006, Coboleda *et al.*, 2007, Fuxa y Skok, 2007, Lescale *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos indican que aquellos animales conteniendo la variante alélica -103A pueden presentar una disminución de la expresión del gen *TLR2*, lo cual podría tener consecuencias perjudiciales para los ejemplares conteniendo esta variante.

4.2 La alteración del núcleo de bases conservadas para la unión del factor ETSF disminuye la actividad transcripcional en *TLR4* porcino.

El análisis funcional del polimorfismo en la región promotora del gen *TLR4* se llevó a cabo sobre el SNP -280C→T, el cual demostró ser capaz de alterar la actividad transcripcional del promotor *TLR4*, provocando una reducción altamente significativa de la expresión del gen reportero luciferasa mediante su variante alélica -280T. Este resultado puede deberse a que su localización involucra una secuencia diana para el factor transcripcional ETSF, el cual es un sitio de unión conservado entre los promotores humano y porcino. La conservación del factor de transcripción ETSF entre las secuencias ortólogas humana y porcina sugiere que dicho elemento *trans* desempeña una función relevante en la activación de la transcripción, lo cual concuerda con la reducción de hasta un 44% de la expresión del gen reportero luciferasa observada en el presente trabajo.

El factor transcripcional ETSF pertenece a una familia de oncogenes cuya característica principal radica en la presencia de un dominio ETS (*E-Twenty Six*), el cual es requerido para la unión de la proteína a la secuencia específica de ADN rica en purina 5' -GGAA/T- 3' (o complementaria). ETSF es reconocido por ser un activador transcripcional, capaz de regular la transcripción de aproximadamente 200 genes diana que contribuyen a diversos procesos biológicos tales como la apoptosis, desarrollo y función de células inmunitarias, hematopoyesis, proliferación y migración celular (Wasylyk *et al.*, 1992, Clements *et al.*, 2006, Heo y Cho, 2014).

Los resultados obtenidos en el ensayo funcional sugieren que la disminución de la actividad promotora se debe a que el SNP -280C→T afecta la primera base del motivo invariable GGA necesario para la interacción del factor transcripcional ETSF. Estudios realizados en el promotor del gen interferón tau bovino demostraron que la mutación de dos bases en el núcleo en dos sitios de unión a ETS-2 (ACAGGAAGTG → ACAGagAGTG y CCAGGAAGTG → CCAGagAGTG) provoca una disminución del 60% y 70%, de la actividad promotora (Sakurai *et al.*, 2013).

Otros estudios han demostrado la importancia del factor ETSF en la regulación de la actividad transcripcional, remarcando que la falta de interacción del elemento *trans* ETSF con el ADN produce una marcada disminución de células T, células NK esplénicas y alteraciones en el desarrollo de las células B, producto de la alteración de la actividad promotora de los genes implicados en el desarrollo de dichas células (Eyquem *et al.*, 2004, Clements *et al.*, 2006).

4.3 La creación de un nuevo sitio STAT mediante la inserción de 23 pb en el promotor *TLR5* produce un incremento en la actividad transcripcional.

El resultado del análisis bio-informático en el gen *TLR5* reveló que solo un sitio de unión para el factor transcripcional PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activator*

Receptor) fue afectado por la presencia de un SNP. PPAR pertenece a una familia de receptores nucleares que actúan como sensores lipídicos que regulan de forma coordinada la expresión de una amplia gama de genes, modulando de este modo importantes eventos metabólicos (Berger *et al.*, 2005). Entre las funciones inmunológicas que involucran al factor PPAR se encuentran la activación de las caspasas, apoptosis, inducción de la respuesta inflamatoria (Moraes *et al.*, 2006).

Con respecto a las variaciones Indel, ambas inserciones causan una modificación en el patrón de sitios de unión a factores transcripcionales, resultando en un nuevo sitio STAT por la inserción de 23 pb en el Indel 1 y un nuevo sitio ZF02 por la inserción de 5 pb en el Indel 2. Los factores transcripcionales ZF02 y STAT desarrollan funciones diversas a nivel transcripcional. ZF02 es un represor transcripcional involucrado en un gran número de procesos biológicos, aunque se relaciona con mayor frecuencia a genes involucrados en el metabolismo lipídico y energético (Wagner *et al.*, 2000, Schmitz *et al.*, 2004), también interviene en procesos como el ciclo y diferenciación celular y embriogénesis (Sakai *et al.*, 2003). Por otro lado, STAT pertenece a una familia de factores transcripcionales estrechamente vinculados con la activación transcripcional relacionada con diversas funciones del sistema inmune, principalmente aquellas mediadas por interferón y citoquinas, observándose además que STAT puede incrementar la proliferación de células T y regular la actividad de los macrófagos a través de sus funciones inductoras de la expresión génica (Takeda y Akira, 2000).

El análisis funcional mediante ensayos de luciferasa mostró que tanto el Indel 2 como el SNP -495A→G no inducen cambios en la actividad transcripcional de la secuencia promotora del gen *TLR5*. En el caso del SNP -495A→G afectando el sitio de unión PPAR, la ausencia de alteración en la expresión génica observada en el ensayo funcional podría deberse a la naturaleza promiscua del factor PPAR, el cual no requiere una secuencia diana altamente específica para desarrollar sus

funciones reguladoras, como ha sido observado previamente en ratones (Temple *et al.*, 2005).

La carencia de modificación transcripcional asociada al Indel 2 puede deberse a la elevada incidencia de sitios diana para ZF02 en el promotor *TLR5*, siendo además el principal sitio de unión a factores de transcripción identificado en la región. Pudiendo deberse a un efecto compensatorio sobre la actividad transcripcional, o bien por la suposición de que el nivel de actividad represora del factor ZF02 sobre el promotor *TLR5* porcino está más relacionada con la concentración de la proteína en el medio que con el número de sitios de unión presentes en la secuencia promotora. Por el contrario, la inserción de 23 nucleótidos correspondientes al Indel 1 provoca un incremento significativo de la actividad transcripcional, lo cual concuerda con la relevancia funcional del factor transcripcional STAT en la regulación génica de la respuesta inmune innata (Chen *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2013).

De igual forma, los resultados del estudio funcional permitieron confirmar la localización del núcleo promotor en la región de 500 nucleótidos más cercanos al sitio de inicio del primer exón. Esto fue respaldado por la marcada diferencia en los ratios de actividad luciferasa observados, ya que el nivel de expresión luciferasa generado por el fragmento de -534 a +20 nucleótidos es alrededor de 15 veces más alto que el generado por el fragmento más alejado del primer exón (-965 a -427 nucleótidos).

