

Variabilidad genética en el microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* en un rebaño de cabras Criollas (*Capra hircus*)

Genetic variability in the microsatellite “A” at region 3’UTR of the *SLC11A1* gene in a herd of native goats (*Capra hircus*)

Oscar De La Rosa*¹, Belkys J. Vásquez Marín¹, Alexis F. Márques y Luis Dickson²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP).

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Lara). Correo electrónico: delarosa100@gmail.com

RESUMEN

El gen *SLC11A1* codifica un transportador catiónico localizado en la membrana del fagolisosoma de los macrófagos, que tiene participación activa en la supresión de infecciones bacterianas y presenta dos microsatélites polimórficos (dinucleótido GT) en el extremo 3’UTR y algunos de sus alelos han sido asociados con resistencia natural a patógenos intracelulares en animales domésticos. A fin de caracterizar la variabilidad genética del microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* presentes en un rebaño de cabras Criollas localizado en el estado Lara, se amplificó mediante una PCR un fragmento de 233 pb a partir del ADN aislado de 62 muestras sanguíneas colectadas en el centro de producción de ovinos y caprinos del INIA-Lara. Los amplicones obtenidos fueron sometidos a un análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) y las muestras fueron agrupadas según la identidad de su patrón SSCP; de esta manera se formaron seis grupos de análisis. Se tomaron muestras representativas de cada grupo para determinar el número de repeticiones GT en el microsatélite “A”, mediante secuenciación de ADN. Las frecuencias genotípicas fueron estimadas a partir de la secuencia nucleotídica correspondiente a cada grupo de análisis (GT12/GT17=0,016; GT12/GT13=0,016; GT13/GT13=0,016; GT13/GT15=0,290; GT13/GT16=0,483; GT16/GT18=0,177) y las frecuencias alélicas obtenidas fueron GT12=0,0161; GT13=0,4113; GT15=0,1452; GT16=0,3306; GT17=0,0081 y GT18=0,0887. El coeficiente de información polimórfica fue 0,6390, la heterocigosidad observada fue 98,39% y la heterocigosidad esperada era 69,79%. El rebaño muestreado no se encuentra en equilibrio genético (P<0,05).

Palabras clave: marcador molecular, genotipos, polimorfismo.

Recibido: 19/05/14 Aprobado: 08/10/14

ABSTRACT

The *SLC11A1* gene encodes a cationic transporter located in the membrane of phagolysosome of macrophages, which has active participation in the suppression of bacterial infections and has two polymorphic microsatellite (dinucleotide GT) at the end 3’UTR and some of its alleles have been associated with natural resistance to intracellular pathogens in domestic animals. In order to characterize genetic variability in microsatellite “A” at region 3’UTR of *SLC11A1* gene present in a herd of native goats located in Lara state, was amplified by PCR a fragment of 233 bp from DNA isolated from 62 blood samples collected in the Center of Production of Sheep and Goats of INIA-Lara. The amplicons obtained were subjected to single strand conformational polymorphism analysis (SSCP) and samples were grouped according to the identity of its SSCP pattern; thus six analysis groups formed, representative samples of each group were used to determine the number of repetitions GT in the microsatellite “A”, by DNA sequencing. Genotypic frequencies were estimated on the basis of the nucleotide sequence corresponding to each analysis group. (GT12/GT17=0.016; GT12/GT13=0.016; GT13/GT13=0.016; GT13/GT15=0.290; GT13/GT16=0.483; GT16/GT18=0.177) and the allelic frequencies obtained were GT12=0.0161; GT13=0.4113; GT15=0.1452; GT16=0.3306; GT17=0.0081 and GT18=0.0887. Polymorphic information coefficient was 0.6390, the observed heterozygosity was 98.39% and the expected heterozygosity was 69.79%. The sampled herd is not in genetic equilibrium (P<0.05).

Key words: Molecular marker, genotypes, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El gen *SLC11A1* (Solute Carrier Family 11 Member A1) es un miembro de la familia SLC11 (transportadores de iones metálicos divalentes junto a transporte de protones) y codifica una proteína transmembrana que se localiza en los endosomas tardíos y lisosomas de macrófagos y células dendríticas, y gránulos terciarios de neutrófilos (Techau *et al.*, 2007). La proteína funciona como un transportador de metales de transición divalentes (Fe^{++} y Mn^{++}) que intervienen en el metabolismo del hierro y los mecanismos de resistencia del hospedador contra algunos patógenos (Cellier *et al.*, 2007). En el hombre, algunos alelos de este gen se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas como tuberculosis y lepra, y enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (O'Brien *et al.*, 2008).

