

**Descripción de polimorfismos en los genes Casp-I e IL-7R
asociados a infecciones por *Rhodococcus equi* en équidos
Criollos Colombianos en el Valle de Aburrá**

**Description of polymorphisms in Casp-I and IL-7R genes
associated with *Rhodococcus equi* infection in Colombian
Creole equids in Valle de Aburrá**

Laura María Ramírez Posada¹, MVZ, (e) MSc; Francisco José Valencia Alaix^{2*},
Zoot, MSc; Janeth Pérez García¹, MV, MSc.

¹ Grupo INCA-CES, línea de investigación en farmacología y farmacogenética,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES.

^{2*} Laboratorio IAGEN S.A.S, área de investigación en genómica aplicada,
Carrera 60 No 83^a Sur 161, La Estrella, Antioquia, Colombia. E-mail:
fracovalaix@gmail.com

Resumen

El *Rhodococcus equi* es un microorganismo intracelular, Gram-positivo que causa neumonías en potros entre uno y seis meses de edad cuando la inmunidad derivada de la madre ha empezado a desaparecer. La falta de identificación de la susceptibilidad genética que pueden presentar los potros a este microorganismo, contribuye a un problema para la selección de individuos en la industria equina colombiana, trayendo consigo una alta mortalidad y por ende considerables pérdidas económicas. El objetivo de este estudio fue describir polimorfismos en 12 équidos Criollos Colombianos en el Valle de Aburrá, en los genes Casp-I e IL-7R asociados en estudios previos a infecciones por *Rhodococcus equi*, a través de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de secuencias en 12 potros. Mediante análisis bioinformático se identificó para el gen Casp-I un fragmento de inserción en dos de los potros, y para el gen IL-7R seis polimorfismos de nucleótido simple,

describiendo la presencia de variaciones en estos dos genes en los Équidos Criollo Colombiano.

Palabras clave: Bioinformática, PCR, respuesta inmune, susceptibilidad genética.

Abstract

Rhodococcus equi is an intracellular, Gram-positive microorganism that causes pneumonia in foals between one and six months of age when maternal derived immunity has begun to disappear. The failure to identify genetic susceptibility that may occur in foals to this organism, constitutes a problem for the selection of individuals in the Colombian equine industry, bringing high mortality and therefore considerable economic losses. The aim of this study was to describe polymorphisms in 12 Colombian Creole equids in Valle de Aburrá, in Casp-I and IL-7R genes associated with *Rhodococcus equi* infections in previous studies, through polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis in 12 foals. Through bioinformatic analyses an insert fragment in two foals was identified for the Casp-I gene, and for the IL-7R gene six single nucleotide polymorphisms, describing the presence of variations in this two genes in Colombian Creole Equids.

Key words: Bioinformatics, PCR, immune response, genetic susceptibility.

Introducción

Las enfermedades se relacionan de una forma u otra con los genes. La información codificada por ellos es tan crítica que el cambio en un sólo nucleótido (mutación puntual) del ADN (Ácido Desoxirribonucleico), puede ser suficiente para desencadenar enfermedades hereditarias, afectar la susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas y la vulnerabilidad de los individuos a padecerlas crónicamente (1). Es por ello que pequeñas variaciones en genes específicos de la respuesta inmune, podrían tener un impacto importante en la patogénesis de una enfermedad y en las respuestas posteriores a ésta (2), incluso bajo condiciones ambientales diferentes.

Las mutaciones que generan variaciones genéticas, alterando el riesgo de ocurrencia de una enfermedad infecciosa, se conocen como genes de susceptibilidad/resistencia. Dichos genes se manifiestan con mayor frecuencia en individuos emparentados e influyen la edad de ocurrencia y/o la progresión de la enfermedad o ayudan a proteger contra esta (1).

