Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Caracterización molecular del gen que codifica al receptor tipo-Toll 2 (TLR2) en alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Estefani Geovanna ALTAMIRANO SANCHEZ

ASESOR

Dr. Miguel Angel ROJAS MONTES

Lima, Perú

2022

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Altamirano E. Caracterización molecular del gen que codifica al receptor tipo-Toll 2 (TLR2) en alpacas (Vicugna pacos) y llamas (Lama glama) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Estefani Geovanna Altamirano Sanchez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76351432
URL de ORCID	-------
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Rojas Montes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42290575
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5029-3874
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10810335
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15619652
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Ramiro Luna Espinoza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41958220
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Virología e Inmunología Veterinaria - San Marcos (GIVIVE)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM y al FONDECYT – CONCYTEC a través del PCONFIGI – 2019, Proyecto N° A19080081 (Resolución Rectoral N° 035556-R-19) y por el Proyecto de Ciencias Básicas – FONDECYT con N° de contrato 355-2019.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Dirección: Av. Circunvalación 2800. Latitud: -12.08348 Longitud: -76.984573
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 – 2020
URL de disciplinas OCDE	Ciencia Veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 06 de octubre de 2022**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº 0183-EPMV/FMV-2022**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg.	**Gómez Puerta, Luis Antonio**	**Presidente del Jurado**
MV. Dr.	**Rojas Montes, Miguel Angel**	**Asesor de la Tesis**
MV. Mg.	**Manchego Sayán, Alberto Gustavo**	**Miembro del Jurado**
MV. Dr.	**Luna Espinoza, Luis Ramiro**	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ALTAMIRANO SANCHEZ, ESTEFANI GEOVANNA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN QUE CODIFICA AL RECEPTOR tipo-toll 2 (TLR2) EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) Y LLAMAS (*Lama glama*)",

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

UNMSM Firmado digitalmente por GOMEZ PUERTA Luis Antonio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 12.10.2022 22:09:53 -05:00

……
Gómez Puerta, Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

UNMSM Firmado digitalmente por ROJAS MONTES Miguel Angel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 12.10.2022 15:32:03 -05:00

……
Rojas Montes, Miguel Angel: MV. Dr. Prof. Asociado TC

UNMSM Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 12.10.2022 11:32:01 -05:00

……
Manchego Sayán, Alberto Gustavo: MV. Mg. Prof. Principal DE

……
Luna Espinoza, Luis Ramiro: MV. Dr. Prof. Auxiliar DE

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria
ep.veterinaria@unmsm.edu.pe
"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario

1. Facultad: Medicina Veterinaria
2. Escuela: Medicina Veterinaria
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.
4. Apellidos y Nombres de la Autoridad Académica: Santiani Acosta, Alexei Vicent
5. Operador del Programa Informático de similitudes: Sandoval Monzón, Rocío Silvia
6. Documento evaluado: "Caracterización molecular del gen que codifica al receptor tipo-Toll 2 (TLR2) en alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*)".
7. Autor del documento: Estefani Geovanna Altamirano Sánchez
8. Fecha de recepción del documento: 15 de agosto del 2022
9. Fecha de aplicación del programa informático: 15 de agosto del 2022
10. Software utilizado
    - Turnitin
11. Configuración del programa detector de similitudes:
    - Excluye citas
    - Excluye bibliografía
    - Excluye coincidencias
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: 3%
13. Fuentes originales de similitudes encontradas:
    - cybertesis.unmsm.edu.pe 1 %
    - Hdl.handle.net 1%
    - Verma Subhash, Sodhi Monika, *et al.* Distribution of single nucleotide polymorphisms and protein domain arquitecture of toll.likr receptor-2 in Pahari cattle (Indian non-descrit indigenous breed) <1%
    - www.ibiantech.com <1%
    - www.revistas.una.ac.cr <1
    - www.yumpu.com <1
14. Observaciones: el mayor porcentaje de las similitudes halladas en la tesis evaluada se encuentra en la sección revisión bibliográfica.
15. Calificación de originalidad: DOCUMENTO CUMPLE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD, SIN OBSERVACIONES. Fecha del informe: 15 de agosto del 2022

UNMSM
Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.08.2022 16:05:53 -05:00

Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mí familia, por su constante cooperación y apoyo incondicional, quienes, con su carisma y positivismo, me forjaron desde muy pequeña.

A mis padres quienes me han acompañado en toda esta travesía, ellos han sido mi más grande motivación para seguir esforzándome cada día y lograr la culminación de este trabajo, que desde pequeña me inculcaron a ser perseverante ante las dificultades y la resiliencia, tomando cada error como un aprendizaje.

También dedicar a mis dos queridos hermanos menores, quienes me ayudaron a ser un mejor ejemplo para ellos.

A mis padrinos y tíos a la vez, quienes fueron una pieza fundamental para desarrollarme en lo personal y profesional de la carrera, quienes nunca dudaron en mí y en todas las metas que aún me faltan cumplir.

Agradecimientos

A Dios Padre quien me fortalece en cada prueba, brindándome salud y por darme la oportunidad de conocer a personas que serán amistades para toda la vida.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM y al FONDECYT – CONCYTEC por la subvención del trabajo de tesis a través del PCONFIGI – 2019, Proyecto N° A19080081 (Resolución Rectoral N° 035556-R-19) y al Proyecto de Ciencias Básicas – FONDECYT con N° de contrato 355-2019.

Al Dr. Miguel Rojas Montes, por su excelente competencia y amistad desde inicio hasta el término del proyecto, por abrirme las puertas de su equipo de investigación y la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo.

Al Dr. Alberto Manchego Sayán, mi co-asesor, desde el curso de Inmunología Veterinaria por su amistad y por sus sabios puntos de vista en cada detalle del proyecto.

Al Grupo de Investigación de Inmunología y Virología Veterinaria (GIVIVET) por brindarme las facilidades y equipos, y permitirme trabajar en las instalaciones del Laboratorio de Virología y Bacteriología de la FMV- UNMSM.

Al Dr. Lenin Maturrano, quien desde su primera lección del dogma de biología me brindo su confianza y me alentó para seguir adelante.

Al Dr. Luis Luna, por su amistad y orientación en la realización de este y otros proyectos.

Al Dr. Alfonso Chavera, por su atinada forma de enseñar, gracias por permitirme ser su delegada y aprendiz en el laboratorio, me llevo muchas enseñanzas suyas.

Al Dr. Wilfredo Huanca, por su amistad e inolvidables consejos en la redacción de este proyecto.

Al Dr. Harold Pérez por su amistad y ayuda constante hasta el último minuto.

A equipo multidisciplinario de IVITA Maranganí, por la realización de este proyecto, a los productores alpaqueros, por permitirme la recolección de las muestras, por sus enseñanzas de campo y su hospitalidad.

A quienes son considerados parte de mis amigos desde primer año, por compartir gratos momentos juntos en las buenas y malas, y por ser pieza importante en mí desarrollo profesional.

A mis amigos y compañeros de la Casa Blanca, quienes compartimos y aprendimos mutuamente de esta hermosa carrera.

Al equipo humano de biblioteca, en especial al Sr. Vicente siempre a disposición del estudiante con su carisma y sapiencia. Al personal de informática, Sr. Roberto Choque, por su paciencia y amistad.

A las amistades profesionales de la Universidad Complutense de Madrid quienes me dieron soporte durante la realización del proyecto.

A las personas que no fueron mencionadas, quiero que sepan muchas gracias por cada granito de arena de esta meta.

Índice

Dedicatoria ii
Agradecimientos iii
Índice v
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE CUADROS xi
LISTA DE ÁNEXOS xii
ABREVIATURAS 13
I. INTRODUCCIÓN 14
II. REVISIÓN DE LITERATURA 16
2.1. Camélidos sudamericanos (CSD) 16
2.1.1. Producción de CSD 17
2.1.2. Importancia social y económica 17
2.1.3. Problemática actual 18
2.1.4. Sistema inmunológico de los CSD 19
2.2. Sistema inmune innata 19
2.2.1. Generalidades 19
2.2.2. Receptor Tipo Toll 20
2.3. Receptor Tipo Toll 2 (TLR 2) 21
2.3.1. Propiedades 21
2.3.2. Relevancia del TLR2 26
2.4. Estudios de TLR 2 27
2.4.1. Humanos 27
2.4.2. Animales mamíferos 27
III. MATERIALES Y MÉTODOS 30
3.1. Lugar y tiempo de ejecución 30
3.2. Descripción del material experimental 30
3.2.1. Criterios de muestreo 31
3.2.2. Consideraciones éticas 32
3.3. Diseño experimental u observacional 32

3.3.1. Toma y conservación de muestras 32
3.3.2. Aislamiento de CMSP....32
3.3.3. Extracción de ARN....33
3.3.4. Análisis de integridad y cuantificación del ARN extraído por fluorometría. 34
3.3.5. Diseño de oligonucleótidos 35
3.3.6. Producción de ADN complementario (ADNc)....39
3.3.7. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) 39
3.3.8. Electroforesis del producto amplificado....40
3.3.9. Purificación, clonación y secuenciación 40
3.3.10. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. 40
3.3.11. Análisis de la estructura de la proteína LRR 41
IV. RESULTADOS....42
4.1. Selección de las muestras para la amplificación del TLR2....42
4.2. Detección de isoformas del gen *TLR 2* 43
4.3. Análisis de secuencia de las isoformas del gen *TLR 2*....45
4.4. Alineamiento múltiple 45
4.4.1. Variaciones (mutaciones) de las secuencias 48
4.4.2. Mutaciones sinónimas y no sinónimas....50
4.5. Análisis filogenético del gen *TLR 2*....56
4.5.1. Distancia entre nucleótidos y aminoácidos 56
4.5.2. Dendogramas....56
4.6. Análisis de la estructura del TLR 2 60
4.6.1. LRRsearch....60
4.6.2. SMART....61
4.6.3. SWISS-MODEL....61
V. DISCUSIÓN....63
VI. CONCLUSIONES 70
VII. RECOMENDACIONES....70
VIII. BIBLIOGRAFÍA....71
IX. ANEXOS 79

RESUMEN

Los receptores tipo-Toll (TLRs) reconocen los diferentes patrones moleculares asociados patógenos (PAMPs) que están presentes en bacterias, virus, hongos y parásitos. Su activación da como resultado una producción mejorada de péptidos antimicrobianos, citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que atraen y activan células inmunitarias profesionales. Los TLR2 son los encargados de reconocer peptidoglucanos, lipopéptidos y proteínas de superficie de las bacterias Gram +, Gram – y virus, respectivamente, a nivel extracelular e iniciar una respuesta inmune adecuada ante la infección contra estos agentes. El objetivo del trabajo fue caracterizar molecularmente la ORF (*Open Reading Frame*) completa del gen que codifica al TLR2 en alpacas y llamas. Para esto se colectaron 10 muestras de sangre de animales adultos (5 alpacas y 5 llamas) clínicamente saludables de cada especie, para la obtención de células mononucleares de sangre periférica por centrifugación. A partir de estas células se extrajo el ARN total y se evalúo la integridad del ARN y cantidad por fluorometría. El ARN viable fue sometido a una RT-PCR para la amplificación del ORF completo del TLR2. Los mejores productos fueron seleccionados para su clonación y secuenciación. Las secuencias de nucleótidos fueron editadas, ensambladas, alineadas y convertidas a secuencias de aminoácidos, usando los programas Chromas de Technelysium Pty Ltd y, SeqMan, EditSeq, y MegAlign Pro del paquete bioinformático DNASTAR Lasergene, respectivamente. Para el análisis filogenético se utilizó el software MEGA X, la predicción de los dominios estructurales de los TLR2 fue realizado utilizando los softwares en línea SMART y LRRsearch. Como resultado del estudio se obtuvo 3 clones, uno de alpaca y 2 de llamas, las 7 secuencias de dichos clones confirmaron la existencia de cómo mínimo 3 isoformas para este gen en alpacas y llamas. Al análisis filogenético se observa que dichas isoformas tienen una estrecha relación genética mostrando un porcentaje de similaridad que varía entre 99.1% al 99.5% cuando comparamos las secuencias de un mismo clon, y entre 97.6% al 99.5% cuando se comparan los diferentes clones. Las secuencias fueron comparadas con los genes predictivos de *TLR2* en camélidos de viejo mundo obteniendo una similaridad en el rango de 96.1% al 96.7%. Nuestras 7 secuencias fueron anotadas y depositadas en el GenBank (MT350705 - MT350711). Se concluye que las isoformas de alpacas y llamas obtenidas en nuestro estudio son diferentes a las descritas en otros camélidos. Se espera que la metodología desarrollada en este estudio pueda ser replicada en animales enfermos, con el fin de poder identificar polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs), para diferenciar genéticamente a los animales resistentes y susceptibles a infecciones en campo.

Palabras clave: Receptor tipo-Toll (TLR), alpacas, ORF, análisis filogenético.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) recognize the different associated pathogenic molecular patterns (PAMP's) that are present in bacteria, viruses, fungi, and parasites. Its activation results in improved production of antimicrobial peptides, cytokines and pro- inflammatory chemokines that attract and activate professional immune cells TLR2s are responsible for recognizing the peptidoglycans, lipopeptides and surface proteins of the Bacteria Gram +, Gram – and Viruses, respectively, at the extracellular level and initiate an adequate immune response to infection against these bacterial agents. The objective of the work was to molecularly characterize the complete ORF (Open Reading Frame) of the gene that encodes TLR2 in alpacas and llamas. For this, 10 blood samples were collected from clinically healthy adult animals (5 alpacas and 5 llamas) of each species, to obtain peripheral blood mononuclear cells by centrifugation. From these cells, the total RNA was extracted, and the RNA integrity and quantity were evaluated by fluorometry. The viable RNA was subjected to an RT-PCR for the amplification of the complete ORF of the *TLR.* The best products were selected for cloning and sequencing. Nucleotide sequences were edited, assembled, aligned, and converted to amino acid sequences, using Chromas, EditSeq, SeqMan, BLAST and MegAlign from the DNAstar Lasergene bioinformatics package, respectively. For the phylogenetic analysis, the MEGA X software was used, the prediction of the structural domains of the TLR2 was made using SMART and LRRsearch software's. As a result of the study, 3 clones were obtained, one of alpaca and 2 of llamas, the 7 sequences of these clones confirmed the existence of at least 3 isoforms for this gen in alpacas and llamas, to the phylogenetic analysis it is observed that these isoforms have a close genetic relationship showing a percentage of similarity that varies between 99.1% to 99.5% when we compare the sequences of the same clone, and between 97.6% to 99.5% when comparing the sequences obtained from the same clone and between the different clones. The sequences were compared with the predictive genes of *TLR2* in old world camelids obtaining a similarity in the range of 96.1% to 96.7%. Our 7 sequences were annotated and deposited in the GenBank (MT350705 - MT350711). It is concluded that the isoforms of alpacas and llamas obtained in our study are different from those described in other camelids. It is expected that the methodology developed in this study can be replicated in sick animals, to be able to identify single nucleotide polymorphism (SNPs), to genetically differentiate animals resistant and susceptible to infections in the field.

Key words: Toll-like receptor (TLR), alpacas, ORF, phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los camélidos (Pinto Jiménez *et al.,* 2010).....17
Figura 2. Mecanismo de acción de los TLRs. (Duan *et al*., 2022) 21
Figura 3. Estructura del receptor tipo- Toll 2. (Gao *et al*., 2017).....22
Figura 4. Respuesta de TLR2/1 y TLR2/6 a lipoproteínas bacterianas diaciladas y triaciladas. 24
Figura 5. Vías de señalización de TLR2 (InvivoGen, 2018). 26
Figura 6. Localización de lugar de muestreo en Maranganí, Cusco-Perú. 31
Figura 7. Esquematización del aislamiento del CMSP usando el fundamento de separación celular por densidad utilizando el Histopaque 1.077. 33
Figura 8. Esquematización de la extracción de ARN usando el InnuPREP RNA Kit. 34
Figura 9. Esquematización de la preparación del protocolo de análisis de integridad y cuantificación del ARN extraído. (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33241). 35
Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de TLR2 en camélidos y mamíferos marinos utilizados para identificar las regiones conservadas de los TLR2, utilizando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA). 37
Figura 11. Productos amplificados de RT-PCR de las ORF TLR2 (2348 pb). Carriles PM: 2348 pb del marcador de ADN; los carriles 1, 6, 7 y 8 con las identificaciones de S007 (alpaca), L010 (llama), L022 (llama) y L017 (llama), respectivamente, corresponden con luminiscencia que corresponden a 2348 pb; el carril 11 es el blanco y el carril 12 es PM marcador de ADN. 44
Figura 12. Amplificados de las ORF TLR2 (2348 pb) enviados a clonar y secuenciar. Carriles 1: Padrón de peso (PM) de 100pb; los carriles 1, 2 y 3 con luminiscencia que corresponden a 2348pb son positivos a las variantes de ORF de TLR2: S007 (alpaca), L022 (llama) y L017 (llama), respectivamente. 44
Figura 13. Cromatograma de una colonia de un clon de la alpaca S007 editado utilizando el programa Chromas usando el ORF11. F. Para cada colonia del clon del S007 se obtuvo 6 cromatogramas (secuencias) utilizadas para la formación de un contig de 2348pb. 46
Figura 14. Alineamiento y formación de las secuencias contiguas (contig) utilizando las 6 secuencias nucleotídicas obtenidas de una colonia del clon S007. A) y B) muestran la formación de contig a través del programa SeqMan y C) muestra ya el contig formado y exportado utilizando EditSeq. 47

Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas obtenidas de la isoforma 1 de la del clon S007, mediante el programa de BLAST.....48
Figura 16. Segmento de alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de las tres isoformas clonadas de la alpaca S007, este segmento va de la posición 61 hasta la 180. Se usó el software MegAlign. 51
Figura 17. Segmento de alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las tres isoformas clonadas de la alpaca S007, este segmento va de la posición 181 hasta la 360. Se usó el software MegAlign.....52
Figura 18. Distancia entre aminoácidos entre las secuencias obtenidas y las secuencias con más identidad de la distancia en el software BLAST. Se usó el software MegAlign. 58
Figura 19. Árbol filogenético de la ORF TLR 2. El dendograma fue construido utilizando el método de Neighbor-Joining, las distancias fueron corregidas usando el modelo matemático de matrix JTT (Jones, Taylor y Thompson). La significancia estadística fue estimada por el análisis de Bootstrap con 1000 repeticiones, utilizando el programa MEGA 11 (https://www.megasoftware.net/)..... **Error! Bookmark not defined.**
Figura 20. Secuencias Motif halladas en la isoforma 1 de S007. Se usó el programa LRRresearch (http://lrrsearch.com/). 60
Figura 21. Representación diagramática de los dominios de la isoforma 1 del clon de alpaca S007 conformado por 785 aa. A nivel del ectodominio se encuentran los LRRs. Los dominios fueron predichos usando el programa SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). 61
Figura 22. Arquitectura del ectodominio predictivo en 3D de la isoforma 1 del clon de la alpaca S007. En el cuadro inferior grafica las secciones: 3 posiciones de LRRs (1, 2 y 3) del ectodominio, dominio transmembrana (4), y TIR (5). Se trabajó con el programa SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).....62

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Identificación de las muestras de los 10 animales distribuidos en 5 alpacas y 5 llamas. 31
Cuadro 2. Fastas descritos en el GenBank cercanos filogenéticamente a la alpaca y llama. 36
Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación del gen *TLR2* en alpacas y llamas.....38
Cuadro 4. Condiciones de la PCR que se estandarizaron para este estudio. 39
Cuadro 5. Resultado de la calidad (integridad) del ARN de los 10 muestras extraídas de alpacas y llamas, calificándolas como excelente, bueno y mala, que están sombreado s de color verde, amarillo y rojo, respectivamente.....43
Cuadro 6. Códigos de acceso en GenBank de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como de la página UnitProt. 48
Cuadro 7. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS)/ no sinónimas (dN) de lastres isoformas obtenidas del clon de la alpaca S007. 53
Cuadro 8. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS)/ no sinónimas (dN) de las tres isoformas obtenidas del clon de la llama L022. 54
Cuadro 9. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS)/ no sinónimas (dN) de todas las secuencias obtenida de los 6 clones. 55
Cuadro 10. Similaridad de las secuencias de aa en los genes de las isoformas obtenidas de los clones de alpaca S007, y llamas L017 y L022.....57

LISTA DE ÁNEXOS

Anexo 1. Distancia entre nucleótidos entre las variantes de la alpaca Suri S007. Se usó el software MegAlign. 79
Anexo 2. Distancia entre aminoácidos entre las isoformas de la alpaca S007. Se usó el software MegAlign. 79
Anexo 3. Distancia entre nucleótidos entre las variantes de la llama L022. Se usó el software MegAlign. 79
Anexo 4. Distancia entre aminoácidos entre las variantes de la llama L022. Se usó el software MegAlign. 80
Anexo 5. Distancia entre nucleótidos entre la isoforma 1 de L017 con las anteriores secuencias obtenidas. Se usó el software MegAlign. 80
Anexo 6. Distancia entre aminoácidos entre la isoforma 1 de L017 con las anteriores secuencias obtenidas. Se usó el software MegAlign. 80
Anexo 7. Posiciones de las regiones de las secuencias aminoacídicas del clon de la isoforma 1 de S007 descrito en la página de GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). 81
Anexo 8. Árbol filogenético de las isoformas halladas de la ORF del gen *TLR2* en alpacas y llamas. Cada una de ellas junto a su representación gráfica de sus dominios, gracias al uso del software SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). 82

ABREVIATURAS

A, Ala: Alanina
A: Adenina
C, Cys: Cisteína
C: Citocina
CSD: Camélidos sudamericanos
D, Asp: Aspártico
DAMP's: Patrones moleculares asociados a daño
E, Glu: Glutámico
F, Phe: Fenilalanina
G, Gly: Glicina
G: Guanina
H, His: Histidina
I, Ile: Isoleucina
K, Lys: Lisina
L, Leu: Leucina
LRR: Repetición rica en leucina
M, Met: Metionina
N, Asn: Asparagina
P, Pro: Prolina
PAMP's: Patrones moleculares asociados a patógenos
Q, Gln: Glutamina
Q, Trip: Triptófano
R, Arg: Arginina
S, Ser: Serina
T, Thr: Treonina
T: Timina
TLR: Receptor tipo-Toll
V, Val: Valina
Y, Tyr: Tirosina

I.INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos domésticos (CSD) representa para el poblador altoandino del Perú, el 80% de su renta anual derivado de la venta de su fibra, carne y otros subproductos, logrando beneficiar a las comunidades campesinas que se dedican a una ganadería de subsistencia con estas especies animales.

El contexto actual de la conservación y crianza de los CSD pretende connotar la importancia de la mano de los productores, quienes brindan un sistema de empresas familiares dando hincapié en la industria textil en el caso de alpacas, y carne, en llamas, ambas ramas dan un flujo de comercio que se extiende a nivel nacional. La crianza de alpacas y llamas, que es sustento de familias camelicultoras, se ve a menudo afectada por la presencia de enfermedades infecciosas, parasitarias y nutricionales, las cuales originan un déficit económico para la productividad del altiplano. La elevada tasa de mortalidad en crías de alpacas y llamas dentro de su primer semestre de vida aumenta la cifra de 30%, incluso superando el 50% de animales nacidos, ésta a su ve puede llegar a un 80% de las crías.

Los estudios de biología molecular nos dan un amplio conocimiento de la historia evolutiva en CSD, por ello en este estudio se inicia detectando en animales sanos uno de los componentes de la respuesta inmune innata e inmediata, es decir, los receptores tipo-Toll, quienes reconocen a los patógenos, una vez detectadas y posteriormente analizadas, se espera obtener más información de las secuencias de genes en estudio tomando como referencia un genoma incompleto de alpaca y genomas de camélidos del viejo mundo, depositados en el GenBank, mejorando así el campo de investigación con más data en beneficio de la sanidad animal altoandina mejorando la producción de CSD.

Consecuentemente, el presente trabajo tiene como objetivo principal el inicio del estudio molecular de los receptores tipo-Toll (TLRs) del sistema inmune innato en alpacas y llamas, comenzando con la detección, amplificación, clonación y secuenciación del gen que codifica a los TLR2 expresados en células mononucleares de sangre periférica para su posterior análisis filogenético.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Camélidos sudamericanos (CSD)

Los orígenes de las alpacas y llamas de América del Sur son temas controversiales debido a la hibridación entre estas formas y a complicaciones a la hora de evaluar los restos zoo-arqueológicos. En estudios moleculares, el cual se intensificó a partir de 1980's, tales como de análisis en el genoma mitocondrial de estas especies a su vez de sus microsatélites concluyen que las llamas fueron domesticadas del guanaco y las alpacas de la vicuña (Pinto *et al*., 2010).

La separación entre el género *Vicugna* y *Lama* sucedió hace más de dos millones de años aproximadamente, sin embargo, la domesticación que ocurrió fue proceso complejo y tardío asociado al medio ambiente de grupo de cazadores- recolectores a lo largo de los Andes (Yacobaccio, 2021). Según la teoría más aceptada es la de Wheeler, plantea que la separación entre dichos géneros dependía del tipo de uso que se les daba a los animales en cuatro períodos tales como caza generalizada, caza especializada, control de los primeros camélidos domesticados (4000 a 3500 años a.C.) y al período de pastoreo de camélidos domesticados (3500 a.C.), siendo este último período donde se haya establecido la especie de llama y alpaca y, consecuentemente, las razas especializadas de alpaca como la Huacaya y Suri así como la llama en al menos dos variedades, Q'ara y Chaccu (Figura 1) (Diaz-Lameiro, 2016).

