

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Allelic frequencies for SNP variants in the gene *Nramp1* in bovine infected with *Brucella abortus* or classified by resistance to the pathogenFrecuencias alélicas para variantes SNP en el gen *Nramp1* en bovinos infectados con *Brucella abortus* o clasificados por resistencia al patógenoFernando Cerquera M.¹, Rodrigo Martínez S.², Rubén Toro O.³, Jaime Tobón C.⁴, Jaime Gallego G.⁵, Esperanza Rueda⁶

ABSTRACT

The natural resistance to brucellosis in cattle has been associated to genetic factors mainly to some single nucleotide polymorphism (SNP), located within *Nramp1* gen. The current research has studied the effect of nucleotide variants to be found in coding regions and other one located in 3 non translated region of *Nramp1* gene, on the animal classification as resistant or susceptible, moreover was identified the main genotypes to be found on the infected animals, confirmed as positives by antibody anti-brucella titles. Was established the genotypic and allelic frequencies for five single nucleotide polymorphism in animals from blanco orejinegro (*Bos taurus taurus*) and zebu breeds (*Bos taurus indicus*) and serum samples belonging to positive crossbred animals (*Bos taurus x Bos indicus*). The genotype was defined by the methodology known as "single strand conformational polymorphism". To estimate the macrophage capacity to control the bacterial survival, an in vitro assay was performed, which allowed define the phenotype as resistant or susceptible. The results suggest a significant association for SNP4 ($p = 0.0506$) with the phenotypic variation for resistant or susceptibility, because was found the genotype (BB) at higher frequency in susceptible animals and naturally infected animals, than those resistant animals.

Keywords: Brucellosis, disease resistance, blanco orejinegro, zebu, genotype.

RESUMEN

La resistencia natural a la brucelosis en bovinos ha sido asociada a factores genéticos, principalmente a algunos polimorfismos de nucleótido simple ubicados dentro del gen *Nramp1*. La presente investigación evalúa el efecto de variantes tipo polimorfismos de nucleótido simple presentes en regiones codificantes y en la región 3'UTR del gen *Nramp1*, en la clasificación de los animales como resistentes o susceptibles; además se determinan los genotipos predominantes en animales naturalmente infectados y comprobados como positivos por la presencia de anticuerpos anti *Brucella abortus*. Se establecieron las frecuencias genotípicas y alélicas para cinco polimorfismos de nucleótido simple identificados dentro del gen *Nramp1* en animales de las razas blanco orejinegro (*Bos taurus taurus*) y cebú (*Bos taurus indicus*) y en muestras serológicamente positivas provenientes de animales cruzados (*Bos taurus x Bos indicus*). La determinación de genotipos se realizó mediante la metodología polimorfismo conformacional de cadena sencilla. Se realizó un ensayo de desafío infeccioso in vitro, para estimar la capacidad de los macrófagos bovinos para controlar la sobrevivencia bacteriana, lo que permitió definir los individuos como resistentes o susceptibles. Los resultados sugieren una asociación significativa del SNP4 ($p = 0,0506$) con la variación para el fenotipo de susceptibilidad, pues se encontró el genotipo homocigoto (BB) en alta frecuencia en animales catalogados como resistentes y el genotipo heterocigoto (AB) en alta frecuencia en animales catalogados como susceptibles y en animales con títulos de anticuerpos anti *Brucella abortus*.

Palabras clave: brucelosis, resistencia a enfermedades, blanco orejinegro, cebú, genotipo.

Radicado: 3 de diciembre de 2008
Aprobado: 12 de marzo de 2009

¹ Licenciado en Biología. Bogotá. fcerquera@yahoo.com

² Z. Ph.D. Grupo de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, C.I. Tibaitatá, Corpoica, Mosquera. ramartinez@corpoica.org.co

³ MV. M.Sc. Vecol, Bogotá. ortizo98@yahoo.com

⁴ MV. Grupo de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, E.E. El Nus, San Roque, Antioquia. jtonbon@corpoica.org.co

⁵ MV. Grupo de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, E.E. El Nus, San Roque, Antioquia. jgallego@corpoica.org.co

⁶ MV. M.Sc. C.I. Ceisa, Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Bogotá. esperanza.rueda@ica.gov.co

INTRODUCCIÓN

LA BRUCELOSIS BOVINA ES una enfermedad infectocontagiosa producida por la bacteria *Brucella abortus* y caracterizada por abortos, retención de la placenta, orquitis, epididimitis e infertilidad (Harmon *et al.*, 1989; Rodríguez y Crespo, 2002), que ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria. Según datos del Instituto Colombiano Agropecuario (2002) en Colombia se calculan pérdidas anuales por 42.000 millones de dólares representados en

la incapacidad de incursionar en el comercio de animales y productos. Los programas de control de la brucelosis normalmente han incluido vacunación, aislamiento y sacrificio de ganado infectado; sin embargo estos mecanismos han sido costosos y relativamente inefectivos en la erradicación de la enfermedad (Price *et al.*, 1990); por lo tanto, una alternativa es emplear programas de selección de animales genéticamente resistentes a la enfermedad, lo cual constituye una estrategia fácil y de bajo costo (Wigley, 2004).