El *Rhodococcus equi* es un cocobacilo pleomórfico, Gram-positivo, aerobio intracelular facultativo, del orden *Actinomycetales* (3); capaz de multiplicarse y destruir los macrófagos impidiendo, de esta forma, la fusión con los lisosomas fagocitarios (4). Es una bacteria cosmopolita, oportunista de distribución mundial, habitante normal del suelo y de las heces de los herbívoros en general (5). Existen cepas patógenas y no patógenas, las primeras asociadas a la presencia de proteínas codificadas por un plásmido relacionado con la virulencia (VapA), del cual carecen las cepas no patógenas (4).

Este microorganismo se localiza principalmente en el tejido pulmonar y es una de las principales causas de neumonía en potros entre el primer y sexto mes de vida, cuando la inmunidad derivada de la madre ha empezado a desaparecer (4).

En potros se han observado variaciones individuales en la susceptibilidad genética a desarrollar la enfermedad clínica, que han sido asociadas con el uso de microsatélites a genes relacionados con la inmunidad como la Caspasa-I (Casp-I) y el receptor de la interleucina-7 (IL-7R), que juegan un papel importante en la activación de citoquinas, linfocitos T y de apoptosis (6,7,8).

La Caspasa-I, es una proteasa de cisteína, que desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios y en apoptosis, siendo responsable de la maduración de la pro-interleucina 1 β y de la pro-interleucina 18 a sus formas pro-inflamatorias y biológicamente activas (9); también actúa en la inactivación de precursores de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y en el factor de necrosis tumoral (TNF-) para producir la activación de citoquinas (7,10).

La IL-1 está asociada a varias reacciones inmunes, incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la infección, mientras que la IL-18 es importante para la producción de interferón gamma (IFN- γ) y la amplificación de la actividad citolítica de las células asesinas naturales (9). Estos procesos se requieren para la eliminación de la infección por *Rhodococcus equi* debido a su naturaleza intracelular dentro de los macrófagos (11).

El gen de Casp-I se encuentra localizado en el cromosoma equino (*Equus caballus*) siete, tiene un tamaño de 1218 pares de bases (pb) y una longitud de 405 aminoácidos, la cual cuenta con una similitud del 72% y del 68% con la del humano y la del ratón respectivamente (7).

El receptor de la interleucina-7 (IL-7R) es un heterodímero formado por la cadena alfa (IL-7R α) y por la cadena gamma común (γ) (8). La señalización del receptor de la IL-7 es esencial para la linfopoyesis de las células T y B, mediante la promoción de la proliferación, diferenciación y supervivencia de estas células (11). Se encuentra localizado en el cromosoma equino 21 y contiene 1377 pb (12).

Los équidos Criollos Colombianos, son una especie introducida en el neotrópico, que han tenido cambios en las frecuencias de sus genes en comparación a la población de origen europeo (13), por lo que es necesario identificar las diferencias genéticas presentes y contrastarlos con otras razas para relacionarlo con la presencia e interacción con *Rhodococcus equi*, a través del uso de herramientas moleculares. La falta de identificación de la susceptibilidad genéticamente determinada a un microorganismo como el *Rhodococcus equi*, contribuye a dificultades en la selección de individuos en la industria equina Colombiana, asociado a una alta mortalidad y pérdidas económicas considerables. Conocer la susceptibilidad de individuos a enfermedades como la infección por *Rhodococcus equi*, permitirá reducir la incertidumbre en planes de mejoramiento genético, cruzamiento y conservación en équidos Criollos Colombianos.

El propósito de éste estudio fue validar la información existente acerca de la presencia y estructura de polimorfismos en la regiones de respuesta inmune Casp-I e IL-7R, asociados en estudios previos con infecciones por *Rhodococcus equi*, en équidos Criollos Colombianos en el Valle de Aburrá.

Materiales y métodos

El presente estudio fue aprobado por el Comité de ética para el uso y cuidado de los animales (CICUA) de la Universidad CES, en la sesión número 04 del 28 de mayo de 2013.

