



## **POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS**

De La Rosa, Oscar, Marques, Alexis, F. Vásquez, Belkys, J. Dickson, Luis, C.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-odelarosa@inia.gov.ve

### **RESUMEN**

La paratuberculosis, es una infección bacteriana crónica provocada por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), que afecta principalmente a ovinos, bovinos y caprinos, caracterizada por emaciación progresiva del animal hasta su total deterioro. El control de la paratuberculosis radica en medidas de alto costo económico y difícil implementación, por esta razón se buscan alternativas basadas en la susceptibilidad genética del huésped al patógeno. El gen *Slc11a1* codifica una proteína transportadora de cationes localizada en la membrana del fagolisosoma de los macrófagos, que tiene participación activa en la supresión de infecciones bacterianas. El gen presenta un microsatélite polimórfico (GTN) en la región no traducida del extremo 3' (3'-UTR) y algunos de sus alelos han sido asociados con resistencia natural a patógenos como *Brucella* y *Mycobacterium* en animales domésticos. A objeto de demostrar la presencia de polimorfismos de *Slc11a1* en cabras criollas, se realizó un análisis por PCR-SSCP de un fragmento de 200 pb correspondiente al extremo 3'-UTR. En la muestra de 20 individuos se obtuvieron cuatro patrones electroforéticos (215, 230, 245 y 265 pb) y tres genotipos; 215/215, 230/265 y 245/265. Las frecuencias alélicas fueron 0,550(215pb), 0,100(230pb), 0,125(245pb) y 0,225(265pb). Las frecuencias genotípicas fueron 0,55(215/215), 0,20(230/265) y 0,25(245/265). Los genotipos no se presentan en equilibrio poblacional ( $p > 0,05$ ). Estos resultados preliminares evidencian varios polimorfismos de *Slc11a1* e indican la necesidad de conocer sus secuencias nucleotídicas a fin de identificar alelos favorables que puedan ser incorporados a programas de control.

**Palabras clave:** polimorfismos, gen SLC11A1, resistencia, paratuberculosis.



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

## Introducción

La resistencia natural a enfermedades infecciosas está ligada a la eficiencia de la respuesta inmune y se encuentra bajo control genético [Ibeagha-Awemu et al., (2008)]. El uso y selección de animales resistentes de manera natural a un patógeno particular puede, reducir los costos asociados a tratamiento y control de la enfermedad, mejorar el bienestar animal y obtener productos animales más saludables para consumo humano.

El gen *Slc11a1* que era conocido anteriormente como *Nramp1* (Proteína 1 de macrófago asociada a resistencia natural) [Vidal et al., (1996)], codifica una proteína transmembrana transportadora de cationes divalente que está ubicada en el fagolisosoma de los macrófagos regulando la actividad bactericida de los mismos (Forbes y Gros, 2001), Este gen ha sido estudiado en humanos, animales de laboratorio y animales de granja [Awomoyi, (2007); Li et al., (2011)]. En el bovino se ha mapeado en el cromosoma BTA 2 y presenta una repetición polimórfica Guanina-Timina (GTn) en el extremo 3' no traducido (3'-UTR) que ha sido asociada con resistencia natural a brucelosis [Feng et al., (1996); Barthel et al., (2001)].

Barthel et al. (2001) identificaron en el ganado bovino el alelo GT12, que resulto asociado con resistencia a brucelosis, mientras que Martínez et al., (2008) encontraron que el alelo GT13 estaba asociado a resistencia in vitro a *Brucella abortus* y los alelos GT14 y GT15 presentaron asociación con la condición de susceptibilidad. En búfalos, el genotipo BB presenta un efecto protector contra *Brucella abortus* [Caparelli et al., (2007)]. En ovejas, Reddacliff et al. (2005) encontraron un microsatélite polimórfico en la secuencia no



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

codificante del extremo (3) que está asociado con susceptibilidad a *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, agente causal de la paratuberculosis o Enfermedad de Johne.

En cabras, la secuencia completa de *Slc11a1* no se conoce aún, sin embargo se tiene disponibilidad de la secuencia de ADN complementario (GenBank FJ388877), donde se identificaron dos microsátelites polimórficos en la región 3'-UTR y uno de ellos está asociado a resistencia a *Mycobacterium avium* subs paratuberculosis en cabras griegas autóctonas [Liandris et al., (2009); Korou et al., (2010); Vacca et al., (2011)].