El gen inicialmente llamado de la proteína-1 del macrófago asociado con resistencia natural (Nrpmp1, por su sigla en inglés de *natural resistance-associated macrophage protein*) y posteriormente llamado Slc11A1 (*solute carrier family 11*) ha sido relacionado con resistencia o susceptibilidad a muchos patógenos intracelulares tales como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella enterica* y *Leishmania donovani* en un rango diverso de especies de mamíferos, incluyendo el ratón y el hombre (Vidal *et al.*, 1995; Bellamy, 1999). Con base en las características de esta familia de proteínas, se ha propuesto que el gen Nrpmp1 afectaría la replicación intrafagosomal de la bacteria alterando el contenido de cationes divalentes y el pH del fagosoma (Grunenheid *et al.*, 1997). En estudios funcionales se ha demostrado que el gen Nrpmp1 regula la actividad antimicrobial en macrófagos de ratón, a través de la expresión de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α) e interferón gama (IFN- γ) (Ables *et al.*, 2001). También se ha reportado que los macrófagos de bovinos genéticamente resistentes a un desafío infeccioso in vivo con *Brucella abortus* (cepa 2308) son superiores en su capacidad para controlar su multiplicación bacteriana intracelular, al igual que de *Salmonella dublin* y *Mycobacterium bovis*; este mecanismo es mediado también por el gen Nrpmp1 (Barthel *et al.*, 2001).

En bovinos, el carácter de resistencia o susceptibilidad para la brucelosis presenta un control genético altamente heredable y puede ser incrementado en una generación de selección (Martínez *et al.*, 2005). El gen presenta un polimorfismo en la región terminal 3' no traducida (UTR), el cual fue reportado por Horin y colaboradores (1999) como una variación en el número de repeticiones de la secuencia GT (guanina-timina), y se ha demostrado una asociación del alelo GT/13 con resistencia a la enfermedad en bovinos (Barthel *et al.*, 2001) y en búfalos (Boriello *et al.*, 2006; Caparelli *et al.*, 2007).

Sin embargo, en los trabajos reportados por Kumar y colaboradores (2005) en bovinos de origen cebuino y cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus*) y por Paixao y colaboradores (2007) no se presentó asociación significativa

del polimorfismo (3'UTR) con resistencia a la brucelosis. Han sido identificados nuevos polimorfismos de este gen, entre ellos uno dentro del intrón X, que es estable y se encuentra distribuido en poblaciones *Bos taurus* (Coussens *et al.*, 2004) y varios polimorfismos en el exón V e intrones IV y V (Ables *et al.*, 2002). Recientemente, Martínez y colaboradores (2008) identificaron once nuevos polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), de los cuales cinco se encuentran en la secuencia codificante, uno en la región promotora y cinco en los intrones.

Los reportes citados sugieren un elevado grado de polimorfismo dentro del gen Nrpmp1 y es posible que alguna de estas variantes esté relacionada con resistencia a la brucelosis en la especie bovina. Por lo anterior, objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de variantes SNP existentes en regiones codificantes del gen Nrpmp1 en el estado sanitario tanto de poblaciones no infectadas y serológicamente positivas a la enfermedad, como de animales resistentes y susceptibles clasificados a partir de un desafío infeccioso in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Se utilizó una población de 187 bovinos constituida por animales de las razas blanco orejinegro (*Bos taurus taurus* n = 62) y cebú brahman (*Bos taurus indicus* n = 27), y animales cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus* n = 98). Los primeros fueron previamente clasificados como resistentes o susceptibles (por análisis de desafío infeccioso in vitro); los segundos (cruzados) fueron encontrados serológicamente positivos a brucelosis, diagnosticados por elisa competitiva, con títulos altos de anticuerpos anti *Brucella abortus*, por lo que fueron considerados animales control susceptibles a la infección.