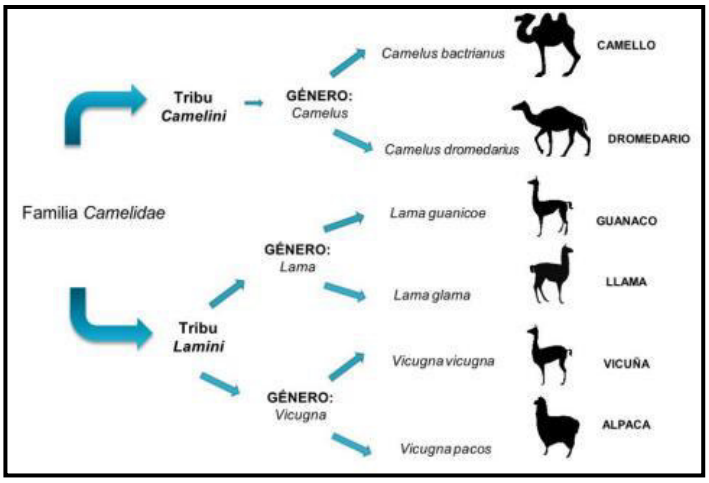


Figura 1. Clasificación de los camélidos (Pinto *et al.*, 2010).

2.1.1. Producción de CSD

Las características fenotípicas y los atributos diferenciales entre llamas y alpacas compiten en la forma de presentarlos e incluso se distingue entre las mismas razas de cada especie. A grandes rasgos, por ejemplo, en la especie alpaca presentamos a la raza Huacaya y Suri, la primera raza, como aspecto morfológico, contempla la fibra rizada y corta, a lo contrario de la segunda, tiene fibras rectas y largas (Bustinza *et al.,* 2021). En el caso de las llamas, presentan las razas Chaccu, productora de fibra se diferencia por sus mechones de ficha en la frente, incluyendo el cuello y las extremidades; y la raza Q'ara quien se caracteriza por el menor desarrollo de fibra alrededor de todo el cuerpo, la cara no presenta mechón de fibra, ni en cuello ni extremidades sumado a tener una mayor cantidad de cerdas de fibra (Mestanza *et al.*, 2014).

La clasificación de las alpacas por edad y sexo inicia con el término de "cría" desde el nacimiento hasta los 8 meses de edad (destete), "tuis menor" que comprende desde el destete hasta 1 año, y "tuis mayor" que va desde alpaca hembra o macho de un año a los dos años, luego tenemos a las madres, padres o reproductores (Franco *et al*., 2009).

2.1.2. Importancia social y económica

Los camélidos sudamericanos exhiben una alta capacidad de adaptación en los suelos de los Andes (FA0, 2005). Un ejemplo de esta habilidad se muestra al comparar la raza de alpaca Suri y Huacaya, donde se menciona que esta última presenta un mayor soporte en variaciones de clima y de ambiente, en comparación a la alpaca Suri, siendo fundamentado en la proporción de espalda parcialmente descubierta por la caída de la morfología de sus fibras (FA0, 2005; Caso y Municipio, 2020).

En general la importancia de estos camélidos abarca múltiples recursos como su fibra, carne, estiércol, siendo transporte de carga, así como en el aspecto cultural como especie de nuestra puna peruana. Estos animales representan una potencial fuente de ingreso económico del trabajo de las familias altoandinas con situación precaria de esta población rural, quienes, en primera instancia,

lo usan como herramienta de subsistencia y tratan de innovar con medidas de mejoramiento en la sanidad, nutrición, reproducción y manejo del animal (Alendez, 2021).

2.1.3. Problemática actual

La distribución de camélidos sudamericano abarca los países que recorren la Sierra de los Andes, los cuales van desde Perú, Bolivia, Argentina y Chile. Respecto a la situación actual del sector alpaquero y de llamas en nuestro país, se expone la necesidad de dar una tecnificación del mejoramiento de la crianza de camélidos, así como conocer el protocolo de producción incluyendo un plan sanitario, manejo reproductivo la época de esquila, dirigir un acopio directo de venta de carne y fibra, etc. (Choque *et al*., 2021).

El ecosistema alpaquero predomina en piso ecológicos tales como bofedales y lomadas, así como las laderas, y zonas de cerro, entonces una desventaja es lograr tener el territorio disponible y debido manejo de los suelos (INTECSA, 1993; Suyana Fundación, 2010).

Uno de los principales problemas en camélidos es el ámbito sanitario como la prevención y control de enfermedades, siendo las de mayor implicancia: las infecciosas y parasitarias. En época de lluvia, ocurre una alta mortalidad en la etapa neonatal y tuis, una de las causas más preocupantes es el complejo diarreico neonatal. (Suyana Fundación, 2010; Dionisio Córdova, 2012; Alendez, 2021;)

Estas diarreas neonatales son causadas por enteropatógenos que incluyen bacterias como *Clostridium perfringens* como agente principal, virus y parásitos. Los factores predisponentes son aspectos del manejo tales como una deficiencia en la toma de calostro de las crías, la posibilidad de una madre no vacunada originando bajos niveles de anticuerpos protectivos en crías, una la indigestión, el estrés de las crías, así como el temprano consumo de forrajes que modifica el pH intestinal en la flora normal junto a un peristaltismo lento y un aumento de ácido clorhídrico. Todo ello favorece el ingreso de *Clostridium perfringens* al intestino donde se incrementa la colonización en mucosa del epitelio intestinal mediante la proliferación y producción de las toxinas de esta bacteria. Ocasionando un daño del epitelio intestinal lo que hidroliza las membranas de la mucosa produciendo necrosis y hemorragia del tejido, consecuentemente a la excesiva producción de toxinas que pasan a sangre, hay daño en membranas de los glóbulos rojos, plaquetas y polimorfonucleares, dando una toxemia aguda, cólicos subagudos o agudos, conllevando a la muerte (Rojas *et al*., 2016).

La presentación de brotes epidémicos de la enfermedad alcanza el 50% del total de crías nacidas constituyendo la principal causa de las pérdidas neonatales en el Perú. (Alendez, 2021)

2.1.4. Sistema inmunológico de los CSD

Las alpacas y llamas son animales que resisten condiciones climáticas extremas (p. ej. heladas a más de 4000 msnm), aprovechan los pastos pobres de ese tipo de geografías y en sus etapas adultas son animales sumamente resistentes a enfermedades. Sin embargo, a pesar de su gran resistencia a enfermedades infecciosas en su vida adulta, en la etapa neonatal y tui (entre 2 y 8 meses de edad) su sistema inmune no está totalmente desarrollado y habituado a todos los factores ambientales y microbianos hostiles de su nicho ecológico dando como resultado una alta mortalidad en los primeros meses de vida (Martin *et al.*, 2010).

El complejo diarreico neonatal es uno de mayores causantes de mortalidad en esta especie en los primeros meses de vida, los agentes etiológicos asociados a este complejo son bacterias (Gram+, *Clostridium perfringens*, etc.), virales (rotavirus, coronavirus, etc.) y parasitarios (*Eimerias spp.*, *Cryptosporidium parvum,* etc.) (Martin *et al.*, 2010; Rojas *et al*., 2016). Dando signos clínicos como depresión severa, anorexia, postración, diarreas, quejidos, las crías no maman, cabeza apoyada sobre el suelo, extremidades anteriores estiras en casos avanzados, muerte súbita por la toxemia aguda (Martin *et al.*, 2010).

El calostro es esencial en crías de camélidos ya que dura aproximadamente 10 a 15 días, luego de este tiempo las crías están desprotegidas de anticuerpos, por ello con una vacuna como mecanismo de inmunidad pasiva se transmite los anticuerpos que protegen a las crías de las enfermedades como este tipo de enterotoxemia (Martin *et al.*, 2010).

2.2. Sistema inmune innata

2.2.1. Generalidades

La inmunidad innata es la parte conservada del proceso evolutivo de los organismos vertebrados e invertebrados. La activación de este da lugar a la inmunidad adaptativa, la cual es mediada por la respuesta selectiva de las células T y B hacia el antígeno, sin embargo, ésta se ha visto solo en vertebrados. La respuesta innata depende de receptores invariantes presentes en las células de la respuesta inmune innata, en contrario de los receptores selectivos y de la memoria inmunológica del sistema inmune adaptativo (Voogdt y Putten, 2016; Shavit, 2017; Chandler *et al*., 2019).

El sistema inmune innato está mediado por las células presentadoras de antígeno (CPA) así como los leucocitos fagocíticos, las células presentadoras de antígeno y las células epiteliales de las mucosas y del endotelio (Voogdt y Putten, 2016; Shavit, 2017; Chandler *et al*., 2019).

Estas células de la respuesta inmune responden a las moléculas conservadas y específicas en las estructuras de los patrones de patógenos, denominados “patrones moleculares asociados a patógenos” [PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*] así como los ligandos endógenos liberados de las células dañinas como las “patrones moleculares asociados a daño”

[DAMPs, del inglés *damage associated molecular patterns*]. Los ejemplos de PAMP se encuentra LPS, lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicoico de peptidoglicano, ADN CpG metiladas de bacterias, micobacterias, etc (Voogdt y Putten, 2016; Shavit, 2017). Los receptores de reconocimiento de estos patrones son un grupo de moléculas codificadas a nivel de la línea germinal de las células inmunitarias innatas denominadas "receptores de reconocimiento de patrones [PRR del inglés *pattern recognition receptors*], donde incluye a los receptores tipo Toll, los receptores de lectina tipo C, receptores tipo Nod (NLR), receptores de lectina tipo C, los receptores tipo AIM2, y sensores intracelulares de ADN y ARN. Tras el reconocimiento de estos ligandos de los patógenos o de las células dañadas, los PRR comienzan una cascada de señalización donde el factor nuclear kappa, MyD88, el interferón tipo I (IFN), y demás vías de interacción conllevando a la activación de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias o antivirales (Voogdt y Putten, 2016; Gao *et al*., 2017; Shavit, 2017; Chandler *et al*., 2019; Duan *et al*., 2022).

2.2.2. Receptor Tipo Toll

En los vertebrados, la familia TLR está compuesta por un total de 13 miembros, de los cuales 11 (TLR1-11) están presentes en los mamíferos y 12 (TLR1-9, TLR11-13) en los ratones. Cada TLR detecta un conjunto diferente de PAMPs como lípidos bacterianos (reconocidos por TLR1, 2, 4), ADN viral (TLR3, 7, 8), ADN bacteriano (TLR9), proteínas bacterianas o de parásitos (TLR5 y 10) (Astakhova *et* al, 2009; Voogdt y Putten, 2016; Novack *et al*., 2017; Elfeil *et al*., 2021).

Hasta la fecha, 13 genes que codifican los TLRs han sido identificados de acuerdo con sus funciones y secuencias en los mamíferos (TLR1-13), dentro de las cuales 10 están presentes en el genoma humano (TLR1-10), 13 en roedores (TLR1-13) y 10 en bovinos, cabras y ovejas (TLR1-10) (Chang *et al*., 2006, 2009; Raja *et al*., 2011; Voogdt y Putten, 2016; Xu *et al*., 2019).

Las regiones de reconocimiento de ligando de los TLR para patógenos intracelulares (p.ej. virus) se encuentran en el TLR3, 7, 8 y 9, dichas regiones están ubicados en el compartimiento endosomal dentro del citoplasma, mientras que la región de reconocimiento de ligando fúngico y bacteriano están presentes en el TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 y están localizados en la superficie de la célula (Abbas, 2015; Raja *et al*., 2011; Voogdt y Putten, 2016).

Se han observado diferencias específicas de especies en el reconocimiento de ligandos de TLR, como el ARN monocatenario, el ADN bacteriano y la flagelina entre el hombre y el ratón (Farhat *et al*., 2010; Keestra *et al.*, 2018). Estas diferencias pueden deberse a una presión selectiva distinta en cada hospedero para adaptarse a nuevos entornos y patógenos. Remarcando el concepto que la estructura y función de los TLR se han diversificado en respuesta a los cambios en los hábitats y los desafíos ambientales que sufren tanto la especie hospedera como su microflora propia y extraña (Voogdt y Putten, 2016)

2.3. Receptor Tipo Toll 2 (TLR 2)

Estos receptores son expresados y distribuidos a través de la arquitectura celular, el cual envuelve una serie de pasos de señalización, así como su expresión en cada tipo de recetor tipo-Toll (Figura 2) (Duan *et al*., 2022).

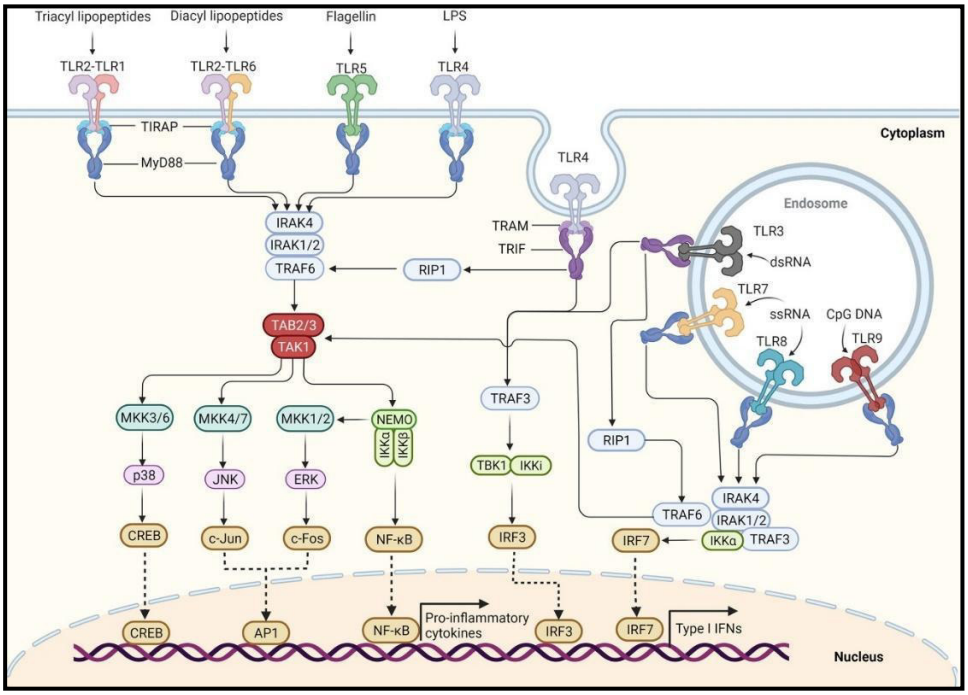


Figura 2. Mecanismo de acción de los TLRs. (Duan *et al*., 2022)

2.3.1. Propiedades

2.3.1.1. Estructura

Los TLRs pertenecen al grupo de glicoproteínas transmembrana del tipo I que están compuestos por 3 dominios: I) Un dominio extracelular (DEC) compuestos por un número variable de repeticiones ricas en leucinas (LRRs, del inglés *leucine rich repeats*), son motivos estructurales de proteínas, encargados del reconocimiento de los PAMPs (Figura 3) (Duan *et al*., 2022).

El siguiente dominio es el II) un dominio transmembrana compuesta de aproximadamente 20 aa que atraviesa la membrana y se conecta al III) dominio intracelular u de homología citoplasmático Toll/receptor de interleucina 1(ILR-1), también conocido como el dominio TIR (TIR, del inglés *Toll/IL-1 receptor*), es una región altamente conservada desde el punto de vista evolutivo, que tiene la función de producir señales que mediaran 2 vías de señalización celular (Figura 4) (Voogdt y Putten, 2016; Duan *et al*., 2022).

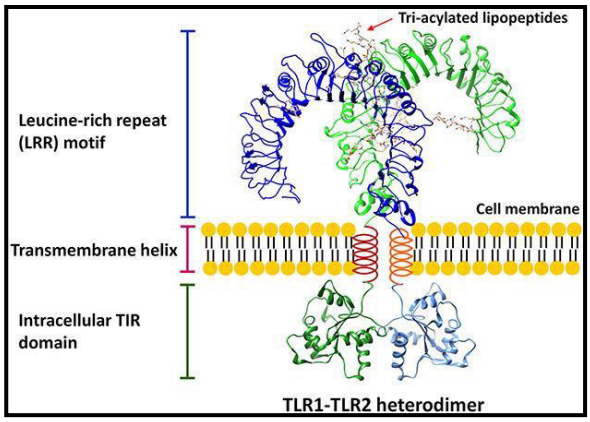


Figura 3. Estructura del receptor tipo- Toll 2. (Gao *et al*., 2017)

2.3.1.1.1. LRR: Secuencias MOTIF

Las repeticiones ricas en leucina (LRR) son motif de 24 a 29 residuos identificados en diversas proteínas con variadas funciones, estos a su vez, proporcionan un modelo para la elaboración de interacciones de proteínas – proteínas (Kobe y Kajava, 2001).

La estructura de las LRR presenta una arquitectura común, sin embargo, en caso del TLR 2, se le considera un miembro inusual de este patrón (Kobe y Kajava, 2001). Las proteínas de LRR se presentan en forma de herradura con superficies cóncavas elaboradas por hebras β, y las convexas por bucles y 310 hélices. La hebra β paralela contiene diferentes ángulos y radios en comparación a otros LRRs de otras TLRs. El dominio extracelular del TLR2 se suele dividir en tres subregiones. El primero es el N- terminal que consiste en LRR NT y 14 LRR motif, su arquitectura es típica, sin embargo, difiere de 24 aa, conservando la asparagina y la fenilalanina. El dominio central y el C- terminal que está compuesto por LRRs, aquí la hebra β modifica su forma se cree debido a la ausencia de asparagina y fenilalanina en el dominio central (Jin *et al*., 2007; Kang *et al*., 2009; Kaur *et al*., 2020).

2.3.1.1.2. TIR

Los TLRs poseen una señalización de dominio intracelular denominado receptor Toll/ interleucina – 1 (TIR), que está presente en el dominio C-terminal del dominio extracelular, es una familia de receptores de interleucina-1 (IL-1R) que interactúa con moléculas adaptadoras (Kobe y Kajava, 2001).

Este dominio realiza las asociaciones entre las proteínas, además es fundamental en la transducción de señales de la vía de señalización de TLR, mediante la activación de las proteínas citoplasmáticas como MyD88, una proteína adaptadora TLR. La señalización de TLR se divide esencialmente en vías dependientes e independientes de MyD88, en caso de TLR2 son netamente dependientes (Kaur *et al*., 2020).

2.3.1.2. Química de unión al ligando

La especificidad de la unión del ligando se ha explicado para los TLRs de la familia 1-6 entre algunas de las especies de mamíferos. El polimorfismo en los TLR ha sido reportado en ganado resistente a enfermedades. Pero hay pocos informes disponibles sobre la distribución de polimorfismos genéticos en los TLR2 y 6 en bovinos, caprinos, ovinos y camélidos (Subhash *et al.*, 2018).

Los heterodímeros de TLR 2/1 reconocen bacterias Gram – (lipopéptidos triacilados) y micoplasmas, y a su vez, el TLR 2/6 a bacterias Gram + (lipopéptidos diacilados) y también micoplasmas (Akira *et al.,* 2006).

2.3.1.2.1. Homodímero TLR 2/2

Respecto al homodímero TLR2/2, se h evaluado la existencia de una molécula denominada diprovocim, el cual favorece la interacción de este homodímero. Esta molécula se una a las proteínas TLR en la zona tipo bolsillo de unión de ligando. Los grupo carbonilo y amida de TLR2/2 y el diprovocim establecen una cadena de enlaces de hidrogeno, semejante a la formación de cadenas beta de las proteínas. No obstante, los terminales C de los dominios extracelulares de los TLR2 se encuentran más distantes de otros heterodímeros, lo cual complica la interacción de los terminales C de los dominios intracelulares, es decir del TIR de ambos TLR2s, para dar la señalización respectiva., por ello se ha propuesto que son menos comunes que al formar un heterodímero como tal (Jin *et al*., 2007; Kang *et al*., 2009; Kaur *et al*., 2020).

2.3.1.2.2. Heterodímeros TLR 2/1 y TLR 2/6

La arquitectura del TLR2 forma heterodímeros con TLR1y TLR6. El heterodímero TLR2/1 y un lipopéptido triacilado sintético, tales como Pam3CSK4, que es la primera arquitectura cristalizada obtenida mediante el reconocimiento de TLR2/1 hacia este tipo de lipopéptido. Respecto al heterodímero TLR2/6 interactúa con lipopéptidos diacilados, tales como Pam2CSK4, que también se obtuvo como estructura cristalizada (Jin *et al*., 2007; Kang *et al*., 2009).

En el heterodímero TLR2/1 al interactuar con Pam_3CSK_4, se presenta en forma de "m" al insertarse con sus ligandos, y esto es dado por los dos dominios C-terminales que interactúan con la parte intracelular, así como los dominios N-terminales que se arquean hacia el lado extracelular. Este lipopéptido, Pam_3CSK_4, presenta tres cadenas lipídicas, dos de ellas se unen al bolsillo hidrofóbico del TLR2 y una al bolsillo de TLR1, estas uniones hacia ambos TLRs se dan mediado por el glicerol del ligando que desarrolla enlaces H, así como los átomos de S que desarrollan uniones hidrofóbicas con zonas específicas del TLR2 (Jin *et al*., 2007).

En el caso del heterodímero TLR2/6 con su Pam_2CSK_4, se presenta con dos formas en "m", los dos dominios N-terminal se van en direcciones opuestas, y los dos extremos C-terminales se

ensamblan en la región central. En esta unión se presenta diversos sitios de unión a ligando, por ejemplo, el bolsillo que se forma en el heterodímero esta parcialmente bloqueado por hileras paralelas constituidas por residuos de fenilalanina (2 residuos: F345 y F365), considerándose este bolsillo en menor longitud que el del heterodímero TLR2/1 (Kang *et al*., 2009; Kaur *et al*., 2020).

A comparación de los lipopéptidos triacilados aquí los diacilados son seleccionados por su estructura específica. La parte de este heterodímero TLR2/6, se sitúa en los LRRs 11 y 22 del TLR2, allí se conjuga con Pam_2CSK_4 mediante dos hileras lipídicas como un bolsillo hidrofóbico, así como su enlace de Hidrogeno con el aa F319 del LRR11 de TLR6. En TLR2/1 con Pam_3CSK_4 esta unión de hidrogeno no se da, y más bien la cadena lipídica del Pam_3CSK_4 que se une a la amida, es más relevante en este heterodímero, por otro lado, los aa expuestos de LRR11- 14 son clave en el heterodímero TLR2/6. Siendo mayor unión hidrofóbica e hidrofílica y en este último que en el anterior heterodímero, siendo mejor impulsada por la relación externa de los enlaces de Hidrogeno de LRR1 y el ligando (Figura 4) (Kang *et al*., 2009).

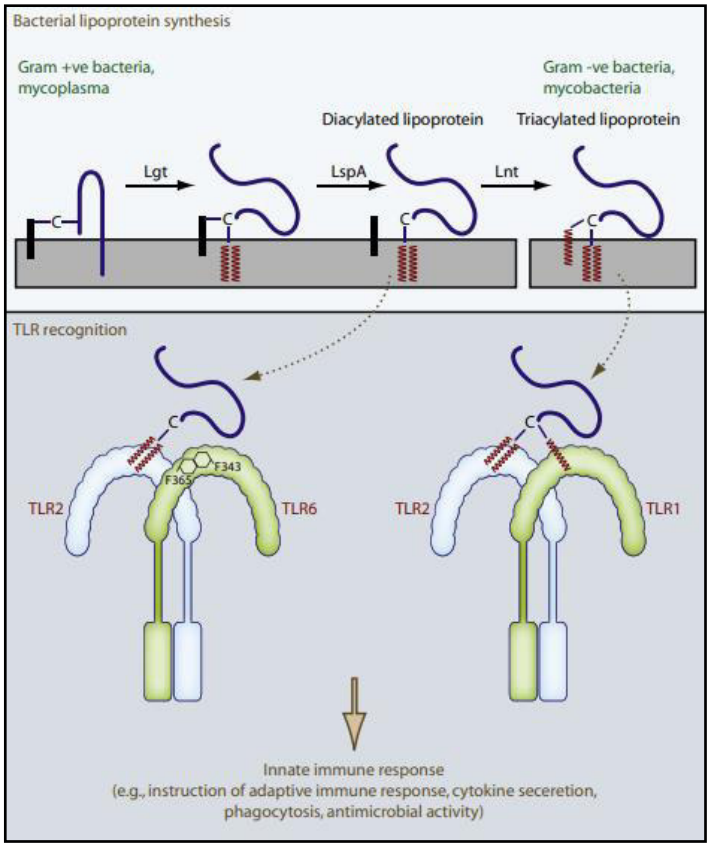


Figura 4. Respuesta de TLR2/1 y TLR2/6 a lipoproteínas bacterianas diaciladas y triaciladas (Schenk *et al,* 2009).

2.3.1.3. Vías de señalización de los TLR2

La señalización de los TLRs se inicia mediante la unión del ligando con el ectodominio, así como el reconocimiento de la estructura molecular en cada TLR, gracias a las moléculas adaptadoras que se hallan en el dominio TIR tales como MyD88 [siglas del inglés "*Myeloid differentiation primary response gene 88*"], TIRAP [siglas del inglés "*TIR domain containing adaptor protein*"] o Mal, TRIF [siglas del inglés "*TIR-domain-containing adaptor- inducing interferón β*"], y TRAM [siglas del inglés "*TRIP-related adaptor molecule*"]. Ahora bien, existen dos vías para la señalización, la primera es dependiente de MyD88 o por TRIP (Figura 5) (Muroi *et al*, 2012).

En nuestro caso, el TLR2 usa la primera vía, además también inducida por ligando de los dominios TIR citoplásmicos esenciales de sus heterodímeros. Esto entonces activa una cascada de eventos de fosforilación que varían dependiendo de si fue TLR2 / 1 o TLR2 / 6 que se estimula, iniciando en última instancia diversas respuestas inmunes innatas y adaptativas en el huésped (Lee *et al*, 2010; Muroi *et al*, 2012).

Para facilitar dicha señalización se interactúa con TIRAP, quien media la acción entre el MyD88 y el TLR2. Una vez el TLR2 activado, se inicia la unión del MyD88 al dominio TIR mediante mecanismo TIR-TIR, a su vez se asocian a IRAK1y IRAK4, estos no logran unirse de manera contigua. En el momento que están a punto de unirse el IRAK1 es fosforilado por IRAK4. Posteriormente, el IRAK1 interactúa con TRAF6, que es una ligasa de ubiquitina, este complejo interactúa con TAK1 [siglas del inglés *Transforming growth factor-β-activated kinase 1*], TAB1 y TAB2, dirigiéndose hacia la membrana plasmática. Esta unión fosforila a TAK1 y TAB2, quien va al citosol junto a TRAF6 y TB1, e IRAK1 se queda en la membrana. TRAF6/TAK1 interacciona con la enzima conjugadora de ubiquitina Ubc13 y Uec1A, se ubiquitina ciertos restos de residuos de TRAF6 logrando activar a TAK1 (Lee *et al*, 2010; Muroi *et al*, 2012).

