



ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis del polimorfismo del gen *NRAMP 1* y susceptibilidad genética a tuberculosis en población de Coyopolan, municipio de Ixhuacán de los Reyes

Polymorphism analysis of *NRAMP 1* gen and genetic susceptibility to tuberculosis in Coyopolan municipio de Ixhuacan de los Reyes population

Jesús Antonio Lara Reyes, Salvador Contreras Huerta, Emilio Gamboa Flores,
Alma Clementina Andrade Bonilla, Sandra López Huerta,
Dolores Carranza González, Armando Méndez Pérez
Laboratorio de Patología Experimental, Facultad de Medicina Zona Xalapa
Universidad Veracruzana

Lara-Reyes JA, Contreras-Huerta S, Gamboa-Flores E, Andrade-Bonilla AC,
López-Huerta S, Carranza-González D, Méndez- Pérez A.

Análisis del polimorfismo del gen *NRAMP 1* y susceptibilidad genética a tuberculosis
en población de Coyopolan, municipio de Ixhuacán de los Reyes
Rev Med UV 2008; 8(1): 14-18.

RESUMEN

Existen observaciones que sugieren un papel significativo de factores genéticos en la resistencia innata a infección por *Mycobacterium Tuberculosis*. Los grupos humanos que se han caracterizado por resistencia a la enfermedad tienen en común su origen en poblaciones cuyos ancestros habitaron lugares densamente poblados y ciudades con brotes epidémicos de tuberculosis, como Europa Occidental, donde se piensa que la tuberculosis se originó. Las poblaciones con mayor susceptibilidad tienen su origen habitualmente en culturas que no refirieron anteriormente prevalencia de tuberculosis como las poblaciones prehispánicas, de acuerdo con la teoría de susceptibilidad genética. El grupo de estudio para el análisis de polimorfismo del gen *NRAMP 1* elegido es de Coyopolan, Municipio de Ixhuacán de los Reyes, Veracruz. Son 22 pacientes y 24 contactos familiares. El estudio del polimorfismo del exón 8

del gen *NRAMP 1* en esta población tiene la finalidad de demostrar si este gen es importante en la resistencia al inducir la capacidad bactericida del macrófago que se encuentra en los alvéolos pulmonares y granulomas.

Palabras clave: *NRAMP 1*, polimorfismo, primer, latencia, Coyopolan.

ABSTRACT

There are observations that suggest a significant role of genetic factors in innate resistance to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. What the human groups characterized by resistance to the disease have in common is that their ancestors lived in densely populated areas and cities with rife tuberculosis, as was true in Western Europe, where tuberculosis probably began. The populations with the highest susceptibility are those

Recibido 15/10/2007 - Aceptado 12/06/2008

whose origins are prehispanic cultures, which were once free of tuberculosis. Using this theory of genetics susceptibility, the analysis group for the study of polymorphism of NRAMP 1 gene is a group from Coyopolan, community in the County of Ixhuacán of the Reyes, Veracruz. The group consists of 22 patients with the progressive disease and 24 family contact samples. The study of polymorphism of the exon 8 from NRAMP 1 gene in this population is important. It has the finality of demonstrating if this gene is important in the resistance of the bactericide capacity of the pulmonary alveolar and granulomas macrophages.

Key words: NRAMP 1, polymorphism, primer, latency, Coyopolan.

INTRODUCCIÓN

El hábitat natural de *Mycobacterium tuberculosis* son los macrófagos alveolares. Después de la fagocitosis del bacilo por las células responsables, el *Mycobacterium tuberculosis* se aloja en vacuolas, que muestran resistencia para fusionarse a lisosomas correspondiendo a un fenotipo no fusogenico. Este último proceso condiciona la viabilidad y persistencia del microorganismo¹. Los factores involucrados en el fenómeno de adherencia se han identificado como receptores inductores del sistema inmune-innato; entre estas proteínas se encuentran "Toll" 2 y 4, ubicados tranmuralmente en la membrana celular del macrófago y esfingolípidos capsulares del bacilo.

