

Análisis de la diversidad genética de una población de caballos Criollo Argentino mediante polimorfismos de nucleótido simple de los genes IL12B y TNF- α

Genetic diversity analysis of a Criollo Argentino horses population using single nucleotide polymorphisms of IL12B and TNF- α genes

Corbi Botto CM^{1,2}, Sadaba SA^{1,2}, Zappa ME¹, Peral García P¹, Díaz S^{1*}

¹Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEVET),

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

CCT La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET);

²Becarios CONICET. *Correo electrónico de la autora: sdiaz@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La caracterización de una población es el primer paso en el camino hacia su conservación y utilización. La raza Criollo Argentino es una de las referentes de la especie equina en Argentina y, por lo tanto, un patrimonio ganadero local que representa un recurso único en cuanto a la identidad y al sistema productivo del país. El objetivo de este trabajo fue analizar una población de caballos Criollo Argentino del norte de Argentina por medio de la caracterización de la variabilidad genética de cuatro marcadores moleculares del tipo *single nucleotide polymorphism* (SNP) localizados en los genes que codifican para las citoquinas IL-12B y TNF- α . Se recolectaron muestras de 50 caballos Criollo Argentino y se extrajo ADN genómico que se utilizó para tipificar mediante PCR-Pirosecuenciación®, tres SNPs en el promotor del gen TNF- α y uno localizado en el exón 5 del gen IL-12B. Se estimaron frecuencias génicas y genotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética. En IL-12B se detectaron dos alelos, mientras que en TNF- α se observaron 4 haplotipos, entre ellos uno no descrito hasta el momento en equinos. Los resultados muestran que la heterocigosis esperada fue superior en TNF- α ($H_e=0,764$) y la población se encuentra en equilibrio para el locus IL-12B (p -valor $\geq 0,05$). Se destaca la importancia del caballo Criollo Argentino como acervo génico para el estudio de características genéticas y enfermedades de la especie equina.

Palabras clave: equinos, SNP, citoquinas, variabilidad genética

Abstract: Characterization of genetic resources is a key step in the pursuit of its use and conservation. Criollo Argentino is one of the iconic breeds of the equine species in Argentina, and therefore a local livestock patrimony that represents a unique resource in terms of productive system and identity of the country. The aim of this work was to analyze a population of Criollo Argentino horses from the north of Argentina by characterizing the genetic variability of four single nucleotide polymorphisms (SNP) located in the genes that encode for IL-12 and TNF- α cytokines. Hair samples from 50 Criollo Argentino horses were collected to isolate genomic DNA, and genotype by PCR-Pyrosequencing™, three SNPs located in the TNF- α gene promoter region, and one located in exon 5 of IL-12B gene. Genic and genotypic frequencies were estimated, as well as Hardy-Weinberg equilibrium and genetic diversity. Two alleles were detected in IL-12B, while TNF- α showed four haplotypes, one of which never described up until now in horses. Results show that genetic diversity was higher in TNF- α ($H_e=0.764$) and IL-12B is in equilibrium (p -value ≥ 0.05). This shows the importance of Criollo Argentino breed as an interesting genetic pool for the study of genetic characteristics and diseases of the equine species.

Key words: equine, SNP, cytokine, genetic variability

Introducción

La caracterización de una población es el primer paso en el camino hacia su conservación y utilización. La raza Criollo Argentino es una de las referentes de la especie equina en Argentina y, por lo tanto, un patrimonio ganadero local que representa un recurso único en cuanto a la identidad y al sistema productivo del país. La selección de esta raza para el estudio se realizó teniendo en cuenta las características genéticas que presentan estos caballos con respecto a los marcadores genéticos analizados en estudios previos (Peral García 1994; Díaz 1997), así como a sus rasgos de rusticidad y adaptabilidad, producto de períodos de la raza sujeta a la selección natural en ambientes diversos. Esta adaptación a las condiciones de vida del medio ambiente le permitió desarrollar sus grandes cualidades de resistencia a las enfermedades (Dowdall 1982), posicionando al caballo Criollo Argentino como la herramienta de trabajo para muchos productores en este país.