Genotipado

El aislamiento y extracción de ADN para las muestras blanco orejinegro y cebú se realizó a partir del método de fenol cloroformo isoamil alcohol, de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1988). Los sueros de los animales cruzados se procesaron mediante un kit comercial (Purelink™; Invitrogen Cat. No CS11040). Los primers fueron diseñados usando dos fuentes: la secuencia disponible del ADN de *Bos taurus* (GenBank Accession Number: DQ493965) y la información reportada (Martínez *et al.*, 2008a; Coussens *et al.*, 2004). Se amplificaron por la metodología de PCR cinco fragmentos del gen, mediante el uso de 0,3 U taq ADN polimerasa (Bio-tools), 200 μ M dNTP y 1,5 mM de MgCl₂, en condiciones de incubación inicial de 94°C durante 5 min, seguido de

33 ciclos de 95°C durante 1 min, temperatura de 61°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, e incubación final de 72°C durante 4 minutos.

Para la detección de los polimorfismos, los productos de PCR fueron mezclados v/v con una solución tampón desnaturalizante para SSCP (95% formamida, 0,6% azul de bromofenol y 0,6% de xylene cyanol) y se desnaturalizaron a 94°C durante 5 minutos. Los amplímeros se enfriaron rápidamente sobre hielo y se cargaron en un gel de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 al 8% y se sometieron a electroforesis durante 16 horas a temperatura de 10°C y a 2 W. Los polimorfismos fueron observados por tinción con nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991, modificado en Barroso *et al.*, 1997). Se determinaron los genotipos para cuatro variantes SNP (descritas por Martínez *et al.*, 2008a) localizadas en regiones codificantes (exones 9, 10, 11, 15) y una localizada en la región 3' no traducida (UTR) (tabla 1, figura 1).

Metodología desafío infeccioso in vitro

La población de animales de las razas blanco orejinegro y cebú utilizada en genotipado por análisis SSCP fue previamente confirmada como negativa (evaluada por elisa competitivo), por lo cual se le utilizó para evaluar su fenotipo de resistencia a brucelosis, mediante una metodología de

desafío infeccioso in vitro, previamente descrita por Price y colaboradores (1990) y utilizada por Qureshi y colaboradores (1996), Martínez y colaboradores (2005, 2008b) y Paixao y colaboradores (2007). Se tomaron 400 ml de sangre de cada individuo y se separaron los macrófagos mediante el procedimiento de gradientes de densidad (Histopaque 1,077; Sigma Chemical St. Louis). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y diluidas para colocar 50.000 macrófagos por pozo. Se infectaron los macrófagos adicionando a una placa de 96 pozos 50 µl de la dilución de bacteria (5 x 10⁵ bacterias previamente opsonizadas). Esta mezcla fue centrifugada a 170 x G durante 10 min e incubada durante 1 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente se añadió medio RPMI-estreptomicina a una concentración final de 13,5 mg/ml para eliminar la bacteria extracelular antes de la incubación a 37°C durante 30 minutos. Más tarde se retiró este medio de los pocillos y se reemplazó por 200 µl de medio RPMI. Diez minutos más tarde, se reemplazaron 100 µl de este medio (para extraer cualquier residuo de estreptomicina) junto con 100 µl de medio RPMI suplementado con 5% de suero autólogo (del mismo animal) inactivado con calor.

Para obtener los resultados para el tiempo cero (T 0 h), el medio RPMI fue inmediatamente extraído de los valles y 100 µl de agua fría estéril deionizada fue añadida durante 10 min. Estos 100 µl fueron empleados para preparar series de diluciones a 1/5, 1/10 y 1/50. Se adicionaron 100 µl por triplicado en placas de Petri que contenían agar selectivo para *Brucella abortus* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Las placas de Petri se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Las mismas diluciones fueron realizadas a las 24 y 48 horas.

Los recuentos de unidades formadoras de colonia (UFC) se realizaron 4 días después; con esta información se determinó el número de bacterias a las cero horas (NBT 0) y a las 24 horas (NBT 24) (datos no presentados). El índice de resistencia se calculó como la raíz cuadrada del

Tabla 1. Posición y efecto en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los SNP evaluados

SNP	Posición del aminoácido en la proteína	Cambio de nucleótido	Cambio del aminoácido
SNP3	272 exón 9	C/T	Alanina / valina
SNP4	321 exón 10	G/A	ácido aspártico / asparagina
SNP5	356 exón 11	A/T	Prolina / alanina
SNP6	542 exón 15	Delección GAG	Delección de glutamina
3'UTR	Región terminal	GT/13	---