La acidificación del fagosoma es un signo de maduración del eje funcional endosoma-lisosoma; en la fase temprana, el pH es de 6, y en la fase tardía desciende su pH a 5. Este proceso resulta del depósito de protones en las vacuolas endosomales tempranos y tardíos, asociado a liberación de Na, K, y ATPasa. El fagosoma que alberga al *Mycobacterium* muestra un pH de 6-6.5² con menor pH que los lisosomas. La alteración en la capacidad de acidificar normalmente el complejo fagosoma-lisosoma es probablemente el fundamento de la permisividad del huésped aunado a la presencia de Na, K y ATPasa en el interior del fagolisosoma que alberga al microorganismo.

Skaemene³ describió bases genéticas de resistencia a tuberculosis en el brazo largo del cromosoma 2,35 humano habiendo descrito previamente su homólogo en el Cromosoma 1 del ratón, y lo denominó gen de resistencia

bcg (NRAMP 1), que se expresa en macrófagos. Crowle y Elkins⁴, *In Vitro*, demostraron que los macrófagos provenientes de gente de raza blanca permitieron una lenta replicación de *Mycobacterium tuberculosis* en su interior, mientras que macrófagos provenientes de individuos de raza negra y aborígenes canadienses mostraron una alta replicación del bacilo y un patrón de expresión de HLA-DR de resistencia a tuberculosis en 70% de macrófagos provenientes de raza blanca y 30% de raza negra y nativo canadienses. Bajo estas premisas, se considera que la resistencia a enfermedades infecciosas se fundamenta en fenómenos biológicos implícitos en una selección natural que favorece la sobrevivencia de individuos genéticamente seleccionados. De manera biológicamente significativa, se aprecia resistencia vinculada con evidencias prehistóricas examinadas por medio estudios de biología molecular de prevalencia de tuberculosis en lugares de alta población de Europa occidental y Norte de África y ausencia en poblaciones del África Shariana y culturas nativas de Latinoamérica donde se refleja la prevalencia actual que es de 95% en relación con 5% en Europa Occidental, lo cual indica, un fenómeno biológicamente evolutivo que condiciona una selección natural⁵.

NRAMP 1 es expresado exclusivamente en macrófagos; se encuentra localizado y es reclutado a su membrana fagosoma-lisosomal, y permanece en esa localización⁶. NRAMP 1 funciona como un transportador de cationes pH dependiente; indispensables estos cationes divalentes son indispensables para la función bactericida del macrófago y su función como cofactor enzimático inducción de la explosión oxidativa, y en la reacción de Fenton que contribuye a la defensa en contra de infecciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 22 pacientes con tuberculosis pulmonar progresiva y 24 contactos familiares con prolongada convivencia con los enfermos y libres de sintomatología de origen mestizo en Coyopolan y 9 comunidades rurales del Municipio de Ixhuacán los Reyes, localizado a 45 kilómetros de la ciudad de Xalapa con una altitud de 1800 metros sobre el nivel del mar. La realización del estudio fue con consentimiento aprobado y firmado por los pacientes. El diagnóstico de cada uno de los pacientes

fue hecho en razón de su sintomatología, evidencia radiológica de tuberculosis pulmonar, baciloscopia con tinción de Ziehl-Neelsen y técnica de PCR múltiple en sangre y esputo con obtención y amplificación de DNA con DNAzol.

El DNA genómico se aisló con técnica de DNAzol de leucocitos de sangre periférica de pacientes y contactos; posteriormente fue amplificada la región génica NRAMP 1 por reacción en cadena de la polimerasa, genotipificando de la región 823 C/T una delección de TGTG D543N por medio de polimorfismo de NRAMP 1.

El polimorfismo en 823C/T fue definido por una mutación puntual en el codón 249 exón 8 (GCC por GGT) codificando glycina. Para amplificar la región⁷ se utilizaron los siguientes primers: sentido 5' - CTT GTC CTG ACC AGG CTC CT-3' antisentido 5' CAT GGC TCC GAC TGA GTC AG-3'.

Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera: se utilizaron los reactivos 20mM de Tris, pH 8.4, 60mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.4 dNTPs (Giba), BRL, 0.1µM de cada primer y 100 nanogramos de DNA genómico y 1U de Taq.

Polimerasa (Gibco) en 25µM de reacción mixta. La reacción en cadena de la polimerasa se efectuó en un termociclador programable marca APOLLO The Source. Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: paso de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos y 30 ciclos a 94°C por 30"; se continuó con alineamiento de la cadena a 63°C por 30 ciclos y 72°C por 30 ciclos; posteriormente se efectuó un paso final de extensión de la cadena a 72°C por 2 minutos.