Luego la proteína TAK1 activa al compuesto IKK (formado por IKKα, IKKβ y NEMO o IKKγ), éste a su vez mediante un proceso de fosforilación activa a IkBα, quien libera a NF-Kb, el cual se dirige hacia el núcleo para regular la transcripción de distintos genes pro-inflamatorios. Además, el TAK1, activa a ERK1/2, JNK p38, que son proteínas de MAPK, esto favorece a reconocer los factores de transcripción de AP-1, quien estabiliza los ARNm (Lee *et al*, 2010; Muroi *et al*, 2012).

Se ha estudiado que el ácido lipoteicoico (ALT) tiene un rol importante en la respuesta inflamatoria el cuales inducido por bacterias Gram +, donde se ejecuta la activación de los MAPKs por medio de TLR2/MyD88/PI3K/Rac1/Ak, que inducen la activación de NF-Kb, y a su vez, es reclutado para un aumento de la expresión de fosfolipasa A2 citosólica (FLAc) y del ciclooxigenasa-2 (COX-2) quienes fomentan la producción de PGE2/IL-6, actuando como antiinflamatorios (Lee *et al.*, 2010).

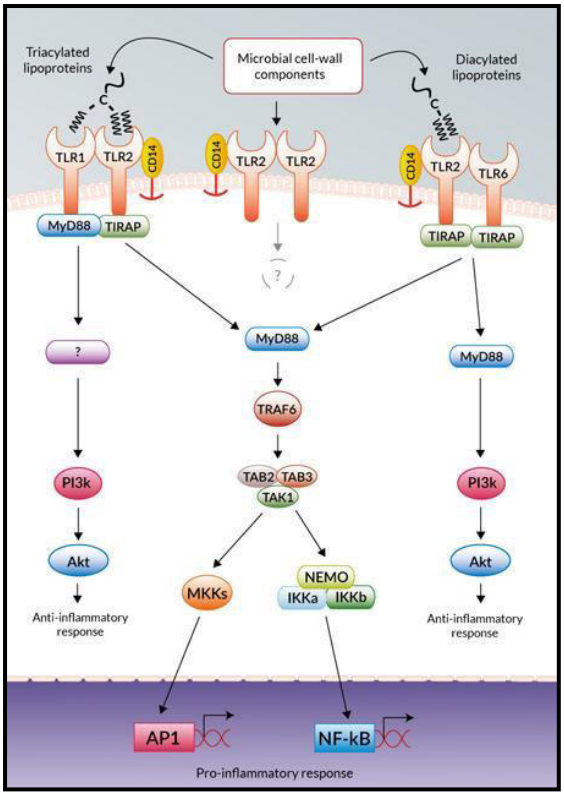


Figura 5. Vías de señalización de TLR2 (InvivoGen, 2018).

2.3.2. Relevancia del TLR2

Los TLR2 juega un papel importante en el sistema inmune innato ya que reconocen diferentes PAMPs (Akira *et al*., 2001; Iwasaki y Medzhitov, 2010; Abbas, 2015) como lipopolisacáridos, lipopéptidos y ácidos nucleicos derivados de diferentes patógenos (p. ej. bacterias Gram +) (Akira *et al*., 2006; Grillo *et al.,* 2010).

Este receptor es considerado el TLR más promiscuo después de considerar la amplia gama de PAMPs microbianos que reconoce (Shivakumara *et al*., 2018). El TLR2 forma heterodímeros con TLR1, TLR6 y desempeña un papel importante en la identificación de moléculas receptoras al distinguir los lipopéptidos tri y diacilados (Jann *et al*., 2008; Skevaki *et al*., 2015).

Así como en el estudio de la respuesta inmune en frente de las proteínas del Pili de *Streptococcus pyogenes* donde menciona que la falta de asociación entre la proteína del Pili y HEKBlue hTLR 4 había demostrado además que la interacción con, y la activación de, HELK- Blue hTLR2 era específica de TLR2 más que de la unión a otros componentes de la superficie celular de las líneas celulares HEK-Blue hTLR Por ello sostiene que el TLR2 es uno de los más promiscuos de los TLRs, en gran parte debido a sus características de heterodimerización con lípidos o proteínas modificadas, en adición se ha informado de que las proteínas bacterianas no lipidadas, incluyendo la porina meningococal PorB y el SSL3 estafilocócico, se unen directamente al TLR2 (Takahashi *et al*., 2022).

En el estudio de receptores de reconocimiento de patrones implicados en el reconocimiento y la respuesta del huésped a *Helicobacter pylori*, se mención a que el TLR2 es el TLR más promiscuo para los PAMP, principalmente debido a su capacidad de formar estructuras heterodiméricas (Gonzalez *et al*, 2021).

La variación de la TLR2 aumenta el riesgo de infecciones graves en humanos, ratones y ganado doméstico (White *et al*., 2003; Shinkai *et al*., 2006).

2.4. Estudios de TLR 2

2.4.1. Humanos

Se ha obtenido estudios donde se evalúa el rol de los TLR 2 en las enfermedades infecciosas causadas por *Mycobacterium spp*., llevado de conocimientos de la biología celular hasta el manejo terapéutico en humano, según Wanbin HU del 2022, para reconocer los patógenos invasores y comenzar con una respuesta inmunitaria innata protectora, se vio la necesidad de estudiar a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) siendo el TLR 2 uno de los más importantes contra la infección micobacteriana (Dong *et al.,* 2011; Hu & Spaink, 2022; Matsumoto *et al*., 2022).

Incluso el proceso de reconocimiento de los lipopéptidos tri o diacilados por parte de los heterodímeros requiere la participación de moléculas accesorias, por ejemplo, CD14 y CD36 están bien caracterizadas como moléculas de entrega de ligandos que potencian las respuestas de TLR2 a los ligandos, especialmente e inclusive con una menor concentración de estos, aunque la participación de estas moléculas no es relevante (Pasare y Medzhitov, 2004; Hu y Spaink, 2022).

El TLR2 también fue reportado como participante en la respuesta ante las enfermedades infecciosas, así como otras enfermedades, tanto como enfermedades agudas y crónicas, cáncer, e incluso en desordenes metabólicos. Sin embargo, estas interacciones de los hospederos aún hay discusiones controversiales por lo cual se sugiere para futuras investigaciones un trabajo más amplio y detallado (Juárez, 2017; Hu y Spaink, 2022; Matsumoto *et al.*, 2022).

2.4.2. Animales mamíferos

2.4.2.1. Camélidos del viejo mundo

En caso de camélidos del viejo mundo se ha estudiado la ORF del gen del receptor tipo-Toll 2 (TLR2) de *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus* quienes fueron clonado y secuenciados, donde se obtuvo las secuencias de ADNc de la TLR 2 y luego se tradujeron en secuencias de aminoácidos. En esta parte se encontró que el ORF del camello dromedario tenía una longitud de 1857 pb y codificaba 618 aminoácidos con un peso molecular de 692,72 kDa. El ORF del camello bactriano tiene la misma longitud de 2358 pb que codifica 785 aminoácidos (Dahiya *et al*., 2014; Park *et al*., 2014)

Se pretendió en el estudio mejorar la comprensión de la historia evolutiva de estos camélidos, así como proporcionar un recurso de investigación mediante un primer informe de secuencia del gen *TLR2*, para obtener datos de familia de linajes, así como en un futuro relacionas las funciones inmunes asociadas con la infección bacteriana de los camellos (Dahiya *et al*., 2014; Park *et al*., 2014).

2.4.2.2. Animales de producción

2.4.2.2.1. Camélidos Sudamericanos

Respecto a los camélidos sudamericanos, se ha desarrollado recientemente la data de la secuencia del genoma completo, así como como el mapa del genoma de una alpaca (*Vicugna pacos*) denominada "Carlotta" (AHFN -0088) el cual se realizó por el Genome Institute, Washington University School of Medicine en St. Louis, MO, subvencionado por el National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health. Este estudio se ha tomado como referencia para diversos estudios genómicos comparativos (Park *et al*., 2014; Richardson *et al*., 2019).

Se toma como referencia la información genómica de la alpaca hembra proveniente de los Estados Unidos de América, denominada Carlotta, quien fue una alpaca donadora de la empresa Nyala's Accoyo Empress Carlotta para una biblioteca BAC [siglas en inglés: *Bacterial Artificial Chromosomes*] CHORI-246, quien proporciono su muestra de sangre, obteniendo un ADN genómico, además se presenta como parte del estudio de genoma humano, donde se pretendió establecer un genoma completo de esta especie, sin embargo, en un primer momento no se obtuvo como tal. Ahora bien, a partir de allí se identificaron tres isoformas o variantes predictivas de la ORF incompleta del gen que codifica al TLR2 (Johnson, 2014). Es por ello, que se usó esta data como base, siendo la única información para poder detectar las isoformas y lograr una caracterización molecular completa del gen que ensambla al TLR2 en las especies alpaca y llamas (Johnson, 2014; Richardson *et al*., 2019).

2.4.2.2.2. Rumiantes

En el caso de rumiantes como el *Bos taurus*, lo más resaltante son los polimorfismo que recae en las características funcionales de los aminoácidos, durante la evolución. Ello podría traer implicaciones en el sistema inmune innato. Entre razas existe mayor polimorfismos relacionado a diferentes entornos geográficos, es decir microbiano (Jann *et al*, 2008; Zhang *et* al., 2009; Ruiz *et al*., 2011).

2.4.2.3. Animales marinos

Según Ishengoma y colaboradores del año 2017, donde se evaluaron las 7 TLRs de vertebrados terrestres y cetáceos, donde se evidencia la existencia de una selección positiva mostrando que la presión selectiva es gracias a los patógenos, quienes se adaptaron al curso de la evolución de los ungulados y cetáceos (Ishengoma *et al.*, 2017).

2.4.2.4. Animales domésticos

En unas recientes investigaciones de clonación molecular, se obtuvo el ARNm del TLR2 en caninos el cual se detectó en un estudio donde las muestras provenían la alta expresión en leucocitos en la sangre y bazo, moderada expresión en ovario, pulmones, páncreas y placenta, y bajo niveles de expresión fue en cerebro, colon , corazón, riñón, hígado , próstata, intestino delgado, etc. Se concluyó que desde que el TLR2 fue expresado en amplio rango de tejidos, se considera parte esencial del sistema inmune innato(Ishii *et al*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y tiempo de ejecución

El estudio se llevó a cabo desde el mes de julio del 2019 hasta agosto del 2020, para lo cual se usó muestras de sangre de alpacas y llamas provenientes de IVITA Maranganí en la región de Cusco - Perú. Las muestras colectadas se procesaron y analizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología (Sección Inmunología) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la región de Lima - Perú.

3.2. Descripción del material experimental

El material experimental constó de 10 muestras de sangre: 5 de alpacas (3 de Huacaya y 2 de Suri) y 5 de llamas (3 de Chaccu y 2 de Q'ara) adultas (Cuadro 1), procedentes de la zona ganadera de camélidos sudamericanos de la estación IVITA Maranganí localizados en distrito de Marangani, provincia de Canchis, en el departamento de Cusco, Perú (coordenadas 14°24´45.3´´S, 71°11´32.6´´W; a ~ 4000 msnm) (Figura 6).

Cuadro 1. Identificación de las muestras de los 10 animales distribuidos en 5 alpacas y 5 llamas.

Id muestra	Fecha de nacimiento	Raza	Especie
H016	20 / enero/ 2018	Huacaya	Alpaca (*Vicugna pacos*)
H041	19/ febrero/ 2018	Huacaya	
H024	29/ enero/ 2018	Huacaya	
S072	11/ marzo/ 2017	Suri	
S007	17/ marzo/ 2018	Suri	
L022	26/febrero/ 2018	Q'ara	Llama (*Lama glama*)
L010	06/ enero/ 2018	Q'ara	
L037	01/abril/ 2018	Q'ara	
L035	22/marzo /2018	Chaccu	
L017	03/ febrero/ 2018	Chaccu	

Figura 6. Localización de lugar de muestreo en Maranganí, Cusco-Perú.

3.2.1. Criterios de muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), utilizando 2 criterios de muestreo.

3.2.1.1. Criterio de inclusión

Animales mayores a un año que en los últimos 6 meses no hayan presentados signos clínicos de alguna afección.

3.2.1.2. Criterio de exclusión

Animales menores de un año o animales mayores de un año, con reporte de afecciones en los últimos 6 meses.

3.2.2. Consideraciones éticas

Las muestras de sangre fueron tomadas por personal capacitado integrado por el tesista y un profesor del IVITA-Marangani (Médico veterinario encargado de la Sanidad Animal) ligado al proyecto, con consentimiento informado del director del IVITA-Maranganí.

Los animales fueron manejados bajo el protocolo de Autorización N.º 2009-001 del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Diseño experimental u observacional

3.3.1. Toma y conservación de muestras

Se colectó 5 ml de sangre en tubos Vacutainer estériles por cada animal, las muestras fueron tomadas de la vena yugular de alpacas y llamas adultas, y vertidas en tubos con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético). Las muestras fueron llevadas a la estación IVITA Maranganí hasta su envío al laboratorio de Inmunología de la FMV-UNMSM donde fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

3.3.2. Aislamiento de CMSP

Las muestras obtenidas fueron utilizadas para aislar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Figura 7), para ello se adicionó 3 ml de la solución Histopaque 1.077 (Sigma, USA) en un tubo de centrifuga cónico Foley de 15 ml de capacidad, luego se agregó 3 ml de sangre proveniente de las muestras colectadas. Esta mezcla se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, después se aspiró hasta 500 µl de la capa superior de la interfaz opaca de la solución cuidadosamente con una pipeta de Pasteur, ya que contiene las células mononucleares, y se transfirió hacia otro tubo de centrifuga cónico limpio.

A continuación, se procedió a lavar estas células añadiendo10 ml de solución salina estéril isotónica tamponada con fosfato [PBS siglas en inglés *Isotonic Phosphate Buffered Saline Solution*] a un nuevo tubo, se mezcló con la ayuda de una pipeta Pasteur, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min**,** se aspiró y descartó el sobrenadante. El precipitado se lava nuevamente con 5 ml de PBS**,** luego se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Se realiza un lavado más, el sedimento obtenido al final contiene las CMSPs que se resuspendieron en 700 µl de PBS estéril, para luego ser congelados hasta su procesamiento.

Los eritrocitos y granulocitos se precipitan al fondo del tubo de centrifuga, y las células mononucleares se agrupan en la interfaz opaca creada entre el Histopaque 1.077 y el plasma, separando estas células por gradiente de densidades, obteniéndosae las CMSP purificadas. (Figura 7).

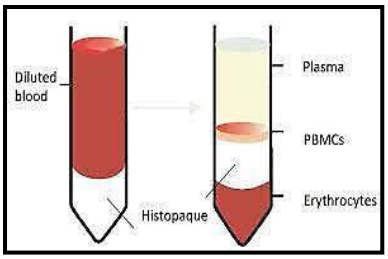


Figura 7. Esquematización del aislamiento del CMSP usando el fundamento de separación celular por densidad utilizando el Histopaque 1.077.

3.3.3. Extracción de ARN

La extracción de ARN genómico de las CMSP aisladas fue realizada utilizando el kit innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (AnalytikJena, Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Figura 8).

El protocolo de extracción se inició adicionando 400 µl de la solución de lisis RL a cada pellet de CMSP a trabajar, esta mezcla se incubó por dos minutos a temperatura ambiente (TA), se resuspendió el pellet por pipeteo, y se incubó por tres minutos más a TA. Posteriormente, para eliminar el ADN genómico se usó el filtro spin D, éste se coloca en un nuevo tubo, donde se agrega la muestra lisada, una vez vertido la muestra lisada en el filtro se centrifugó a 11000 rpm durante 2 minutos, al término, se descarta el filtro spin D que atrapó el ADNg de la muestra. La solución filtrada contiene solo ARN genómico, ahora bien, para separarlo de otros componentes y restos celulares, se usó el filtro Spin R, el cual se coloca en un nuevo tubo.

A la solución que fue filtrada por el spin D, se le adicionó un volumen igual (aprox. 400 µl) de etanol al 70%, se mezcló por pipeteo, después se transfirió dentro del nuevo tubo con el filtro Spin R, una vez vertido en el filtro se centrifugó a 11000 rpm durante 2 minutos, al término, se desecha el tubo receptor con el filtrado y se colocó el filtro spin R en un nuevo tubo receptor.

Ahora bien, se abrió el filtro Spin R y se adicionó 500 µl de solución de lavado HS, se cerró la tapa y se centrifugó a 11000 rpm por un minuto, se descartó el tubo y el filtrado, y se colocó el filtro Spin R en otro nuevo tubo. Nuevamente se abre y se adiciono 700 µl de solución de lavado LS, y se hizo lo mismo que el paso anterior, y se coloca el filtro Spin R en otro nuevo tubo, el cual se centrifugo a 11000 rpm por tres minutos para remover todas las trazas del etanol, y se descartó el tubo receptor.

Finalmente, se colocó el filtro Spin R dentro de un tubo de elución, se abrió cuidadosamente la tapa, y se agregó 50 µl de agua libre de ARNasa. Se incubó a TA por dos minutos y se centrifugó a 11000 rpm por un minuto, y listo se extrajo el ARN de las muestras. El ARN total purificado se almacenó a -80°C hasta su posterior uso (Figura 8).

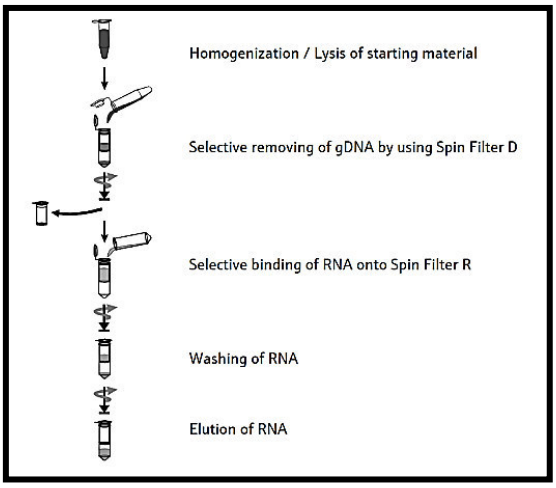


Figura 8. Esquematización de la extracción de ARN usando el InnuPREP RNA Kit.

3.3.4. Análisis de integridad y cuantificación del ARN extraído por fluorometría.

El ARN extraído fue sometido a un análisis de integridad y cuantificación por fluorometría (Qubit 4 Fluorometer - Invitrogen, USA), utilizando el Qubit® RNA IQ Assay Kit, y el Qubit RNA HS Assay Kit, respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los protocolos para analizar la integridad y cuantificar la cantidad de ARN de cada muestra son idénticos para ambos Kits comerciales. Ambos inician con la preparación de una solución buffer de trabajo la cual sirve para diluir el agente (fluoróforo) del kit utilizado en una proporción de 1:200.

Con la solución de trabajo lista, se toma 190 µl de esta solución y se añade a 2 o 3 tubos de ensayo dependiendo del número de estándares que utiliza el kit, luego se adiciona 10 µl de cada estándar para obtener un volumen final de 200 µl, por otro lado, tomamos 198 µl de la solución de trabajo y la adicionamos a un tubo de ensayo por cada muestra extraída (n= 10), luego se agregó dos µl de cada extraído, consiguiendo un volumen final de 200 µl, y a continuación, se llevan a vórtex por 3 segundos, cuidadosamente sin crear burbujas. Posteriormente se dejó que todos los tubos se incuben a temperatura a TA durante dos minutos.

Para evaluar el análisis de integridad, procedimos a leer los estándares y las muestras con fluorómetro Qubit®. Para ello en la pantalla de inicio del fluorómetro, se pulsó “RNA”, y luego seleccionamos “RNA IQ” de la lista de “ensayos de RNA”, se introdujo el tubo que contiene el estándar n° 1 en la cámara de muestras y se pulsó “leer muestra”, igualmente con la 2° y 3° estándar. Luego se pulsó la opción de “ejecutar muestras”, además se selecciona el volumen que se añadió de muestra extraída al tubo, se introduce el tubo de muestra, se cierra la tapa y se pulsa “leer tubo”.

Para la lectura se visualizó una pantalla grafica circular como puntuación IQ de ARN, o puntuación de calidad de la muestra. Si todo el círculo está azul será un IQ de ARN =10 mientras que todo el círculo esté anaranjado será un IQ de ARN= 0. El valor inferior indica la composición porcentual de su muestra de ARN en % de ARN grande y/o estructurado y % de ARN pequeño (Figura 9).

En el caso de la cuantificación de ARN se trabajó con el Qubit RNA HS Assay que detecta muestras que tengan un rango de 250 pg/µl a 100 ng/µl de ARN y permite obtener la concentración de ARN del extraído en la unidad de medida deseada (Por ejemplo: µg/µl o ng/µl).

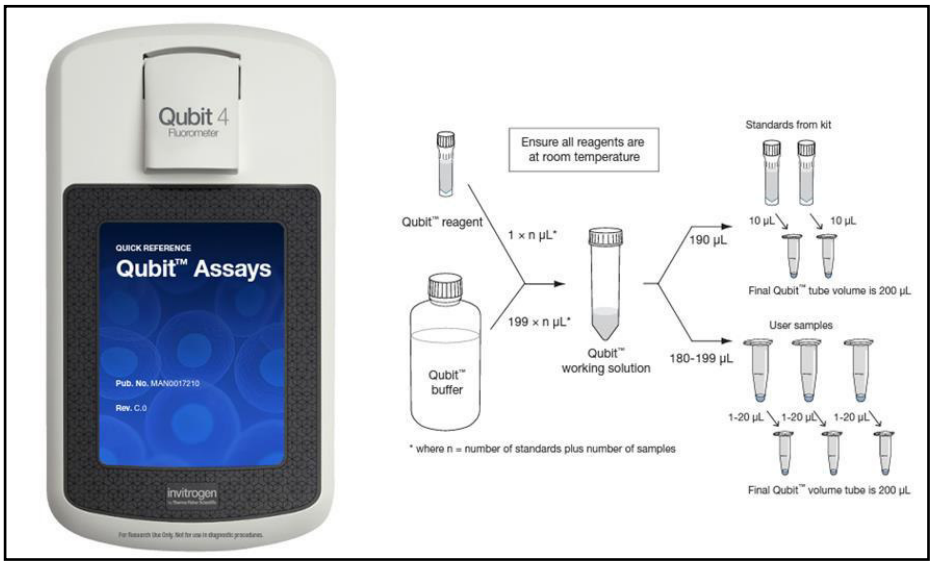


Figura 9. Esquematización de la preparación del protocolo de análisis de integridad y cuantificación del ARN extraído. (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33241) .

3.3.5. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se creó una fasta de secuencias de nucleótidos del gen *TLR2* completo de *Camelus bactrianus, Camelus dromedarius*, *Camelus ferus*, *Balaenoptera musculus*, *Orcinus orca*, *Lagenorhynchus obliquidens* y de *Vicugna pacos*, todos en su mayoría genes predictivos que fueron sometidos al GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (Cuadro 2).

Las Fastas fueron utilizadas para realizar un alineamiento múltiple de todas las secuencias dentro de esta, para poder identificar las posibles regiones conservadas y variables de la ORF del TLR2 en alpacas y llamas, todo este proceso tuvo como finalidad seleccionar las regiones conservadas para el diseño de nuestros oligonucleótidos (Figura 10, Cuadro 3).

Cuadro 2. Fastas descritos en el GenBank cercanos filogenéticamente a la alpaca y llama.

Especie	Estado	Fastas descritas en el Gen Bank de *TLR2*
Vicugna pacos (“Carlotta”)	Predictivo	XM_015246997.2 -TLR2_V.X1 XM_006213170.3 - TLR2_V.X2 XM_015246998.2 - TLR2_V.X3
Camelus bactrianus	Predictivo	XM_010968521.2 - TLR2_V.X1 XM_010968522.2 - TLR2_V.X2 XM_010968523.2 - TLR2_V.X3
	Definitivo	NW_011516836.1– TLR2
Camelus dromedarius	Predictivo	XM_031464412.1 – TLR2_V.X1 XM_010992530.2 – TLR2_V.X2 XM_010992531.2 – TLR2_V.X3 XM_010992532.2 – TLR2_V.X4 XM_031464430.1– TLR2_V.X5
	Definitivo	NC_044512.1 – TLR2
Camelus ferus	Definitivo	NC_045697.1 – TLR2
Balaenoptera musculus	Definitivo	NC_045789.1 – TLR2
Orcinus orca	Definitivo	NW_004438419.1 – TLR2
Lagenorhynchus obliquidens	Definitivo	NW_020837961.1 – TLR2

Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de TLR2 en camélidos y mamíferos marinos utilizados para identificar las regiones conservadas de los TLR2, utilizando el programa MegAlign del software DNASTAR (Lasergene, USA).

Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación del gen *TLR2* en alpacas y llamas.

Gen	Ensayo	Oligonucleótidos	Secuencia del oligonucleótido (5' – 3')	Posición	Tamaño del producto (pb)*	Referencia
ORF TLR 2	RT-PCR	ORF-TLR2.F	CTTTGTGGACAGTGTGGGTCTTC	11- 33	2348	Este estudio
		ORF-TLR2.R	CTAGGACYTTATTGCAGCTCTCAAATT	2332-2358		
	Sanger	ORF-TLR2-F2	CTTGGTAAATTTAGAACGCCTGTTTTAG	878-903		
		ORF-TLR2-F3	TCGGAGAACTTTGTGAAGAGCGAG	2113-2137		
		ORF-TLR2-R2	GTCATTGTTGCCGACATAGGTGAT	208-232		
		ORF-TLR2-R3	ACTGATTCTCATAACTAATAACGTGGG	1498-1524		

*pb: pares de base.