4.4 El SNP -920G→A del promotor *NOD2* interfiere con la actividad del complejo NFAT/ICSBP.

Con respecto a la identificación de variación polimórfica en la región promotora del gen *NOD1* porcino, el SNP1 -920G→A modifica el patrón de factores transcripcionales afectando un sitio de unión a ICSBP (Proteína de

secuencias consenso de unión a interferón) localizado entre dos secuencias NFAT. La presencia de él alelo -920A alteró la secuencia de ADN del promotor, resultando en la pérdida del sitio diana para ICSBP y como consecuencia impidiendo la interacción promotor/ICSBP.

Los ensayos funcionales con el gen reportero luciferasa confirmaron el efecto hipotético del polimorfismo *NOD1* -920G→A sobre la actividad promotora de dicho gen. La diferencia significativa entre las variantes alélicas del SNP -920G→A sugiere claramente que la presencia del alelo -920A ocasiona una modificación en un sitio de unión a ICSBP, evitando la interacción de este factor transcripcional con la región promotora del gen *NOD1*, con un efecto desfavorable sobre la transcripción del gen.

La función de ICSBP dentro de la transcripción génica ha sido descrita en varias investigaciones, resaltando su función reguladora de la respuesta inmune antiviral así como en el desarrollo de células mieloides (Mak *et al.*, 1998). Varios estudios han señalado que el factor ICSBP lleva a cabo sus funciones mediante asociación con otros factores transcripcionales, principalmente IRF-1, IRF-2, PU.1 y NFAT (Sharf *et al.*, 1995, Masumi *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2003). Esta aseveración concuerda con los resultados obtenidos en el estudio predictivo realizado, sugiriendo que NFAT podría realizar la función de apoyo requerida para la interacción de ICSBP con el ADN promotor, ya que se ha demostrado que ICSBP no se une al ADN de forma independiente, sino que requiere de la interacción con elementos ETS, en este caso NFAT para desempeñar sus funciones. De igual manera, se ha descrito que NFAT puede no realizar la función de activación de la transcripción pero si es requerido para favorecer la interacción de ICSBP con el ADN, tal como se ha observado en estudios sobre el promotor de IL-12 murino (Zhu *et al.*, 2003). De esta forma, la presencia del SNP -920G→A evitaría la interacción del factor ICSBP reclutado por el elemento NFAT adyacente.

4.5 La presencia de la variante alélica -2393A en el promotor *NOD2* genera un nuevo sitio de unión a CEBP que incrementa la expresión del gen reportero.

Por otro lado, el SNP3 -2393G→A localizado en la región promotora del gen *NOD2* porcino, genera un cambio en el patrón transcripcional, reemplazando el sitio de unión al factor GATA (tatAGATAATGGA) por un sitio de unión a CEBP (TATAAATAATgga). La creación de un sitio CEBP mediante la presencia del alelo -2393A, podría actuar favorablemente sobre la expresión del gen *NOD2* debido a que el factor transcripcional CEBP constituye una proteína de regulación transcripcional positiva, capaz de activar la síntesis de ARN mediante la interacción con la secuencia promotora de los genes diana (Friedman *et al.*, 1989), siendo clave en la regulación de múltiples funciones esenciales como el ciclo celular, hematopoyesis, desarrollo tisular y respuesta inmune innata y adaptativa (Tsukada *et al.*, 2011).

Con base en los resultados obtenidos en el estudio funcional del polimorfismo, se logró determinar que la presencia de la variante alélica -2393A, la cual genera un sitio de unión a CEBP a partir de una secuencia de unión a GATA, resultando en un incremento significativo en la actividad luciferasa, sugiere claramente que la variante alélica -2393A juega un rol beneficioso sobre la expresión del gen *NOD2* y por lo tanto, confiere ventajas en la función de reconocimiento de patógenos desarrollada por el receptor. Este resultado es respaldado por el hecho de que se ha demostrado que la interacción de CEBP con la secuencia de ADN influye positivamente en la actividad promotora de los genes diana (Friedman *et al.*, 1989).

Por otro lado, se ha demostrado que CEBP interactúa intensamente con otros elementos formando complejos *enhancer*, como el factor SP1, al cual se asocia para potenciar la actividad transcripcional de algunos genes, como IL-1 β (Yang *et*

al., 2000). Otros estudios han reportado que la capacidad de CEBP para inducir genes mieloides en células B requiere se su combinación con SP1 (Tsukada *et al.*, 2011). Incluso se ha observado que CEBP actúa en la activación transcripcional del gen *LY96*, mediante su interacción con un elemento SP1 ubicado en una posición remota, a una distancia de 400 pb del sitio diana para CEBP (Tissières *et al.*, 2009). Esta podría ser la razón del incremento de la actividad transcripcional observado en los ensayos funcionales con el promotor *NOD2*, ya que al generar un sitio de unión a CEBP se favorecería la formación de un complejo potenciador con alguno de los elementos SP1 identificados en la región.

4.6 La frecuencia de las variaciones genéticas muestra una estrecha relación con su funcionalidad.

Finalmente, al relacionar los datos obtenidos en los ensayos funcionales con la información del análisis poblacional de cada una de las variaciones genéticas se observó una marcada relación entre el nivel de expresión transcripcional generado por cada variante alélica con su frecuencia en las poblaciones estudiadas. Asimismo, se pudo observar que en el caso del SNP4 -103G→A del promotor *TLR2*, a pesar de que el alelo -103A causante de una disminución de la actividad transcripcional, se presentó tanto en cerdos domésticos como en jabalíes, en ambos casos su frecuencia fue menor con respecto al resto de los polimorfismos detectados en la región promotora. De forma similar, la variante -920A del SNP1 en el promotor *NOD1*, presentó una frecuencia extremadamente baja en la población.

Únicamente el SNP6 del promotor *TLR4* no presentó la misma tendencia. Por el contrario, la inserción de 23 pb en el promotor *TLR5* y la variante -2393A del SNP3 del promotor *NOD2*, las cuales potencian la actividad transcripcional mediante la creación de sitios STAT y CEBP respectivamente, mostraron

frecuencias elevadas entre la población, con valores de 0,215 (TLR5) y 0,139 (el valor más alto entre los polimorfismos de *NOD2*).