El producto amplificado (234 pb) se analizó en electroforesis en gel de agarosa a 1.5%; posteriormente, 5 µl del producto de PCR fue digerido, con 5 unidades de enzima NarI (Gibco BRL) a 37°C por 3 horas en solución buffer en un volumen total de 20 µl. Los fragmentos de la cadena fueron revisados en gel de agarosa a 2%.

El gel se corrió a 80V, por 35 minutos. Se obtuvo la presencia de homocigotos al alelo normal mediante la visualización de fragmentos de 135 y 99 pares de bases; de la misma manera se encontró heterocigotos con mutación puntual equivalente a 234, 135 y 99 pares de bases, y homocigotos 234 con mutación puntual en 823 C/T exón 8 de NRAMP 1.

RESULTADOS

El análisis del polimorfismo del gen NRAMP 823C/T por RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) no mostró una desviación estadística representativa en el genotipo entre contactos y pacientes correspondiente a heterocigotos C/T; no obstante, sí existe una discreta tendencia exacerbada hacia un leve incremento en pacientes con tuberculosis pulmonar en relación con testigos; sin embargo, en homocigotos con mutación puntual T/T se evidenció en uno de los contactos y no fue expresado en ninguno de los pacientes con tuberculosis progresiva. Cabe señalar que estos resultados no son estadísticamente significativos como un determinante genético para desarrollar la enfermedad. Probablemente debido a que el testigo T/T está libre de latencia a tuberculosis.

Imágenes de la amplificación por PCR de la región 249, exon 8.

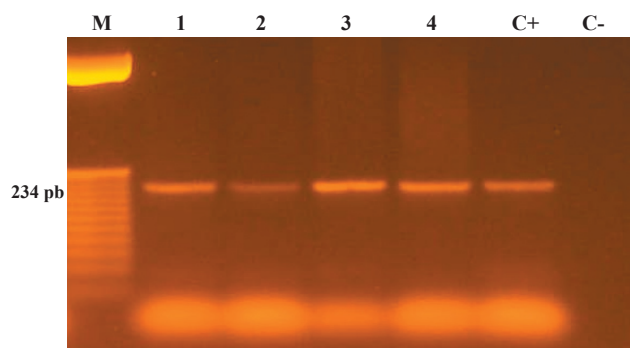


Figura 1. Amplificación por PCR de la región 249, exon 8, en controles sanos. Se observa un producto de 234 pb en gel de agarosa al 2%. M = marcador de peso molecular. C+ = control positivo. C- = control negativo

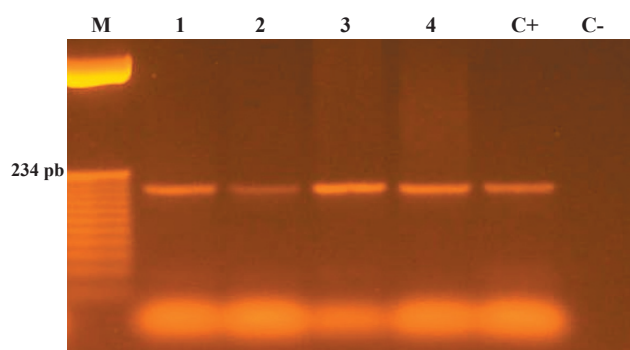
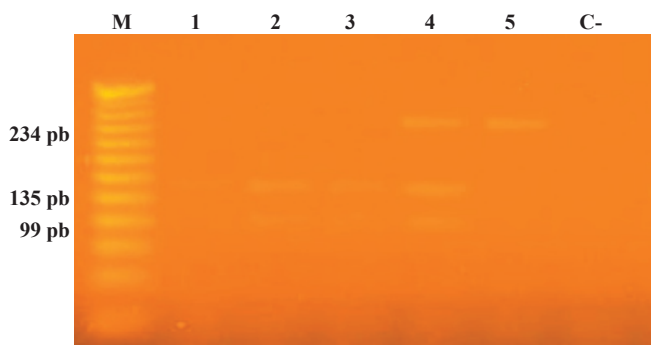
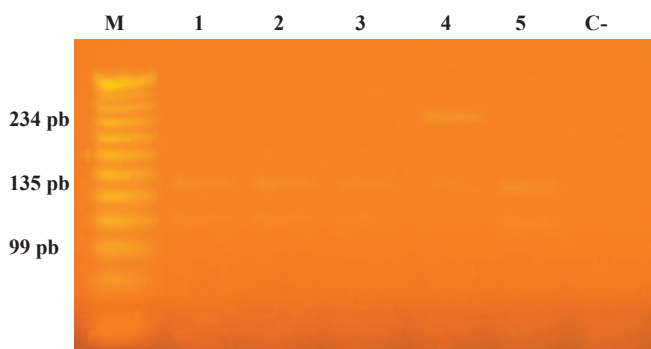