Tipo de estudio

Investigación observacional exploratoria prospectiva transversal. Se empleó una muestra de 12 potros de diferentes criaderos del Valle de Aburrá, lejanamente emparentados de acuerdo al registro, once equinos y cuatro asnales de los cuales, seis fueron hembras y nueve machos.

Métodos

Los individuos incluidos en el estudio fueron revisados y manipulados en el lugar de alojamiento de cada animal. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular, haciendo punción con un Vacutainer[®] 21 x 1,5^{ml} (BD Vacutainer, Plymouth, UK) para extraer 3 ml de sangre venosa depositados en tubo con anticoagulante EDTA (Vacutest Kima, Arzergrande, Italia).

Las muestras fueron rotuladas y transportadas al laboratorio Iagen S.A.S. (Municipio La Estrella, Antioquia). Se realizó aislamiento y purificación del ADN, mediante el kit comercial DNeasy[®] Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), el cual se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 40 minutos a un voltaje de 75 mV para verificar su integridad y concentración.

Para la amplificación del ADN, se realizó la PCR utilizando todas las muestras procesadas, empleando dos juegos de cebadores (primers) en sentido/antisentido previamente descritos por Horín *et al* 2010, cuyas secuencias se detalla en la tabla 1. Los fragmentos seleccionados para

amplificación se tomaron de estudios previos donde los relacionan con la susceptibilidad genética a infecciones por *Rhodococcus equi*.

Tabla 1: Cebadores propuestos para los diferentes genes.

Locus	Primers (Sentido/Antisentido)	Tamaño del producto de PCR (pb)	Temperatura de hibridación (°C)	Número de acceso al GenBank
Casp-I	5qGAGGATGATGCCATTAAGAAAG-3q 3qGAAGGTGTAATGAGGGAAGA-5q	155	60	EF 492868
IL7R	5c-TGGTGGTGTGTCTCTCTTGTTTC-3c 3qTGGGTTTCTTACACTTCACTGG-5q	230	60	NM 001081942

La reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 µl con 15 µl de buffer 10x (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 0.2 µl de dNTPs (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 10 µM, 1 µl de cada primer a 10 µM, 0.3 µl de la Taq polimerasa (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y 1.2 µl de DNA. La PCR se realizó en un termociclador convencional (PerkinElmer 9600, Shelton, Estados Unidos). El protocolo final fue definido experimentalmente durante una prueba piloto, y consistió en una desnaturalización inicial a 95 C° seguida de 35 ciclos a 94 C° por 30 segundos, temperatura de hibridación 66 C° a 30 segundos y una extensión final a 72 C° por 5 minutos.

Los viales con 25 µl del producto de amplificación fueron corridos inmediatamente por electroforesis de la siguiente manera: 8 µl de la reacción de PCR fueron mezclado con 2 µl de buffer de carga y sembrados en un gel de agarosa al 1,8% (Amresco, Solon, Ohio, Estados Unidos) junto con 4 µl de marcador de peso molecular en escala 100 (3000-100 GeneRuler™ DNA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para el corrido electroforético se utilizó como fuente de iones 500 ml de TBE 1X (Amresco, Solon, Ohio, Estados Unidos) a 100 voltios constante durante 35 minutos. Al gel se le añadieron 2 gotas de bromuro de etidio (0.625 mg/ml) (Amresco, Solon, Ohio, Estados Unidos) y los productos de amplificación fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. Los amplicones fueron almacenados a . 20 C°, hasta su envío a secuenciar.

Las secuencias fueron obtenidas por la empresa MacroGen® utilizando un secuenciador Illumina, quienes purificaron los amplicones obtenidos y realizaron la secuenciación utilizando cada par de cebadores para procesar la región en los sentidos 5q 3qy 3q 5qy así incrementar la confiabilidad de los resultados.

La calidad de las secuencias se controló con el programa Sequence scanner realizando la verificación con un valor de QV20+, incluyendo longitud mínima de la secuencia, y esta información es la presentada en la secuencia consenso final.