Estas observaciones sugieren en gran medida un mecanismo de selección natural, en el que si bien los alelos “perjudiciales” no son eliminados completamente de la población, si se mantienen a frecuencias bajas, mientras que aquellos alelos que teóricamente no presentan ningún efecto o confieren ventajas a los individuos, son más frecuentes dentro de las poblaciones. No obstante, los resultados de este análisis deben tomarse con cautela debido al número de ejemplares porcinos estudiados.

5 FUNCIONALIDAD DE LAS VARIACIONES GENÉTICAS EN LAS SECUENCIAS CODIFICANTES

Los posibles efectos producidos por la sustitución de aminoácidos a causa de la presencia de polimorfismos no sinónimos, fueron estudiados en los tres receptores TLR. En total se analizó un SNP no sinónimo por cada receptor, cada uno de ellos afectando un dominio LRR encargado del reconocimiento e interacción con los PAMPs.

5.1 La variante 136A del SNP +561C→G altera la capacidad de interacción de TLR2 con el ligando.

El análisis funcional del SNP +561C→G (P136A) localizado dentro la secuencia que codifica para el dominio LRR4 de la proteína TLR2, reveló que la presencia de la variante alélica 561G causa una disminución de la expresión del gen reportero. Este resultado sugiere que la sustitución del aminoácido 136 prolina por alanina afecta la capacidad de interacción del receptor TLR2 con el ligando sintético Pam3CSK4 y con la cepa bacteriana de *Salmonella* inactivada utilizada en el ensayo.

Debido a que la secuencia del gen reportero se insertó en un vector cuyo promotor dependía de la activación por NFκB, se puede deducir que la alteración producida por la sustitución del aminoácido prolina por alanina, trae como consecuencia una disminución en la activación de la cascada de señalización intracelular mediada por TLR2, lo que conlleva una menor translocación de NFκB al núcleo y finalmente una menor activación de genes de respuesta inmune, en este caso representados por los niveles disminuidos de expresión del gen reportero luciferasa. Una de las razones que podrían explicar este resultado radica en las características propias de cada residuo.

Prolina es un aminoácido poco reactivo, y debido a su incapacidad para ocupar muchas de las conformaciones fácilmente adoptadas por otros aminoácidos, suele encontrarse en curvaturas estrechas, otorgándole rigidez a la proteína (Betts y Russell, 2003), por lo cual la sustitución del aminoácido prolina por cualquier otro aminoácido causa una desestabilización de la estructura proteica (McMillan, 2009). Además, se ha reportado que prolina desempeña un papel importante en el reconocimiento molecular, particularmente en la señalización intracelular, jugando un papel clave en muchas cascadas de señalización (Betts y Russell, 2003).

Por esta razón, la sustitución del aminoácido prolina por alanina podría estar afectando significativamente la estabilidad y conformación estructural de la proteína a nivel del dominio LRR; región ampliamente conocida por su importancia en la función de reconocimiento de patógenos.

5.2 El receptor TLR2 porcino es incapaz de reconocer al LPS de *Salmonella typhimurium*.

TLR2 es uno de los receptores con mayor espectro de reconocimiento de componentes de origen bacteriano, detectando un gran número de PAMPs, que van desde lipoproteínas, lipoarabinomananos, lipomananos, lipopéptidos, ácido

lipoteicoico, hasta glicosilfosfatidilinositol, glicoproteínas, peptidoglicano y zymosan. Algunos autores también han sugerido que TLR2 es capaz de reconocer el LPS bacteriano (Zähringer *et al.*, 2008).

En este sentido, el reconocimiento del LPS por el receptor TLR2, es un tema que no ha quedado completamente claro en la actualidad, ya que si bien existen reportes que demuestran la capacidad de TLR2 para reconocer al LPS de microorganismos tales como, *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori*, se ha demostrado que el LPS de dichos agentes difiere estructuralmente del LPS procedente de enterobacterias (Werts *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2003, Hashimoto *et al.*, 2004).

Existe otro reporte que sugiere que TLR2 es capaz de desencadenar una cascada de señalización para la activación del NFκB, mediante la formación del complejo de reconocimiento al LPS, mediante la interacción de TLR2 con las moléculas CD14 y LBP, tal como sucede con TLR4. En ese estudio, el preparado de LPS utilizado procedió de una cepa bacteriana de *Escherichia coli* (Yang *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que la nula capacidad de reconocimiento al LPS de *Salmonella typhimurium* observada en el presente trabajo, puede deberse a las diferencias estructurales en el LPS de los diferentes microorganismos, haciendo que TLR2 pueda interactuar o no con el LPS, dependiendo del microorganismo del cual proceda. No obstante, es necesario realizar un estudio más completo para definir el papel de TLR2 en el reconocimiento del LPS bacteriano.

5.3 El cambio asparragina por histidina en un dominio LRR del receptor TLR4 modifica la capacidad de reconocimiento al LPS.

El resultado del análisis funcional del SNP +807A↔C indicó que el cambio de asparragina por histidina produce un efecto dañino sobre la función de reconocimiento del LPS desarrollada por TLR4. Sin embargo, determinar el

mecanismo exacto mediante el cual la sustitución del aminoácido asparragina por histina produce este efecto resulta difícil de especificar.

Asparragina e histidina comparten características funcionales similares, sugiriéndose en algunos casos, que dichos aminoácidos pueden ser sustituidos entre sí, sin provocar alteraciones en las proteínas (Lowe *et al.*, 1985, Betts y Russell, 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican claramente que la presencia de cada uno de los aminoácidos en la posición 189 del dominio LRR, afecta de forma diferente la actividad de reconocimiento de patógenos ejercida por la proteína TLR4. Esto podría deberse a que dada la naturaleza de los residuos involucrados, el reemplazo de asparragina por histidina podría modificar la carga de la cadena lateral introduciendo iones positivos, ya que a diferencia del aminoácido histidina, asparragina es un aminoácido polar neutro, por lo que al ser sustituido por histidina, cargaría positivamente esa región, causando un fenotipo perjudicial, conllevando a una alteración en la interacción de TLR4 con el ligando. Esta mención estaría sustentada con los datos del análisis predictivo de la estabilidad estructural de la proteína, donde se observó que la sustitución del aminoácido asparragina 189 por histidina conlleva un efecto perjudicial sobre la funcionalidad de la proteína (score = 0,97).

Lo anterior sugiere que en TLR4 porcino, la presencia del aminoácido asparragina 189 es crítica para el correcto funcionamiento del dominio LRR, ya que a pesar de contar con características similares, el aminoácido histidina produce una disminución en la respuesta final del receptor, suponiendo una disminución en la activación de genes de respuesta inmune mediados por TLR4.