En esta evaluación preliminar, se pretende evidenciar la presencia de polimorfismos (GTn) en el extremo 3'-UTR de *Slc11a1* en una muestra de un rebaño de cabras criollas usando un análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) [Gasser et al., (2006)].

Los resultados de este ensayo servirán para evaluar la pertinencia de un programa de búsqueda e identificación de genotipos promisorios de *Slc11a1* que permitan identificar individuos susceptibles o resistentes a paratuberculosis dentro del rebaño caprino criollo nacional.

### **Materiales y Métodos**

Un total de 20 muestras de sangre periférica de un rebaño de caprinos criollos del INIA - Lara, fue colectada en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C, hasta que se aisló el ácido nucleico (ADN) siguiendo la metodología propuesta por Miller et al., (1988), con algunas modificaciones propias.



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

El segmento genómico de interés (3'-UTR) fue amplificado por PCR, utilizando los cebadores F(5'- GTGGAATGAGTGGGCACAGT-3') y R (5'- CTCTCCGTCTTGCTGTGCAT-3') propuestos por Feng et al., (1996).

La mezcla para la amplificación PCR fue la siguiente: Solución tampón 1X, 100 µM dNTP's, 1,8 mM MgCL 2 , 200 nM cebador F, 200nM cebador R, 1 U de Taq polimerasa y 50 ng del ADN molde en un volumen final de 25 µL.

El perfil térmico usado en el termociclador consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 2:30 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturalización a 94oC por 20 segundos, hibridación a 63oC por 40 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, para concluir con una fase de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los producto de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis vertical en condiciones SSCP de acuerdo a lo descrito por Gasser et al. (2006). Se preparó un gel de poliacrilamida con una relación 37,1:1 y concentración de 10%. A fin de ajustar la temperatura y estructura del gel se realizo una recorrida a 10oC con una potencia de 200 voltios durante 20 minutos. Como paso previo a la electroforesis, los amplicones se desnaturalizaron a 95oC por 15 min, mezclando 5 µL del amplicón y 5 µL de una solución de carga (87% formamida, 14% agua ultrapura, 1% EDTA y 1% Azul Bromofenol), luego se colocaron 8 µL de la mezcla desnaturalizada en cada pocillo del gel y se efectuó la electroforesis durante 5 horas, a 10oC de temperatura y con una potencia de 800 voltios e intensidad de 10 miliAmperios. El gel



POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

resultante de la corrida electroforética fue colocado en una lámina de acetato y teñido por inmersión con Sybr ® safe en concentración de 1/10000 durante 30 minutos.

### Resultado y Discusión

En la muestra de 20 individuos se obtuvieron cuatro patrones electroforéticos; 215, 230, 245 y 265 pares de bases (pb) y tres genotipos; 215/215 pb, 230/265 pb y 245/265 pb, representados en las Figuras 1 y 2.

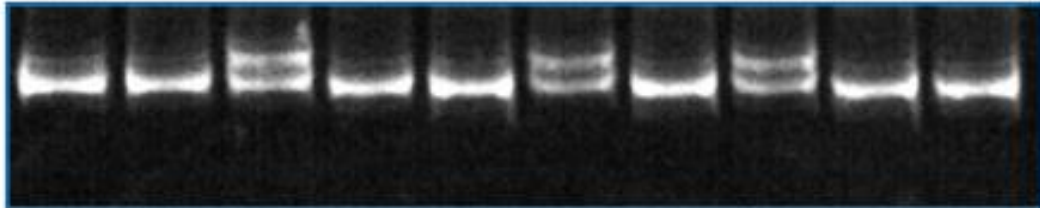


Figura 1. Muestras del 1 al 10

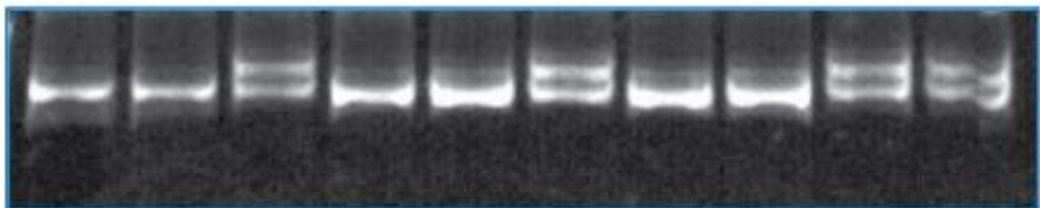


Figura 2. Muestras del 11 al 20



## POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra ensayada se presentan en las Tablas 1 y 2. Los resultados indican que los genotipos obtenidos no se ajustan al equilibrio poblacional de Hardy – Weinberg ( $p > 0,05$ ) dentro de la muestra probada.