Las secuencias obtenidas se verificaron contra las bases de datos disponibles en NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para asegurar que el producto secuenciado correspondiera a los genes de Casp-I e IL-7R equinos y elegir la secuencia para usar como referencia durante el alineamiento.

Se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas utilizando el programa MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) con las secuencias de referencia elegidas, y se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia utilizando el programa BLAST para identificar variaciones con respecto a la secuencia de referencia del genoma equino (EquCab2 GCA_000002305.1).

Para comparar las secuencias se calculó un dendrograma de distancias utilizando los software BioEdit v.7.2.5 (Biological Sequence Alignment Editor, Tom Hall, Ibis Biosciences) y MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (14), usando como modelo las distancias de Kimura -2 parámetros, y un remuestreo estadístico de 10.000 réplicas usando bootstrap.

Resultados

Se secuenciaron 12 muestras en total, tanto para Casp-I como para IL-7R. A cada muestra se le asignó un código de secuenciación los cuales se detallan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Subespecie, sexo, edad y código de la secuencia para las doce muestras de IL-7R y Casp-I

Subespecie	Sexo	Edad (días)	Código Secuencia IL-7R	Código Secuencia Casp-I
Equino	Macho	48	1	52
Equino	Macho	150	2	53
Equino	Macho	95	3	54
Equino	Macho	210	4	55
Equino	Hembra	150	5	56
Equino	Hembra	36	6	57
Equino	Hembra	132	7	58
Equino	Macho	75	8	59
Asnal	Macho	120	9	60
Asnal	Macho	91	10	61
Asnal	Hembra	135	11	62
Asnal	Hembra	184	12	63

Análisis de los resultados de Casp-I

La longitud de la secuencia obtenida para el gen de Casp-I tras el alineamiento con MUSCLE fue de 240 pb. Para su alineamiento se uso como referencia la secuencia de Caspasa-I para *Eqqus caballus* (EF492868).

El análisis en BLAST presenta una similitud de las secuencias de Casp-I obtenidas con la reportada con un valor de 79% con *Eqqus caballus*.

Después de alineado el fragmento obtenido para Casp-I se encuentran dos regiones de saltos entre las posiciones 17-34 y 45-58, generados por la existencia de inserciones en las secuencias 56 y 57 que correspondían a dos equinos.

El dendrograma realizado para la región de Casp-I (Ver figura 1), mostró que las secuencias 52, 53, 54, 55, 58 y 59 son las que menos distancia genética tienen con la secuencia EF492868, mientras que las secuencias 56 y 57 son las que más se alejan debido a las inserciones que presentan. De acuerdo a lo

anterior, la mayoría de las muestras, excepto las 56 y 57, son afines a *Equus caballus* y estadísticamente la agrupación tiene un 100% de soporte en los remuestreos realizados.