El conocimiento de la variabilidad genética entre individuos de una especie resulta relevante para comprender, por ejemplo, los procesos biológicos y celulares que subyacen tras una entidad patológica. Partiendo de la premisa de que la expresión diferencial de algunos genes podría tener consecuencias en el proceso de la enfermedad, es importante profundizar en el conocimiento de la variación de las secuencias en los genes implicados en la respuesta inmune.

La identificación de variantes en el ADN que contribuyen a las enfermedades ha sido un objetivo central en la genética humana y ha cobrado importancia creciente en especies domésticas y pecuarias. Poder identificar los *loci* causales requiere de la habilidad para determinar variaciones en la secuencia de ADN a escala genómica. En la gran mayoría de los sitios genómicos (~99%) cada individuo tiene el mismo residuo nucleotídico en ambos cromosomas homólogos (LaFramboise 2009). En contraste, los polimorfismos de nucleótido simple o *single nucleotide polymorphisms* (SNP) son posiciones genómicas en las que coexisten dos nucleótidos distintos (alelos) y cada uno aparece en una proporción significativa de la población (polimorfismos). Los SNPs son la fuente de variación genética más común e informativa en los individuos de una especie. El número de SNPs publicados en las bases de datos supera el millón y medio en humanos, y corresponden a una frecuencia aproximada de un SNP cada 2000 pb (Kruglyak y Nickerson 2001; Zhao *et al.* 2003), en tanto que el genoma equino tiene un tamaño aproximado de 2,67 Gb con una frecuencia de un SNP cada 1500 pb (Wade *et al.* 2009).

El objetivo de este trabajo fue analizar una población de caballos de la raza Criollo Argentino del

norte de Argentina por medio de la caracterización de la variabilidad genética de cuatro marcadores moleculares del tipo SNP, localizados en los genes equinos que codifican mediadores de la respuesta inmune tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y subunidad p40 de la interleuquina 12 (IL-12B).

Materiales y métodos

Población analizada

Para este estudio se utilizaron muestras de pelo y sangre de 50 caballos de la raza Criollo Argentino, hijos de cinco padrillos diferentes. Los caballos pertenecen a la Cabaña de Caballos Criollos de INTA Leales del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), localizada en Tucumán.

Toma de muestras y extracción de ADN

Las muestras de sangre se tomaron por punción yugular con aguja estéril y se mantuvieron refrigeradas para extraer la interfase que contiene el *buffy-coat*. Posteriormente se almacenaron en freezer a -20 °C. La extracción de ADN se realizó con el reactivo DNAzol® siguiendo las recomendaciones del fabricante (Ausubel *et al.* 1990). El ADN resultante se resuspendió en agua destilada estéril y se cuantificó con espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare). Alternativamente, los bulbos pilosos se usaron para extraer el ADN mediante el uso de NaOH 200 mM.

Genotipificación de los SNPs

Se analizaron cuatro marcadores moleculares del tipo SNP ubicados en los genes que codifican para las citoquinas IL-12B y TNF- α . Usando el ADN genómico extraído como molde, se amplificaron separadamente las regiones de interés (exón 5 de IL-12B y promotor de TNF- α) mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos (Tabla 1). Los productos de PCR se observaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en tampón TBE1X (Tris-Cl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH=8,4), se sometieron a tinción con bromuro de etidio (5mg/ml) y se observaron bajo transiluminación UV. Posteriormente, los SNPs se detectaron mediante Pirosecuenciación®, según el procedimiento recomendado (Ronaghi 2001).