Finalmente, la casi nula presencia de la variante alélica +807C (189H) detectada a nivel poblacional, se corresponde con los datos poblacionales reportados para dicho alelo por Shinkai y colaboradores (2006b), quienes únicamente

detectaron la presencia de la variante N189H en un bajo porcentaje de cerdos Berkshire, lo cual supone claramente que esta variante alélica juega un papel dañino en la actividad de reconocimiento de patógenos ejercida por TLR4, y su baja frecuencia podría representar un mecanismo de selección evolutiva del fenotipo.

5.4 La sustitución del aminoácido altamente conservado 402prolina afecta significativamente la función de reconocimiento desarrollada por TLR5.

Los resultados del análisis funcional del SNP no sinónimo +1272C→T (P402L) revelaron una disminución de la actividad luciferasa provocada por la variante alélica +1272T. Dicha variante ocasiona un cambio de aminoácido en la posición 402, donde normalmente se ubica un residuo prolina, reemplazándolo por un residuo leucina (Figura 6).

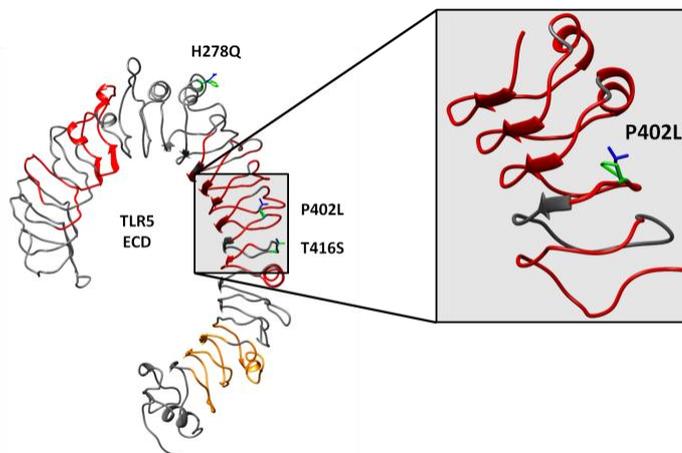


Figura 6. Visualización de los SNP no sinónimos identificados en el dominio extracelular de TLR5 porcino. En rojo se encuentran señalados los dominios LRR implicados en el complejo de reconocimiento TLR5/flagelina, obtenido mediante alineamiento con la secuencia TLR5 humana. Los dominios LRR involucrados en la dimerización de TLR5 se muestran en color naranja. Los aminoácidos mutantes se indican en azul y los silvestres en verde. El SNP no sinónimo analizado funcionalmente y su localización están ampliados en el recuadro.

proteínas (Lillemo y Morris, 2000), por lo que su reemplazo por una leucina puede desestabilizar la estructura de la proteína, reduciendo su concentración celular (Newbold *et al.*, 2001). Esto podría explicar la disminución significativa de la expresión del gen reportero, observada en el análisis funcional del SNP +1272C→T.

6 CONSIDERACIONES GENERALES

La presencia de variaciones genéticas en los genes *PRR* estudiados en el presente trabajo, ocasionó alteraciones tanto a nivel de actividad transcripcional como a nivel funcional de las proteínas, dependiendo de su ubicación dentro del genoma.

Otro dato relevante fue la observación de que los niveles de expresión de los genes *PRR* no solo están determinados por los elementos reguladores que intervienen en la formación del complejo transcripcional basal, sino que además la presencia de variaciones genéticas pueden influir directamente en el resultado final de la activación transcripcional al interferir en la interacción del ADN con un factor transcripcional concreto.

Por otro lado, la presencia de los polimorfismos localizados tanto en las regiones promotoras y codificantes puede ser el reflejo de un proceso de selección natural y de adaptación a las condiciones medioambientales a lo largo del tiempo, los cuales han permanecido como un posible mecanismo de respuesta frente a posibles cambios en el entorno, ya que algunos autores han sugerido que los cambios en los niveles de expresión y funcionalidad de los genes *PRR* pueden desempeñar un doble papel, pudiendo ser perjudiciales o beneficiosos para el hospedador, dependiendo de las condiciones del medio.

En este sentido se ha descrito que en el caso de TLR3 humano la presencia de un polimorfismo (1234C→T) provoca una disminución en la respuesta a

poli(I:C), la cual está asociada con la susceptibilidad a herpes labial recurrente, pero además, la misma variación se ha asociado a la resistencia natural a la infección con VIH-1 y protección contra atrofia geográfica (Zhou *et al.*, 2011, Sironi *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2012). De igual forma, algunos autores han demostrado que el reconocimiento de la flagelina por TLR5, además de desempeñar un rol vital en la regulación de la flora bacteriana intestinal, promueve la infección con *Salmonella* y su diseminación sistémica. Este doble papel desarrollado por los PRR podría ser la razón por la cual se observa una elevada variabilidad en las regiones promotoras y codificantes de cada uno de los genes analizados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral suponen un paso importante hacia la determinación de los factores genéticos que influyen en los patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades, principalmente de aquellas de tipo infeccioso.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Las regiones promotoras de los genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *NOD1* y *NOD2* porcinos carecen de secuencia TATA-Box consenso, la cual es reemplazada por diversos elementos capaces de activar la transcripción mediante el reclutamiento de un complejo transcripcional basal externo.
2. A pesar de llevar a cabo funciones de reconocimiento de patrones similares, los resultados del análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes *TLR* y *NLR* evaluadas en el presente trabajo, sugieren que la activación transcripcional depende de mecanismos diferentes entre cada uno de los genes, variando en función del patrón de elementos transcripcionales ubicados en cada una de las regiones promotoras.
3. Los datos obtenidos en la búsqueda de polimorfismos revelaron un elevado nivel de variabilidad genética a nivel de regiones promotoras, las cuales se conservan en mayor o menor grado entre las poblaciones de cerdos domésticos y salvajes.
4. Los dominios transmembranarios e intracelulares de los TLR presentan un menor grado de variabilidad con respecto a los dominios extracelulares, sugiriendo que la presencia de polimorfismos está estrechamente relacionada con la función desempeñada por cada dominio de las proteínas receptoras.
5. Algunas de las variaciones genéticas detectadas en las regiones promotoras de los genes *TLR* y *NLR* tienen la capacidad de alterar la expresión del gen reportero luciferasa, sugiriendo que esas variaciones pueden modificar la expresión de los genes que codifican para PRR.
6. El receptor de patrones moleculares *TLR2* es incapaz de reconocer al LPS de *Salmonella thyphimurium*, a pesar de los reportes que indican lo contrario, lo que

sugiere que las diferencias estructurales entre el LPS de los diversos microorganismos bacterianos es clave para llevar a cabo la función de reconocimiento a dicho compuesto.