3.3.6. Producción de ADN complementario (ADNc)

Se realizó la transcripción reversa (RT, del inglés *reverse transcription*), utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) que nos proporciona todos los elementos para realizar nuestro master mix que contiene: 0.4 µl de agua libre de nucleasas; 0.5 µl de la mistura de desoxinucleótidos trifosfatados a 10 mM (dNTP) (conteniendo desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxitimina trifosfato [dTTP], desoxicitidina trifosfato [dCTP] y desoxiguanosina trifosfato [dGTP]; concentración final de 0.5 mM), 2 µl del tampón de la enzima concentrada 5X; 1.2 µl de la solución de cloruro de magnesio (25mM; concentración final de 3mM); 0.5 µl del primer random hexámero y 0.4 µl (10U) de la enzima reversa (ImProm-II Reverse Trascriptase, Promega, Madison, WI, Estados Unidos). A este mix se adiciono 5 µl de ARN extraído, el cual será homogenizado y llevado al termociclador modelo T100™ (BIO-RAD, USA). El ciclo térmico de la retro transcripción para este kit es una temperatura inicial de 25°C por 5 minutos, seguido de una temperatura de 42°C por 45 minutos. El ADNc obtenido fue guardado a -20°C hasta ser sometido a la reacción de PCR la cual se describe a continuación.

3.3.7. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR tomamos 5 µl del ADNc obtenido y adicionamos 45 µl de la siguiente mistura: 18 µl de agua libre de nucleasas; 25 µl GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega, USA) (contiene: GoTaq® DNA Polymerase suplementado en 2X Green GoTaq®Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM dATP, 400 µM CATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP y 3 mM MgCl2), 1 µl de los primers ORF-TLR2.F y 1 µl ORF-TLR2.R a una concentración de 20 µM. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador modelo T100™ (BIO-RAD, USA). El ciclo de la PCR está descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de la PCR que se estandarizaron para este estudio.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95 °C	10 minutos
Desnaturalización	40 ciclos	94 °C	1 minuto
Hibridación		57 °C	1 minuto
Elongación		72 °C	3 minutos 30 segundos
Extensión final		72°C	10 minutos

3.3.8. Electroforesis del producto amplificado

El análisis de los resultados de las reacciones de la PCR fue realizado por electroforesis en gel de agarosa. Se preparó el gel de agarosa a 1.5% con TBE 0.5X (Tris 0.089 M; ácido bórico 0.0089M; EDTA 0.025 M, pH 8.3) adicionando 5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ µl), una vez catalizado el gel, se aplicó 5 µl de cada producto de la PCR (amplicon) y seguidamente fue sometido a la electroforesis a 100V por 2 hora con tampón TBE 0.5X.

Al término de la electroforesis, los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta y fotografiado con cámara digital. El tamaño del fragmento amplificado (2348 pb) fue estimado por comparación con un patrón de tamaño molecular de 100 pares de bases (pb) (Promega, USA).

3.3.9. Purificación, clonación y secuenciación

Los productos de PCR verificados fueron sometidos a una nueva electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para cortar la banda (amplicon) específica del gel y purificarla usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA).

Los productos purificados de la ORF completa se enviaron para su clonación y secuenciamiento a la plataforma de secuenciación Macrogen, ubicada en Seúl – Corea. Macrogen clonó los productos utilizando el vector comercial pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA), el plásmido con el inserto fue transformado dentro de una *Escherichia coli* DH5. Los clones fueron confirmados por una PCR de colonia y por un análisis de restricción enzimática con *EcoRI*, finalmente, fueron secuenciados por el método de Sanger en ambas direcciones, utilizando los 6 oligonucleótidos diseñados en este estudio (Cuadro 3).

3.3.10. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

La edición y empalme de las secuencias obtenidas se realizaron mediante los programas Chromas v.2.5.1 [Technelysium Pty Ltd, Helensvalle, QLD – Australia], EditSeq y SeqMan del software Lasergen v.7.0 [DNASTAR Inc., Madison, WI, USA]. Las secuencias editadas y ensambladas fueron sometidas a un alineamiento múltiple global con la base de datos del GenBank para confirmar que se obtuvo las secuencias del TLR2.

Las secuencias nucleotídicas de los clones fueron convertidas a secuencias de aminoácidos y nuevamente sometidas a un alineamiento múltiple usando el método Clustal W usando el algoritmo de MegAlign del software Lasergene v.7.0 [DNASTAR Inc., Madison, WI, USA]. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank con los códigos de acceso MT350705 al MT350711.

Una vez realizado el alineamiento múltiple, se efectuó el análisis filogenético utilizando el programa MEGA XI (Kumar, 2018). La distancia de identidad de nucleótidos y de aminoácidos fue corregida utilizando el método matemático de Kimura 2 – parámetros y el de matrix JTT (Jones, Taylor y Thompson, 1992), respectivamente. El árbol filogenético se construyó utilizando el modelo de *Neighbor – Joining* (Saitou y Nei, 1987), para establecer el límite de confianza de la filogenia se utilizó un Bootstrap de 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). El análisis filogenético tuvo como objetivo comparar nuestras secuencias con las secuencias de los genes de *TLR2* predictivos de la única alpaca "Carlotta", así como de camellos del viejo mundo, cetáceos, rumiantes, suinos y humanos depositados en el GenBank, para darnos una pista del origen evolutivo de este receptor de respuesta inmune innata y poder extrapolar mejor sus funciones.

3.3.11. Análisis de la estructura de la proteína LRR

Se utilizó el software LRRsearch (http://lrrsearch.com/), para la identificación de los motivos (motif) proteicos presentes en las repeticiones ricas en leucina (LRR) que forman el dominio extracelular del TLR2. Estos motif por lo general son estructurales y constan de 20 a 30 aminoácidos que no son usualmente ricos en leucina, de las cuales 11 residuos son conservados (LxxLxLxxN/CxL) dentro de los LRRs. Se usó también el programa SMART [siglas en inglés *Simple Modular Architecture Research Tool*] para representar gráficamente los TLR2 secuenciados las cuales fueron obtenidos en este estudio, así como para representar a través de gráficos los dominios del TLR2 de manera general. Estos dos análisis en conjunto sirvieron para realizar la anotación de las secuencias de las proteínas de los TLR2 en alpacas y llamas.

IV. RESULTADOS

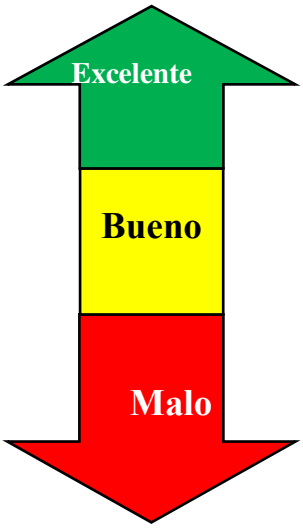
4.1. Selección de las muestras para la amplificación del TLR2

Al analizar la integridad del ARN de las 10 muestras extraídas, se observó que solo 6 (S007, H016, H041, L010, L017 y L022) tuvieron cantidades suficientes de ARN para poder evaluar la calidad e integridad del material genético extraído, presentando entre 60% a 80% de ARN de cadena larga (Cuadro 5). Cabe recalcar que las muestras H024, S072, L035 y L037, restantes no pudieron ser evaluadas debido a tener concentraciones de ARN demasiado bajos para ser medidos por el Qubit® RNA IQ Assay Kit.

Las muestras que presentaron una buena o excelente calidad de ARN fueron sometidas a la cuantificación de este, presentando valores de entre 3 ng/µL hasta 10 ng/µL, estas mismas muestras fueron sometidas a la reacción de transcriptasa reversa y el ADNc obtenido fue nuevamente cuantificado obteniendo valores entre los 30 a 60 ng/µL ADNc por muestra.

Las muestras H024, S072, L035 y L037, no consiguieron ser cuantificadas por el Qubit RNA HS Assay Kit y Qubit DNA HS Assay Kit, por tener muy baja concentración de ácido nucleicos.

Cuadro 5. Resultado de la calidad (integridad) del ARN de los 10 muestras extraídas de alpacas y llamas, calificándolas como excelente, bueno y mala, que están sombreados de color verde, amarillo y rojo, respectivamente.



Especie	Raza	ID muestra	Calidad del ARN (60-100%)
Alpaca	Suri	S007	Excelente[a]
Llama	Q'ara	L022	Excelente
Llama	Chaccu	L017	Excelente
Alpaca	Huacaya	H016	Bueno[b]
Alpaca	Huacaya	H041	Bueno
Llama	Q'ara	L010	Bueno
Alpaca	Huacaya	H024	Mala[c]
Alpaca	Suri	S072	Mala
Llama	Chaccu	L035	Mala
Llama	Q'ara	L037	Mala

[a]: 80-100% de ARN de cadena larga

[b]: 69-79%

[c]: No hubo lectura, por baja cantidad de ARN.

4.2. Detección de isoformas del gen *TLR 2*

El ADNc de las 10 muestras fueron sometidos a la PCR inicial, consiguiendo amplificar la ORF completa del TLR2 (2348pb) de 4 de las 10 muestras, coincidentemente las muestras positivas (S007, L010, L017 y L022) fueron las que obtuvieron los mejores resultados en la evaluación de calidad y cuantificación del ARN extraído. En la Figura 11 podemos observar los productos de 2348pb fuertemente positivas de dos llamas (L017 y L022) y una alpaca (S007); pero también podemos observar una muestra con ligera intensidad de una llama (L010).

Las muestras S007 (alpaca), L022 (llama) y L017 (llama), fueron nuevamente sometidos a una PCR para obtener un mayor volumen del producto de la ORF del TLR2(2348pb). De esta manera conseguimos suficiente material para clonar y secuenciar dichos productos (Figura 12).

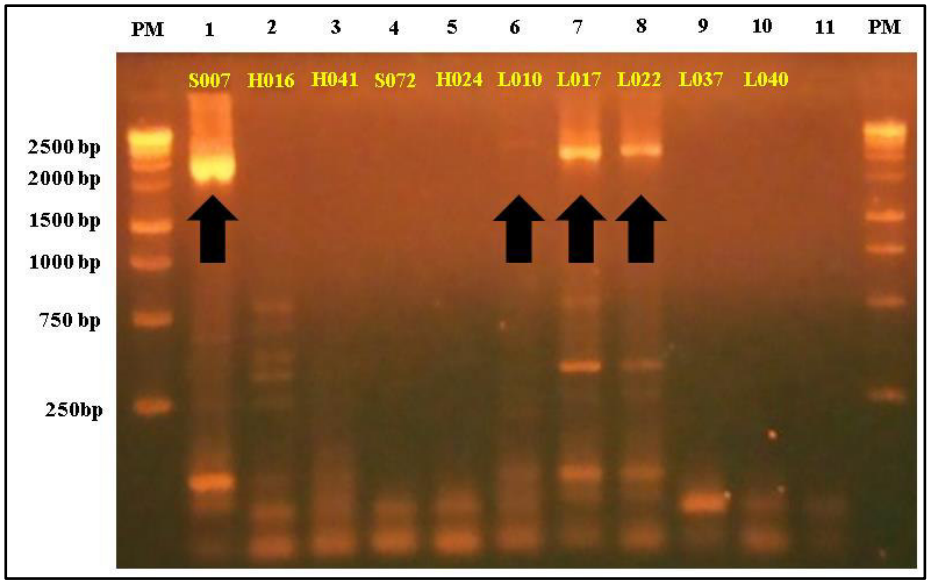


Figura 11. Productos amplificados de RT-PCR de las ORF TLR2 (2348 pb). Carriles PM: 2348 pb del marcador de ADN; los carriles 1, 6, 7 y 8 con las identificaciones de S007 (alpaca), L010 (llama), L022 (llama) y L017 (llama), respectivamente, corresponden con luminiscencia que corresponden a 2348 pb; el carril 11 es el blanco y el carril 12 es PM marcador de ADN.

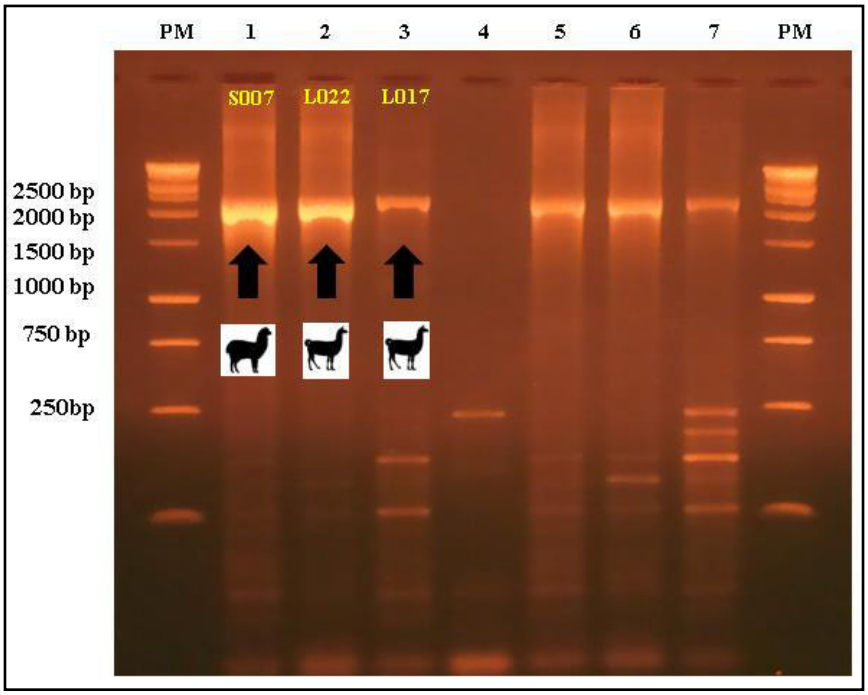


Figura 12. Amplificados de las ORF TLR2 (2348 pb) enviados a clonar y secuenciar. Carriles 1: Padrón de peso (PM) de 100pb; los carriles 1, 2 y 3 con luminiscencia que corresponden a 2348pb son positivos a las variantes de ORF de TLR2: S007 (alpaca), L022 (llama) y L017 (llama), respectivamente.

4.3. Análisis de secuencia de las isoformas del gen *TLR 2*

Los amplificados de las muestras S007, L022 y L017, fueron enviadas para su clonación y secuenciamiento a la empresa Macrogen en Corea del Sur. Las 3 muestras fueron exitosamente clonadas, por cada clon se procedieron a secuenciar 3 colonias, cada colonia fue secuenciada utilizando los 6 oligonucleótidos diseñados en el estudio (Cuadro 3); obteniendo 6 secuencias por cada colonia para la construcción de las secuencias contiguas (contig) de la ORF completa del TLR2.

La edición y corrección de las secuencias obtenidas de cada colonia fueron realizados utilizando el programa Chromas (Figura 13), para luego alinear y sobreponer dichas secuencias usando el programa SeqMan y así obtener un contig de 2348 pb (Figura 14), cada contig fue sometido al BLAST confirmando que caracterizamos el gen *TLR2* (Figura 15). Por cada clon se obtuvieron 3 contig de 2348 pb.

4.4. Alineamiento múltiple

Las secuencias completas fueron alineadas entre ellas, además fueron comparadas con la ORF del gen *TLR2* completa de la alpaca Carlotta registrada en el GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), el cual tiene como código de acceso: XM_006213170.3. Gracias a los softwares de EditSeq y MegAlign, se identificaron las mutaciones a nivel de nucleótidos y aminoácidos.

Como resultado, de la muestra S007 se obtuvieron 3 isoformas: S007.VX1, S007.VX2 y S007.VX3, las cuales están subidas en el GenBank con los siguientes números de acceso MT350709.1, MT350710.1 y MT350711.1, respectivamente. Respecto a la muestra L022 también se obtuvo 3 isoformas: L022.VX1 y L022.VX2 y L022.VX3, siendo sus números de acceso MT350705.1, MT350706.1 y MT350707.1, de manera respectiva. Por último, de la muestra L017 solo se obtuvo una isoforma: L017.VX1, con numero de acceso MT350708.1.

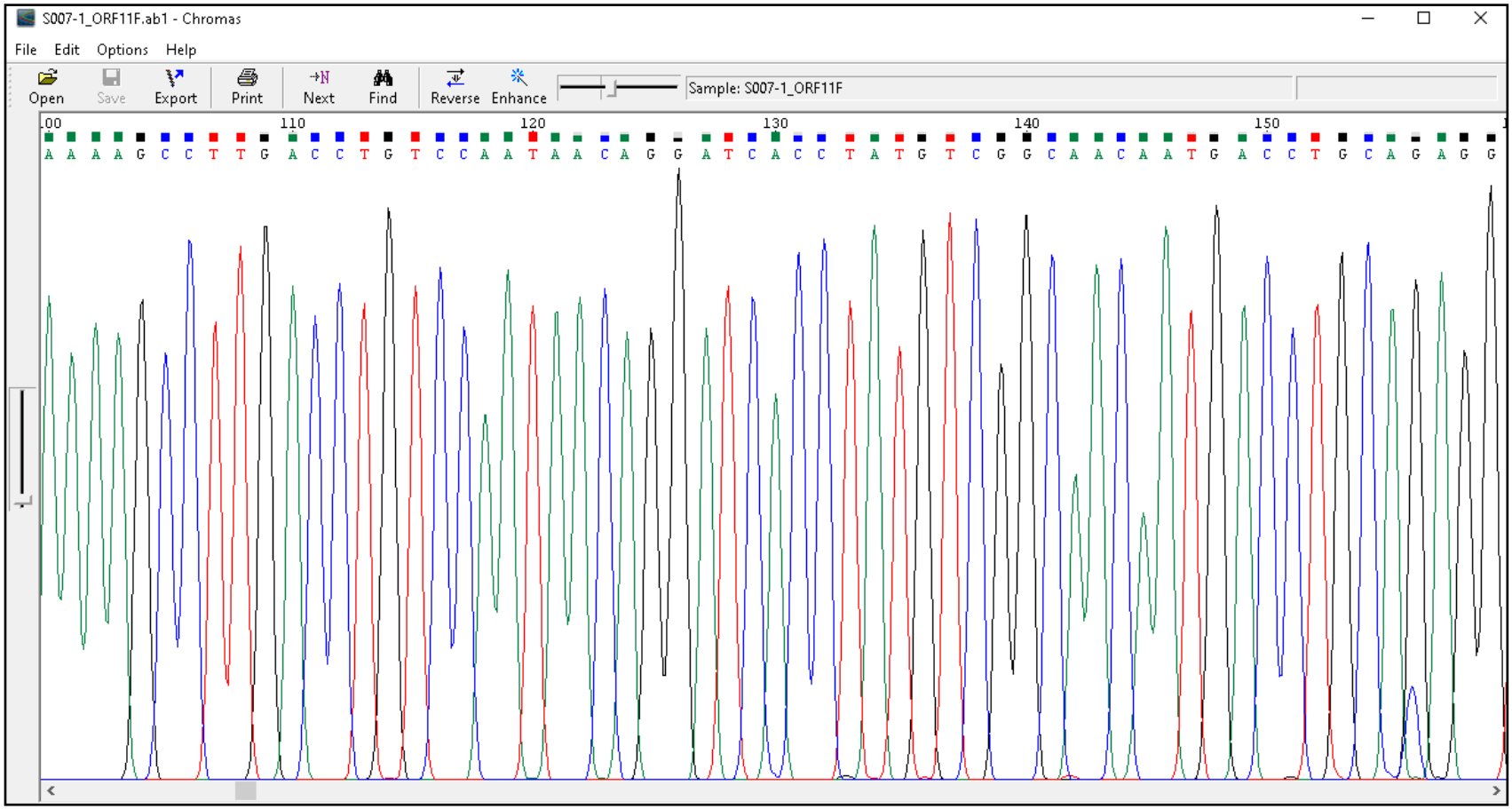
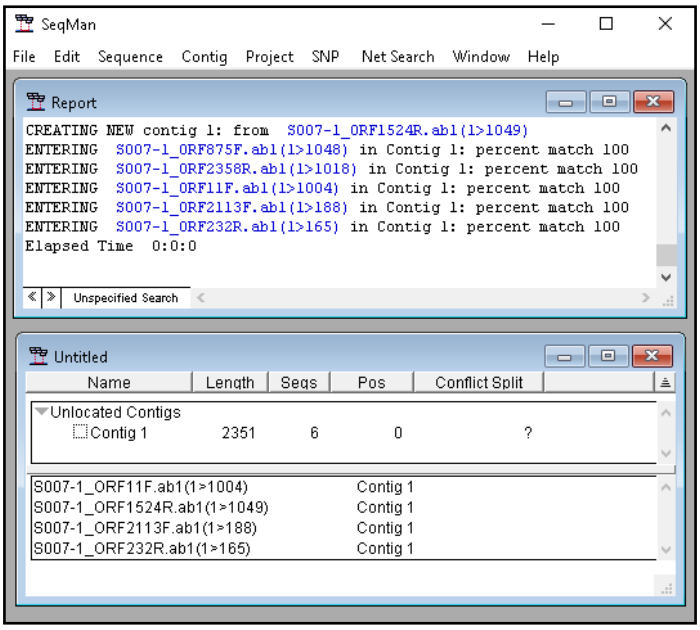
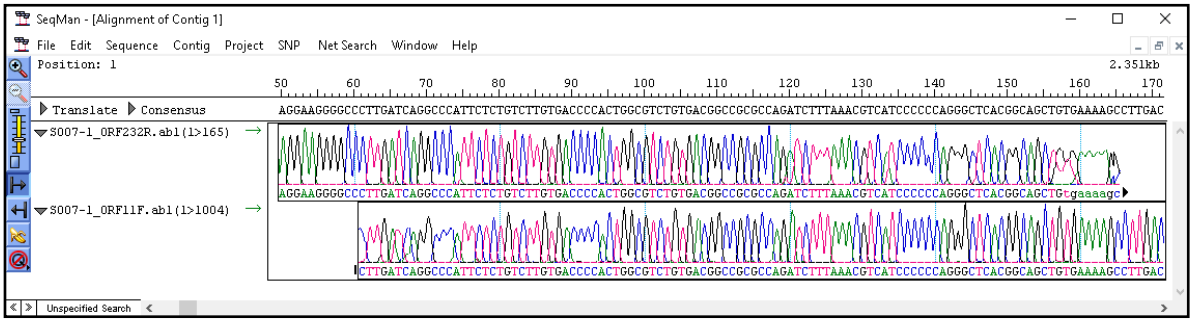


Figura 13. Cromatograma de una colonia de un clon de la alpaca S007 editado utilizando el programa Chromas usando el ORF11. F. Para cada colonia del clon del S007 se obtuvo 6 cromatogramas (secuencias) utilizadas para la formación de un contig de 2348pb.

A.



B.



C.

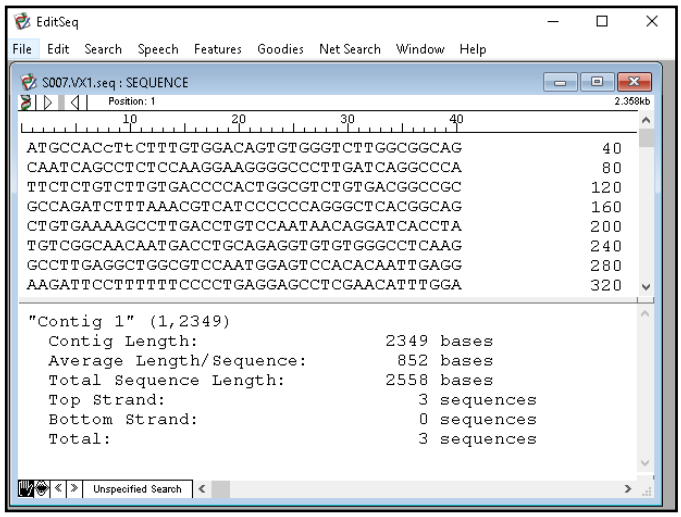


Figura 14. Alineamiento y formación de las secuencias contiguas (contig) utilizando las 6 secuencias nucleotídicas obtenidas de una colonia del clon S007. A) y B) muestran la formación de contig a través del programa SeqMan y C) muestra ya el contig formado y exportado utilizando EditSeq.

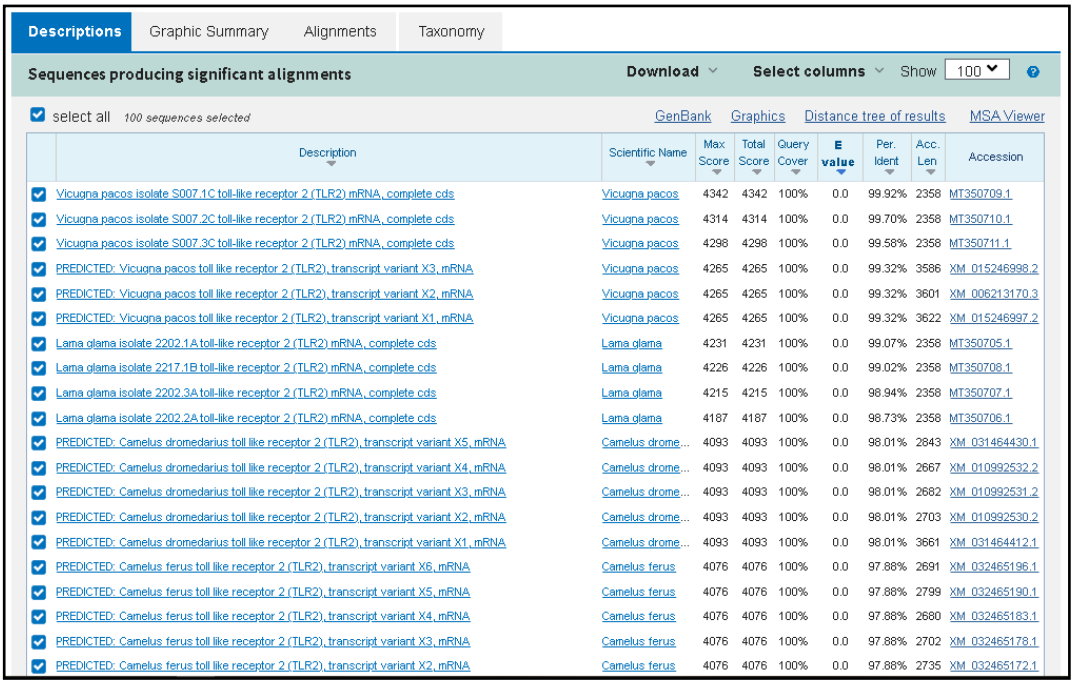


Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas obtenidas de la isoforma 1 de la del clon S007, mediante el programa de BLAST.