En animales domésticos, el gen *SLC11A1* es considerado como un candidato para el control de la resistencia o susceptibilidad a diversos patógenos intracelulares (Adams y Templeton, 1998; Blackwell *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2005; Pinedo *et al.*, 2009). Desde su identificación inicial por Vidal *et al.* (1993), el gen *SLC11A1* o *Nramp1* (como fue conocido inicialmente), ha sido objeto de numerosos estudios a fin de determinar su variabilidad genética (Pitel *et al.*, 1994; Matthews y Crawford, 1998; Horín *et al.*, 1999; Ables *et al.*, 2002; Coussens *et al.*, 2004; Borriello *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Paixão *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008a; Liandris *et al.*, 2009; Trujillo y Valderrama, 2009; Vacca *et al.*, 2011; Hasenauer *et al.*, 2013) y la asociación de los polimorfismos identificados, con los estados de resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas en especies de interés zootécnico (Barthel *et al.*, 2000; Barthel *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2005; Capparelli *et al.*, 2007a; Capparelli *et al.*, 2007b; Paixao *et al.*, 2007; Ganguly *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008b; Cerquera *et al.*, 2009; Korou *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010; Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010; Kadarmideen *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Paixão *et al.*, 2012; Taka *et al.*, 2013; Iacoboni *et al.*, 2014).

Un estudio realizado por Liandris *et al.* (2009), determinó la secuencia del gen *SLC11A1* a partir de una muestra de 50 cabras *Capra hircus*,

GenBank FJ388877, (Benson *et al.*, 2013) y se reportó el hallazgo de dos microsatélites polimórficos en el extremo 3' de la región no traducida (3'UTR), donde ambos microsatélites presentan como motivo de repetición un dinucleótido Guanina-Timina (GT). Los microsatélites denominados en este trabajo "A" y "B" están delimitados en su extremo 5' por una secuencia de 41 nucleótidos y en su extremo 3' por una secuencia de 28 nucleótidos, con alta homología entre los dos microsatélites. Ambas microsatélites y sus respectivas regiones flanqueantes son contiguas (Figura 1).

El microsatélite "A" mostró de 14 a 18 repeticiones GT, mientras que el microsatélite "B" solo presentó dos alelos con 7 y 8 repeticiones GT, y ambos presentan un motivo nucleotídico que los delimita con precisión dentro de la secuencia de la región 3'UTR del gen; $AAGG(GT)_nGCATGC\dots AAGG(GT)_nGCATGC$.

Vacca *et al.* (2011) evaluaron seis razas caprinas de explotación común en Europa y determinaron mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que la ubicación cromosómica del gen *SLC11A1* en cabras corresponde a la región pericentromérica del cromosoma 2. En dicho ensayo se realizó un análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991) a partir del microsatélite "A", y se obtuvieron 23 patrones electroforéticos, que correspondieron a ocho alelos con repeticiones dinucleotídicas que van desde GT11 hasta GT19, sin presentar la repetición GT13 en ninguna de las muestras analizadas.

En Venezuela se realizó un ensayo preliminar para detectar la presencia de polimorfismos en el extremo 3'UTR del gen *SLC11A1* en una muestra de 20 cabras Criollas y se identificaron cuatro patrones electroforéticos mediante la técnica SSCP (De La Rosa *et al.*, 2014).

El análisis SSCP se basa en el principio de que la movilidad electroforética de una cadena sencilla de ADN en un soporte no desnaturizante es altamente dependiente de su tamaño y estructura (Gasser *et al.*, 2007). Cuando la molécula se encuentra en solución, la cadena sencilla de ADN adopta una conformación secundaria y terciaria particular debida al apareamiento complementario de

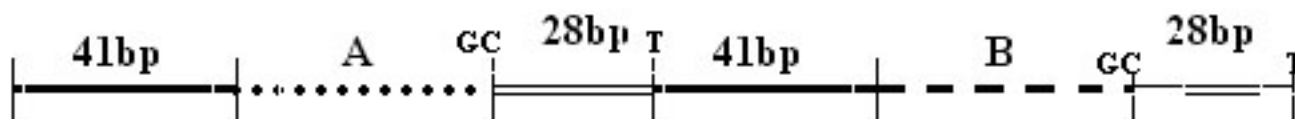


Figura 1. Organización estructural de la región 3'UTR en el gen SLC11A1 en cabras. Adaptado de Liandris *et al.* (2009).

los nucleótidos intracatenarios. Estos arreglos conformacionales dependen de la longitud de la cadena, secuencia nucleotídica, localización y número de regiones de apareamiento (Hayashi, 1991). Por lo tanto, una mutación en una determinada posición nucleotídica en la secuencia principal puede alterar la conformación tridimensional de la molécula (Hayashi, 1991). Cuando las cadenas de ADN son separadas en una matriz no desnaturizante a temperatura constante, las cadenas que difieren por un solo nucleótido pueden discriminarse, tomando en cuenta los cambios en su movilidad como consecuencia de las diferentes conformaciones adoptadas (Gasser *et al.*, 2007).