7. La presencia de polimorfismo no sinónimo en secuencias que codifican para dominios LRR de los TLR afecta la capacidad de dichos receptores para llevar a cabo el reconocimiento de PAMP, sugiriendo que estas alteraciones provocan una disminución en la respuesta inmune desencadenada por los TLR.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira S. (2003). *Mammalian Toll-like receptors*. Current Opinion in Immunology 15(1): 5-11.
- Akira S. et al. (2006). *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. Cell 124(4): 783-801.
- Amir-Zilberstein L. et al. (2007). *Differential Regulation of NF- κ B by Elongation Factors Is Determined by Core Promoter Type*. Molecular and Cellular Biology 27(14): 5246-5259.
- Anderson K.V. (2000). *Toll signaling pathways in the innate immune response*. Current Opinion in Immunology 12(1): 13-19.
- Arbour N.C. et al. (2000). *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nature Genetics 25(2): 187-191.
- Athman R. y Philpott D. (2004). *Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins*. Current Opinion in Microbiology 7(1): 25-32.
- Barbalat R. et al. (2011). *Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System*. Annual Review of Immunology 29(1): 185-214.
- Barreiro L.B. et al. (2008). *Natural selection has driven population differentiation in modern humans*. Nature Genetics 40(3): 340-345.
- Barrett J.C. et al. (2005). *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics 21(2): 263-265.
- Berger J.P. et al. (2005). *PPARs: therapeutic targets for metabolic disease*. Trends in Pharmacological Sciences 26(5): 244-251.
- Bergman I.-M. et al. (2010). *European wild boars and domestic pigs display different polymorphic patterns in the Toll-like receptor (TLR) 1, TLR2, and TLR6 genes*. Immunogenetics 62(1): 49-58.
- Betts M.J. y Russell R.B. (2003). *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*. Bioinformatics for Geneticists. John Wiley & Sons, Ltd. 289-316.
- Bouwman P. y Philipsen S. (2002). *Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors*. Molecular and Cellular Endocrinology 195(1-2): 27-38.
- Bowie A. y O'Neill L.A. (2000). *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. Journal of Leukocyte Biology 67(4): 508-514.
- Burke S.J. et al. (2014). *NF-kappaB and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 306(2): E131-149.

- Butler J.E.F. y Kadonaga J.T. (2002). *The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression*. *Genes & Development* 16(20): 2583-2592.
- Cao S. et al. (2005). *KLF11-mediated Repression Antagonizes Sp1/Sterol-responsive Element-binding protein-induced Transcriptional Activation of Caveolin-1 in Response to Cholesterol Signaling*. *Journal of Biological Chemistry* 280(3): 1901-1910.
- Cartharius K. et al. (2005). *MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites*. *Bioinformatics* 21(13): 2933-2942.
- Clements J.L. et al. (2006). *Impaired Generation of CD8+ Thymocytes in Ets-1-Deficient Mice*. *The Journal of Immunology* 177(2): 905-912.
- Cobaleda C. et al. (2007). *Pax5: the guardian of B cell identity and function*. *Nature Immunology* 8(5): 463-470.
- Cooper G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. Boston University.
- Chang M. et al. (2011). *Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Journal of Virology* 85(16): 8403-8412.
- Chen Q. et al. (2012). *Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3*. *PLoS ONE* 7(8): e42971.
- Chuvpilo S. et al. (1993). *Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter*. *Nucleic Acids Research* 21(24): 5694-5704.
- Deaton A.M. y Bird A. (2011). *CpG islands and the regulation of transcription*. *Genes & Development* 25(10): 1010-1022.
- Dissing J. et al. (1996). *A Five Minute Procedure for Extraction of Genomic DNA from Whole Blood, Semen and Forensic Stains for PCR*. 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics (Internationale Gesellschaft für forensische Hämoenetik e.V.), Santiago de Compostela, 12-16 September 1995. Carracedo A., Brinkmann B. y Bär W., Springer Berlin Heidelberg. 6: 269-271.
- Eder W. et al. (2004). *Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(3): 482-488.
- Excoffier L. et al. (2005). *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis*. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Eyquem S. et al. (2004). *The development of early and mature B cells is impaired in mice deficient for the Ets-1 transcription factor*. *European Journal of Immunology* 34(11): 3187-3196.

Fadeel B. (2012). *Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system*. Swiss Medical Weekly 142(1424-3997).

Farhat K. et al. (2008). *Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling*. Journal of Leukocyte Biology 83(3): 692-701.

Fazio G. et al. (2011). *The Role of PAX5 in ALL, Novel Aspects in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Italy, InTech.

Feldman A.L. y Dogan A. (2007). *Diagnostic uses of Pax5 immunohistochemistry*. Advances in Anatomic Pathology 14(5): 323-334.

Fiorentino F. et al. (2003). *The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders*. Molecular Human Reproduction 9(7): 399-410.

Foster S.L. y Medzhitov R. (2009). *Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response*. Clinical Immunology 130(1): 7-15

Friedman A.D. et al. (1989). *CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells*. Genes & Development 3(9): 1314-1322.

Fuxa M. y Skok J.A. (2007). *Transcriptional regulation in early B cell development*. Current Opinion in Immunology 19(2): 129-136.

Gabriel S.B. et al. (2002). *The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome*. Science 296(5576): 2225-2229.

Gazouli M. et al. (2005). *Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population*. World Journal of Gastroenterology 11(5): 681-685.

Gerold G. et al. (2007). *What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections?* Seminars in Immunology 19(1): 41-47.

Gewirtz A.T. et al. (2006). *Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease*. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 290(6): 1157-1163.

Girardin S.E. et al. (2001). *CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive Shigella flexneri*. EMBO reports 2(8): 736-742.

Girardin S.E. et al. (2003). *Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan*. Science 300(5625): 1584-1587.