Cuadro 6. Códigos de acceso en GenBank de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como de la página UnitProt.

Nombre científico	GenBank		UnitProt
	Nucleótido	Proteínas	
***Lama glama:* L022 – Isoforma 1**	MT350705.1	QVN25309.1	A0A8E6M9P0
***Lama glama:* L022 – Isoforma 2**	MT350706.1	QVN25310.1	A0A8E6MCU3
***Lama glama:* L022 – Isoforma 3**	MT350707.1	QVN25311.1	A0A8E6HPW5
***Lama glama:* L017 – Isoforma 1**	MT350708.1	QVN25312.1	A0A8E6HQE2
***Vicugna pacos:* S007 – Isoforma 1**	MT350709.1	QVN25313.1	A0A8E6HQ92
***Vicugna pacos:* S007 – Isoforma 2**	MT350710.1	QVN25314.1	A0A8E6HPW6
***Vicugna pacos:* S007 – Isoforma 3**	MT350711.1	QVN25315.1	A0A8E6HQK3

4.4.1. Variaciones (mutaciones) de las secuencias

En el alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) de las colonias de cada clon, se observaron posiciones de nt y aa que no coincidían entre las secuencias de una misma muestra, a estas posiciones se les denominan mismatches (abreviatura en inglés para falta de coincidencia).

4.4.1.1. Análisis de variación de los clones de la Alpaca S007

Sus 3 isoformas (S007.VX1, S007.VX2 y S007.VX3) presentan las siguientes diferencias a nivel de nt: S007.VX1 y el S007.VX2 presenta 5 mismatches, S007.VX1 y el S007.VX3 presenta 8 mismatches, S007.VX2 y el S007.VX3 presenta 5 mismatches. A nivel de aa, el clon S007.VX1 y el S007.VX2 presenta 4 mismatches, S007.VX1 y el S007.VX3 presenta 7 mismatches, y los clones S007.VX2 y S007.VX3 presenta 5 mismatches, esto confirma la presencia de mutaciones sinónimas y no sinónimas dentro de las secuencias obtenidas. Las identificación de las mutaciones de nt y aa con sus respectivas posiciones están descritos en el cuadro 7.

Por ejemplo, en la figura 16 se presenta un pequeño segmento del alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos entre las 3 isoformas de la alpaca S007, ahora bien, este segmento va de la posición 61 hasta 180, se logra hallar dos mutaciones, la primera en la posición 114 de la S007.VX1, presenta una citocina (C) en vez de una timina (T), y en el caso de la segunda, en la posición 137 de la S007.VX1, presenta una T en vez de una C.

En el caso de secuencias aminoacídicas, en la figura 17 se observa un segmento que va desde la posición 181 a 360, donde se detectaron 4 mutaciones. La primera es en la posición 188 de la S007.VX1, cambia de Q a R; la segunda es en la posición 212 de S007.VX2 donde hay una I en vez de V; la tercera es en la posición 263 de la S007.VX3 que hay una A en lugar de T; y la última mutación en la posición 343 de la S007.VX3 que presenta a la L como una I.

4.4.1.2. Análisis de variación de los clones de la llama L022

La muestra de llama L022 presenta 3 isoformas (VX1, VX2 y VX3), las cuales presentan las siguientes diferencias a nivel de nt: L022.VX1 y el L022.VX2 presenta 17 mismatches, L022.VX1 y el L022.VX3 presenta 16 mismatches, L022.VX2 y el L022.VX3 presenta 23 mismatches. A nivel de aa, el L022.VX1 y el L022.VX2 presenta 8 mismatches, L022.VX1 y el L022VX3 presenta 13 mismatches, L022.VX2 y el L022.VX3 presenta 15 mismatches. Las identificación de las variaciones de nt y aa con sus respectivas posiciones están descritos en el cuadro 8.

4.4.1.3. Análisis de la variaciones del clon de la llama L017.

Se realizó la comparación con los isoformas de los clones de S007 y L022, obteniendo diferencias a nivel de nt y aa. A nivel de nt, L017 fue comparado con la S007.VX1, S007.VX2, S007.VX3, L022.VX1, L022.VX2 y L022.VX3, quienes presentaron 21, 22, 25, 9, 27, 21 mismatches, respectivamente. De acuerdo con las secuencias de aa, el L017 fue analizado con la S007.VX1, S007.VX2, S007.VX3, L022.VX1, L022.VX2 y L022.VX3, para identificar 14, 16, 19, 8, 17 y 17 mismatches, de manera respectiva. Estas posiciones están descritas en el cuadro 9.

4.4.2. Mutaciones sinónimas y no sinónimas

Se obtuvo mutaciones sinónimas y sinónimas al comparar entre isoformas y entre los clones. En primer lugar, dentro las 3 isoformas de la muestra S007 se hallaron 9 mutaciones puntuales de nucleótidos de las cuales 8 fueron mutaciones no sinónimas y una mutación sinónima (Cuadro 7). En segundo lugar, respecto a las 3 isoformas de la muestra L022 se visualizó 28 mutaciones puntuales de nucleótidos siendo 18 no sinónimas y 10 sinónimas (Cuadro 8). Finalmente, la única isoforma de L017 fue comparada con las 3 isoformas de S007 y L022, donde se obtuvo 13 mutaciones puntuales de nucleótidos, donde 9 fueron mutaciones no sinónimas y 4 sinónimas (Cuadro 9).

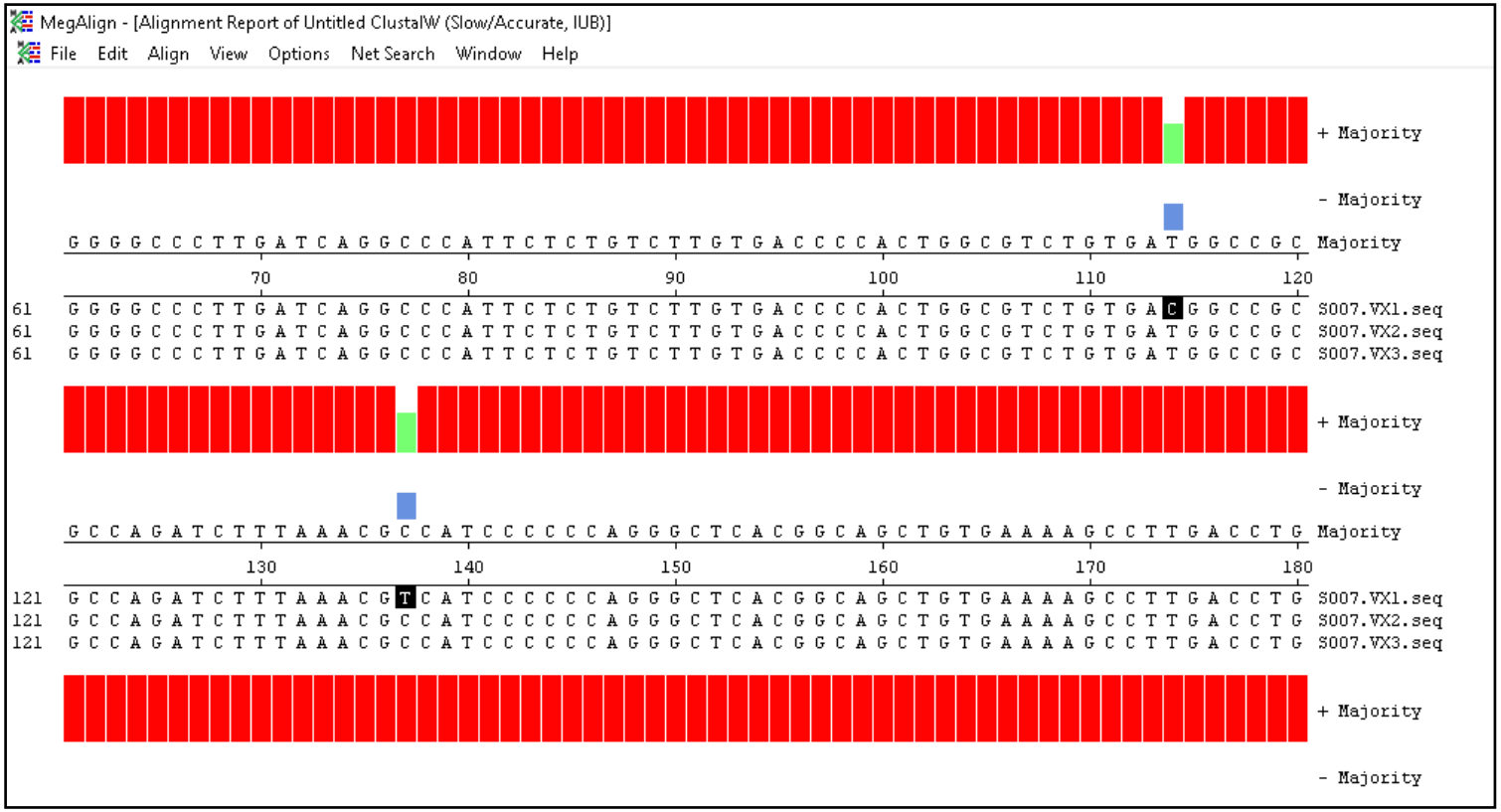


Figura 16. Segmento de alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de las tres isoformas clonadas de la alpaca S007, este segmento va de la posición 61 hasta la 180. Se usó el software MegAlign.

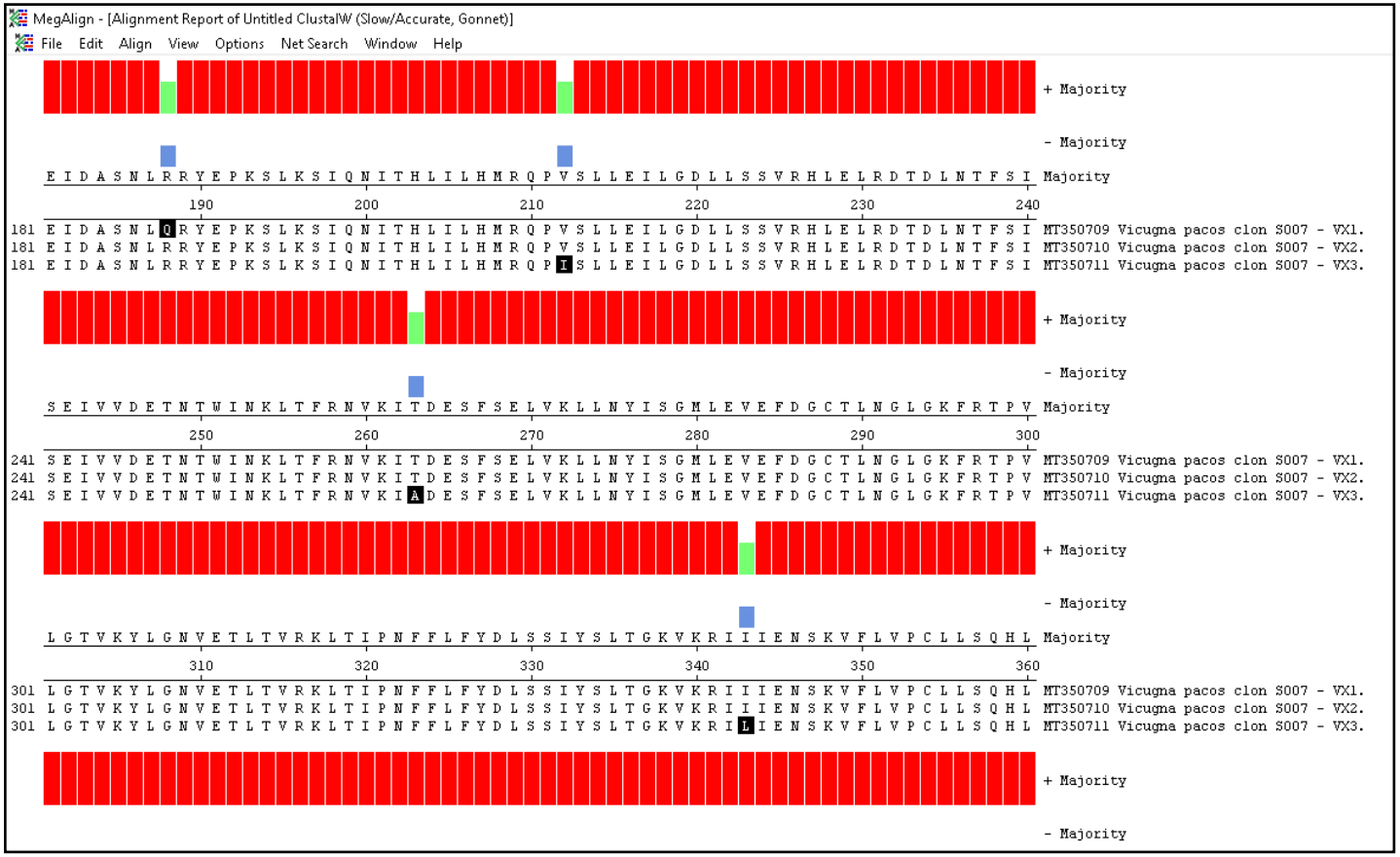


Figura 17. Segmento de alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las tres isoformas clonadas de la alpaca S007, este segmento va de la posición 181 hasta la 360. Se usó el software MegAlign.

Cuadro 7. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) de las tres isoformas obtenidas del clon de la alpaca S007.

Posición del nucleótido	Alelo	Posición del AA	AA	Mutación (d_S o d_N)	Cambio de polaridad	Dominio	Isoforma (VX1, VX2, VX3)
114	C/T	38	D/D	dS	NP/NP	ECD	VX1
137	T/C	46	V/A	dN	P/P	ECD	VX1
563	A/G	188	Q/R	dN	P/NP	ECD	VX1
634	A/G	212	I/Y	dN	NP/P	ECD	VX3
787	G/A	263	A/T	dN	NP/P	ECD	VX3
1027	C/A	343	L/I	dN	NP/NP	ECD	VX3
1305	G/C	435	W/C	dN	NP/P	ECD	VX1
1321	C/T	441	H/Y	dN	NP/P	ECD	VX3
1501	G/A	501	A/T	dN	NP/P	ECD	VX2

En el presente cuadro nos demuestra las mutaciones al alinear todas las isoformas del clon de la alpaca S007: S007.VX1 (color rojo), S007.VX2 (anaranjado) y S007.VX3 (celeste). Las filas de color verde son las mutaciones no sinónimas. ECD: ectodominio, TM: dominio de transmembrana y TIR: dominio intracelular.

Cuadro 8. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) de las tres isoformas obtenidas del clon de la llama L022.

Posición del nucleótido	Alelo	Posición del AA	AA	Mutación (d_S o d_N)	Cambio de polaridad	Dominio	Isoforma (VX1, VX2, VX3)
35	T/C	12	V/A	dN	NP/NP	ECD	VX1
218	C/T	73	P/L	dN	NP/NP	ECD	VX1
286	C/T	96	P/S	dN	NP/P	ECD	VX3
407	C/T	136	P/L	dN	NP/NP	ECD	VX3
452	G/A	151	S/N	dN	P/P	ECD	VX3
568	C/T	190	H/Y	dN	NP/P	ECD	VX2
718	G/A	240	V/I	dN	NP/NP	ECD	VX3
801	C/T	267	F/F	dS	NP/NP	ECD	VX2
838	G/A	280	V/M	dN	NP/NP	ECD	VX3
1014	G/A	338	K/K	dS	NP/NO	ECD	VX2
1043	G/A	348	R/K	dN	NP/NP	ECD	VX3
1418	T/C	473	F/S	dN	NP/P	ECD	VX3
1607	C/T	536	S/F	dN	P/NP	ECD	VX3
1720	C/T	574	R/W	dN	NP/NP	ECD	VX1
1779	T/C	593	S/S	dS	P/P	TM	VX2
1791	C/T	597	C/C	dS	P/P	TM	VX2
1813	C/G	605	L/V	dN	NP/NP	TM	VX2
1833	T/C	611	H/H	dN	NP/NP	TM	VX1
1865	C/T	622	T/M	dN	P/NP	TIR	VX2
1892	C/A	631	T/K	dN	P/NP	TIR	VX3
1908	T/C	636	P/P	dS	NP/NP	TIR	VX1
1929	C/T	643	D/D	dS	NP/NP	TIR	VX2
1935	T/C	645	F/F	dS	NP/NP	TIR	VX2
2043	C/T	681	I/I	dS	NP/NP	TIR	VX2
2093	A/G	698	H/R	dN	NP/NP	TIR	VX2
2106	C/T	702	F/F	dS	NP/NP	TIR	VX3
2268	G/A	756	M/I	dN	NP/NP	TIR	VX2
2315	A/G	772	Q/R	dN	P/NP	TIR	VX3

En el presente cuadro nos demuestra las mutaciones al alinear todas las isoformas del clon de la llama L022: L022.VX1 (color rojo), L022.VX2 (anaranjado) y L022.VX3 (celeste). Las filas de color verde son las mutaciones no sinónimas. ECD: ectodominio, TM: dominio de transmembrana y TIR: dominio intracelular.

Cuadro 9. Distribución de mismatches y mutaciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) de todas las secuencias obtenida de los tres clones: S007, L017 y L022.

Posición del nucleótido	Alelo	Posición del AA	AA	Mutación (d_S o d_N)	Cambio de polaridad	Dominio	S007	L022	L017
35	T/C	12	V/A	dN	NP/NP	ECD		VX1	VX1
114	C/T	38	D/D	dS	NP/NP	ECD	VX1		
137	T/C	46	V/A	dN	NP/NP	ECD	VX1		
218	C/T	73	P/L	dN	NP/NP	ECD		VX1	VX1
254	C/G	85	A/G	dN	NP/NP	ECD	VX1, VX2, VX3		
286	C/T	96	P/S	dN	NP/P	ECD		VX3	
358	G/T	120	G/W	dN	NP/NP	ECD			VX1
367	C/A	123	P/T	dN	NP/P	ECD			VX1
407	T/C	136	L/P	dN	NP/NP	ECD		VX1, VX2	VX1
428	T/C	143	M/T	dN	NP/P	ECD	VX1, VX2, VX3		
452	T/A	151	I/N	dN	NP/NP	ECD			VX1
452	G/A	151	S/N	dN	P/P	ECD		VX3	
472	G/A	158	G/G	dS	NP/NP	ECD	VX1, VX2, VX3		
482	C/A	161	T/N	dN	P/P	ECD			VX1
486	T/C	163	F/F	dS	NP/NP	ECD			VX1
493	A/G	165	K/E	dN	NP/NP	ECD	VX1, VX2, VX3		
563	G/A	188	R/Q	dN	NP/P	ECD	VX2, VX3		
568	C/T	190	H/Y	dN	NP/P	ECD		VX2	
634	A/G	212	I/V	dN	NP/NP	ECD	VX3		
718	G/A	240	V/I	dN	NP/NP	ECD		VX3	
787	G/A	263	A/T	dN	NP/P	ECD	VX3		
801	C/T	267	F/F	dS	NP/NP	ECD		VX2	
838	G/A	280	V/M	dN	NP/NP	ECD		VX3	
1014	G/A	338	K/K	dS	NP/NP	ECD		VX2	
1027	A/T	343	I/L	dN	NP/NP	ECD	VX1, VX2		VX1
1027	C/T	343	L/L	dS	NP/NP	ECD	VX3		
1030	T/A	344	L/I	dN	NP/NP	ECD		VX1, VX2, VX3	
1043	G/A	348	R/K	dN	NP/NP	ECD		VX3	
1305	G/C	435	W/C	dN	NP/NP	ECD	VX1		VX1
1321	C/T	441	H/Y	dN	NP/P	ECD	VX3		
1418	C/T	473	S/F	dN	P/NP	ECD		VX1, VX2	
1501	G/A	501	A/T	dN	NP/P	ECD	VX2		
1602	C/T	534	N/N	dS	P/P	ECD	VX1, VX2, VX3		
1607	C/T	536	S/F	dN	P/NP	ECD		VX3	
1720	T/C	574	W/R	dN	NP/NP	ECD		VX2, VX3	
1779	T/C	593	S/S	dS	P/P	TM		VX2	
1791	T/C	597	C/C	dS	P/P	TM		VX1, VX3	VX1
1792	A/G	598	T/A	dN	P/NP	TM	VX1, VX2, VX3		
1813	C/G	605	L/V	dN	NP/NP	TM		VX2	
1833	T/C	611	H/H	dS	NP/NP	TM		VX1	VX1
1865	C/T	622	T/M	dN	P/NP	TIR		VX2	
1892	C/A	631	T/K	dN	P/NP	TIR		VX3	
1908	T/C	636	P/P	dS	NP/NP	TIR		VX1	VX1
1929	C/T	643	D/D	dS	NP/NP	TIR		VX2	
1935	T/C	645	F/F	dS	NP/NP	TIR		VX2	
2015	G/A	672	R/K	dN	NP/NP	TIR	VX1, VX2, VX3		
2043	C/T	681	I/I	dS	NP/NP	TIR		VX2	
2092	T/C	698	C/R	dN	P/NP	TIR	VX1, VX2, VX3		
2093	A/G	698	H/R	dN	NP/NP	TIR		VX2	
2106	C/T	702	F/F	dS	NP/NP	TIR		VX3	
2268	G/A	756	M/I	dN	NP/NP	TIR		VX2	
2315	A/G	772	Q/R	dN	P/NP	TIR		VX2	

En el presente cuadro nos demuestra las mutaciones al alinear todas las isoformas de los tres clones: Tres isoformas de la alpaca S007 (color rojo), tres isoformas de la L022 (celeste) y una isoforma de la L017 (anaranjado). Las filas de color verde son las mutaciones no sinónimas. ECD: ectodominio, TM: dominio de transmembrana y TIR: dominio intracelular.

4.5. Análisis filogenético del gen *TLR 2*

4.5.1. Distancia entre nucleótidos y aminoácidos

4.5.1.1. Alpaca S007

Respecto a las distancias de nucleótidos (nt) entre sus isoformas se observa: S007.VX1 y el S007.VX2 presenta 99.8% de identidad de nt, S007.VX1 y el S007.VX3 presenta 99.7% de identidad de nt y en S007.VX2 y el S007.VX3 presenta 99.8% de identidad de nt **(Anexo 1)**. Además, se evalúo las distancias entre las secuencias de aminoácidos: S007.VX1 y el S007.VX2 presenta 99.5%, S007.VX1 y el S007.VX3 presenta 99.1% y en S007.VX2 y el S007.VX3 presenta 99.4% de similaridad de aa, respectivamente **(Anexo 2)**. Cabe mencionar como referencia que 1% de diferencia a nivel de aminoácidos equivale a 8 mismatches entre las secuencias comparadas.

4.5.1.2. Llama L022

Respecto a las distancias de nucleótidos entre sus isoformas se muestra: L022.VX1 y el L022.VX2 presenta 99.2%, L022.VX1 y el L022.VX3 presenta 99.4% y en L022.VX2 y el S007.VX3 presenta 99.0% de identidad de nt, respectivamente **(Anexo 3)**. Además, se evalúo las distancias entre las secuencias de aminoácidos: S007.VX1 y el S007.VX2 presenta 98.9%, S007.VX1 y el S007.VX3 presenta 98.5% y en S007.VX2 y el S007.VX3 presenta 98.1%. de similaridad de aa, respectivamente **(Anexo 4).**

4.5.1.3. Llama L017

Se realizó un alineamiento entre las especies más representativas según el BLAST, comparando las secuencias de nucleótidos **(Anexo 5)** y aminoácidos **(Anexo 6)** de L017, junto a las demás isoformas de la L022 Y S007. Dando como resultado que la isoforma de TLR2 de L017 al ser alineadas con las isoformas de L022 y S007 muestran una identidades de nt en el rango de 99.1% a 98.9% y a nivel de aa entre el 99% a 97.6% de similaridad.

4.5.1.4. Distancias con las secuencias de BLAST

Se procedió a analizar las distancia de todas las 7 secuencias obtenidas las cuales fueron comparadas con las secuencias genómicas referenciales de camélido bactriano y dromedario, así como porcino, ovinos, caprinos, vacunos y animales marinos, las cuales están publicadas en el GenBank (Cuadro 10). Se observó gran similitud entre las secuencias, con algunas variaciones de pares de bases entre especies. (Figura 18).