Análisis estadístico

Para cada marcador se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) mediante el test de estimación de probabilidad de P-valores. Además, se estimó la diversidad genética mediante el cálculo de la heterocigosis (He) de los individuos por locus observado y según

Cebador	Secuencia
IL12Be5 F	5'-CACGACCTTACTCCAAAGCCCA-3'
IL12Be5-R-biot	5'-CTTGCCCTGGACCTGAATAGAG-3'
TNF- α F2	5'-GCCAGGAGAGAGAGAAGCAA-3'
TNF- α P1R	5'-CGATCACCCCAAAGTGCA-3'

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la amplificación por PCR de las citoquinas IL-12 y TNF- α .

lo esperado bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, de acuerdo a la fórmula de Nei (1978), incorporando la corrección de Levene (1949) para pequeñas muestras. Estos análisis genéticos poblacionales se realizaron utilizando el conjunto de programas GENEPOP versión 4.0 (Rousset 2008). La composición y diversidad de haplotipos del promotor de TNF- α se determinó mediante el programa PHASE (Scheet y Stephens 2005) y el análisis de segregación familiar con datos de *pedigree*.

Resultados

La Pirosecuenciación® permitió detectar exitosamente, en la población de caballos Criollo Argentino analizada, el SNP del exón 5 de IL-12B. El alelo G ($f=0,82$) resultó el más frecuente y se detectaron los tres genotipos posibles: GG, AG, AA, con frecuencias genotípicas de: 0,66, 0,32 y 0,02, respectivamente. La población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$). La heterocigosis esperada para el locus IL12B fue de $He=0,298$. Los pirogramas obtenidos se muestran en la Figura 1.

Los pirogramas de la Figura 2 muestran las dos bases posibles para cada posición: TNF^{-95C/T}, TNF^{-89C/T} y TNF^{-85C/T}; tomadas en conjunto, estas tres posiciones permiten definir los haplotipos probables en el promotor del gen TNF- α . Para verificar los distintos haplotipos observados en la población en estudio, se analizaron los resultados obtenidos con el programa

PHASE y se compararon con la segregación en individuos emparentados. Los haplotipos presentes en la población de caballos criollos fueron: TTC (Fig. 2a), CTT (Fig. 2b), CTC (Fig. 2c), con frecuencias de: 0,399, 0,268 y 0,231, respectivamente. Además, se detectó la variante C en la posición TNF-89_{CT} (Fig. 2d), generando una combinación haplotípica poco frecuente (TCT, $f=0,059$). La heterocigosis esperada en TNF- α fue de $He=0,764$.

Discusión

Los polimorfismos de nucleótido simple son las variaciones genéticas más comunes descritas en los genes de citoquinas (Merino *et al.* 2013). El polimorfismo en el gen de IL12p40 fue descrito en estudios de asociación con las enfermedades equinas causadas por *Lawsonia intracellularis* y *Rhodococcus equi*, en razas de caballos de Europa, y no existen reportes previos en razas que se crían en nuestro país. La presencia de variabilidad en la región del promotor del gen TNF- α y la distribución de los haplotipos del TNF- α se limitaban a razas como Old Kladruber, Akhal-Teke, Thoroughbred, Arabes y Standardbred. En los caballos Criollo Argentino, los resultados evidencian desequilibrio de ligamiento, es decir, la frecuencia incrementada de determinadas combinaciones de SNPs (haplotipos) y la ausencia de otras. La construcción de haplotipos puede realizarse mediante un análisis de segregación familiar, el estudio de individuos de parentesco conocido y/o con la asistencia de software específico, tal como el programa PHASE. Sobre la base de los datos de frecuencias de los SNPs en la población analizada, el software asigna una probabilidad de ocurrencia a cada uno, siendo casi nula para los haplotipos CCT (< 4 %) y TTT (< 0,2 %). Además, el análisis de segregación de los individuos emparentados permitió confirmar la ausencia de animales con estos dos haplotipos.