- Govindaraj R.G. et al. (2011). *Comparative Analysis of Species-Specific Ligand Recognition in Toll-Like Receptor 8 Signaling: A Hypothesis*. PLoS ONE 6(9): e25118.
- Grabe N. (2002). *AliBaba2: Context Specific Identification of Transcription Factor Binding Sites*. In Silico Biology 2(1): S1-S15.
- Gray I.C. et al. (2000). *Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics*. Human Molecular Genetics 9(16): 2403-2408.
- Guha M. y Mackman N. (2001). *LPS induction of gene expression in human monocytes*. Cellular Signalling 13(2): 85-94.
- Hashimoto M. et al. (2004). *Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from Porphyromonas gingivalis*. International Immunology 16(10): 1431-1437.
- Hawn T.R. et al. (2003). *A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease*. The Journal of Experimental Medicine 198(10): 1563-1572.
- Hayashi K. (1991). *PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*. Genome Research 1(1): 34-38.
- Hayashi F. et al. (2001). *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature 410(6832): 1099-1103.
- Heo S.H. y Cho J.Y. (2014). *ELK3 Suppresses Angiogenesis by Inhibiting the Transcriptional Activity of ETS-1 on MT1-MMP*. International Journal of Biological Sciences 10(4): 438-447.
- Hernández L J.C. y Urcuqui I S. (2012). *Activation and Regulation of Inflammasome NLRP3 during Infectious Diseases - Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas*. Iatreia 25(4): 380-390.
- Hertz C.J. et al. (2001). *Microbial Lipopeptides Stimulate Dendritic Cell Maturation Via Toll-Like Receptor 2*. The Journal of Immunology 166(4): 2444-2450.
- Hornung V. et al. (2002). *Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1- 10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides*. The Journal of Immunology 168(9): 4531-4537.
- Hosoi Y. et al. (2004). *Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer*. International Journal of Oncology 25(2): 461-468.
- Hu C. et al. (2010). *Functional characterization of the NF- κ B binding site in the human NOD2 promoter*. Cellular & Molecular Immunology 7(4): 288-295.

- Huang H. et al. (2013). *Cytokine signaling in the differentiation of innate effector cells*. JAK-STAT 2(1): e23531.
- Hugot J.-P. et al. (2001). *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature 411(6837): 599-603.
- Ibeagha-Awemu E.M. et al. (2008). *A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig*. Mammalian Genome 19(4): 226-245.
- Inohara N. et al. (2000). *An Induced Proximity Model for NF- κ B Activation in the Nod1/RICK and RIP Signaling Pathways*. The Journal of Biological Chemistry 275(36): 27823-27831.
- Janeway C.A. y Medzhitov R. (2002). *INNATE IMMUNE RECOGNITION*. Annual Review of Immunology 20(1): 197-216.
- Jozaki K. et al. (2009). *Influence of polymorphisms in porcine NOD2 on ligand recognition*. Molecular Immunology 47(2-3): 247-252.
- Kang I. et al. (2010). *Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 267(3): 385-389.
- Kathrani A. et al. (2010). *Polymorphisms in the Tlr4 and Tlr5 Gene Are Significantly Associated with Inflammatory Bowel Disease in German Shepherd Dogs*. PLoS ONE 5(12): e15740.
- Kawai T. y Akira S. (2010). *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nature Immunology 11(5): 373-384.
- Kelley L.A. y Sternberg M.J. (2009). *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server*. Nature Protocols 4(3): 363-371.
- Kielland A. y Carlsen H. (2010). *Molecular imaging of transcriptional regulation during inflammation*. Journal of Inflammation 7(1): 20.
- Kim E.J. et al. (2013). *Association between Genetic Polymorphisms of NOD 1 and Helicobacter pylori-Induced Gastric Mucosal Inflammation in Healthy Korean Population*. Helicobacter 18(2): 143-150.
- Klein-Hessling S. et al. (1996). *HMG I(Y) interferes with the DNA binding of NF-AT factors and the induction of the interleukin 4 promoter in T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences 93(26): 15311-15316.
- Kobayashi K. et al. (2002). *RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems*. Nature 416(6877): 194-199.

- Krasznai M. et al. (2011). *Association of TLR4 and TNF-alpha polymorphisms with clinical symptoms and cytokine levels in patients with allergic rhinitis*. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 268(4): 561-567.
- Kruithof E. et al. (2007). *Gene conversion limits divergence of mammalian TLR1 and TLR6*. *BMC Evolutionary Biology* 7(1): 148-158.
- Kumar S. et al. (2013). *Recognition of bacterial infection by innate immune sensors*. *Critical Reviews in Microbiology* 39(3): 229-246.
- Lacombe-Harvey M.-E. et al. (2013). *A highly conserved arginine residue of the chitosanase from Streptomyces sp. N174 is involved both in catalysis and substrate binding*. *BMC Biochemistry* 14(1): 23.
- Lange C. et al. (2011). *Defining the Origins of the NOD-Like Receptor System at the Base of Animal Evolution*. *Molecular Biology and Evolution* 28(5): 1687-1702.
- Lania L. et al. (1997). *Transcriptional regulation by the Sp family proteins*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29(12): 1313-1323.
- Le H.T. y Harton J.A. (2013). *Pyrin- and CARD-only Proteins as Regulators of NLR Functions*. *Frontiers in Immunology* 4: 275.
- Lee M.S. y Kim Y.-J. (2007). *Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk*. *Annual Review of Biochemistry* 76(1): 447-480.
- Lescale C. et al. (2010). *Reduced EBF expression underlies loss of B-cell potential of hematopoietic progenitors with age*. *Aging Cell* 9(3): 410-419.
- Lichtinger M. et al. (2007). *Transcription Factor PU.1 Controls Transcription Start Site Positioning and Alternative TLR4 Promoter Usage*. *Journal of Biological Chemistry* 282(37): 26874-26883.
- Lillemo M. y Morris C.F. (2000). *A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1100.
- Lowe D.M. et al. (1985). *Probing histidine-substrate interactions in tyrosyl-tRNA synthetase using asparagine and glutamine replacements*. *Biochemistry* 24(19): 5106-5109.
- Lu J Fau - Sun P.D. y Sun P.D. (2012). *The structure of the TLR5-flagellin complex: a new mode of pathogen detection, conserved receptor dimerization for signaling*. *Science Signaling* (1937-9145).
- Mak T.W. et al. (1998). *ICSBP. The Gene Knockout FactsBook*. Mak T.W., Penninger J., Roder J., Rossant J. y Saunders M. London, Academic Press. 541-542.

Manavalan B. et al. (2011). *Similar structures but different roles - An updated perspective on TLR structures*. *Frontiers in Physiology* 2: 1-13.

Manley J.L. et al. (1996). *Mechanisms of Transcriptional Activation and Repression can Both Involve TFIID*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351(1339): 517-526.

Martinon F. et al. (2007). *NALP Inflammasomes: a central role in innate immunity*. *Seminars in Immunopathology* 29(3): 213-229.