4.5.2. Dendogramas

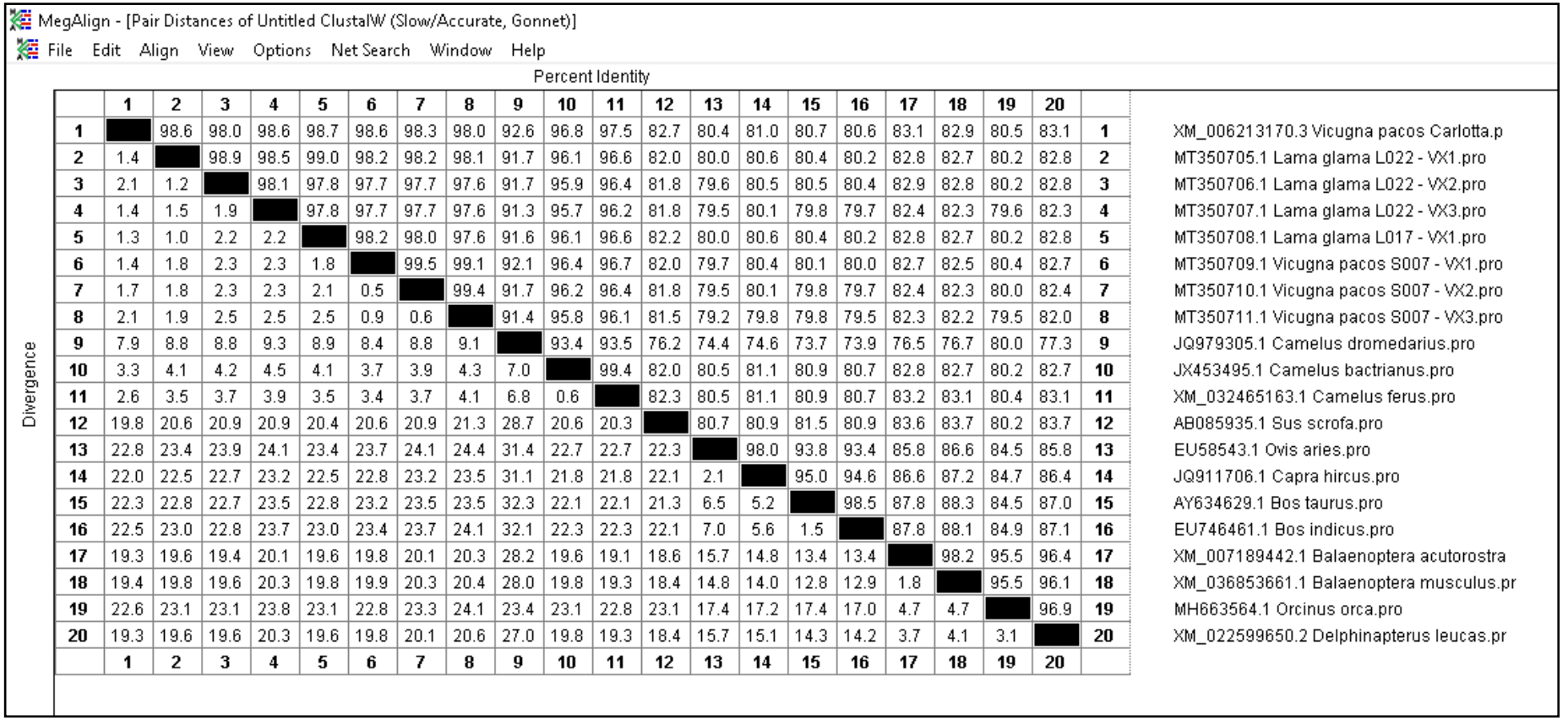
El análisis filogenético es la representación de la distancias genéticas de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas al comparar con otras especies, quienes son las más cercanas evolutivamente mediante el programa MEGA XI (https://www.megasoftware.net/).

Por ello, se analizaron las secuencias aminoacídicas, donde se obtuvo que las 7 isoformas de los 3 clones presentan: la secuencia de la alpaca "Carlotta" con las tres isoformas (VX1, VX2 Y VX3) de S007 fueron 99.4%, 99.4% y 99.2%, con la isoforma VX1 de L017 fue 99.4%, y con tres las isoformas (VX1, VX2 y VX3) de L022 fueron 99.4%, 99.0% y 99.4%, para cada uno.

Respecto al camélido dromedario con las isoformas VX1, VX2 y VX3 de la S007 fueron 97.8%, 97.8% y 97.6%, con la isoforma VX1 de la llama L017 fue 97.7%, y, por último, con las isoformas VX1, VX2 y VX3 de L022 fueron 97.7%, 97.7% y 97.6%, para cada uno. En el caso del camélido bactriano, son las siguientes distancias: Con la isoforma VX1, VX2 Y VX3 de S007 fueron 97.8%, 97.7% y 97.6%, con la isoforma VX1 de L017 fue 97.5%, y con las isoformas VX1, VX2 y VX3 de L022 fueron 97.6%, 97.5% y 97.5%, de acuerdo con el orden escrito (Figura 19).

Cuadro 10. Similaridad de las secuencias de aa en los genes de las isoformas obtenidas de los clones de alpaca S007, y llamas L017 y L022.

Especie	Código de acceso	Similaridad aa
Vicugna pacos: Carlotta	XM_006213170.3	98.0 – 98.7 %
Camelus ferus	XM_032465163.1	96.1 – 96.7 %
Camelus bactrianus	JX453495.1	95.7 – 96.4 %
Camelus dromedarius	JQ979305.1	91.3 – 92.1 %
Balaenoptera acutorostrata scammoni	XM_007189442.1	82.3 – 82.9 %
Balaenoptera musculus	XM_036853661.1	82.2 – 82.8 %
Delphinapterus leucas	XM_022599650.2	82.0 – 82.8 %
Sus scrofa	AB085935.1	81.5 – 82.2 %
Capra hircus	JQ911706.1	79.8 – 80.6 %
Bos taurus	AY634629.1	79.8 – 80.5 %
Bos indicus	EU746461.1	79.5 – 80.4 %
Orcinus orca	MH663564.1	79.5 – 80.4 %
Ovis aries	EU58543.1	79.2 – 80.0 %



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1		98.6	98.0	98.6	98.7	98.6	98.3	98.0	92.6	96.8	97.5	82.7	80.4	81.0	80.7	80.6	83.1	82.9	80.5	83.1	**1**	XM_006213170.3 Vicugna pacos Carlotta.p
2	1.4		98.9	98.5	99.0	98.2	98.2	98.1	91.7	96.1	96.6	82.0	80.0	80.6	80.4	80.2	82.8	82.7	80.2	82.8	**2**	MT350705.1 Lama glama L022 - VX1.pro
3	2.1	1.2		98.1	97.8	97.7	97.7	97.6	91.7	95.9	96.4	81.8	79.6	80.5	80.5	80.4	82.9	82.8	80.2	82.8	**3**	MT350706.1 Lama glama L022 - VX2.pro
4	1.4	1.5	1.9		97.8	97.7	97.7	97.6	91.3	95.7	96.2	81.8	79.5	80.1	79.8	79.7	82.4	82.3	79.6	82.3	**4**	MT350707.1 Lama glama L022 - VX3.pro
5	1.3	1.0	2.2	2.2		98.2	98.0	97.6	91.6	96.1	96.6	82.2	80.0	80.6	80.4	80.2	82.8	82.7	80.2	82.8	**5**	MT350708.1 Lama glama L017 - VX1.pro
6	1.4	1.8	2.3	2.3	1.8		99.5	99.1	92.1	96.4	96.7	82.0	79.7	80.4	80.1	80.0	82.7	82.5	80.4	82.7	**6**	MT350709.1 Vicugna pacos S007 - VX1.pro
7	1.7	1.8	2.3	2.3	2.1	0.5		99.4	91.7	96.2	96.4	81.8	79.5	80.1	79.8	79.7	82.4	82.3	80.0	82.4	**7**	MT350710.1 Vicugna pacos S007 - VX2.pro
8	2.1	1.9	2.5	2.5	2.5	0.9	0.6		91.4	95.8	96.1	81.5	79.2	79.8	79.8	79.5	82.3	82.2	79.5	82.0	**8**	MT350711.1 Vicugna pacos S007 - VX3.pro
9	7.9	8.8	8.8	9.3	8.9	8.4	8.8	9.1		93.4	93.5	76.2	74.4	74.6	73.7	73.9	76.5	76.7	80.0	77.3	**9**	JQ979305.1 Camelus dromedarius.pro
10	3.3	4.1	4.2	4.5	4.1	3.7	3.9	4.3	7.0		99.4	82.0	80.5	81.1	80.9	80.7	82.8	82.7	80.2	82.7	**10**	JX453495.1 Camelus bactrianus.pro
11	2.6	3.5	3.7	3.9	3.5	3.4	3.7	4.1	6.8	0.6		82.3	80.5	81.1	80.9	80.7	83.2	83.1	80.4	83.1	**11**	XM_032465163.1 Camelus ferus.pro
12	19.8	20.6	20.9	20.9	20.4	20.6	20.9	21.3	28.7	20.6	20.3		80.7	80.9	81.5	80.9	83.6	83.7	80.2	83.7	**12**	AB085935.1 Sus scrofa.pro
13	22.8	23.4	23.9	24.1	23.4	23.7	24.1	24.4	31.4	22.7	22.7	22.3		98.0	93.8	93.4	85.8	86.6	84.5	85.8	**13**	EU58543.1 Ovis aries.pro
14	22.0	22.5	22.7	23.2	22.5	22.8	23.2	23.5	31.1	21.8	21.8	22.1	2.1		95.0	94.6	86.6	87.2	84.7	86.4	**14**	JQ911706.1 Capra hircus.pro
15	22.3	22.8	22.7	23.5	22.8	23.2	23.5	23.5	32.3	22.1	22.1	21.3	6.5	5.2		98.5	87.8	88.3	84.5	87.0	**15**	AY634629.1 Bos taurus.pro
16	22.5	23.0	22.8	23.7	23.0	23.4	23.7	24.1	32.1	22.3	22.3	22.1	7.0	5.6	1.5		87.8	88.1	84.9	87.1	**16**	EU746461.1 Bos indicus.pro
17	19.3	19.6	19.4	20.1	19.6	19.8	20.1	20.3	28.2	19.6	19.1	18.6	15.7	14.8	13.4	13.4		98.2	95.5	96.4	**17**	XM_007189442.1 Balaenoptera acutorostra
18	19.4	19.8	19.6	20.3	19.8	19.9	20.3	20.4	28.0	19.8	19.3	18.4	14.8	14.0	12.8	12.9	1.8		95.5	96.1	**18**	XM_036853661.1 Balaenoptera musculus.pr
19	22.6	23.1	23.1	23.8	23.1	22.8	23.3	24.1	23.4	23.1	22.8	23.1	17.4	17.2	17.4	17.0	4.7	4.7		96.9	**19**	MH663564.1 Orcinus orca.pro
20	19.3	19.6	19.6	20.3	19.6	19.8	20.1	20.6	27.0	19.8	19.3	18.4	15.7	15.1	14.3	14.2	3.7	4.1	3.1		**20**	XM_022599650.2 Delphinapterus leucas.pr
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**		

Figura 18. Distancia entre aminoácidos entre las secuencias obtenidas y las secuencias con más identidad de la distancia en el software BLAST. Se usó el software MegAlign.

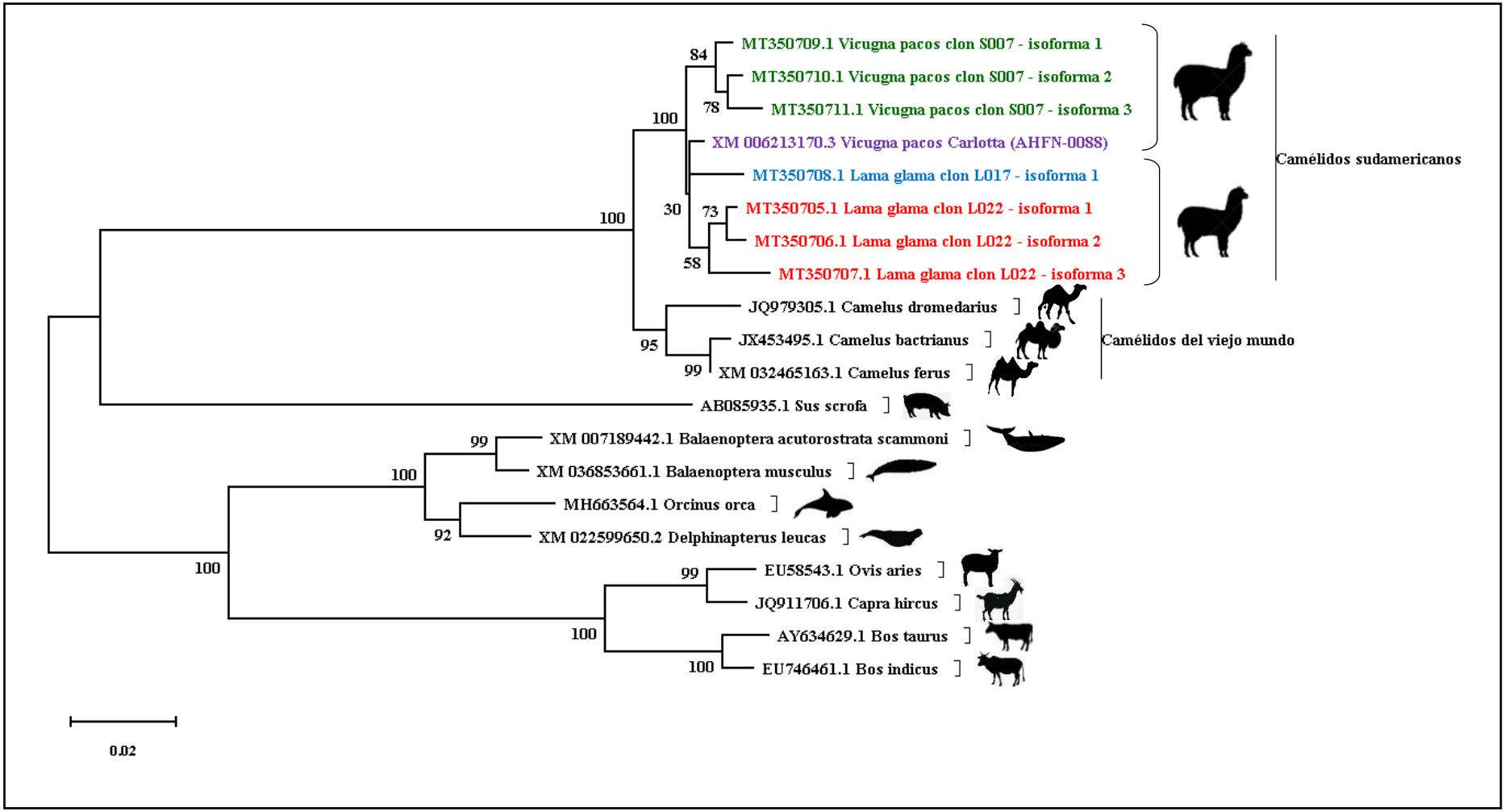


Figura 19. Árbol filogenético de la ORF TLR 2. El dendograma fue construido utilizando el método de Neighbor-Joining, las distancias fueron corregidas usando el modelo matemático de matrix JTT (Jones, Taylor y Thompson). La significancia estadística fue estimada por el análisis de Bootstrap con 1000 repeticiones, utilizando el programa MEGA 11 (https://www.megasoftware.net/).

4.6. Análisis de la estructura del TLR 2

4.6.1. LRRsearch

Para analizar la arquitectura proteínica de los clones de TLR2 se subieron las secuencias de aa a LRRresearch (http://lrrsearch.com/). Se logró hallar repeticiones ricas en leucina, denominados Motif, los cuales forman parte del dominio extracelular o ectodominio de los clones obtenidos. En la figura 20, se puede observar los LRRs de la isoforma 1 de la S007, se identificaron los "motif" (LRRs de 22 a 29 aa), el primero de ellos está compuesto por: VKSLDLSWNRI, que inicia en la posición 54 y termina en la 64 posición de un total de 785 aa. En total se han encontrado 15 motif en solo ese clon.

Length: 785 AA, **Molecular Weight:** 86.35 kDa

Name	Sequence	Score	Start	End
LRR-HCS 1	VKSLDLSNNRI	20.31	54	64
LRR-HCS 2	LKALRLASNGV	13.81	78	88
LRR-HCS 3	LEHLDLSYNRL	23.24	102	112
LRR-HCS 4	LKFLNVLGNPY	8.38	126	136
LRR-HCS 5	LRILKVGNSNP	5.88	151	161
LRR-HCS 6	LEELEIDASNL	10.3	176	186
LRR-HCS 7	VRHLELRDTDL	11.69	224	234
LRR-HCS 8	LEYLDLSENLM	17.32	362	372
LRR-HCS 9	LQTLILRQNHL	18.94	389	399
LRR-HCS 10	LTHLDISKNNF	19.46	415	425
LRR-HCS 11	MKYLNLSSTRI	14.31	438	448
LRR-HCS 12	LEILDISNNNL	20.09	459	469
LRR-HCS 13	LKELYISRNKL	17.88	479	489
LRR-HCS 14	LLVMRISRNTI	8.87	501	511
LRR-HCS 15	LKTLEAGGNSF	11.53	525	535

Sequence:

MPPSLWTVWVLAAAISLSKEGALDQAHSLSCDPTGVCDGRARSLNVIPPGLTAAVKSLDLSNNR
ITYVGNNDLQRCVGLKALRLASNGVHTIEEDSFFPLRSLEHLDLSYNRLSNLSASWFRTLSALK
FLNVLGNPYKTLGEMSLFSHLPNLRILKVGNSNPFSKIQEKDFSGLTFLEELEIDASNLQRY
EPKSLKSIQNITHLILHMRQPVSLLEILGDLLSSVRHLELRDTDLNTFSISEIVVDETNTWINK
LTFRNVKITDESFSELVKLLNYISGMLEVEFDGCTLNGLGKFRTPVLGTVKYLGNVETLTVRKL
TIPNFFLFYDLSSIYSLTGKVKRIIIENSKVFLVPCLLSQHLKSLEYLDLSENLMSEEYLENSA
CEHAWPFLQTLILRQNHLKSLEKTGEVLLTLKNLTHLDISKNNFDSMPENCQWPEKMKYLNLS
STRIHSLTYCIPLTLEILDISNNNLNSFSLILPQLKELYISRNKLKTLPDASSLPTLLVMRIS
RNTISTFSKEQLASFQKLKTLEAGGNSFICSCDFLSFTQGQRALAQVLIDWPENYLCDSPSHV
RGRRVQDVRLSLAECHRAAVVSAACCTLFLLLLVTGVLCHHFHGVWYMKMMWAWLQAKRKPKKA
PRGDLCYDAFVSYSEQDSYWVENLMVQELEHFNPPFRLCLHKRDFIPGKWIIDNIIDCIEKSCK
TIFVLSENFVKSEWCKYELDFSHFRLFDESDDTAILILLEPIERKAIPQRFCKLRKIMNTKTYL
EWPADEMQREGFWLNLRAAIKS

Figura 20. Secuencias Motif halladas en la isoforma 1 de S007. Se usó el programa LRRresearch (http://lrrsearch.com/).

Por otro lado, en la FASTA de aminoácidos que se encuentran en GenBank **(Anexo 6)**, muestra que el primer motif se encuentra entre el 55 a 78, en cambio del programa del LRRsearch que inicia en la posición 54, esto demuestra que en este caso no está contando a la metionina y por ello se adelante una posición.

En total se obtuvieron los siguientes motif predictivos: 15 motif en las isoformas 1, 2 y 3 de S007, 14 en la única isoforma 1 de L017, así como 16 en las isoformas 1 y 2 de L022, y 15 en la isoforma 3 de L022.

4.6.2. SMART

Las secuencias aminoacídicas de los clones obtenidos fueron subidas al software online de Simple Modular Arquitecture Research Tool :SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) donde se puede identificar los LRR en forma esquematizada, donde nos permitió visualizar a cada clon en sus tres dominios: ectodominio, transmembrana, e intracelular o TIR. A su vez en este software nos permitió saber las posiciones de aa que corresponde a cada dominio, así como su subdivisión del ectodominio en péptido señal, LRR_NT y LRR_CT (Figura 21). También se puede visualizar todos los dominios de TLR2 de los 7 clones en el **Anexo 8.**

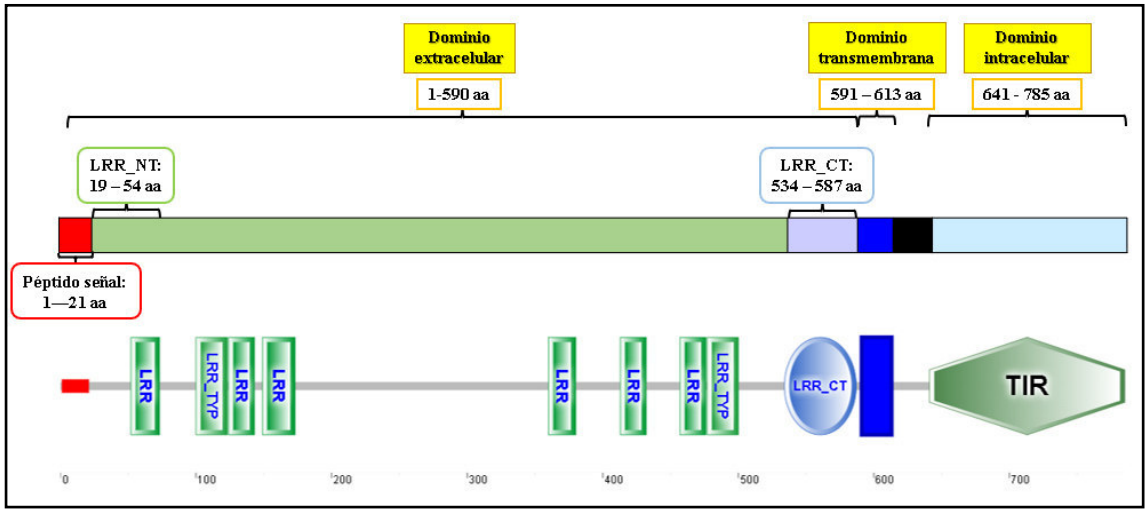


Figura 21. Representación diagramática de los dominios de la isoforma 1 del clon de alpaca S007 conformado por 785 aa. A nivel del ectodominio se encuentran los LRRs. Los dominios fueron predichos usando el programa SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/).

4.6.3. SWISS-MODEL

Para una representación gráfica en 3D se usó el software en línea SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/). En la figura 22, donde se observa la estructura 3D basado en las posiciones de los LRRs de la isoforma 1 del clon de alpaca S007, se obtuvo 3 LRRs que se encuentran en señalados a su región aproximada de 785 aa.

En la misma figura se observa una pequeña leyenda que muestra las subsecciones de los dominios, además de a transmembrana (posición de 590 a 613), y TIR (posición 644 a 783), estos dos últimos no se esquematizaron sino exclusivamente los LRRs del ectodominio.

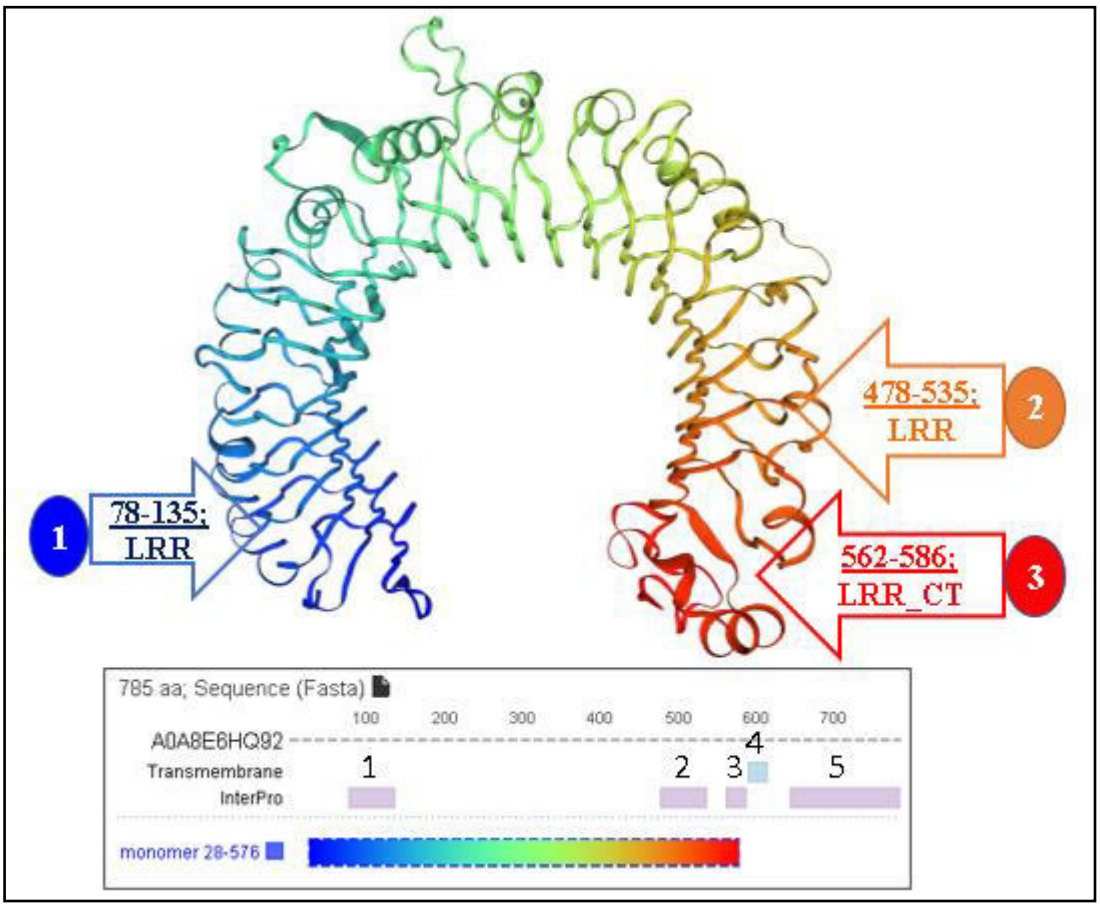


Figura 22. Arquitectura del ectodominio predictivo en 3D de la isoforma 1 del clon de la alpaca S007. En el cuadro inferior grafica las secciones: 3 posiciones de LRRs (1, 2 y 3) del ectodominio, dominio transmembrana (4), y TIR (5). Se trabajó con el programa SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/).

V. DISCUSIÓN

El estudio dio excelentes resultados en el diseño y estandarización de una metodología para la caracterización molecular de la ORF completa del gen *TLR2* en alpacas y llamas. Esto se debe a que nos guiamos de estudios exitosos en la amplificación y secuenciamiento del gen *TLR2* realizados en diferentes especies animales como el *Datong Yak* (Shuai *et al*, 2020), en *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus* (Dahiya *et al*, 2013), en *Bos indicus* y de un cruce *Bos indicus* x *Bos taurus* (Shivakumara *et* al, 2018), en el ganado vacuno criollo como el Pahari de la India (Subhash *et al*, 2018), en caninos (Ishii *et al*, 2016) y en aves como el pollo oscuro chino (Pal *et al*, 2019). En el caso de estudios en humanos, Mustafa y colaboradores en el año 2021, usaron el amplificado y clonaje de sus productos de PCR para la caracterización molecular y estructural del gen que codifica al TLR6 de humanos y de especies relacionadas, teniendo como objetivo comparar todos estos TLRs para determinar sus SNPs predictivos. Otros estudios importantes que tomamos en cuenta para nuestro trabajo y están centrados en camélidos del viejo mundo, fueron los de Suthar (2019) y Premraj (2002) donde caracterizan los genes que sintetizan al TLR1 e IFN – β, respectivamente, realizando la clonación y el secuenciamiento de los productos de PCR, usando el vector pGEM – T Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y el secuenciamiento por el método Sanger.