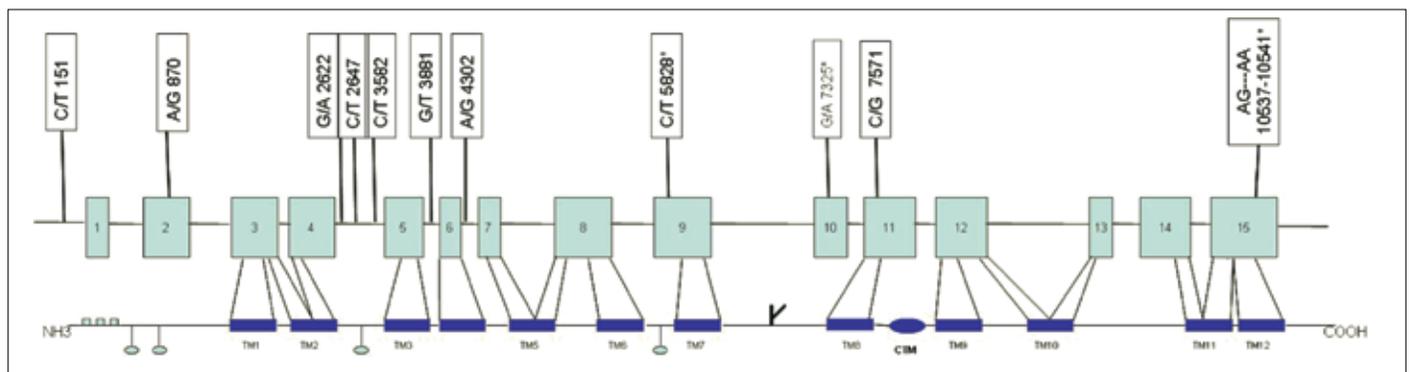


Figura 1. Estructura genómica y polimorfismos del gen Nrpmp1. Los cuadros representan los exones y la línea conectora corresponde a los intrones. Los SNP se indican según su posición en la secuencia DQ493965 y la estructura de la proteína. TM: dominio de transmembrana (Tomado de Martínez *et al.*, 2008a)

porcentaje de la proporción de unidades formadoras de colonia leídas a 24 horas de las leídas a cero horas ($SOB = \sqrt{(NBT24/NBT0) \times 100}$) (índice descrito por Martínez *et al.*, 2006, 2002; Templeton y Adams, 1992). Posteriormente, los animales se clasificaron como resistentes (R) cuando el valor de SOB < 10 y, susceptibles (S) cuando el valor de SOB > 10, de acuerdo con el control de las células sobre la sobrevivencia bacteriana (datos no presentados). Estos mismos animales, ya clasificados como resistentes o susceptibles, fueron utilizados para la determinación de los genotipos para cada SNP.

Análisis de información

Para los estudios de asociación se evaluó independientemente cada marcador haciendo análisis de frecuencias alélicas y genotípicas, mediante una prueba de X^2 , haciendo uso del procedimiento FREQ, del programa estadístico SAS. También se determinó el efecto significativo de cada variante SNP sobre la probabilidad de clasificar un animal como resistente o susceptible, para lo cual se realizó un análisis de regresión logística (Proc logistic) donde se utilizó como variable dependiente la clasificación de los individuos en función de los genotipos. El modelo de regresión logística puede escribirse como:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

Donde p es la probabilidad de que ocurra el evento de interés (en este caso la clasificación de los individuos como susceptibles o resistentes), dado el valor de las variables independientes, que fueron el genotipo para cada variante SNP y el grupo racial. El cálculo de la estimación de la probabilidad de que el animal sea susceptible es:

$$\hat{p} = \frac{e^{suma}}{1 + e^{suma}}; \text{ donde}$$

$$suma = \hat{b}_0 + \hat{b}_1x_1 + \hat{b}_2x_2 + \dots + \hat{b}_kx_k$$

La significación de los coeficientes del modelo se realizó mediante el estadístico de Wald (Lehmann, 1974).

RESULTADOS

En esta investigación se determinaron los genotipos de cinco marcadores moleculares tipo SNP (polimorfismo de nucleótido simple) localizados en regiones codificantes del gen Nramp1, donde se determinaron sus frecuencias genotípicas y alélicas en cada uno de los grupos raciales blanco orejinegro, cebú y cruces (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Además, se registraron las frecuencias genotípicas y alélicas entre animales con fenotipo clasificado como resistente o susceptible a la enfermedad, evaluados a partir de la metodología de desafío infeccioso *in vitro*; y como control positivo de animales susceptibles se utilizaron animales persistentemente infectados, determinados por la presencia de títulos infecciosos de anticuerpos anti *Brucella abortus*.

Al evaluar las frecuencias genotípicas entre razas, se encontró que SNP4 presentó en la población blanco orejinegro una alta frecuencia del genotipo homocigoto BB ($p = 0,7$), y en la población cebú se encontró en mayor frecuencia el genotipo heterocigoto AB ($p = 0,44$) al igual que en los animales con serología positiva a la enfermedad, donde se presentó una elevada frecuencia del genotipo heterocigoto AB ($p = 0,9$). Estos animales fueron incluidos como control positivo de animales susceptibles a *Brucella abortus*. Para este mismo polimorfismo SNP4 se encontró una alta frecuencia del alelo A en la raza cebú ($p = 0,57$), similar a lo encontrado en los animales infectados donde se presentaron ambos alelos a frecuencias similares ($p = 0,44$ y $p = 0,56$ para los alelos A y B respectivamente), mientras que el alelo B se encontró con mayor frecuencia en la raza blanco orejinegro ($p = 0,83$) (tabla 2).