Masumi A. et al. (2002). *IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages*. *FEBS Letters* 531(2): 348-353.

McMillan L. (2009). *Post-genomic structural analysis of single amino acid polymorphisms. Department of Structural and Molecular Biology*. University College London. Doctor of Philosophy: 335.

Medzhitov R. et al. (1997). *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature* 388(6640): 394-397.

Michelsen K.S. et al. (2001). *The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Murine Dendritic Cells (DCs): PEPTIDOGLYCAN AND LIPOTEICHOIC ACID ARE INDUCERS OF DC MATURATION AND REQUIRE TLR2*. *Journal of Biological Chemistry* 276(28): 25680-25686.

Miyake K. (2004). *Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2*. *Seminars in Immunology* 16(1): 11-16.

Mogensen T.H. (2009). *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. *Clin Microbiol Rev* 22(2): 240-273, Table of Contents.

Montaño P. y Vargas A. (2002). *Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro*. *Interciencia* 27(1).

Moraes L.A. et al. (2006). *Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation*. *Pharmacology & Therapeutics* 110(3): 371-385.

Moreno C. y Sanchez-Ibarrola A. (2003). *Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario*. *Revista de Medicina Universidad de Navarra* 47(3): 29-33.

Muller A. et al. (2011). *H. pylori exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection*. *Cell Communication and Signaling* 9(1): 25.

- Muneta Y. et al. (2003). *Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in Mycoplasma hyopneumoniae infection*. Journal of Interferon & Cytokine Research 23(10): 583-590.
- Nakajima T. et al. (2008). *Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution*. Immunogenetics 60(12): 727-735.
- Nemazee D. et al. (2006). *Immunology: Tolllike receptors and antibody responses*. Nature 441(7091): E4; discussion E4.
- Nera K.-P. et al. (2006). *Loss of Pax5 Promotes Plasma Cell Differentiation*. Immunity 24(3): 283-293.
- Newbold R.J. et al. (2001). *The destabilization of human GCAP1 by a proline to leucine mutation might cause cone-rod dystrophy*. Human Molecular Genetics 10(1): 47-54.
- Nischalke H.D. et al. (2011). *Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis*. Journal of Hepatology 55(5): 1010-1016.
- Niskanen A.K. et al. (2014). *Balancing selection and heterozygote advantage in major histocompatibility complex loci of the bottlenecked Finnish wolf population*. Molecular Ecology 23(4): 875-889.
- Ojeda A. et al. (2006). *Unexpected High Polymorphism at the FABP4 Gene Unveils a Complex History for Pig Populations*. Genetics 174(4): 2119-2127.
- Parkin J. y Cohen B. (2001). *An overview of the immune system*. The Lancet 357(9270): 1777-1789.
- Patel H. et al. (2012). *Toll-Like Receptors in Ischaemia and Its Potential Role in the Pathophysiology of Muscle Damage in Critical Limb Ischaemia*. Cardiology Research and Practice 2012: 13.
- Peakall R. y Smouse P. (2012). *GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update*. Bioinformatics.
- Pettersen E.F. et al. (2004). *UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis*. Journal of Computational Chemistry 25(13): 1605-1612.
- Philpott D.J. y Girardin S.E. (2004). *The role of Tolllike receptors and Nod proteins in bacterial infection*. Molecular Immunology 41(11): 1099-1108.
- Poltorak A. et al. (1998). *Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene*. Science 282(5396): 2085-2088.

- Ragnarsdóttir B. et al. (2010). *Toll-Like Receptor 4 Promoter Polymorphisms: Common TLR4 Variants May Protect against Severe Urinary Tract Infection*. PLoS ONE 5(5): e10734.
- Rathinam V.A.K. et al. (2010). *The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses*. Nature Immunology 11(5): 395-402.
- Safe S. y Abdelrahim M. (2005). *Sp transcription factor family and its role in cancer*. European Journal of Cancer 41(16): 2438-2448.
- Saito T. et al. (2001). *Novel Transcriptional Regulation of the Human CYP3A7 Gene by Sp1 and Sp3 through Nuclear Factor κ B-like Element*. Journal of Biological Chemistry 276(41): 38010-38022.
- Sakai T. et al. (2003). *Identification of the DNA Binding Specificity of the Human ZNF219 Protein and Its Function as a Transcriptional Repressor*. DNA Research 10(4): 155-165.
- Sakurai T. et al. (2013). *Transcriptional Regulation of Two Conceptus Interferon Tau Genes Expressed in Japanese Black Cattle during Peri-Implantation Period*. PLoS ONE 8(11): e80427.
- Schmitz G. et al. (2004). *Zinc finger protein ZNF202 structure and function in transcriptional control of HDL metabolism*. Current Opinion in Lipidology 15(2): 199-208.
- Sharf R. et al. (1995). *Functional Domain Analysis of Interferon Consensus Sequence Binding Protein (ICSBP) and Its Association with Interferon Regulatory Factors*. Journal of Biological Chemistry 270(22): 13063-13069.
- Sharma B.S. et al. (2006). *Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein Bulls*. Journal of Dairy Science 89(9): 3626-3635.
- Shaw M.H. et al. (2008). *NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors*. Current Opinion in Immunology 20(4): 377-382.
- Shaw P.J. et al. (2010). *NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome*. European Journal of Immunology 40(3): 624-627.
- Shi Q. et al. (2001). *Constitutive Sp1 Activity Is Essential for Differential Constitutive Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Pancreatic Adenocarcinoma*. Cancer Research 61(10): 4143-4154.
- Shimazu R. et al. (1999). *MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4*. The Journal of Experimental Medicine 189(11): 1777-1782.
- Shinkai H. et al. (2006). *Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: Complete sequencing of genomic region and expression analysis*. Molecular Immunology 43(9): 1474-1480.

Shinkai H. et al. (2006b). *Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes.* Immunogenetics 58(4): 324-330.

Singh D.P. et al. (2012). *Transcriptional Protein Sp1 Regulates LEDGF Transcription by Directly Interacting with Its Cis-Elements in GC-Rich Region of TATA-Less Gene Promoter.* PLoS ONE 7(5): e37012.

Sironi M. et al. (2012). *A Common Polymorphism in TLR3 Confers Natural Resistance to HIV-1 Infection.* The Journal of Immunology 188(2): 818-823.

Smale S.T. y Kadonaga J.T. (2003). *THE RNA POLYMERASE II CORE PROMOTER.* Annual Review of Biochemistry 72(1): 449-479.