Nuestro trabajo sigue la misma metodología antes mencionada, y esto difiere de otros estudios realizados en el país en CSD como el realizado por Montes y colaboradores el 2011, que utilizaron los oligonucleótidos descritos para la caracterización de TLRs en bovinos, y que no lograron amplificar todo el gen ya que solo se obtuvo un pequeño fragmento de este gen (118 pb de TIR y 539 pb del ectodominio) de un animal del total: 154 animales, entre 144 animales sanos y 10 enfermos, a su vez las tres SNPs que hallaron no mostraron asociación estadística entre ambos grupos. Otro estudio en CSD, como el de Guzmán y colaboradores el año 2017, tomaron como referencia las secuencias de TLR4 de bovino y porcino publicadas en el GenBank, donde solo consiguieron amplificar dos amplicones de 345 y 621pb del gen que codifica al TLR4 en muestras de varios órganos de 57 crías con patrón neumónico, no pudiendo detectar ningún SNP que relaciones con los procesos neumónicos. En contraste con nuestro estudio, nosotros pusimos mucho detalle en el diseño de nuestros oligonucleótidos utilizando Fastas de secuencias completas y parciales provenientes de camélidos del viejo mundo y especies muy relacionadas filogenéticamente a los camélidos como son los mamíferos marinos, todas las secuencias utilizadas fueron tomadas del GenBank (Cuadro 3); otro punto a resaltar, es que para mejorar el secuenciamiento y obtener las diversas isoformas del TLR2 amplificadas de una misma muestra animal, los productos de PCR fueron sometidos a clonación, debido a esta metodología conseguimos 7 secuencias completas de la ORF del gen *TLR2* provenientes de una alpacas y dos llamas, al comparar estos resultados con los otros trabajos realizados en el país, podemos denotar el gran avance obtenido, nuestras secuencias permitirán en estudios posteriores realizar análisis más amplios y detallados sobre la función y estructura del TLR2, así como la asociación de sus SNPs con la resistencia o susceptibilidad a diversas enfermedades en estas especies animales.

Otro punto importante en la metodología que nos dio la posibilidad de obtener diversas isoformas del TLR2 de un mismo animal se debe a trabajar con ARNm y no con ADN extraído de CMSP; aquí se puede generar una discusión debido a que algunos estudios con el objetivo de identificar polimorfismos en ganado bovino con tuberculosis (Zhao *et al*., 2017), ganado caprino con mastitis (Ruiz *et al.,* 2017) e incluso con la caracterización molecular del TLR2 en ganado enano de la India (Satheesha1 *et al.,* 2021) y en yaks (Shiui *et al.,* 2020) han trabajado con ADN genómico. Pero esta aparente problemática de trabajar con ARN o ADN, en realidad no lo es, porque va a depender de la finalidad del estudio, es por ello, que uno extrae ADN para identificar variantes alélicas predominantes de una especie con una condición dada (ex. enfermedad, síndrome o resistencia ante un enfermedad), en cambio cuando se trabaja con ARNm es para poder obtener los diferentes niveles de expresión e isoformas de un gen de interés en momentos y condiciones establecidos (Luque, 1999; Sandoval *et al.,* 2013; Juárez, 2017).

Esto lo corrobora Hrdlickova y colaboradores (2016), mencionando que trabajar con ARN, nos permite detallar un análisis más amplio de la expresión genética, incluyendo la detección de isoforma predictivas o variantes, así como el desarrollo de perfiles digitales (del inglés *fingerprints*) de dicha expresión. Debido a esto los diferentes estudios con el objetivo de caracterizar los diferentes TLRs en animales como caninos (Ishii *et al.,* 2016), bovinos (Shivakumara *et al.,* 2018), aves (Pal *et al.*, 2019) y Camélidos (Dahiya *et al.,* 2013) se dan en su gran mayoría usado ARN genómico como muestra matriz. Por otra parte, ya en los proyectos de caracterización de genomas completos en diferentes especies de animales se usa el secuenciamiento de ARNm en su mayoría, un ejemplo de esto es el trabajo publicado por Richardson y colaboradores (2019) que trabajó con muestras de ARN extraídas de la alpaca Carlotta con el fin de completar la caracterización del genoma de este animal por NGS y poder conseguir el 100% del genoma para su anotación genómica a nivel cromosomal, teniendo como resultado el genoma VicPac3.1 (genoma completado en un 95%).

En el presente estudio no conseguimos caracterizar las 10 muestras trabajadas provenientes de alpacas (5) y llamas (5), y esto se debe posiblemente a fallas en la conservación de las muestras durante el transporte desde IVITA Marangani en Cusco hasta el Laboratorio de Inmunología en la facultad de Medicina Veterinaria en Lima. Otra posible razón, podría deberse al tiempo que se dejó en congelación las muestras hasta el momento de su procesamiento para la extracción del ARN (fue un tiempo de casi dos meses debido a la pandemia). Esto se comprobó cuando evaluamos la calidad del ARN extraído de las 10 muestras, los resultados confirmaron que solo 3 muestras presentaban una excelente calidad de ácido nucleico (Cuadro 5), coincidentemente fueron las tres muestras que conseguimos caracterizar. Este sistema de evaluación de calidad de ácido ribonucleico se evidencia en la degradación de ARN expresado en una mayor cantidad de ARN de fragmentos pequeños, según Tourrière y colaboradores (2002), menciona que durante la regulación de ARN existe una degradación debido a exonucleasas, quienes coordinan la de adenilación de los ARNm de las células eucariotas y es normal la presencia de esta degradación en la muestra, pero según Mewis y colaboradores (2014), el aumento de esta degradación en una muestra de ácido ribonucleico extraído se debe principalmente a las ARNasas endógenas que degradan lentamente material genético obtenido favoreciendo la contaminación de productos proteicos y ADN en la muestra. Este tipo de degradación del material extraído depende mucho de método del extracción, el tipo de muestra biológica y el tiempo en que es procesada la muestra es por este motivo que se realiza el análisis de calidad y cuantificación del ARN, para obtener concentraciones optimas de ácido nucleico de buena calidad para estandarizar los diversos protocolos que se diseñan para medir una correcta expresión genotípica.

La ORF completa del gen que codifica al TLR2 de los CSDs que caracterizamos tienen un tamaño de 2358 pares de bases de nucleótidos (pb), que se traducen en 785 aminoácidos (aa). El codón de inicio es una metionina (ATG) en la posición 1-3 y el codón de stop (TAG) en la posición 2356-2358. Debemos tener en cuenta que el tamaño de esta ORF varia asociado a la especie animal, así podemos describir que en *Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*, la ORF del TLR2 tienen un tamaño de 1857 pb (618 aa) y 2358 pb (785 aa), respectivamente (Dahiya *et al*., 2013). En el caso de especies animales genéticamente más distantes a los CSD como el *Datong yak* muestran un tamaño de 2355 pb (784 aa) (Shuai *et al*., 2020).

El secuenciamiento de los diversos clones de la ORF completa del TLR2, nos permitió identificar la presencia de diversas isoformas tanto en alpacas y llamas. Específicamente describimos 3 isoformas del clon de una alpaca (código S007) de la raza Suri, 1 isoforma de una llama (código L017) de la raza Chaccu y 3 isoformas de una llama (código L022) de la raza Q'ara. Estos resultados confirmarían nuestra hipótesis, la cual plantea que, diseñando, mejorando y estandarizando una buena metodología para la caracterización del TLR2 en CSD se podría obtener al menos la caracterización completa de una isoforma de TLR2 en estas especies animales. Cabe especificar que nuestra metodología englobó al material genético a usar (ARN genómico), a un buen diseño de oligonucleótidos, a metodologías de apoyo como la clonación de los productos y al secuenciamiento clásico. Debido a las características del TLR2, al expresarse con una gran variedad de isoformas para cumplir su función como receptor proteico de forma homodímera (TLR2/2) y heterodímera (TLR2/1 y TLR2/6), para así desempeñarse como un receptor de reconocimiento de la respuesta inmune innata con un gran repertorio reconociendo una gran variedad de PAMPs de bacterias, virus y hongos (Jin *et al*., 2007; Kang *et al*., 2009; Kaur *et al*., 2020), fue por estos motivos que el TLR2 fue el primer PRR seleccionado para dar inicio al estudio de la caracterización molecular de todos receptores tipo-Toll en CSD, este estudio forma parte de este gran proyecto.

Las secuencias completas de las 7 isoformas obtenidas permitieron analizarlas demostrando que, entre ellas a pesar de ser filogenéticamente muy relacionadas, presentan una gran diversidad genética evidenciándose con la presencia de una regular cantidad de mismatches entre los clones esta información esta detalla en los cuadros 7, 8 y 9. Estudios semejantes al nuestro pero donde describen perfiles de expresiones parciales del gen *TLR2* en ganado Malnad Gidda concluyen que este TLR en esta especie es altamente polimórfico, debido al hallazgo de 2 mutaciones no sinónimas (Satheesha *et al*., 2021). En contraste con nuestro resultados, nosotros evidenciamos que hay una alta cantidad de mutaciones no sinónimas predictivas en las isoformas reportadas, resaltando que en las 3 isoformas del TLR2 de la llama L022 fue la que presento un mayor cantidad de mutaciones no sinónimas; pero este no es el único tipo de mutaciones que encontramos ya que reportamos mutaciones sinónimas en una cantidad moderada.

Sharp *et al* de 2022, infiere el rol esencial de las mutaciones sinónimas, que aunque no cambien el aminoácido formado, podrían ocasionar mínimos efectos pero importantes en la aptitud y función celular; este artículo, juntamente con el experimento de Shen *et al* del mismo año, sugieren mediante la exploración de cambios sinónimos en la *levadura Saccharomyces cerevisiae*, donde concluyen que las mutaciones sinónimas fueron un poco menos perjudiciales en comparación a las no sinónimas, debido a que ambas lentificaban su expresión como población mutante a través del tiempo, es decir, ambas mutaciones presentan similar posibilidad de influir en el nivel de expresión de un gen.

El cálculo de la distancia filogenética de las isoformas de los TLR2 en alpacas y llamas fue determinado mediante un alineamiento múltiple basado en Fastas de secuencias de dicho gen, compuesta por nuestras secuencias, las secuencias de camélidos del viejo mundo, así como de rumiantes y cetáceos de esta manera se pudo calcular utilizando el software MEGAX, el porcentaje de identidad y similaridad de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Nuestras secuencias presentaron un relaciona filogenética muy próxima a las secuencias de TLR-2 depositadas en el GenBank de la alpaca Carlotta (XM_006213170.3), *Camelus ferus* (XM_032465163.1), *Camelus bactrianus* (JX453495.1), *Camelus dromedarius* (JQ979305.1), presentando 98%, 96.1%, 95.7% y 91.3% de similaridad de aminoácidos, respectivamente. Al comparar nuestros resultados con el estudio de Dahiya el año 2013, que tuvo como objetivo el análisis de la secuencia del gen *TLR2* en camélidos del viejo mundo, reporta que el *C. bactrianus* y el *C. dromedarius* obtuvieron un 85.7% y 66.8% de similaridad con la especie Sus scrofa, de manera respectiva. En nuestro estudio las alpacas y llamas mostraron un 81.5 – 82.2% de similitud con la especie *Sus scrofa*, lo cual presenta una cercanía evolutiva mayor en comparación del *C. dromedarius* y menor que el *C. bactrianus*; cabe resaltar que este porcentaje mencionado es aún mayor cuando comparamos con los rumiantes, detallados puntos en el cuadro 9 y figura 18. Por otro lado, tomando en referencia el programa BLAST, mostró que los mamíferos marinos tenían una cercana evolutiva lo cual se confirma mediante el porcentaje de similitud y también a nivel del árbol filogenético, incluso dejando atrás al porcino y rumiantes más conocidos. Xu y colaboradores el año 2019, sugiere que hay evidencia de selección positiva en TLR2 en cetáceos, un tipo de selección natural que mantiene una frecuencia genética en una población, al observar cambios en los aminoácidos y de radicales largos localizados en los LRRs, esto se debe al reconocimiento de diferentes PAMPs a través de la habilidad homo y heterodímero del TLR2; similar acontecimiento sucede al identificar la actividad funcional en TLR4, Shen *et al* del 2012, que resalta la historia evolutiva de la diversidad de cetáceos y de la adaptación acuática a partir de sus ancestros terrestres. Adicionalmente, Fagundes del 2014 y Medrano del 2009, sostiene que las subórdenes Tylopoda (camélidos) y Cetacea (delfines, ballenas, orcas) pertenecen a la orden Cetartiodactyla, en otras palabras, provienen del mismo clado.

La filogenia descrita en la figura 19, describe las distancias filogenéticas que corresponde entre las especies, por ejemplo, se observa de izquierda a derecha dos grandes grupos (clados), la primera que está compuesto en tres subgrupos: especies de CSD (*Vicugna pacos* y *Lama glama*), camélidos del viejo mundo (*C. ferus*, *C. dromedarius* y *C. bactrianus*) y los porcinos "*Sus scrofa*" ; el segundo grupo el cual está conformado por mamíferos marinos, quienes se encuentran más próximos al primer grupo y de manera lejana, los rumiantes. Un punto relevante en el subgrupo de las especies CSD, nos muestra que se ramifica en dos grupos: el primer clado de las 3 isoformas de la alpaca Suri de código S007, y el segundo clado dado por la alpaca Huacaya Carlotta junto a las llamas de las razas Chaccu de código L017 y Q'ara de códigoL022; esto quiere decir que en vez que la alpaca Carlotta se presente más cercano a la alpaca Suri, al parecer, está más cercana a las llamas Chaccu y Q'ara, uno de los varios factores que podrán influir en ello es el factor medioambiental de ambos grupos, observando que nuestros animales de estudios como S007, L017 y L022 provienen de la Sierra de Perú a unos 4000 msnm., y la alpaca Carlotta viene de un recinto de Norteamérica, EE. UU., a unos 490 msnm. con climas y un tipo de manejo completamente distintos. Esto podría deberse a los factores ambientales que subyacen en cada animal , ya sea del territorio de donde viene, la progenie, el clima, el manejo, la alimentación, todo ello nos extrapolaría que para que un gen se exprese y se presente como característica genotípica depende de diversos factores, y más aún si se pretende en un futuro obtener una característica fenotípica como tal.

La identificación de polimorfismos de un solo nucleótidos implicada en la función o estructura del TLR2 revelan un papel esencial en la resistencia o susceptibilidad contra agentes patógenos, mediante una asociación. Esto se evidencia en enfoques de investigación de relación o asociación de polimorfismo de TLR2 con enfermedades como la tuberculosis bovina, brucelosis bovina, paratuberculosis bovina, mastitis subclínica caprina, por Zhao *et al* del 2017, Yapan *et al* del 2014, Koets *et* al del 2010 y Ruiz *et al* del 2017, respectivamente.

Las mutaciones sinónimas y no sinónimas predictivas, en mayor proporción, se encuentran en el dominio extracelular o también denominado "ectodominio", específicamente en las zonas repetidas ricas de leucina, los LRRs, compuesto por motif que contiene 24–29 residuos de aminoácidos que contienen una región central altamente conservada **(L XX L X L XX (N/L) X L XX L XX L)**, en nuestras 7 secuencias se encontraron alrededor de 15 motif en cada una de ellas. El primer motif fue **VKSLPLSNNPRI**, observando que en LRRsearch y SMART son variables ya que en el primero no considera al primer codón de inicio. En la ORF de *C. dromedarius* y *C. bactrianus* presentaron un motif de amidación (posición 576 de aa), en el caso de *C. bactrianus* se nota otro motif denominado RGD, es decir de fijación celular, y en el *C. dromedarius* hay un motif de unión a membrana lipídica de procariotas.

Cada motif podría estar implicado en una específica señalización para actividad funcional en la respuesta inmune innata, además dependerá cuantas motif presenta cada especie a su vez, frente a que patógeno se esté enfrentando para que se exprese ese gen, se espera una mayor investigaciones tomando como base estos datos en camélidos del nuevo y viejo mundo.

Nuestras secuencias de los clones obtenidos fueron depositadas al GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), y meses posteriores la plataforma UnitProt (https://www.uniprot.org/) las recogió y confirmó su veracidad anexando nuestras secuencias a su base de datos purado, estas secuencias se encuentran de libre acceso con las últimas actualizaciones respecto a temas de secuencias de proteínas a nivel mundial (Cuadro 6).

Nuestro trabajo permite seguir una metodología para el estudio de los TLRs en camélidos sudamericanos, el proyecto mayor de la cual es parte este estudio tiene como meta caracterizar los 10 TLRs presentes en CSD para un posterior investigación en la identificación, detección y caracterización de los SNPs, este estudio es el primer paso para conseguir dicha meta.

VI. CONCLUSIONES

- Las 7 secuencias obtenidas de TLR2 detectadas en este estudio determinaron la presencia de como mínimo una isoforma predictiva de la ORF completa del gen que codifica al TLR2 en alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) en sus razas Suri, y Q'ara y Chaccu, respectivamente. Las secuencias obtenidas forman clados que agrupan y separan las isoformas de alpacas y llamas en el dendograma, pero todas las isoformas presentan una estrecha relación filogenética demostrado en un alto porcentaje de identidad de nucleótidos y un alto porcentaje de similaridad de aminoácidos entre estas dos especies de camélidos sudamericanos.

- Existe una diversidad genética con alto porcentaje de similaridad de las isoformas de TLR2 de alpacas y llamas cuando son comparados con los camélidos del viejo mundo tales como *Camelus dromedarius, Camelus bactrianus* y *Camelus ferus* con un rango de similaridad de 91.3 a 92.1%, 95.7 a 96.4 % y 96.1 a 96.7 %.

- Debido a los resultados obtenidos concluimos que los protocolos diseñados y estandarizados en este estudio, nos permite detectar y caracterizar molecularmente como mínimo una isoforma de la ORF completa del gen que codifica al TLR2 en alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*).

VII. RECOMENDACIONES

Se espera que la metodología desarrollada en este estudio pueda ser replicada en animales enfermos, con el fin de poder identificar polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en el TLR2, para diferenciar genéticamente a los animales resistentes y susceptibles a infecciones en campo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ***Abbas, A. K. 2015.*** Capítulo 4 – Inmunidad innata. Inmunología Celular y Molecular 8º Ed, Elsevier Castellano, Paginas 58-63.
2. ***Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. 2001.*** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2, 675–680.
3. ***Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006.*** Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124,783–801.
4. ***Alendez, E. 2021.*** Algunas características de la fibra de llama Ch´acu (*Lama glama*) sin descerdar y descerdado, Kishuara-Andahuaylas. Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurímac Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia.
5. ***Astakhova N. M., Perelygin, A. A., Zharkikh, A. A., Lear, T. L., Coleman, S. J., MacLeod, J. N., & Brinton, M. A. 2009.*** Characterization of equine and other vertebrate TLR3, TLR7, and TLR8 genes. Immunogenetics, 61(7), 529–539. doi:10.1007/s00251-009-0381-z
6. ***Bustinza AV., Machaca V., Cano V., and Quispe J. 2021.*** Evolución y desarrollo de las razas de Alpaca: Suri y Huacaya. Rev Inv Vet Perú 2021; 32(5): e19876 http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19876.
7. ***Caso I., Municipio D. E. U. N. 2020.*** Attributes of south american camelid producers and their relationship with the adoption of innovations. Case of a bolivian municipality. 118–127.
8. ***Chandler, C. E., Harberts, E. M., & Ernst, R. K. 2019.*** Pathogen sensing: Toll-like receptors and nods (innate immunity). In Encyclopedia of Microbiology. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90775-1.
9. ***Chang, J.H., McCluskey, P.J., Wakefield, D. 2006.*** Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. Br.J. Ophthalmol. 90,103–108.
10. ***Chang, J.S., Russell, G.C., Jann, O., Glass, E.J., Werling, D., Haig, D.M. 2009.*** Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 127, 94-105.
11. ***Choque, A. V. B., Machaca, V. M., & Fuentes, V. C. 2021.*** Evolución y desarrollo de las razas de Alpaca: Suri y Huacaya Evolution and development of the alpaca breeds: Suri and Huacaya. 32(5), 1–17.
12. ***Dahiya, S. S., Nagarajan, G., Bharti, V. K., Swami, S. K., Mehta, S. C., Tuteja, F. C., Narnaware, S. D., & Patil, N. V. 2014.*** Sequence analysis of the Toll-like receptor 2 gene of old-world camels. Journal of Advanced Research, 5(6), 695–704. https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.09.001.

13. ***Diaz - Lameiro, A. M. 2016.*** Evolutionary origins and domestication of South American camelids, the alpaca (*Vicugna pacos*) and the llama (*Lama glama*) explained through molecular DNA methods. 92. [Internet] [12 abril 2019]. Disponible en: https://www.proquest.com/openview/1dbb8da49ae8032c05f39fb4b878b667/1.pdf?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y
14. ***Dionisio Córdova, J. C. 2012.*** Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). 61p.
15. ***Dong Seon Kim, Yoonsoo Hahn. 2011.*** Identification of human-specific transcript variants induced by DNA insertions in the human genome. Bioinformatics, Volume 27, Issue 1, 1 January 2011, Pages 14–21, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq612
16. ***Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. 2022.*** Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. 13(March), 1–22. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774.
17. ***Elfeil, W.K., Abouelmaatti, R.R., Talat, S. et al. 2021.*** Molecular characterization of Toll-like receptor type-3 in mallard duck and its response to Newcastle disease virus infection. Environ Sci Pollut Res 28, 55786–55795 (2021). https://doi.org/10.1007/s11356-021-14759-9.
18. ***FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015.*** Situación Actual de los Camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región Andina TCP/RLA/2914. [Internet] [12 abril 2019]. Disponible en: http://www.fao.org/regional/Lamerica/prior/segalim/animal/paises/pdf/2914per.pdf.
19. ***Fagundes De Ávila, Felipe. 2014.*** Mapeo Comparativo del Genoma de Alpaca. Tesis doctoral: Universidad de Texas A&M. URL: http://hdl.handle.net/1969.1/153632.
20. ***Farhat, K., Riekenberg, S., Jung, G., Wiesmüller, K.H., Jungi, T.W., Ulmer, A.J. 2010.*** Identification of full length bovine TLR1 and functional characterization of lipopeptide recognition by bovine TLR2/1 heterodimer. Vet. Res. 41,34.
21. ***Felsenstein J. 1985.*** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
22. ***Franco, M., Peso, D., García, W., & Franco, F. 2009.*** Manual de juzgamiento de alpacas y llamas. Soluciones Prácticas, 1–72. http://www.solucionespracticas.org.pe/manual-de-juzgamiento-de-alpacas-y-llamas.
23. ***Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. 2017.*** Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. 8(July). https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508.

24. ***Grillo, G., et al. 2010.*** UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res. Jan 2010; 38(Database issue): D75–D80.
25. ***Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. 2016. RNA***-Seq methods for transcriptome analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 8(1), e1364. https://doi.org/10.1002/wrna.1364.
26. ***Hu, W., & Spaink, H. P. 2022.*** The Role of TLR2 in Infectious Diseases Caused by Mycobacteria: From Cell Biology to Therapeutic Target.
27. ***INTECSA. 1993.*** Uso y manejo del agua en bofedales - Potenciación de camélidos.
28. ***InvivoGen. 2018.*** Review - TLR2 - InvivoGen. 33(0), 16–17. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw043.16.
29. ***Ishengoma, E., Agaba, M. 2017.*** Evolution of toll-like receptors in the context of terrestrial ungulates and cetaceans diversification. BMC Evol Biol 17, 54. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0901-7
30. ***Ishii, M., Hashimoto, M., Oguma, K., Kano, R., Moritomo, T., & Hasegawa, A. 2006.*** Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2). Veterinary Immunology and Immunopathology, 110(1-2), 87–95. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.09.007.
31. ***Iwasaki, A., Medzhitov, R. 2010.*** Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327 (5963), 291–295.
32. ***Jann, O.C., Werling, D., Chang, J.S., Haig, D., Glass, E.J. 2008.*** Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. BMC Evol. Biol. 8, 288.
33. ***Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S.-G., … Lee, J.-O. 2007.*** Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. Cell, 130(6), 1071–1082. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008.
34. ***Johnson, W. e. 2014.*** Camelid Genetics and Reproductive Biotechnologies. Journal of Heredity, 105(6):931–932.
35. ***Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. 1992.*** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences 8: 275-282.
36. ***Juárez - Méndez S. 2017.*** Identificación de isoformas de RNA mensajero en tumores de ovario. 1era Ed. Madrid: Editorial Academica española. 112 p.
37. ***Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S.-J., Ryu, Y. H., Mah, S., … Lee, J.-O. 2009.*** Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. Immunity, 31(6), 873–884. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.018.

38. ***Kaur, A., Kaushik, D., Piplani, S., Mehta, S. K., Petrovsky, N., & Salunke, D. B. 2020.*** TLR2 Agonistic Small Molecules: Detailed Structure–Activity Relationship, Applications, and Future Prospects. Journal of Medicinal Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01627.

39. ***Keestra, A.M., DeZoete, M.R., VanAubel, R.A., VanPutten, J.P. 2008.*** Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. Mol.Immunol.45, 1298–1307.

40. ***Kobe B., Kajava AV. 2001***. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Department of Biochemistry and Molecular Biology/Institute for Molecular Bioscience: Australia. Elsevier Science Ltd. 2001, 11:725–732.

41. ***Koets, A., Santema, W., Mertens, H., Oostenrijk, D., Keestra, M., Overdijk, M., Rutten, V. 2010.*** Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Preventive Veterinary Medicine, 93(4), 305–315. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.008.

42. ***Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018.*** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.

43. ***Lee IT, Lee CW, Tung WH, Wang SW, Lin CC, Shu JC, Yang CM. 2010.*** Cooperación de TLR2 con MyD88, PI3K y Rac1 en respuestas inflamatorias de las vías respiratorias dependientes de cPLA2/COX-2 inducidas por ácido lipoteicoico. Soy J Pathol; 176 (4): 1671-84. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090714.