Cabe resaltar que para el SNP6 se encontraron 6 alelos y 11 genotipos en la raza cebú y, 3 alelos y 4 genotipos en la raza blanco orejinegro. Dada la variedad de genotipos presentes en este polimorfismo y la muy baja frecuencia de muchos de ellos, se disminuyó el número de indivi-

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes SNP del gen Nramp1 en las razas blanco orejinegro y cebú, y animales cruzados (con serología positiva a *B. abortus*)

SNP	Blanco orejinegro					Cebú					Cruces				
	Genotipo			Alelo		Genotipo			Alelo		Genotipo			Alelo	
	AA	AB	AA	A	B	AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	A	B
SNP3	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,54	0,42	0,04	0,75	0,25	0,88	0,11	0,01	0,93	0,07
SNP4	0,03	0,27	0,70	0,17	0,83	0,35	0,44	0,21	0,57	0,43	0,00	0,90	0,10	0,44	0,56
SNP5	0,03	0,26	0,71	0,16	0,84	0,44	0,48	0,08	0,68	0,32	0,05	0,43	0,52	0,27	0,73
3'UTR	0,00	0,11	0,09	0,06	0,94	0,3	0,46	0,24	0,54	0,46	0,05	0,05	0,90	0,09	0,91

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP del gen Nramp1 para los animales clasificados como resistentes (R), susceptibles (S) a partir del desafío infeccioso e infectados (I), evaluados por títulos de anticuerpos anti *Brucella abortus*

SNP	Animales resistentes					Animales susceptibles					Animales infectados				
	Genotipo			Alelo		Genotipo			Alelo		Genotipo			Alelo	
	AA	AB	AA	A	B	AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	A	B
SNP3	0,95	0,05	0,00	0,98	0,02	0,86	0,13	0,01	0,92	0,08	0,88	0,11	0,01	0,93	0,07
SNP4	0,05	0,35	0,60	0,22	0,78	0,06	0,65	0,29	0,38	0,62	0,00	0,90	0,10	0,44	0,56
SNP5	0,06	0,39	0,55	0,25	0,75	0,12	0,37	0,51	0,30	0,70	0,05	0,43	0,52	0,27	0,73
3'UTR	0,00	0,26	0,74	0,13	0,87	0,08	0,12	0,80	0,14	0,86	0,05	0,05	0,90	0,09	0,91

duos por genotipo y por lo tanto la significancia estadística del modelo; razón por la cual se eliminaron del análisis que se presenta en esta investigación.

El marcador SNP3 no presentó variación en la raza blanco orejinegro, en la que solamente se presentó el alelo A, diferente a lo encontrado en los animales de la raza cebú, en la que se presentó el alelo B con una moderada frecuencia ($p = 0,25$). Por otra parte, el SNP5 presentó mayores frecuencias del alelo B en las razas blanco orejinegro y animales infectados ($p = 0,84$ y $0,73$ respectivamente), mientras que la raza cebú presentó en mayor frecuencia el alelo A ($p = 0,68$). Por último, el marcador 3'UTR presentó ambos alelos a frecuencias similares en la raza cebú, mientras que se encontró en alta frecuencia el alelo B en la raza blanco orejinegro y en los animales infectados.

Los animales se agruparon por su clasificación como susceptibles o resistentes -según su capacidad para controlar la replicación bacteriana intrafagosomal- o como infectados -según la presencia de títulos de anticuerpos anti *Brucella abortus* que indica que son animales persistentemente infectados, por lo que se catalogaron como animales control susceptibles-. Cuando los animales se agruparon por su clasificación, se encontró en los catalogados como resistentes, una alta frecuencia del genotipo AA en la variante SNP3 ($p = 0,95$), y muy baja frecuencia en el genotipo heterocigoto AB ($p = 0,05$); no se presentó el genotipo BB. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las frecuencias genotípicas encontradas en los animales susceptibles, resistentes o infectados. El SNP4 presentó una alta frecuencia del genotipo BB en animales resistentes ($p = 0,60$); y bajas frecuencias tanto en los susceptibles ($p = 0,29$) como en los animales infectados ($p = 0,10$), con diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). En el marcador SNP5 se presentaron los tres genotipos en frecuencias similares y sin diferencias significativas entre grupos ($p > 0,05$). En el marcador 3'UTR tampoco se presentaron diferencias significativas, en el que el genotipo homocigoto BB presentó mayor frecuencia para animales resistentes, susceptibles e infectados ($p = 0,74$, $p = 0,80$ y $p = 0,90$, respectivamente) (tabla 3).