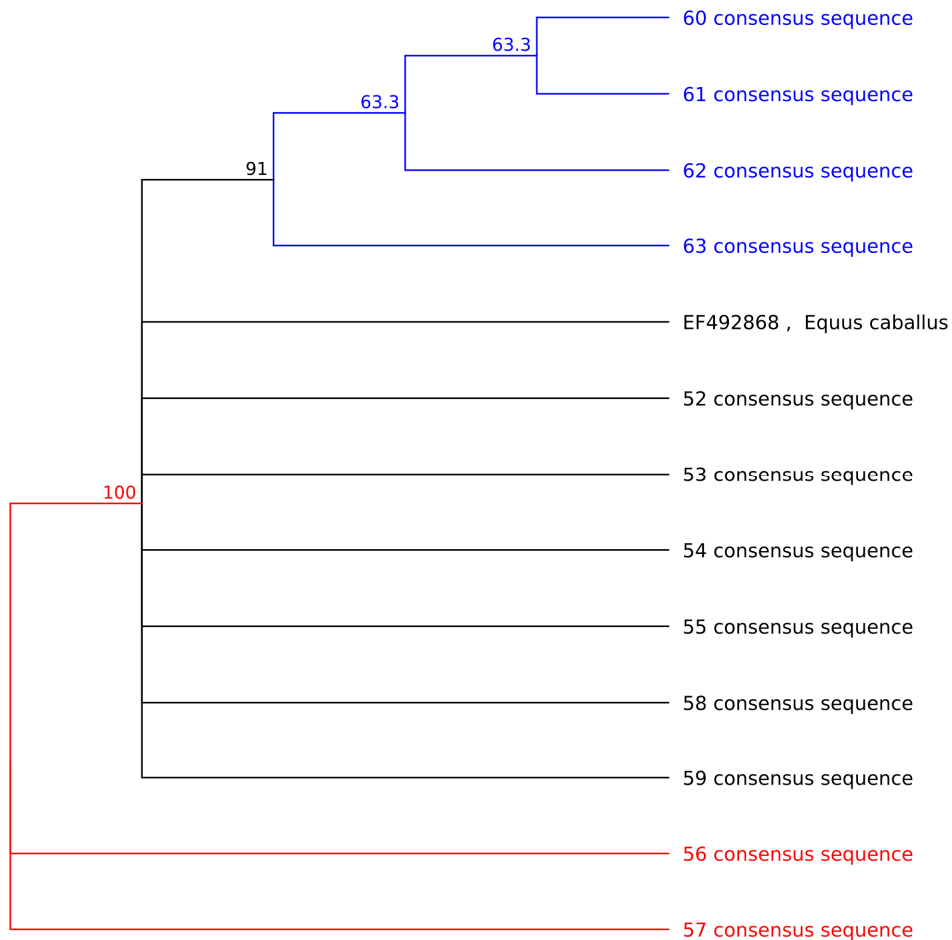


Figura 1. Dendrograma de distancia genética para la región de Casp-I.

Análisis de los resultados para IL-7R

Se analizaron ocho muestras consenso (1-3, 5-6, 8-10), descartando cuatro secuencias (4,7,11 y 12) debido a la baja calidad de los cromatogramas y a la corta longitud de lectura obtenida para estas secuencias tras el proceso de secuenciamiento realizado por Macrogen®.

Tras la alineación con MUSCLE la longitud de la secuencia obtenida para IL-7R fue de 457 pb.

Para su alineamiento se usó como referencia la secuencia del gen del receptor de interleucina 7 de *Equus caballus* (RNA mensajero - NM_001081942).

El análisis en BLAST, verifica que la similitud de las secuencias de IL-7R obtenidas respecto a la secuencia de referencia es de 99%.

En la secuencia 8 se encontró el indicativo de la presencia de dos alelos en la posición 110. Así mismo, se encontraron polimorfismos de nucleótido simple en las posiciones 101(T, A), 110 (A, G), 125 (A, T), 311 (G, A), 370 (A, C) y en la 389 (G,A). Las muestras 6 y 9 presentaron todos los polimorfismos, y adicionalmente el polimorfismo encontrado en la posición 110 se observó en 6 de las 8 muestras analizadas.

El dendrograma realizado para la región de IL-7R mostró que la secuencia 2 es la que menos distancia genética tiene con la secuencia de referencia NM_001081942, mientras que las secuencias 6 y 9 son las que más se alejan debido a la alta carga de polimorfismos que presentan. De acuerdo a lo anterior, la mayoría de las secuencias, excepto las 6 y 9, muestran una agrupación. Ver figura 2.