Smith M.F. et al. (2003). *Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for Helicobacter pylori-induced NF- κ B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells.* Journal of Biological Chemistry 278(35): 32552-32560.

Takeda K. y Akira S. (2000). *STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses.* Cytokine and Growth Factor Reviews 11(3): 199-207.

Takeda K. y Akira S. (2004). *TLR signaling pathways.* Seminars in Immunology 16(1): 3-9.

Takeuchi O. y Akira S. (2001). *Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system.* International Immunopharmacology 1(4): 625-635.

Tang D. et al. (2012). *PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity.* Immunological Reviews 249(1): 158-175.

Temple K.A. et al. (2005). *An Intact DNA-binding Domain Is Not Required for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Binding and Activation on Some PPAR Response Elements.* Journal of Biological Chemistry 280(5): 3529-3540.

Theodoropoulos G.E. et al. (2012). *Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development.* The Breast 21(4): 534-538.

Tissières P. et al. (2009). *Cooperation between PU.1 and CAAT/Enhancer-binding Protein β Is Necessary to Induce the Expression of the MD-2 Gene.* Journal of Biological Chemistry 284(39): 26261-26272.

Tohno M. et al. (2005). *Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine.* Biochemical and Biophysical Research Communications 330(2): 547-554.

Tohno M. et al. (2008a). *Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine.* Molecular Immunology 45(6): 1807-1817.

Tohno M. et al. (2008b). *Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2)*. *Molecular Immunology* 45(1): 194-203.

Toka F.N. et al. (2009). *Accessory-Cell-Mediated Activation of Porcine NK Cells by Toll-Like Receptor 7 (TLR7) and TLR8 Agonists*. *Clinical and Vaccine Immunology* 16(6): 866-878.

Tokusumi Y. et al. (2007). *The New Core Promoter Element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) Directs Activator-, Mediator-, and TATA-Binding Protein-Dependent but TFIID-Independent RNA Polymerase II Transcription from TATA-Less Promoters*. *Molecular and Cellular Biology* 27(5): 1844-1858.

Trinchieri G. y Sher A. (2007). *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. *Nature Reviews Immunology* 7(3): 179-190.

Tsukada J. et al. (2011). *The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation*. *Cytokine* 54(1): 6-19.

Uddin M.J. et al. (2012). *Expression dynamics of Toll-like receptors mRNA and cytokines in porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147(3-4): 211-222.

Uenishi H. et al. (2012). *Genomic survey of polymorphisms in pattern recognition receptors and their possible relationship to infections in pigs*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148(1-2): 69-73.

Vignal A. et al. (2002). *A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics*. *Genetic Selection Evolution* 34(3): 275 - 305.

Wagner S. et al. (2000). *A Broad Role for the Zinc Finger Protein ZNF202 in Human Lipid Metabolism*. *Journal of Biological Chemistry* 275(21): 15685-15690.

Walters R.D. et al. (2013). *NFATc2 recruits cJun homodimers to an NFAT site to synergistically activate interleukin-2 transcription*. *Molecular Immunology* 56(1-2): 48-56.

Wang P. et al. (2012). *Association of NOD1 and NOD2 genes polymorphisms with Helicobacter pylori related gastric cancer in a Chinese population*. *World Journal of Gastroenterology* 18(17): 2112-2120.

Wang X.-p. et al. (2008). *Cloning and SNP screening of the TLR4 gene and the association between its polymorphism and somatic cell score in dairy cattle*. *South African Journal of Animal Science* 38(2): 101-109.

Wasylyk C. et al. (1992). *A novel modulator domain of Ets transcription factors*. *Genes & Development* 6(6): 965-974.

- Weir B.S. y Cockerham C. (1984). *Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure*. *Evolutionary Bioinformatics Online* 38(6): 1358-1370.
- Werling D. y Coffey T.J. (2007). *Pattern recognition receptors in companion and farm animals - The key to unlocking the door to animal disease?* *The Veterinary Journal* 174(2): 240-251.
- Werling D. y Jungi T.W. (2003). *TOLLlike receptors linking innate and adaptive immune response*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91(1): 1-12.
- Werts C. et al. (2001). *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism*. *Nature Immunology* 2(4): 346-352.
- Wu J.-R. y Zeng R. (2012). *Molecular basis for population variation: From SNPs to SAPs*. *FEBS Letters* 586(18): 2841-2845.
- Yan H. y Zhou W. (2004). *Allelic variations in gene expression*. *Current Opinion in Oncology* 16(1): 39-43.
- Yang C.-A. et al. (2012). *Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis*. *Human Immunology* 73(8): 844-851.
- Yang C. et al. (2007). *Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters*. *Gene* 389(1): 52-65.
- Yang R.-B. et al. (1999). *Signaling Events Induced by Lipopolysaccharide-Activated Toll-Like Receptor 2*. *The Journal of Immunology* 163(2): 639-643.
- Yang T.T.C. y Chow C.-W. (2003). *Transcription Cooperation by NFAT•C/EBP Composite Enhancer Complex*. *Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15874-15885.
- Yang Z. et al. (2000). *NF-IL6 (C/EBP β) Vigorously Activates il1b Gene Expression via a Spi-1 (PU.1) Protein-Protein Tether*. *Journal of Biological Chemistry* 275(28): 21272-21277.
- Yeh F.C. et al. (1999). *POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits*. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Alta.
- Yu Y. et al. (2006). *TLR5-Mediated Phosphoinositide 3-Kinase Activation Negatively Regulates Flagellin-Induced Proinflammatory Gene Expression*. *The Journal of Immunology* 176(10): 6194-6201.
- Zähringer U. et al. (2008). *TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity*. *Immunobiology* 213(3-4): 205-224.

Zeng H.-M. et al. (2011). *Genetic Variants of Toll-Like Receptor 2 and 5, Helicobacter Pylori Infection, and Risk of Gastric Cancer and Its Precursors in a Chinese Population*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 20(12): 2594-2602.

Zhong Y. et al. (2013). *Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases*. *Frontiers in Immunology* 4: 333.

Zhou P. et al. (2011). *Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity*. *The FASEB Journal* 25(10): 3489-3495.

Zhu C. et al. (2003). *Activation of the Murine Interleukin-12 p40 Promoter by Functional Interactions between NFAT and ICSBP*. *Journal of Biological Chemistry* 278(41): 39372-39382.

Zhu J. et al. (2008). *Porcine TLR8 and TLR7 are both activated by a selective TLR7 ligand, imiquimod*. *Molecular Immunology* 45(11): 3238-3243.