En la tabla 4 se presentan los estimados para las variables independientes y la significancia de los coeficientes del modelo, donde se encuentra que solamente el coeficiente para SNP4 tiene un efecto significativo ($p = 0,0506$) sobre el cálculo de estimación de la variable respuesta, que es la probabilidad de que el animal sea susceptible. Las otras variantes del gen evaluadas no presentaron un efecto significativo ($p > 0,05$). En este caso, la variante 3'UTR aparece con un valor de probabilidad no significativo ($p = 0,2840$).

Tabla 4. Estimadores para las variables independientes en un análisis de regresión logística donde se determina el efecto de variantes SNP sobre la probabilidad de clasificación de un animal como resistente o susceptible

Parámetro	Estimación	Error estándar	Ji cuadrado	Valor de p
Intercepto	7,0081	13,0073	0,2903	0,5900
Grupo racial	0,3005	0,040	4,0717	0,3024
SNP3	-0,8405	1,1289	0,5544	0,4565
SNP4	0,1005	0,0540	3,4717	0,0506
SNP5	0,000922	0,0575	0,0003	0,9872
3'UTR	-0,0682	0,0637	1,1477	0,2840

Las frecuencias genotípicas encontradas en el SNP4 fueron significativamente diferentes entre animales clasificados por su capacidad de control de la sobrevivencia bacteriana. Se identificaron 20 individuos como resistentes (determinados por sus valores de sobrevivencia bacteriana menor a 10, valores no presentados), en los cuales el genotipo homocigoto BB presentó la mayor frecuencia ($p = 0,60$). Como susceptibles se identificaron 69 individuos (determinados por sus valores de sobrevivencia mayores a 10). Los animales con un estado sanitario positivo a la infección por *Brucella abortus* se tomaron como controles positivos de animales susceptibles; en éstos, el genotipo heterocigoto AB se encontró con mayor frecuencia ($p = 0,65$) y el genotipo homocigoto BB, en menor frecuencia ($p = 0,29$). La frecuencia del genotipo homocigoto AA es muy baja en general. La frecuencia del alelo A en animales resistentes es de 0,22 y la de los susceptibles de 0,38,

en contraste con las superiores encontradas en el alelo B (0,78 y 0,62 respectivamente). Lo anterior se debe a que el muestreo inicialmente se realizó al azar y que para el análisis posterior los individuos se agruparon por su fenotipo de resistencia o susceptibilidad. En el caso de animales que presentaron seropositividad a la infección no se encontraron animales con genotipo AA, pero debido a que se presentó alta frecuencia del genotipo heterocigoto AB, las frecuencias de ambos alelos fueron similares.

DISCUSIÓN

El gen *Nramp1* es uno de los principales candidatos para resistencia natural a brucelosis en bovinos (Templeton *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 1996; Horin *et al.*, 1999; Barthel *et al.*, 2001) y búfalos (Borriello *et al.*, 2006; Capparelli *et al.*, 2007). En este gen se han encontrado variaciones tipo microsatélite (Horin *et al.*, 1999) y polimorfismos tipo SNP en regiones codificantes y no codificantes (Ables *et al.*, 2002; Coussens *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2008a), por esto es interesante encontrar posibles asociaciones entre las variaciones presentes en el gen y la resistencia a enfermedades.

En esta investigación se encontró efecto significativo del marcador SNP 4 sobre la variable respuesta que es la resistencia o susceptibilidad a *Brucella abortus* ($p = 0,0506$). Este polimorfismo reportado inicialmente por Martínez y colaboradores (2008a) corresponde a un cambio de una guanina por una adenina en el exón 10 del gen, que provoca en la proteína un cambio de ácido aspártico por asparagina; esta variante también se ha encontrado en otras especies como *Ovis aries*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* (Martínez *et al.*, 2008a), por lo que podría tratarse de la mutación que explicaría la capacidad del macrófago para controlar la replicación de la bacteria. Los presentes resultados coinciden con lo reportado por Martínez y colaboradores (2008b), quienes encontraron una asociación significativa entre el marcador SNP4 y el control de la sobrevivencia bacteriana in vitro.

