



Variación genética en los genes HOXC13 y KRT31 de alpaca (*Vicugna pacos*)

Genetic variation in HOXC13 and KRT31 genes of alpaca (*Vicugna pacos*)

William Salas^{1,*}; Irene Delgado De La Flor²; Jorge Rodríguez²; Rufino Paucar-Chanca¹

1 Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de Huancavelica, Av. Universitaria S/N, Huancavelica, Perú.

2 Unidad de Biotecnología Molecular, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima, Perú.

*Autor correspondiente: wilyalasc@gmail.com (W. Salas).

ID ORCID de los autores

W. Salas  <http://orcid.org/0000-0003-3652-6007>

I. Delgado  <http://orcid.org/0000-0003-0331-7970>

J. Rodríguez  <http://orcid.org/0000-0002-4193-8017>

R. Paucar-Chanca:  <http://orcid.org/0000-0001-6820-6185>

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar genéticamente polimorfismos de nucleótido único (SNPs) del gen HOXC13 y KRT31 en una población de alpacas Huacaya de Huancavelica, Perú. ADN genómico (n = 96) fue usado para amplificación por PCR y secuenciamiento de un fragmento de 581 pares de bases y 281 pares de bases de los genes HOXC13 y KRT31 respectivamente. Un total de 13 SNPs fueron identificados, todas variantes sinónimas. Cinco SNPs fueron identificados para el gen HOXC13 y 8 SNPs para el gen KRT31, de las cuales 3 SNPs del gen HOXC13 y un SNP del gen KRT31 presentaron frecuencias alélicas menores a 0,05. Todos los SNPs estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg ($p > 0.01$) con valores de FIS cercanos a cero. Los resultados indican la presencia de moderada diversidad genética en el gen HOXC13 y KRT31 en la población de alpacas Huacaya de Huancavelica.

Palabras clave: camélidos; alpaca; HOXC13; KRT31; SNPs.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify and characterize genetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding region of the HOXC13 and KRT31 genes from the huacaya alpaca population from Huancavelica, Peru. Genomic DNA (n = 96) was used to PCR amplification and sequencing of 581 bp and 281 bp fragments from the HOXC13 and KRT31 genes. A total of 13 SNPs were identified for HOXC13 gene and 8 SNPs for KRT31 gene. All 13 SNPs were synonymous variants with three SNPs for HOXC13 gene and one SNP for KRT31 gene with allele frequencies lower than 0.05. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.01$) with FIS values like to zero. The results indicate the presence of moderate genetic diversity in the coding region of the HOXC13 and KRT31 genes from the Huancavelica alpaca population.

Keywords: camelids; alpaca; HOXC13; KRT31; SNPs.

Recibido: 14-04-2020.

Aceptado: 07-06-2020.

INTRODUCCIÓN

La población mundial de alpacas se concentra en la zona alto andina peruana, con más de 3 millones de animales (Food and Agriculture Organization, 2005). En el Perú, los departamentos con mayor población de alpacas son Puno (58%), Cusco (11,9%), Arequipa (8,1%) y Huancavelica (11,4%) (Food and Agriculture Organization, 2005).

En la fibra de alpaca, el diámetro es el carácter económico más importante. En las últimas décadas, el diámetro de fibra viene incrementándose, lo cual ha producido una disminución de la calidad de la fibra de alpaca y por consecuencia en su precio en el mercado de fibras naturales (Montes, 2008). En la actualidad, el diámetro de la fibra de la alpaca se encuentra por encima de los 24 micrones (Food and Agriculture Organization, 2005) produciendo grandes pérdidas económicas para los productores.

El objetivo de los programas de mejoramiento genético es maximizar los caracteres fenotípicos deseables utilizando selección y diferencias genéticas entre individuos. Los estudios en genes relacionados con la producción y regulación de las proteínas de la fibra podrían permitir entender el proceso de la generación de la fibra y permitir los procesos de selección de animales superiores.