Figura 2. Amplificación por PCR de la región 249, exon 8, en pacientes con tuberculosis. Se observa un producto de 234 pb en gel de agarosa al 2%, M = marcador de peso molecular. C+ = control positivo. C- = control negativo

Imágenes del polimorfismo NRAMP1 – 823 C/T.



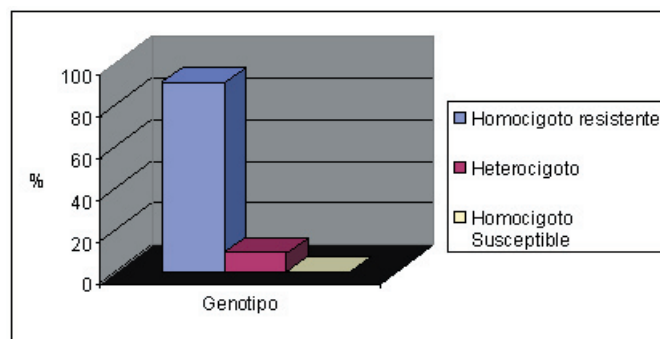
Genotipificación para NRAMP1 – 823 C/T por PCR-RFLP en controles. Las muestras se amplificaron por PCR y fueron sometidas a restricción enzimática con Nar I (M = marcador de peso molecular. En las líneas 1, 2 y 3 se pueden observar homocigotos para el alelo resistente (135 y 99 pb), en la línea 4 un heterocigoto (234, 135 y 99 pb) y en la línea 5 un homocigoto para el alelo susceptible (234 pb). C- = control negativo.)



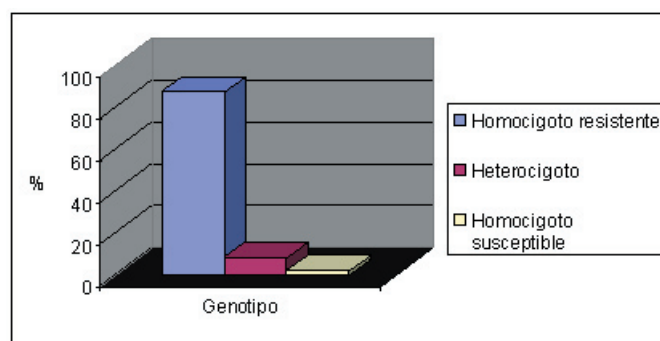
Genotipificación para NRAMP1 – 823 C/T por PCR-RFLP en pacientes con tuberculosis. Las muestras se amplificaron por PCR y fueron sometidas a restricción enzimática con Nar I (M = marcador de peso molecular. En las líneas 1, 2, 3 y 5 se pueden observar homocigotos para el alelo resistente (135 y 99 pb), en la línea 4 un heterocigoto (234, 135 y 99 pb). C- = control negativo.)

Tabla 1. Frecuencias del genotipo NRAMP 1 -823 C/T y su polimorfismo en 22 pacientes con tuberculosis pulmonar y en 24 contactos familiares.		
Variante del genotipo de NRAMP 1	Porcentaje de la frecuencia de genotipos	
	Control (n = 24)	Tuberculosis pulmonar (n = 22)
823 C/T		
C/C	87.5 (21)	90.9 (20)
C/T	8.33 (2)	9.1 (2)
T/T	1.85 (1)	0 (0)

n = sujetos estudiados (el número entre paréntesis representa los sujetos positivos para determinado genotipo)
C/C = homocigoto alelos resistentes
C/T = heterocigoto
T/T = homocigoto alelos susceptibles



Grafica 3. Genotipo de NRAMP1 823 C/T en pacientes con Tuberculosis pulmonar por RFLP.