No se encontró efecto significativo de las otras variantes del gen *Nramp1* con el estado sanitario de los animales, entre ellas la variante correspondiente a la región 3'UTR, lo que coincide con los trabajos publicados por Kumar y colaboradores (2005) y Paixao y colaboradores (2007), quienes reportan que el alelo GT/13 de la región 3'UTR no proporciona suficiente evidencia de resistencia a la brucelosis incluso en condiciones de homocigosis. Sin embargo, los resultados obtenidos por Barthel y colaboradores (2001) demuestran que esta variante presente en esta región 3'UTR afecta críticamente la expresión del gen y, por lo tanto, la replicación intrafagosomal de la bacteria. Además, recientemente Boriello y colaboradores

(2006) y Caparelli y colaboradores (2007) encontraron un efecto significativo del marcador sobre la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad en una población de búfalos. Frente a estas diferencias es importante tener en cuenta que la estructura de la variante GT/n presente en los búfalos difiere de la encontrada en los bovinos, por lo cual fue necesario extender el estudio a otras regiones del gen que podrían afectar la estructura de la proteína y por ende su funcionalidad.

La variante denominada SNP4 también presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) en las frecuencias genotípicas entre animales resistentes y susceptibles evaluados por desafío infeccioso in vitro, así como también de animales con títulos de anticuerpos anti *Brucella abortus*; encontrándose en mayor frecuencia el genotipo homocigoto (BB) en animales resistentes y el genotipo heterocigoto (AB) en animales susceptibles o infectados. Para esta misma variante SNP, Martínez (2008) encontró asociación significativa con el nivel de expresión del gen que codifica para la citoquina del factor de necrosis tumoral α (TNF α), la cual está relacionada con la apoptosis de macrófagos infectados, mediante la activación de la ruta las caspasas (Male, 2003) y éste es uno de los principales mecanismos de la defensa contra la brucelosis en bovinos (Wyckoff, 2002).

Los resultados muestran que en el SNP4 el genotipo BB se presenta en mayor frecuencia en la raza blanco orejinegro; y en todas las poblaciones se encontró baja frecuencia del genotipo AA, posiblemente debido a problemas de muestreo de la población de estudio. Martínez y colaboradores (2005, 2008b), reportaron mayor control de la sobrevivencia bacteriana en la raza blanco orejinegro en comparación con la raza cebú después de aplicar la metodología desafío infeccioso in vitro, una alta frecuencia del genotipo BB, lo cual estaría de acuerdo con lo encontrado en la presente investigación. Este resultado podría estar afectado por las frecuencias alélicas encontradas en cada raza y se requeriría de estudios adicionales para comprobar estos hallazgos.

Estas diferencias pueden ser argumentadas desde lo publicado por Paixao y colaboradores (2005) quienes involucran el término presión selectiva como factor que puede garantizar la posibilidad de encontrar alelos asociados a resistencia en razas no especializadas. Como es el caso del ganado blanco orejinegro, que para este carácter es una raza que no ha sido sometida a procesos de selección fuertes por el hombre (López *et al.*, 2001).

Adicionalmente en este trabajo se encontró una mayor variabilidad para el SNP6 (11 genotipos y 6 alelos en la raza cebú y 4 genotipos y 3 alelos en la raza blanco ore-

jinegro). Esta diversidad genotípica es mayor a la reportada previamente por Martínez y colaboradores (2008b), quienes encontraron sólo un genotipo homocigoto para la raza blanco orejinegro y tres genotipos heterocigotos para la raza cebú. Por lo tanto, se recomienda explorar una población más grande de individuos para encontrar una distribución uniforme de los genotipos y obtener la secuencia de las variantes polimórficas de este fragmento para confirmar lo hallado en la presente investigación.

CONCLUSIONES

Se encontró efecto significativo de los genotipos para el marcador SNP4, con el estado de resistencia o susceptibilidad y un genotipo predominante en los animales infectados; para este polimorfismo se detectó mayor frecuencia del genotipo homocigoto (BB) en animales blanco orejine-

gro, y mayor frecuencia del genotipo heterocigoto (AB) en animales cebú y animales detectados como infectados evaluados por niveles de anticuerpos anti *Brucella abortus*. Este polimorfismo también muestra diferencias considerables en el desafío infeccioso in vitro, presentándose en mayor frecuencia el genotipo BB en animales resistentes y el genotipo AB en animales susceptibles.

No se encontró efecto significativo de la región 3'UTR con resistencia a la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Colciencias por el apoyo financiero, según proyecto 201-2005 y al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, por el aporte de sueros positivos a brucelosis.