Diferentes estudios analizaron genes que codifican proteínas funcionales y estructurales de la fibra o lana como HOXC13 (Tkatchenko *et al.*, 2001), EDAR

(Fujimoto *et al.*, 2008), proteínas asociadas a queratinas (KRTAPs) y queratinas (KRTs) en mamíferos (Foppiano, 2016; Fernández *et al.*, 2019).

Las queratinas son la principal proteína estructural en el pelo de los mamíferos (Rogers, 2002), en humanos, el gen KRT31 codifica la proteína queratina tipo I presente en el citoesqueleto interno de la estructura proteica del pelo (Yu *et al.*, 2009). Muchos estudios indican la importancia de la variación en la estructura de las queratinas en las características fenotípicas del pelo o lana en animales (Chai, 2019).

La proteína HOXC13 es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes productores de queratina y proteínas asociadas a queratinas en humanos y ratones, donde los cambios en los niveles de expresión de estos genes resultan en una variación fenotípica como alopecia, o fragilidad del cabello en ratones (Tkatchenko *et al.*, 2001).

En alpaca, no hay suficiente información acerca de genes estructurales y regulatorios con potencial asociación con caracteres relacionados a la calidad de fibra. El primer paso para la identificación de estos genes es identificar y caracterizar la variación genética existente en los genes involucrados en la presentación del carácter.

El objetivo del estudio fue identificar la diversidad genética en un gen funcional HOXC13 y un gen estructural KRT31 en alpacas de Huancavelica, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

ADN genómico fue extraído de 96 alpacas Huacaya del Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos – Lachocc de la Universidad Nacional de Huancavelica, utilizando un kit comercial (GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit - Vivantis Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La variación genética *in silico* para fragmentos de los genes HOXC13 y KRT31 fueron identificadas con la información disponible de 3 genomas completos de alpacas peruanas disponibles en Bioproject (PRJNA340289) y un genoma de referencia de alpaca (USA) (VicPac2.0.2) utilizando el software BWA (Burrows Wheeler Aligner) (Li, 2009). Cuatro cebadores fueron diseñados para amplificación por PCR un fragmento de 581 pares de bases de la región codante del gen HOXC13 (HOXC13-F: 5'-GGGGCGGACAGAGAAAAAG-3' y HOXC13-R: 5'-GAGAACCCTTGCAGCTGTGAC-3') y 281 pares de bases de la región codante del gen KRT31 (KRT31-F: 5'-GGAGAGCGAGGACTGCAA-3' y KRT31-R 5'-TCAAGATGGGGAATCCAGTGGGA-3') utilizando primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

La amplificación por PCR de los genes HOXC13 y KRT31 fue realizada en un volumen final de 20 μ L

conteniendo: 5 ng DNA genómico, 0,2 mM dNTPs (GeneOn), 1X PCR buffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20; GeneOn), 2,5 mM MgCl₂ (GeneOn), 0,5 U H-SPlus-Taq DNA Polymerase® (GeneOn) y 5 pmol de cada cebador (Macrogen, Inc.).

Las condiciones de PCR utilizadas fueron: un ciclo de 95°C por 2 min, 25 ciclos de 94°C por 30 s, 61°C por 30 s y 72°C por 30 s, con una extensión final de 72°C por 3 min. Los productos de PCR fueron secuenciados por ambas hebras utilizando BigDye terminator® v3.1 kit (Life Technologies) en el analizador genético ABI 3137 XL (servicio proveído por Macrogen Inc.).

La identificación de SNPs fue realizada mediante comparación de secuencias utilizando el software Codon Code aligner (v8.0). Los estimadores de diversidad genética como frecuencias alélicas, heterocigosidad observada y esperada fueron calculados utilizando el software CERVUS v3.0 (Kalinowski, 2007). La prueba para determinación de equilibrio Hardy Weinberg fue calculado utilizando el software Genepop v.4.0 software (Raymond y Rousset, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 5 y 8 SNPs bialelicos fueron identificados en los genes HOXC13 y KRT31 respectivamente. Todos los polimorfismos presentes en ambos genes fueron variantes sinónimas, con 3 SNPs en el gen HOXC13 y un SNPs en el gen KRT31 con frecuencias

alélicas menores de 0,05. Sin embargo, la totalidad de los SNPs (13) descritos en el estudio estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg ($p > 0.01$) con valores de FIS cercanos a cero (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1