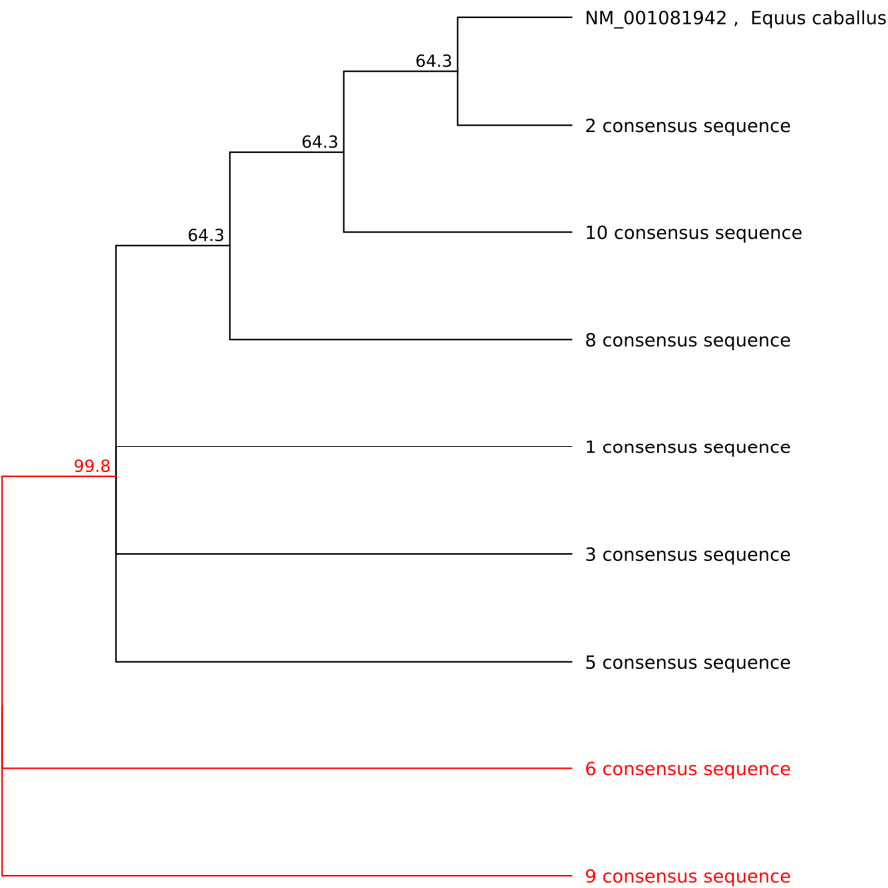


Figura 2. Dendrograma de distancia genética para la región de IL-7R.

Discusión

Múltiples factores como la edad, las condiciones ambientales, incluyendo el nivel de exposición a microorganismos virulentos, y la predisposición genética juegan un papel en la aparición de la neumonía por *Rhodococcus equi* (15), por lo que la respuesta inmune del huésped puede ser definitiva en los casos de desarrollo de la infección por este microorganismo (16). Es importante establecer estudios en el área de la salud equina que involucren el análisis de regiones genómicas de interés y ver cómo estos se pueden replicar en nuestro medio con el fin de encontrar especificidades para las poblaciones de équidos criollos colombianos, teniendo en cuenta su aplicación desde la selección y bienestar animal, relacionándolos con las condiciones medioambientales y de manejo de Colombia.

La susceptibilidad o resistencia genética a infecciones por *Rhodococcus equi* no se ha explorado a nivel de todo el genoma equino; se han realizado estudios previos con genes específicos que intervienen en la respuesta inmune, donde se describen locus genómicos asociados a la presentación de neumonía por *Rhodococcus equi* en potros de la raza cuarto de milla, incluyendo una región en el cromosoma equino 26, correspondiente al gen del receptor de potencial transitorio del canal de cationes, subfamilia M, miembro 2 (TRPM2) que codifica una proteína asociada con la función de los neutrófilos, siendo este otro gen candidato para futuras investigaciones (17).

En trabajos anteriores realizados por Horín *et al* 2004 y 2008, los cuales se tomaron como base para el desarrollo de este proyecto, se encontraron asociaciones significativas entre el gen que codifica el receptor de interleucina-7 (IL-7R) y el gen de Casp-I con la infección por *Rhodococcus equi* en potros pura sangre. Estos genes relacionados con la respuesta inmune, contribuyen a la defensa del huésped contra la infección por *R. equi* (18), siendo esta información genómica útil a la hora de afrontar la problemática de salud animal.