**Tabla 1. Frecuencias alélicas**

ALELOS	FRECUENCIA
215	0,55
230	0,10
245	0,125
265	0,225

**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 2. Frecuencias genotípicas**

GENOTIPO	FRECUENCIA
215/215	0,55
230/265	0,20
245/265	0,25

**Fuente:** elaboración propia.



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

### **Conclusiones**

Los resultados obtenidos indican la necesidad de ampliar la base muestral de esta evaluación a objeto de verificar la presencia de otros alelos.

De igual forma, es necesario conocer las secuencias nucleotídicas de los patrones electroforéticos o genotipos identificados y evaluar la actividad bactericida in vitro de los macrófagos correspondientes a los diversos genotipos presentes, a fin de identificar aquellos que son favorables y que puedan ser valorados con pruebas de campo, con el objeto de incorporar los individuos portadores de estos genotipos favorables a programas de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares que permitan el control y prevención de la paratuberculosis en los rebaños caprinos nacionales.

### **Agradecimiento**

Los autores desean agradecer al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).

### **Referencias Bibliográficas**

Awomoyi A. (2007). The human solute carrier family 11 member 1 protein (SLC11A1): linking infections, autoimmunity and cancer? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 49:324-329.



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA  
NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

Barthel R.; J. Feng, J.; Piedrahita, D.; McMurray, J. Templeton y G. Adams. 2001. Stable transfection of bovine Nramp1 gene into murine RAW2647 cells: effects on *Brucella abortus* survival. *Infect. Immun* 69:3110-3119.

Caparelli R., Alfano, F., Amoroso, M., Borriello, G., Fenizia, D., Bianco, A., Roperto, S., Roperto F., Iannelli, D., 2007. Protective effect of the Nramp1BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.* 75:3089-3096.

Feng J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams G., Templeton, J., (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp 1) Gene. *Genome research* 6: 956-964.

Forbes J y P. Gros. 2001. Divalent-metal transport by NRAMP protein at the interface of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology.* 9:397-403.

Gasser R., Hu, M., Chilton, N., Campbell, B., Jex, A., Otranto, D., Cafarchia, C., Beveridge, I., Zhu. X., (2006). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols.* 1.(6) 3121 – 3128.

Ibeagha-Awemu E., Kgwatalala, P., Ibeagha, A., y Zhao. X., 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep and pig. *Mammalian Genome.* 19:226-245.





OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA  
NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

Korou L., Liandris, E., Gazouli M., Ikonopoulou. J., (2010). Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 144. (3-4). 353– 358.

Li X., Yang, Y., Zhou, F., Zhang, Y., Lu, H., Jiny, Q., Gao. L., (2011). SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 6 (1): e15831. Doi:10.1371/ journal.pone.0015831

Liandris E., Gazouli, M., Ikonopoulou, J., (2009). Characterization of the caprine (*Capra hircus*) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis. *Online J. Vet. Res.* 13:41-52.

Martínez R., Toro, R., Montoya, F., Burbano M., Tobon, J., Gallego, J., Dunner S., Cañon. J., (2008). Bovine SLC11A1 3 UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *J. Anim. Breed. Genet.* 125:271-279

Miller S., Dykes D., Polesky, H., (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids. Res.* 16 (3):1215.

Reddacliff L., Beh, K., McGregor H., Whittington. R., (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johné's disease. *Aust. Vet. J.* 83:435-441.



OBSERVADOR DEL CONOCIMIENTO

VOL 2. N° 1 ENERO 2014.

REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINARIA

POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 EN CABRAS CRIOLLAS. UN ESTUDIO INICIAL DE LA RESISTENCIA  
NATURAL A PARA TUBERCULOSIS

Vacca, G. Pazzola, M., Pisano, C., Carcangiu, V., Diaz, M., Nieddu, M., Robledo, R., Mezzanotte, R., Dettori, M., (2011). Chromosomal localisation and genetic variation of the SLC11A1 gene in goats (*Capra hircus*). *The Veterinary Journal*. 190:60 -65.

Vidal S., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S., Gros. P., (1996). Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol*. 157:3559-3568.