Posición del scaffold, alelo mayor, alelo menor, frecuencia del alelo menor (MAF), heterocigocidad y equilibrio de Hardy – Weimberg (HWE) del gen HOXC13 en alpacas

	Posición del Scaffold*	Alelo mayor	Alelo menor	MAF	Hobs	Hesp	HWE**
1	11647923	A	T	0,236	0,341	0,363	0,567
2	11647945	C	T	0,385	0,418	0,476	0,271
3	11648009	C	T	0,006	0,011	0,011	1,000
4	11648027	A	T	0,029	0,034	0,056	0,057
5	11648042	G	C	0,017	0,034	0,034	1,000

*scaffold 36, VicPac2.0.2

** p-value

MAF: Frecuencia del alelo menor, Hobs: heterocigocidad observada, Hesp: heterocigocidad esperada, HWE: Equilibrio de Hardy Weinberg

Tabla 2

Posición del scaffold, alelo mayor, alelo menor, frecuencia del alelo menor (MAF), heterocigocidad y equilibrio de Hardy – Weimberg (HWE) del gen krt31 en alpacas

	Posición del scaffold*	Alelo mayor	Alelo menor	MAF	Hobs	Hesp	HWE**
1	10534	G	A	0,072	0,144	0,135	1,000
2	10572	C	T	0,106	0,167	0,190	0,243
3	10575	G	A	0,044	0,067	0,085	0,150
4	10628	G	A	0,217	0,344	0,341	1,000
5	10657	G	A	0,317	0,433	0,435	1,000
6	10963	T	C	0,315	0,427	0,437	1,000
7	10995	A	G	0,292	0,449	0,416	0,607
8	11007	T	C	0,320	0,348	0,438	0,086

*scaffold 36, VicPac2.0.2

** p-value

MAF: Frecuencia del alelo menor, Hobs: heterocigocidad observada, Hesp: heterocigocidad esperada, HWE: Equilibrio de Hardy Weinberg

En humanos, mutaciones en el gen HOXC13 son responsables de ciertos padecimientos relacionados con la producción de pelo (Han, 2017). La proteína HOXC13 tiene un efecto ambivalente sobre los promotores del gen de queratina, estudios en cabras mostraron su efecto en el incremento de la actividad de los promotores KRT84 y KRT38, y disminución de la actividad de los promotores de los genes KRT1 y KRT2 (Wang, 2018). Genome Wide-Association Studies (GWAS) para características de importancia económica en lana de ovejas demostró la importancia del estudio de

genes reguladores y estructurales en la transmisión del carácter (Wang *et al.*, 2014). Dos genotipos del gen KRT31 (Sulayman *et al.*, 2018) y SNPs en gen EDAR (Fujimoto *et al.*, 2008) y gen FGFR2 (Fujimoto *et al.*, 2009) fueron significativamente asociados con el diámetro de pelo en humanos.

La presencia de variabilidad genética en los genes HOXC13 y KRT31 en alpacas sugiere la capacidad de selección y permiten explorar la potencial asociación de estos polimorfismos con el diámetro de fibra.

CONCLUSIONES

Se reporta la presencia de 13 polimorfismos tipo SNP en los genes HOXC13 (5 SNPs) y KRT31 (8 SNPs). La totalidad de polimorfismos tipo SNPs estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg y fueron variantes sinónimas, de los cuales 4 (3 en el gen HOXC13 y uno en el gen KRT31) mostraron frecuencias alélicas menores a 0.05.