Según las probabilidades de ocurrencia estimadas en la población analizada, entre los haplotipos que presentan la variante C en la posición TNF⁻⁸⁹ (CCT,

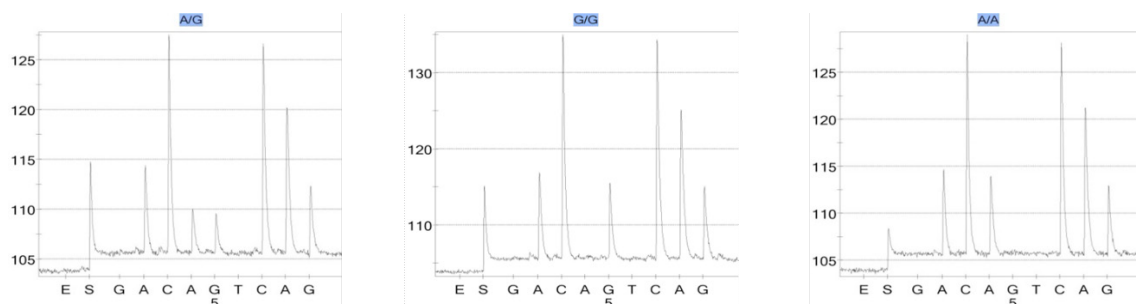


Figura 1. Pirogramas correspondientes a los genotipos detectados en el exón 5 del gen IL12B mediante Pirosecuenciación®: a) AG, b) GG, c) AA.