44. ***Luque González, CM. 1999.*** Caracterización de isoformas de la proteína 4.1: identificación de dominios responsables de su localización subcelular. Tesis doctoral inédita leída en la Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular. URI: http://hdl.handle.net/10486/672098.

45. ***Martin, C., Pinto, C and Cid, M. 2010.*** Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. Rev. Complut. Cien. Vet., 4(1), 37-50.

46. ***Matsumoto, Y., Dimitriou, I. D., Rose, J. La, Lim, M., Camilleri, S., Law, N., Adissu, H. A., Tong, J., Moran, M. F., Chruscinski, A., He, F., Asano, Y., Katsuyama, T., Sada, K., & Wada, J. 2022.*** Tankyrase represses autoinflammation through the attenuation of TLR2 signaling. 1–17.

47. ***Medrano González, Luis. 2009.*** Capítulo: La evolución de los cetáceos. Libro: Evolución biológica. Una visión actualizada desde la revista. Edición: 1. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp.539-588.

48. ***Mestanza, O. A. 2014.*** Análisis genético poblacional en llamas *Lama glama* (Linnaeus, 1758) de la región puno utilizando la región control del ADN mitocondrial. (Tesis de Pre-

Grado). Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, 1–108. http://infoalpacas.com.pe/wp-content/uploads/2015/08/pub.pdf.

49. ***Mewis, J. L., Sun, X., Zuidhof, M. J., & Guan, L. L. 2014.*** Research note: Methodology fornhigh-quality RNA extraction from poultry whole blood for further gene expression analysis. British Poultry Science, 55(2), 194-196. https://doi.org/10.1080/00071668.2014.888397
50. ***Montes A., Quilla R., Díaz M., Rodriguez J. y Agapito J. 2011.*** Evaluación del polimorfismo genético mediante PCR-SSCP en dos secuencias del gen *TLR2* en alpacas (*Vicugna pacos*) y su relación con enfermedades infecciosas. Informe Científico Tecnológico: IPEN. Pág 91-96.
51. ***Muroi M, Tanamoto K. 2012.*** Regulación negativa mediada por IRAK-1 de la señalización del receptor tipo Toll a través de la regulación negativa dependiente de proteasoma de TRAF6. Biochim Biophys Acta; 1823 (2): 255-63. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.10.003.
52. ***Mustafa Ghulam, Mahrosh Hafiza Salaha and Arif Rawaba. 2021***. Sequence and Structural Characterization of Toll-Like Receptor 6 from Human and Related Species. Department of Biochemistry, Government College University, Pakistan. Adaptive Evolution of Autoimmune Proteins in Animals. https://doi.org/10.1155/2021/5545183.
53. ***Pal, A., Pal, A., Mallick, A. I., Biswas, P., & Chatterjee, P. N. 2019.*** Molecular characterization of Bu-1 and TLR2 gene in Haringhata Black chicken. Genomics. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.03.010.
54. ***Park, N. Z., Royal, F., Zealand, N., & States, U. 2014.*** Camelid Genetics and Reproductive Biotechnologies. 105(6), 931–932. https://doi.org/10.1093/jhered/esu069
55. ***Pasare, C., Medzhitov, R. 2004.*** Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. Immunity (21), 733–741.
56. ***Pinto Jiménez, C., Martín Espada, M., & Cid Vázquez, M. 2010.*** Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y características. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 4(1), 23–36. http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1.
57. ***Premraj A., Aleyas Abi George, Nautiyal B., Rasool Thaha Jamal. 2022***. Beta interferons from the extant camelids: Unique among eutherian mammals, Developmental & Comparative Immunology, Volume 133, 2022, 104443, ISSN 0145-305X, https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104443.
58. ***Richardson, M. F., Munyard, K., Croft, L. J., Allnutt, T. R., Jackling, F., Alshanbari, F., Raudsepp, T. 2019.*** Chromosome-Level Alpaca Reference Genome VicPac3.1

Improves Genomic Insight Into the Biology of New World Camelids. Frontiers in Genetics, 10. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00586.

59. ***Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C. B., Fornells, L. A., Silva, R. C., Mendes, G. S., Dias, H. G., Sandoval, N., Pezo, D., & Santos, N. 2016.*** Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern peruvian highland. Journal of Infection in Developing Countries, 10(3), 269–274. https://doi.org/10.3855/jidc.7398

60. ***Ruiz O., Manzano C.,Iriondo M.,Garrido J. M.,† Molina E.,† Vazquez P.,† R. A. Juste ,† and Estonba A. 2011.*** Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. American Dairy Science Association. J. Dairy Sci. 94: 3635-3641.

61. ***Ruiz-Rodriguez, C. T., Brandt, J. R., Oliverio, R., Ishida, Y., Guedj, N., Garrett, E. F., Kahila Bar-Gal, G., Nikolaidis, N., Cardoso, F. C., & Roca, A. L. 2017.*** Polymorphisms of the Toll-Like Receptor 2 of Goats (Capra hircus) may be Associated with Somatic Cell Count in Milk. Animal Biotechnology, 28(2), 112–119. https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1232267 .

62. ***Saitou N. and Nei M. 1987.*** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

63. ***Sandoval Rodríguez A, & Martínez Rizo A, & de la Mora D. 2013.*** Extracción de ácidos nucleicos. Salazar Montes A, & Sandoval Rodríguez A, & Armendáriz Borunda J(Eds.), Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill. https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=102743658.

64. ***Satheesha, G. & Ramakrishnappa, Nagaraja & H M, Yathish & Sahadev, Annayappa & Raja, Jayashree & M., A. & resh, Kot & Siddaraju, Naveen. 2021.*** Molecular Characterization and Expression Profile of Partial TLR2 Gene in Malnad Gidda Cattle. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 10. 2879-2886. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.334.

65. ***Shavit, Z. B. 2017.*** Synergy in Toll-Like Receptors (TLRs). Journal of Cell Signaling, 02(04), 19–20. https://doi.org/10.4172/2576-1471.1000171

66. ***Sharp N. 2022.*** Mutations matter even if proteins stay the same. Nature. Jun; 606(7915):657-659. https://doi.org/10.1038/d41586-022-01091-6. PMID: 35676345.

67. ***Shen, T., Xu, S., Wang, X., Yu, W., Zhou, K., Yang, G. 2012.*** Adaptive evolution and functional constraint at TLR4 during the secondary aquatic adaptation and diversification of cetaceans. BMC Evol. Biol. 12 (1), 39. https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-39.

68. ***Shen, X., Song, S., Li, C. et al. 2022.*** Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. Nature 606, 725–731. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04823-w.

69. ***Schenk M., Belisle JT., Modlin RL. 2009.*** TLR2 Looks at Lipoproteins, Immunity, Volume 31, Issue 6, 2009, Pages 847-849, ISSN 1074-7613, https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.008.

70. ***Shinkai, H., Tanaka, M., Morozumi, T., Eguchi-Ogawa, T., Okumura, N., Muneta, Y., Awata, T., Uenishi, H. 2006.*** 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.

71. ***Shivakumara, P.N., Aravindakshan, T.V., Naicy, T., Anilkumar, K., Uma, R. 2018.*** Molecular characterization and differential mRNA expression profiling of Toll-like receptor-2 gene in Vechur (Bos indicus) and croosbred (Bos indicus x Bos Taurus) cattle of Kerala in response to antrax vaccination. Meta gene, vol (16), pages 15-20, https://doi.org/10.1016/j.mgene.2018.01.003.

72. ***Shuai Peng, Lang Chen, Tian-Yu Zheng, Li Zhang, Zhuo Li, Xiao-Jing Tian, Zhong-Ren Ma, and Li-Xia Liu. 2020.*** Molecular Characterization of the TLR2 Gene in Datong Yak.Indian Journal of Animal Research. (54):957-96. https://doi.org/10.18805/ijar.B-1138.

73. ***Subhash, V., Monika, S., Richa, S., Chander, S., Geetanjali, S., & Mandeep, S. 2018.*** Distribution of single nucleotide polymorphisms and protein domain architecture of toll-like receptor-2 in Pahari cattle (Indian non-descript indigenous breed). Research in Veterinary Science, 117, 144–149.

74. ***Suthar Dhirendra, Purval Mukul, Gahlotl Kritika, Deora Anupama and Maherchandani Sunil. 2019.*** Sequence analysis of Toll like receptor 1 gene of camel (*Camelus dromedarius*). Vol 26 No 1, p 41-47. https://doi.org/10.5958/2277-8934.2019.00006.7.

75. ***Suyana Fundación. 2010.*** Manual de crianza y manejo de alpacas y llamas. Programa de Fortalecimiento Integral Rural. Primera Edición. La Paz, Bolivia. 59 pág.

76. ***Takahashi, R., Radcliff, F. J., Proft, T., & Tsai, C. J. 2022.*** Pilus proteins from Streptococcus pyogenes stimulate innate immune responses through Toll-like receptor 2. 174–185. https://doi.org/10.1111/imcb.12523

77. ***Tourrière, H., Chebli, K., & Tazi, J. 2002.*** mRNA degradation machines in eukaryotic cells. Biochimie, 84(8), 821–837. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01445-1.

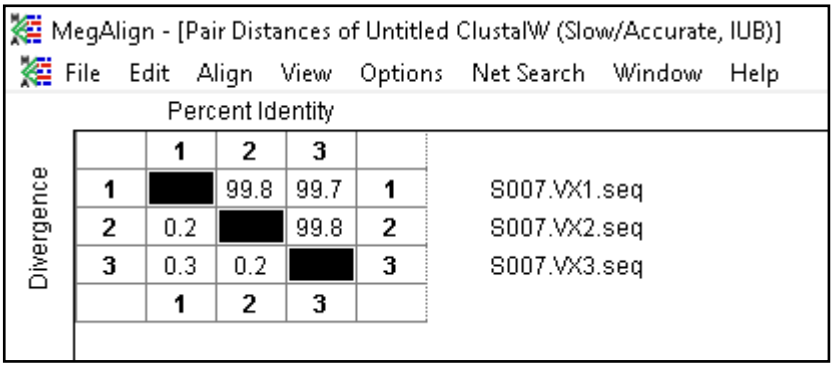
78. ***Voogdt, C. G. P., & Putten, J. P. M. 2016.*** The Evolution of the Toll-Like Receptor System. In The Evolution of the Immune System: Conservation and Diversification.

Elsevier Inc. Academic Press, Pages 311-330. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801975-7.00013-X

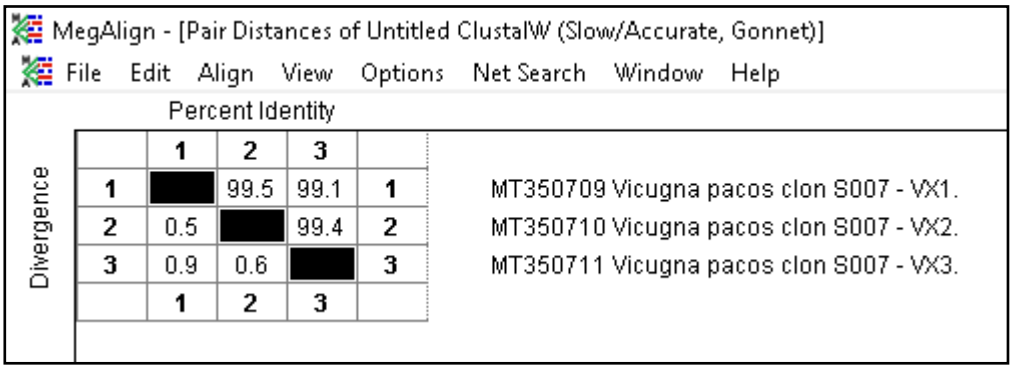
79. ***White, S.N., Taylor, K.H., Abbey, C.A., Gill, C.A., Womack, J.E. 2003.*** Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 10364–10369.
80. ***Xu, S.X., Tian, R., Lin, Y., YU, Z., Ñiu, X., Wang, X. 2019.*** Widespread positive selection on cetacean TLR extracellular domain. Molecular Immunology. 106 (1), 135-142. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.022.
81. ***Yacobaccio, H. D. 2021.*** The domestication of South American camelids: a review. Animal Frontiers, 11(3), 43–51. https://doi.org/10.1093/af/vfaa065.
82. ***Yapan, S., Liping, S., Aizhen, G. y Liguo, Y. 2014.*** Efectos de la mutación del gen Toll-like receptor 2 en la resistencia a la brucelosis bovina. Ciencias Ganaderas, 170, 30–34. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.10.014.
83. ***Zhang, L.P., Gan, Q.F., Ma, T.H., Li, H.D., Wang, X.P., Li, J.Y., Gao, X., Chen, J.B., Ren, H.Y., Xu, S.Z. 2009.*** Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCS in dairy cattle. Anim. Biotechnol. 20, 87–95.
84. ***Zhao, Z., Xue, Y., Hu, Z., Zhou, F., Ma, B., Long, T., Liu, H. 2017.*** Toll-like receptor 2 gene polymorphisms in Chinese Holstein cattle and their associations with bovine tuberculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 186, 51–54. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.02.007.

IX. ANEXOS

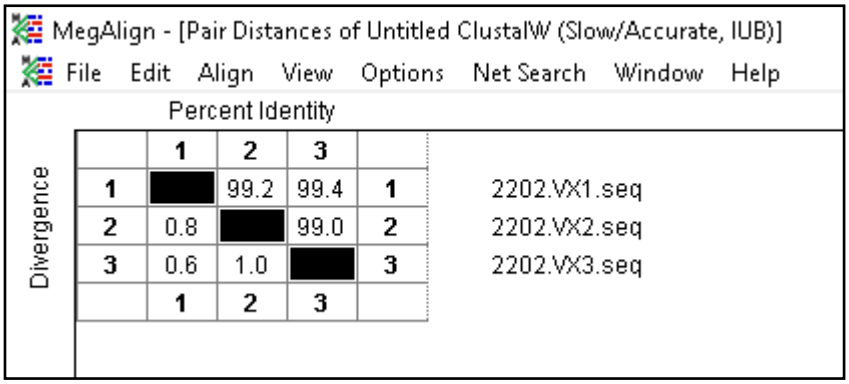
Anexo 1. Distancia entre nucleótidos entre las variantes de la alpaca Suri S007. Se usó el software MegAlign.



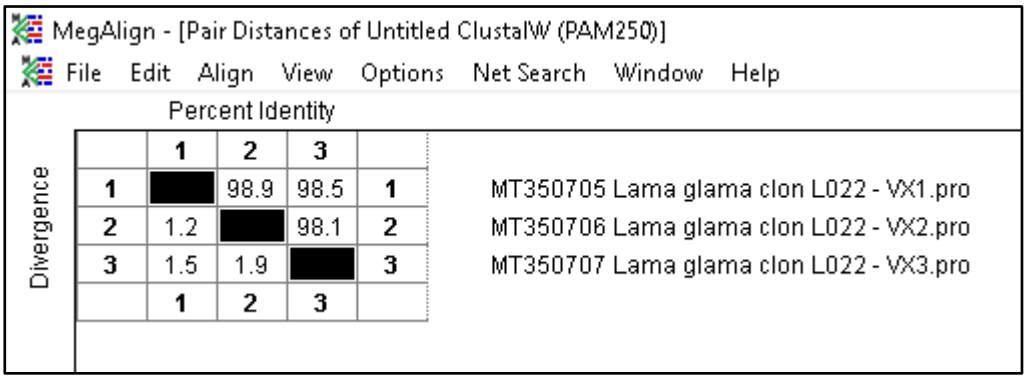
Anexo 2. Distancia entre aminoácidos entre las isoformas de la alpaca S007. Se usó el software MegAlign.



Anexo 3. Distancia entre nucleótidos entre las variantes de la llama L022. Se usó el software MegAlign.



Anexo 4. Distancia entre aminoácidos entre las variantes de la llama L022. Se usó el software MegAlign.


MegAlign - [Pair Distances of Untitled ClustalW (PAM250)]

File Edit Align View Options Net Search Window Help

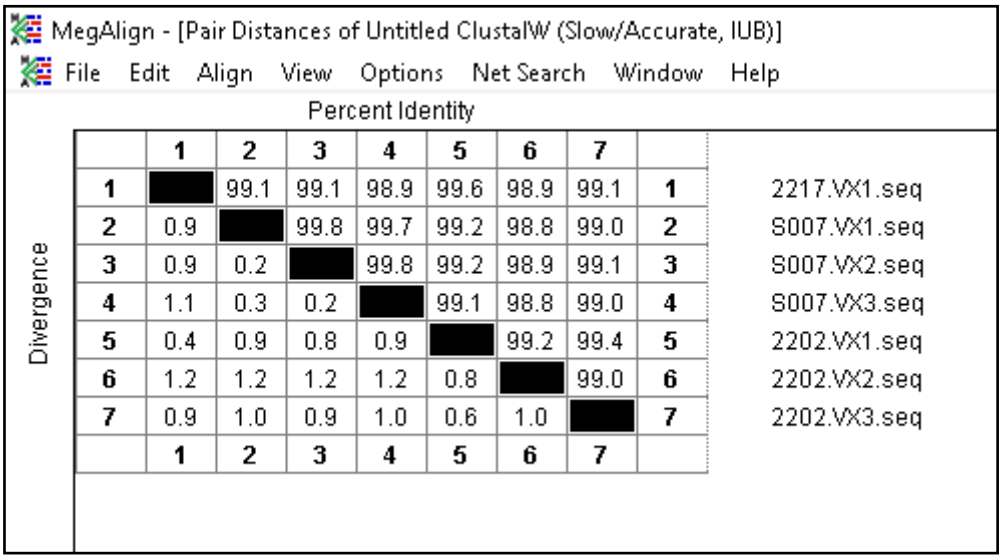
Percent Identity

Divergence

	1	2	3	
1		98.9	98.5	1
2	1.2		98.1	2
3	1.5	1.9		3
	1	2	3	

1 MT350705 Lama glama clon L022 - VX1.pro
2 MT350706 Lama glama clon L022 - VX2.pro
3 MT350707 Lama glama clon L022 - VX3.pro

Anexo 5. Distancia entre nucleótidos entre la isoforma 1 de L017 con las anteriores secuencias obtenidas. Se usó el software MegAlign.


MegAlign - [Pair Distances of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, IUB)]

File Edit Align View Options Net Search Window Help

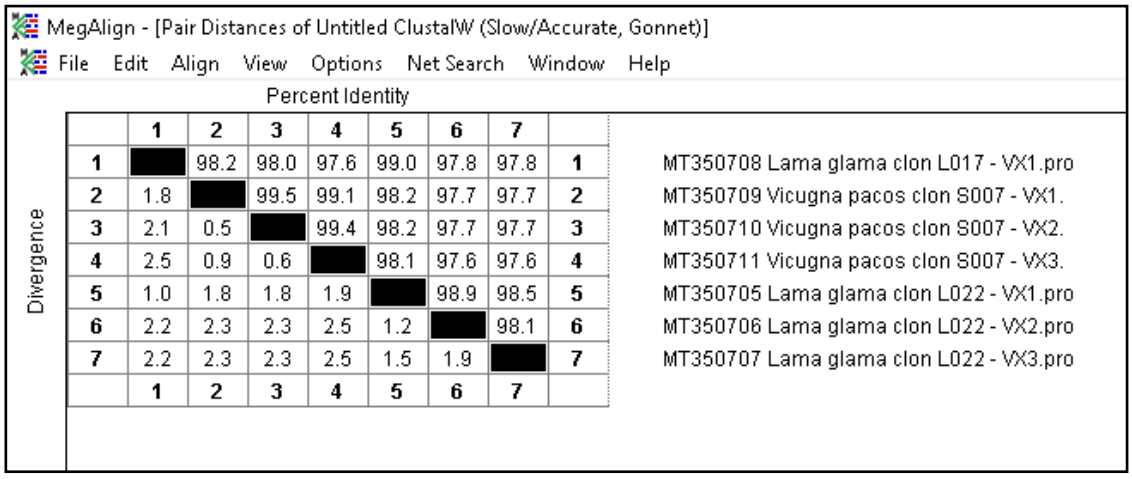
Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	
1		99.1	99.1	98.9	99.6	98.9	99.1	1
2	0.9		99.8	99.7	99.2	98.8	99.0	2
3	0.9	0.2		99.8	99.2	98.9	99.1	3
4	1.1	0.3	0.2		99.1	98.8	99.0	4
5	0.4	0.9	0.8	0.9		99.2	99.4	5
6	1.2	1.2	1.2	1.2	0.8		99.0	6
7	0.9	1.0	0.9	1.0	0.6	1.0		7
	1	2	3	4	5	6	7	

1 2217.VX1.seq
2 S007.VX1.seq
3 S007.VX2.seq
4 S007.VX3.seq
5 2202.VX1.seq
6 2202.VX2.seq
7 2202.VX3.seq

Anexo 6. Distancia entre aminoácidos entre la isoforma 1 de L017 con las anteriores secuencias obtenidas. Se usó el software MegAlign.


MegAlign - [Pair Distances of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)]

File Edit Align View Options Net Search Window Help

Percent Identity

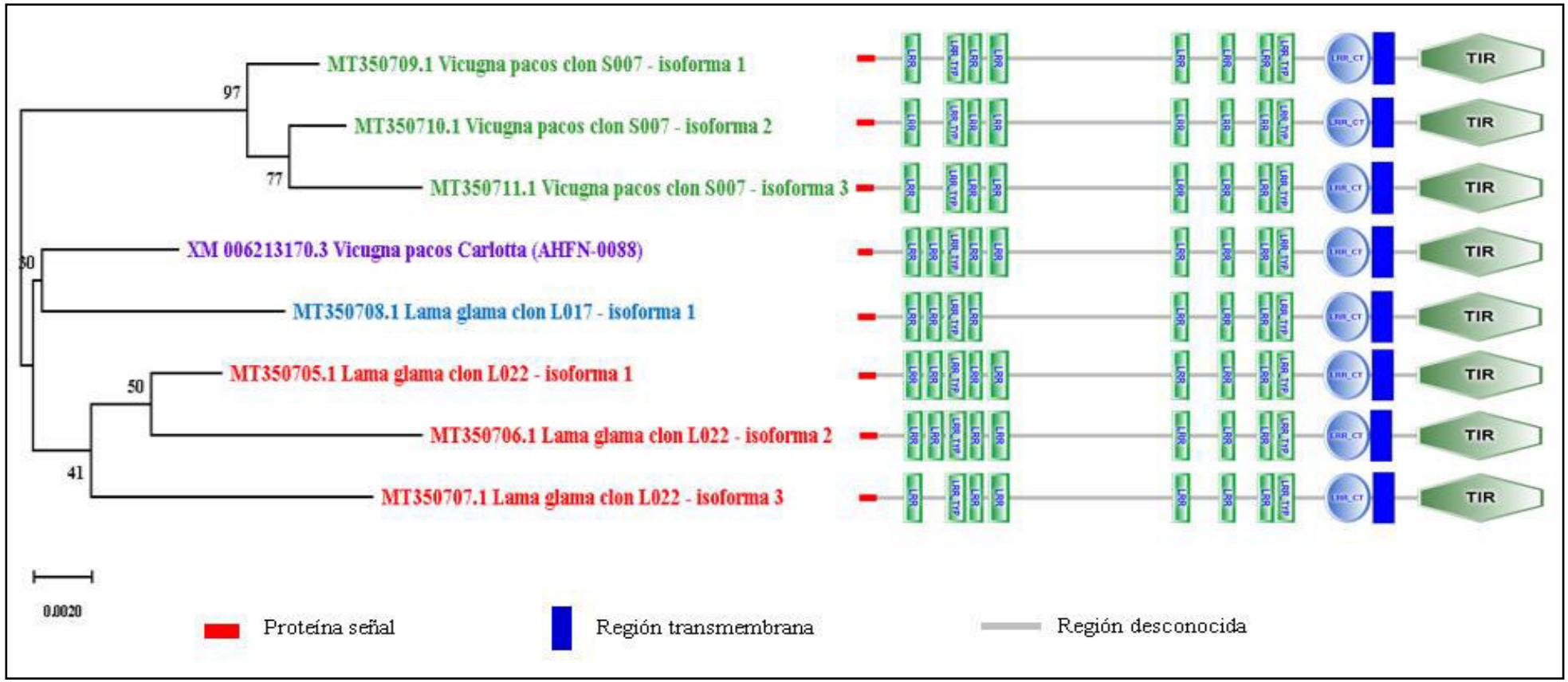
Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	
1		98.2	98.0	97.6	99.0	97.8	97.8	1
2	1.8		99.5	99.1	98.2	97.7	97.7	2
3	2.1	0.5		99.4	98.2	97.7	97.7	3
4	2.5	0.9	0.6		98.1	97.6	97.6	4
5	1.0	1.8	1.8	1.9		98.9	98.5	5
6	2.2	2.3	2.3	2.5	1.2		98.1	6
7	2.2	2.3	2.3	2.5	1.5	1.9		7
	1	2	3	4	5	6	7	

1 MT350708 Lama glama clon L017 - VX1.pro
2 MT350709 Vicugna pacos clon S007 - VX1.
3 MT350710 Vicugna pacos clon S007 - VX2.
4 MT350711 Vicugna pacos clon S007 - VX3.
5 MT350705 Lama glama clon L022 - VX1.pro
6 MT350706 Lama glama clon L022 - VX2.pro
7 MT350707 Lama glama clon L022 - VX3.pro

Anexo 7. Posiciones de las regiones de las secuencias aminoacídicas del clon de la isoforma 1 de S007 descrito en la página de GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). .

```
     Protein         1..785
                     /product="toll-like receptor 2"
     Region          55..>536
                     /region_name="PLN00113"
                     /note="leucine-rich repeat receptor-like protein kinase;
                     Provisional"
                     /db_xref="CDD:215061"
     Region          55..78
                     /region_name="leucine-rich repeat"
                     /note="leucine-rich repeat [structural motif]"
                     /db_xref="CDD:275378"
```

Se observa que este clon está conformado por 1 a 785 aa. Posición de 55 a 536 aa representan al ectodominio donde se hallan todos los LRRs predictivos. Posición 55 a 78 aa conforma la primera LRR, es decir un motif.

Anexo 8. Árbol filogenético de las isoformas halladas de la ORF del gen *TLR2* en alpacas y llamas. Cada una de ellas junto a su representación gráfica de sus dominios, gracias al uso del software SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/).