Los genes analizados mostraron una moderada variabilidad genética (13 SNPs), respaldada por valores de FIS cercanos a cero, sugiriendo su potencial utilidad como marcadores genéticos en genes codantes relacionados con el diámetro de fibra en alpacas.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por el proyecto “Identificadores de marcadores genéticos moleculares SNP para características de importancia económica en la alpaca Huacaya en el distrito de Lachocc, Provincia y Departamento de Huancavelica” (FOCAM- Universidad Nacional de

Huancavelica). La información disponible de los genomas de alpaca peruanos utilizados en el estudio fueron proveídos por el proyecto “Una aproximación de genómica de poblaciones aplicada a la filogenia y mapeo de rasgos productivos en alpaca” (Contract 19-FINCYT-IA-2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chai, W.; Zhou, H.; Gong, H.; Wang, J.; Luo, Y.; Hickford, J. 2019. Nucleotide variation in the ovine KRT31 promoter region and its association with variation in wool traits in Merino-cross lambs. *The Journal of Agricultural Science*. 1-7.

Fernández, A.; Gutiérrez, G.; Ponce de León, F. 2019. Bioinformatic identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in candidate genes for fiber characteristics in alpacas (*Vicugna pacos*). *Revista peruana de biología* 26(1): 87-94.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina (TCP/RLA/2914), Lima, Perú, pp. 1-62.
- Foppiano, F. 2016. Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato. M.Sc. thesis. Faculty of Science and Philosophy. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Peru. 147 pp.
- Fujimoto, A.; Kimura, R.; Ohashi, J.; Omi, K.; Yuliwulandari, R.; Batubara, L.; Mustofa, Mohammad, S.; Urai, I.; Wannapa, I.; Morishita, Y.; Furusawa, T.; Nakazawa, M.; Ohtsuka, R.; Tokunaga, K. 2008. A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Hum Mol Genet.* 17(6): 835-43.
- Fujimoto, A.; Nishida, N.; Kimura, R. 2009. FGFR2 is associated with hair thickness in Asian populations. *J Hum Genet.* 54(8): 461-465.
- Han, K.; Liang, L.; Li, L.; Ouyang, Z.; Zhao, B.; Wang, Q.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Ren, X.; Juang, F.; Lai, C.; Wang, K.; Yan, S.; Huang, L.; GUO, L.; Zeng, K.; Lai, L.; Fan, N. 2017. Generation of HOXC13 knockout pigs recapitulates human ectodermal dysplasia-9. *Human Molecular Genetics* 26(1): 184-191.
- Kalinowski, S.; Taper, M.; Marshall, T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol.* 16: 1009-1106.
- Montes, M.; Quiñacaño, I.; Quispe, R.; Quispe, E.; Alfonso, L. 2008. Quality characteristics of Huacaya alpaca fibre produced in the Peruvian Andean Plateau region of Huancavelica. *Spanish Journal of Agriculture Research* 6(1): 33-38.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. Genepop (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered.* 86: 248-249.
- Rogers, M.A.; Langbein, L.; Winter, H.; Ehmann, C.; Praetzel, S.; Schweizer, J. 2002. Characterization of a first domain of human high glycine-tyrosine and high sulfur keratin-associated protein (KAP) genes on chromosome 21q22.1. *J. Biol. Chem.* 277: 48993-49002.
- Sulayman, A.; Tursun, M.; Sulaiman, Y.; Huang, X.; Tian, K.; Tian, Y.; Tulafu, H. 2018. Association analysis of polymorphisms in six keratin genes with wool traits in sheep. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 31(6): 775-783.
- Tkatchenko, A.; Visconti, R.; Shang, L. 2001. Overexpression of HOXC13 in differentiating keratinocytes results in downregulation of a novel hair keratin gene cluster and alopecia. *Dev Camb Engl.* 128(9): 1547-1558.
- Wang S.; Luo Z.; Zhang Y.; Yua D.; Ge W.; Wang X. 2018. The inconsistent regulation of HOXC13 on different keratins and the regulation mechanism on HOXC13 in Cashmere goat. *BMC Genomics* 19(1): 630.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13(1): 134.
- Yu, Z.; Gordon, S.; Nixon, A.; Bawden, C.; Rogers, M.; Wildermoth, J.; Maqbool, N.; Pearson, A. 2009. Expression patterns of keratin intermediate filament and keratin associated protein genes in wool follicles. *Differentiation* 77: 307-316.