Previamente se han identificado varios tipos de respuesta inmunológica que se relacionan con las regiones evaluadas en este proyecto, que contribuyen a la defensa del huésped contra la infección por *Rhodococcus equi*, como los receptores tipo Toll (TLRs), que son componentes críticos de la respuesta

inmune innata activando el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (19,20); los macrófagos que actúan en la respuesta inmune mediada por células, los cuales son activados por los linfocitos T mediante citoquinas que estos secretan, siendo el principal mecanismo de defensa contra este microorganismo (16); y las inmunoglobulinas (Igs) que juegan un papel importante en la respuesta inmune humoral, principalmente la IgG, que participa en la opsonización de anticuerpos promoviendo la fagocitosis del *R. equi* y en la regulación del crecimiento intracelular, mediante la mejora de la muerte bacteriana con la fusión fagosoma-lisosoma. La eliminación del *R. equi* en los équidos coincide con la producción de la IgG (18).

El receptor tipo Toll 2 (TLR2), está relacionado con la vía de la Casp-1 en la respuesta inflamatoria de patógenos intracelulares como el *Rhodococcus equi* y la *Francisella tularensis* (21). El receptor alfa de la IL-7 (IL-7R), se expresa durante varios procesos virales y bacterianos, y está involucrado en la formación de las células CD8 de memoria (22).

De acuerdo a la revisión realizada del tema, esta es la primera investigación en potros realizada en Colombia que afronta la problemática de salud animal a partir de la información genómica y es importante, establecer inferencias unidas a las evaluaciones moleculares que redunden en el mejor entendimiento de las interacciones genético-ambientales.

Los polimorfismos de un solo nucleótido encontrados en el gen de IL-7R no coinciden con los reportados en los estudios realizados previamente. Sin embargo los resultados arrojados en este estudio validan la presencia de variaciones en los genes de Casp- I e IL-7R en los Équidos de raza Criollo Colombiano y sustentan que existen diferencias antes no reportadas, que podrían tener implicaciones de relación patógeno-hospedero. Al igual que el trabajo elaborado por Jiménez LM *et al*/ 2012, esto sugiere la presencia de una gran diversidad genética en los équidos Criollos Colombianos, y deja abierta la posibilidad de que las variaciones reportadas en este artículo estén asociadas con mayores niveles de resistencia o susceptibilidad a la infección por *Rhodococcus equi*, un aspecto de interés para estudios posteriores. Se sugiere

realizar estudios de asociación genética entre los polimorfismos encontrados en los genes de Casp-I e IL-7R y la infección por *Rhodococcus equi*, utilizando un mayor número de muestras, reportando el comportamiento del microorganismo bajo las condiciones medioambientales en Colombia.

La identificación de las bases genéticas y biológicas de susceptibilidad, o la resistencia a infecciones por *Rhodococcus equi* en potros es importante, ya que podría conducir al desarrollo de herramientas de diagnóstico y terapéuticas para el manejo de los potros en riesgo. Como resultado, los investigadores, veterinarios y criadores tendrían mayores herramientas para tomar importantes decisiones en la cría, bienestar animal y producción de ésta raza, evitando repercusiones en términos económico y de sostenibilidad en las producciones.

Es importante extender estos estudios a otro tipo de afecciones patológicas y lograr establecer programas de mayor impacto y seguimiento para cuantificar los riesgos sanitarios potenciales al desconocer la situación de enfermedades producto de susceptibilidad genética en Colombia.

Conclusiones

Los équidos Criollos Colombianos evaluados en este trabajo, presentan variaciones genéticas en los genes de Casp-I e IL-R7, con la identificación de inserciones en el gen de Casp-I, y seis polimorfismos de nucleótido simple en el gen de IL-R7. Estudios de asociación genética basados en un número mayor de muestras podrían ser utilizados para establecer la prevalencia de estos polimorfismos en la población general y verificar la asociación de los polimorfismos encontrados con la presencia de ésta enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Díaz S, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del complejo principal de

histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria* 2005;25(1):40-52.