Grafica 4. Genotipo de NRAMP1 823 C/T en controles sanos por RFLP.

DISCUSIÓN

El análisis subcelular de NRAMP 1 fue identificada como una proteína de membrana altamente hidrofóbica, cuya expresión es exclusivamente identificada en lisosomas en fase temprana y endosomas en fase tardía por inmunofluorescencia con un marcador LAMP 1⁷ NRAMP 1 es reclutado en fagosomas maduros. Estos resultados sugieren que durante la fagocitosis del bacilo y maduración del fagosoma NRAMP 1 se encuentra unido íntimamente en la membrana fagosomal, de manera que NRAMP 1 es inmediatamente reclutado después de su transcripción hacia el compartimento endosomal-lisosomal tardío en membranas de fagosomas, cuando en estos organelos se encuentran bacilos vivos o partículas inertes. La función NRAMP 1 toda vez que se ubica en posición transmembrana, es inducida por LPS bacilares, y el mediador más importante en este caso es IFN gamma⁸ en una polarización Th1. Esta respuesta del huésped significa inmunocompetencia y no permisividad a *Mycobacterium tuberculosis*.

De acuerdo con la inmunocinética encontrada en la muestra de pacientes y contactos, una polarización Th2 mediada por IL 4, la cual se encuentra en concentraciones

sumamente altas, desactiva la función Th1, antagoniza y deprime la síntesis de INF gamma, y por ende inhibe la transcripción y síntesis de NRAMP 1 aun cuando no existe mutación puntual c/T substitución (gly por asp) en la posición 823 de la proteína⁹; es decir el gen puede ser normal. Existen dos mecanismos para restaurar la resistencia a infección por *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰ una transferencia transgénica del alelo normal (gly 823) en presencia de linfocitos Th 1 activados y con síntesis normal de INF gamma en NRAMP 1 mutado (asp 823); esta sobre expresión elimina la permisividad del huésped a la replicación del bacilo asociado a la activación de la explosión oxidativa y la síntesis de ON en la reacción de Fenton que otorga la función bactericida al macrófago, donde por organotropismo natural se aloja el *Mycobacterium tuberculosis*.

Es importante resaltar que en presencia de polarización Th2 y concentraciones muy altas de IL4 asociado a decremento de INF gamma, el gen NRAMP 1 normal deja de cumplir con su función de no permisividad a enfermedades intracelulares del tipo tuberculosis pulmonar o de alguna otra expresión clínica del mismo agente.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ClemensDC; Horwitz MA. Characterization of the mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp. Med.* 1995; 181(1):257-270.
- 2.- Sturgill-Koszycki S; Schlesinger PH; Chakraborty P, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATPase Science 1994 ;263 (5147):678-681.
- 3.- Malo D; Schurr E; Eptein DJ; Vekemans M; Skamene E; Gross P. Genetic maps indicates that the host resistance locus bcg is located within a group of cytoskeleton –associated protein genes that include Villin and Desmin. *GENOMICS* 1991, 10:356-64.
- 4.-Crwle AJ; Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immun* 1990; 58: 632-5.
- 5.- Brothwell D; Sandison AT. Diseases in antiquity. “A survey of the diseases”. *Injuries and surgery of early population*. Springfield Illinois. Charles Thomas 1996; 7: 115-31, 249-71.
- 6.- Searle S; Bright NA; Roach TI, et al. Localisation of Nramp 1 in macrophages modulation with activation and infection *J. Cell Sci* 1998 111 (Pt 19: 2855-2866.
- 7.- Brown DH; Miles BA; Zwilling BS. Growth of mycobacterium tuberculosis in BCG resistant and susceptible mice. Establishment of latency and reactivation. *Infect and immune* 1995; 63(6) 2243-2247.
- 8.- Govoni G ; Gauthier S; Billia F. et al. Cell –specific and inducible Nramp 1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *L leuko Biol* 1997: 62:277’86.
- 9.- Malo D; Vogan K; Vidal S. et al. Haplotype Mapping and sequence analysis of the Mouse NRAMP gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites *Genomics* 1994: 23: 51-61.
- 10.- Govoni G; Vidal S; Gauthier S. et al. The bcg/Ity/lash locus genetic transfer of resistance to infection in C57BL6 mice transgenic for the NRAMP gly 169 allele. *Infect Immun.* 1999; 67: 2923-9.