REFERENCIAS

- Ables P, Takamatsu D, Noma H, Shazly S, Jin H, Taniguchi T, Sekikawa K, Watanabe T. 2001. The roles of Nramp1 and Trfa genes in nitric oxide production and their effect on the growth of *Salmonella typhimurium* in macrophages from Nramp1 congenic and tumor necrosis factor- mice. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 21(1):53-62.
- Ables P, Nishibori M, Kanemaki M, Watanabe T. 2002. Sequence analysis of the Nramp1 genes from different bovine and buffalo breeds. *Journal of Veterinary Medical Science* 64(11):1081-1083.
- Barthel R, Feng J, Piedrahíta J, MacMurray D, Templeton J, Adams G. 2001. Stable transfection of the bovine Nramp1 Gene into murine RAW264.7 Cells: effects on *Brucella abortus* survival. *Infection and immunity* 69(5): 3110-3119.
- Bellamy R. 1999. The natural resistance- associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes and Infection* 1(1): 23-27.
- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, Ercolini D, Parisi A, Roperto S, Iannelli D. 2006. Genetic resistance to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity* 74(4):2115-2120.
- Barroso A, Dunner S, Cañón J. (1997) Use of a single strand conformation polymorphism analysis to perform a simple genotyping of bovine k-casein A and B Variants. *Journal of Dairy Research* 64(4): 535-540.
- Capparelli R, Alfano R, Grazia M, Borriello G, Fenizia D, Bianco A, Roperto S, Roperto F, Iannelli D. 2007. Protective Effect of the Nramp1 BB Genotype against *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and immunity* 75(2): 988-996.
- Coussens M, Coussens J, Tooker B, Nobis W. 2004. Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (Nramp 1) gene and identification of a novel polymorphism. *DNA Sequence* 15(1): 15-25.
- Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW. 1996. Bovine natural resistance associated macrophage protein (Nramp1) gene. *Genome Research*. 6: 956-964.
- Gruneheid S, Pinner E., Desjardins M., Gross P. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The SLC11A1 protein is a recruit to the membrane of phagosome. *Journal of Experimental Medicine* 185(4): 717-730.
- Horin P, Rychlik I, Templeton JW, Adams GL. 1999. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *European Journal of Immunogenetics* 26:311-313.
- Harmon BG, Adams LG, Templeton JW, Smith R. 1989. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research*. 50(4): 459-465.
- ICA. Grupo de Control y Erradicación de Riesgos Zoonosarios. 2002. Boletín divulgativo.
- Kumar N, Mitra A, Ganguly I, Singh R, Deb S, Srivastava K, Sharma A. 2005. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)13 microsatellite allele at 3'UTR of Nramp1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*) cattle. *Veterinary Microbiology* 111(1-2): 139-143.
- Lehman E. 1974. *Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks*. San Francisco, Holden-Day, 457 p.
- López A, Saldarriaga O, Ossa Jorge, Arango A. 2001. Ganado blanco orejinegro: una alternativa para la producción en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 14(2): 119-126.
- Male M. 2003. *Infectious Diseases. Immunology* 3. Open University Worldwide Eds. New York. pp. 149.
- Martínez R, Toro R, Montoya M, Burbano M, Tobón J, Gallego J, Ariza F. 2005. Evaluación Genética para resistencia a brucelosis en ganado criollo colombiano blanco orejinegro. *Archivos de Zootecnia* 54(206-207): 333-340.
- Martínez R, Dunner S, Barrera G, Cañón J. 2008 a. Identificación de polimorfismos en la región codificante del gen Nramp1 en varias razas de ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*.125: 57-62.
- Martínez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J, Dunner S, Cañón J. 2008 b. Bovine SLC11A1 3'UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *Journal of Animal Breeding and Genetics*... 125(4): 1-9.
- Martínez R. 2008. Resistencia genética a brucelosis en ganado bovino criollo colombiano blanco orejinegro y cebú brahman. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Programa de doctorado.
- Paixao T, Ferreira C, Borges A, Oliveira D, Lage A, Santos R. 2005. Frequency of bovine Nramp1 alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109(1-2): 37-42.
- Paixao T, Poester F, Carvalho A, Borges A, Lage A, Santos R. 2007. Nramp1 3 Untranslated Region Polymorphisms Are Not Associated with Natural Resistance to *Brucella abortus* in Cattle. *Infection and Immunity* 75(5): 2493-2499.
- Price RE, Templeton JW, Smith R, Adams LG. 1990. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity* 58(4): 879-886.
- Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. 1996. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* serovar Dublin, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 50:55-65
- Rodríguez EF, Crespo F. 2002. La brucelosis. En: *Zoonosis, II Curso sobre enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre*. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, España, pp. 437-510.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold spring Harbor Laboratory Press. P 917.
- Templeton JW, Estes DM, Price RE, Smith R, Adams G. 1990. Immunogenetics of natural resistance to bovine brucellosis. *Proceedings of the 4th world congress on genetics applied to livestock production*, Edinburgh, 23-27 July 1990.
- Vidal S, Gros P, Skamene E. 1995. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/ity/Lsh locus. *Journal of Leukocyte Biology*. 58: 382-390.
- Wyckoff JH. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 90(1): 395-415.
- Wigley P. 2004. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. *Research in Veterinary Science* 76(3): 165-169.