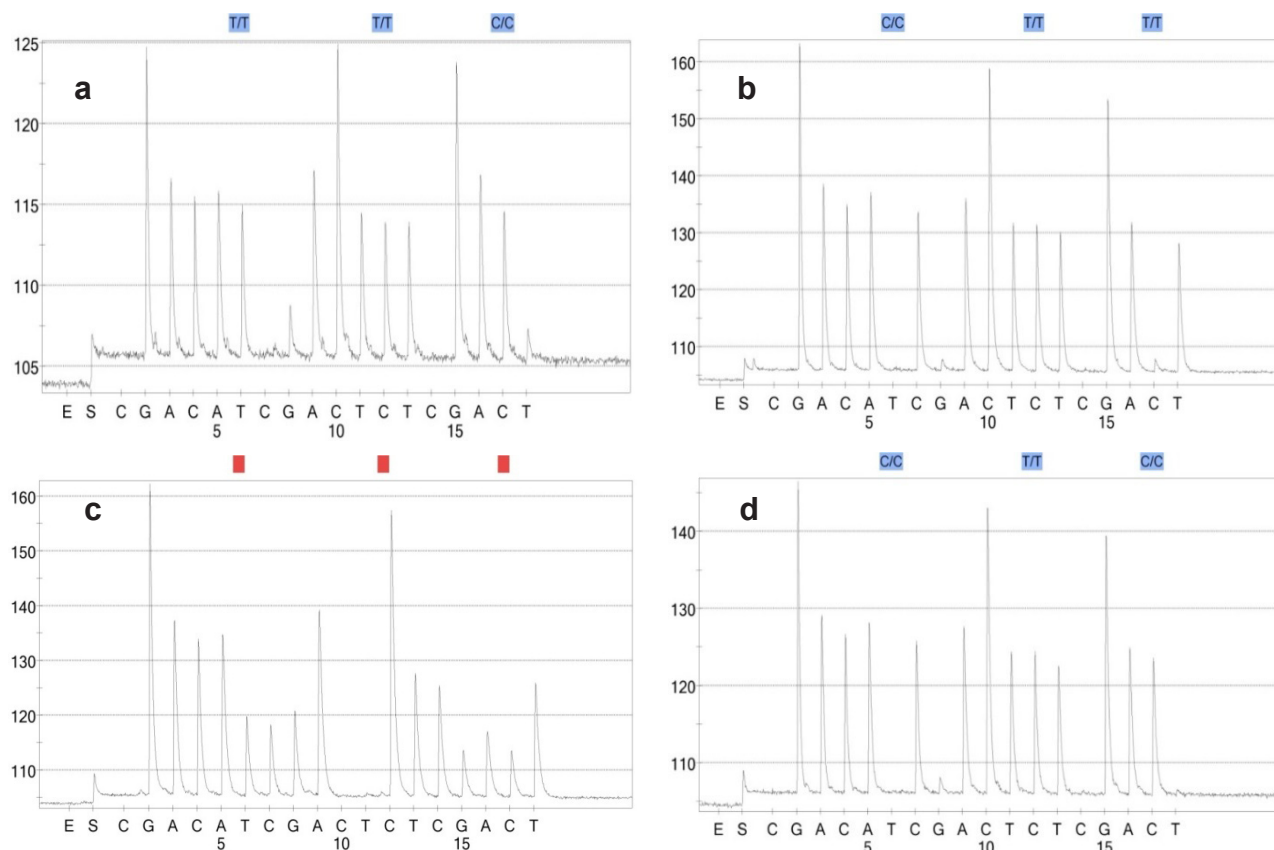


Figura 2. Pirogramas obtenidos para $TNF_{-95C/T}$, $TNF_{-89C/T}$ y $TNF_{-85C/T}$. Se observan los cuatro haplotipos presentes en la población: a) TTC, b) CTT, c) CTC y d) TCT.

TCT, CCC), el haplotipo TCT sería el único probable en esta población. Es de destacar que la presencia de la variante C en esta posición no había sido descrita previamente en ninguna raza equina; sólo se encuentra descrita en asnos y cebras de Grant (Brown *et al.* 2006).

Dada la importancia que tiene la secuencia del promotor en la función regulatoria del gen, el desequilibrio de ligamiento observado podría determinar la eficiencia en la afinidad e interacción con factores de transcripción específicos, que condicionarían la intensidad de la respuesta inmune en las que intervienen estas citoquinas.

Las distintas frecuencias de los haplotipos obtenidas podrían deberse a la presión selectiva sobre ciertos SNPs en esta raza equina. Por lo tanto, la presencia de polimorfismos en los genes de las citoquinas estudiadas pone en evidencia la riqueza del acervo génico de los caballos Criollo Argentino y permite describir un entorno genético informativo para estudios relacionados con la respuesta inmune, por ejemplo, ante enfermedades infecciosas.

Conclusiones

En este trabajo se estimaron los valores de diversidad genética en una población de caballos de la raza Criollo Argentino mediante el análisis de cuatro

SNPs localizados en el exón 5 del gen que codifica para IL-12B y en el promotor de $TNF-\alpha$. En este último se detectó el polimorfismo del SNP $TNF_{-89C/T}$ por lo que se pudo evaluar la presencia de un nuevo haplotipo, no descrito hasta el momento en equinos. Si bien serán necesarios futuros estudios para poder definir si la presencia de estas variantes en las citoquinas estudiadas, y especialmente en el promotor del $TNF-\alpha$, podría tener consecuencias en la respuesta inmune frente a enfermedades o entidades patológicas específicas, los resultados obtenidos permiten destacar la importancia del caballo Criollo Argentino como acervo génico para el estudio de características genéticas y enfermedades de la especie equina.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

Bibliografía

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Struhl K, 1990. Current protocols in molecular biology. New York; John Wiley & Sons, Inc., NY.

Brown JJ, Ollier WER, Thomson W, Matthews JB, Carter SD, Binns M, Pinchbeck G, Clegg PD. $TNF-\alpha$ SNP haplotype frequencies in equidae. Tissue Antigens. 2006; 67: 377-82.

Díaz S. 2003. Estudio del polimorfismo y poligenismo de los *Ici* DRB en caballos criollos argentinos. Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Dowdall, RC, 1982. Criando Criollos. Buenos Aires; Editorial Hemisferio Sur S.A.

Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 2001; 27(3): 234-5.

LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(13): 4181-93.

Levene H. On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Statist.* 1949; 20: 91-4.

Merino AM, Zhang K, Kaslow RA, Aissani B. Structure of tumor necrosis factor-alpha haploblocks in European populations. *Immunogenetics.* 2013; 65(7):543-52.

Peral García P. 1994. Caracterización de los equinos de Pura Raza Criolla. Su comparación con los equinos de Pura Raza Española mediante sus polimorfismos genéticos. Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978; 89: 583-90.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001; 11(1): 3-11.

Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resou.* 2008; 8: 103-6.

Scheet P, Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet.* 2005; 78:629-44.

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science.* 2009; 326: 865-7.

Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmett D, Boerwinkle E. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene.* 2003; 312: 207-13.