2. Horín P, Smola J, Matiasovic J, Vyskocil M, Lukeszová L, Tomanová K, et al. Polymorphisms in equine immune response genes and their associations with infections. *Mammalian genome: Official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2004;15(10):843-50.
3. Campi IC, Bosch LM. Infección por *Rhodococcus equi*. ¿Por qué unos enferman y otros no? *EQUINUS*. 2009;(23):60-73.
4. Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. *Equine Internal Medicine*. St. Louis, Mo.: W. B. Saunders; 2003.
5. Giguère S, Cohen ND, Chaffin MK, Slovis NM, Hondalus MK, Hines SA, et al. Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2011;25(6):1209-20.
6. Horín P, Sabakova K, Futas J, Vychodilova L, Necesankova M. Immunity-related gene single nucleotide polymorphisms associated with *Rhodococcus equi* infection in foals. *International Journal of Immunogenetics*. 2010;37(2):67-71.
7. Wardlow S, Penha-Goncalves MN, Argyle DJ, Onions DE, Nicolson L. Nucleotide Sequence of Equine Caspase-1 cDNA. *DNA Seq*. 1999;10(2):133-7.
8. Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman L, Lauffenburger DA, Chen J. Perspectives on the quantitative immunobiology of the IL-7 signaling network. *Cell Mol Immunol*. 2008;5(2):79. 89.
9. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology*. 2006;8(11):1812. 1825.
10. Annand RR, Dahlen JR, Sprecher CA, Foster DC, Kisiel W, Giegel DA, et al. Caspase-1 (interleukin-1 -converting enzyme) is inhibited by the

human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochemical Journal*. 1999;342:655-665.

11. Dawson TR, Horohov DW, Meijer WG, Muscatello G. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of R. equi pneumonia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010;135:1-11.
12. Pellegrini M, Bouillet P, Robati M, Belz GT, Davey GM, Strasser A. Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The journal of experimental medicine*. 2004;200(9):1189-1195.
13. Jimenez LM, Mendez S, Dunner S, Cañón J, Cortés O. Colombian Creole horse breeds: Same origin but different diversity. *Genetics and molecular biology*. 2012;35(4):790-6.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(12):2725-2729.
15. Heller MC, Jackson KA, Watson JL. Identification of immunologically relevant genes in mare and foal dendritic cells responding to infection by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010;136:144-150.
16. González Godoy CA. Cinética de anticuerpos en equinos hiperinmunizados con vacuna para *Rhodococcus equi*. [Chile]: Universidad de Concepción; 2009.
17. McQueen MC, Doan R, Dindot SV, Bourquin JR, Zlatev ZZ, Chaffin MK, et al. Identification of Genomic Loci Associated with *Rhodococcus equi* Susceptibility in Foals. *Plos one*. 2014;9(6).
18. Horín P, Osickova J, Necesankova M, Matiasovic J, Musilova P, Kubickova S, et al. Single Nucleotide Polymorphisms of Interleukin-1 beta Related Genes and their Associations with Infection in the Horse. *Developments in Biological Standardization*. 2008;132:347-351.

19. Darrah PA, Monaco MC, Jains S, Hondalus MK, Golenbock DT, Mosser DM. Innate Immune Responses to *Rhodococcus equi*. Journal of Immunology. 2004;173:1914-1924.
20. Ferraz LC, Bernardes ES, *et al.* Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. Eur. J. Immunol. 2008;38:2762. 2775.
21. Li H, Nookala S, Bina XS, Bina JE, Re F. Innate Immune Response to *Francisella tularensis* is mediated by TLR2 and caspase-1 activation. Journal of Leukocyte Biology. 2006;80(40):766-773.
22. Hand TW, Morre M, Kaech SM. Expression of IL-7 receptor is necessary but not sufficient for the formation of memory CD 8 T cells during viral infection. PNAS. 2007;104(28):11730-11735.