La interpretación de un análisis SSCP es sencilla. Lo que se busca es una variación de los patrones electroforéticos SSCP entre diferentes muestras. La variación puede ser una banda o algunas bandas adicionales. Las muestras representativas con patrones SSCP distintivos se pueden secuenciar para definir las variaciones de la secuencia. De esta forma, las variaciones inicialmente desconocidas en la secuencia pueden ser identificadas y definidas (Sunnucks *et al.*, 2000). Dada su relativa simplicidad técnica y capacidad de detección de mutaciones, el marcador SSCP proporciona una potente herramienta para identificación de patógenos, evaluación de variación genética dentro y entre muestras o poblaciones y como punto importante, permite identificar mutaciones desconocidas (Bastos *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006; Paixão *et al.*, 2006; Cerquera *et al.*, 2009; Pazzola *et al.*, 2010; Ranjan *et al.*, 2011; Estrada-Cuzcano *et al.*, 2013).

Los pequeños rumiantes, tienen gran impacto socio-económico en los países del tercer mundo y en Venezuela la vida de miles de familias

campesinas depende de una u otra manera de la cría del caprino como medio de vida, lo cual da particular relevancia a su aspecto social sobre cualquier otro (Alejua y Rodríguez, 2006; Muñoz *et al.*, 2008). La cabra fue introducida en Venezuela, al igual que en otros países de Latinoamérica, por los colonizadores españoles durante el siglo XV (Mellado, 1997) y ha evolucionado a través de un proceso de selección natural, incrementando la resistencia y sobrevivencia a un medio muy hostil en las zonas áridas y semiáridas ubicadas en los estados Lara y Falcón.

Estas zonas se caracterizan climáticamente por promedios anuales de precipitación de 420 mm, temperatura promedio de 28,3°C, altitud promedio de 280 m.s.n.m, y vegetación de tipo Bosque Seco-Espinoso en terrenos quebrados y rocosos. Estos parámetros ambientales han condicionado el desarrollo del ganado caprino local, lo que ha resultado en alta rusticidad y adaptación al medio, pero también en bajos niveles de producción. Esto determina un marcado predominio de la cría extensiva con una orientación económica de subsistencia, con rebaños que oscilan entre 200 a 600 animales, en los cuales no existe ningún criterio de selección para la permanencia o descarte de los animales (Pariacote *et al.*, 2004; Dickson y Muñoz, 2007).

El bajo nivel de producción de estos sistemas, tiene origen multifactorial y se hace necesaria la identificación y análisis de estos factores limitantes para poder formular planes de desarrollo coherentes y exitosos. Sin embargo, las iniciativas en el aspecto productivo solo se han dirigido hacia la introducción de recursos genéticos exóticos con alta capacidad genética aditiva para características productivas,

subestimando la adaptación y otras posibles ventajas del caprino Criollo (Dickson *et al.*, 2001).

Por tanto, la identificación de polimorfismos del gen *SLC11A1* representa una primera fase exploratoria para detectar variantes alélicas potencialmente favorables para la resistencia a enfermedades infecciosas, dándole un valor agregado a este germoplasma, con miras a desarrollar un programa integral de conservación e incorporarlo en las estrategias de mejoramiento genético de la población caprina local.

En razón de lo arriba expuesto, este trabajo se planteó como objetivo la caracterización de la variabilidad genética del microsatélite "A", presente en el extremo 3'UTR del gen *SLC11A1* en un rebaño de cabra Criollas en el estado Lara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este ensayo se colectaron 62 muestras de sangre periférica en un rebaño de cabras tipificadas como Criollas, que forman parte de un programa de recuperación y mantenimiento de la raza, fomentado por el Centro de Producción de Ovinos y Caprinos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en el estado Lara, Venezuela. Este rebaño es una población pequeña (152 individuos) que tiene una naturaleza experimental con fines de conservación, con lo cual se realizan cruces dirigidos a fin de mantener la diversidad genética.

Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos Vacutainer® de 5 ml contentivos de K₂EDTA y refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento. El ADN genómico fue aislado usando un protocolo de precipitación salina optimizado por De La Rosa *et al.* (2013), en resumen; 400µl de cada muestra se solubilizaron con 1000µl de un tampón (Tris-Cl 20mM; pH 7,6) y se incubaron a temperatura ambiente por diez minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20.800 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 20 segundos y el sobrenadante fue descartado. Las pastillas resultantes fueron incubadas en una solución de lisis (EDTA 1mM, Tris-Cl 10mM, 0,1% SDS; pH 8) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los residuos proteicos fueron digeridos con proteínasa k (2,5µl, 20 mg.ml⁻¹) durante cuatro horas a 55°C.

Se usó acetato de potasio 5M para precipitar los residuos peptídicos mediante centrifugación a 20800 RCF. El sobrenadante fue mezclado con una solución de etanol absoluto y acetato de sodio 0,12M para provocar la precipitación del ADN. El ADN aislado fue lavado dos veces con etanol al 70% y solubilizado en un tampón de conservación (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8), la integridad de las cadenas aisladas se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con SYBR®Safe incorporado (1/50.000) y la concentración total de ADN en las muestras se determinó mediante espectrofotometría óptica.

Amplificación In Vitro del extremo 3'UTR del gen *SLC11A1*

A partir del ADN genómico aislado se amplificó un segmento de 233 pb usando los cebadores: Ex15F: 5'-GTCTGGACCTGTCTCATCACC-3' y 2Ex15R: 5'-ACTCCCTCTCCATCTTGCTG-3' (Vacca *et al.*, 2011), los cuales tienen como diana un segmento de 233 pb que se ubica en la posición 1587-1820 del gen *SLC11A1* caprino, GenBank GU440577.1 (Benson *et al.*, 2013) y contiene la región del microsatélite "A" (Figura 2).

Las mezclas para la PCR fueron preparadas en un volumen final de 25ul, que contenía; tampón 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP's 0,2 mM; cebadores 0,2 mM cada uno; Taq polimerasa 0,7 U; ADN molde 50 ng. La amplificación se desarrolló con un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 25s a 94°C, 20s a 60,1°C y 15s a 72°C, y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los amplicones se verificaron en geles de agarosa al 2%, con SYBR®Safe incorporado en proporción 1/50.000.

Análisis de Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla

Los productos PCR se mezclaron con una solución desnaturalizante (Formamida 95%; Azul de Bromofenol 0,5%; EDTA 25 mM) en proporción 1:1 y sometidos a desnaturalización a 95°C durante diez minutos e inmediatamente colocados en un recipiente con hielo durante cinco minutos.

Los patrones SSCP se obtuvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (49:1) al 10% con glicerol incorporado en un 4%. La

```
>gi|289707888|gb|GU440577.1| Capra hircus solute carrier family 11 member 1 (Slc11a1) gene, exon 15 and partial cds.
```

```
GTCTGGACCTGTCTCATCACCAGGGAGCCACTCATCTGGCCCCACAGTTCCCACCAACGCTTTCTGTATG
GGCTTCCTGGAGAGGATCAGGAGGAGGGGAGGACCTCGGGATGAACTCCCACCAGGGCCTGGCCACGGGT
GGGATGAGTGACCACAGTGGCCTGCCAGACAAGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCAT
GCACAGCAAGATGGAGAGGGAGTTCACGGGTGGGATGAGTGGGCACAGTGGCCTGCCAGACAAGGGTGTG
TGTGTGTGTGTGCACGCACAGCAAGATGGACAGGGAATTCTGGAAGCCGGCCAAGCCATAGGGACCTGCT
ATTTCTAGCTCAGATCTCGGTATTCTTGAGTATTAATGGGGACACCTACCTTGAATGGTTGTAATA
AGACACTTGAACGCAGAGCCTAGCACTT
```

Figura 2. Secuencia en formato FASTA correspondiente al Exón 15 y un segmento de la secuencia codificante (CDS) del gen del miembro 1 de la familia 11 de transportadores de soluto (SLC11A1) en cabras (*Capra hircus*). Esta versión (1) de la entrada GU440577 fue remitida a GenBank por Vacca *et al.* (2011). En negrita se denota la posición de los cebadores y la región del microsatélite “A” (dinucleótido GT) se resalta en fondo gris.

solución tampón para la corrida fue Tris-Borato-EDTA (TBE)(0,5X) previamente refrigerado a 6°C. La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones; 12 W constantes durante tres horas y temperatura ambiental de 20°C. Una vez finalizada la electroforesis se realizó la tinción de los geles, por inmersión en una solución de SYBR®Safe y TBE 0,5X en proporción 1/10.000, durante 25 minutos con agitación suave continua.

Genotipado de las muestras

Las muestras fueron agrupadas de acuerdo a la identidad de sus patrones SSCP, generando de esta manera seis grupos de análisis. Se seleccionaron las muestras más representativas y mejor definidas de cada grupo, para proceder a su re-amplificación por una PCR. Los amplicones fueron enviados a MacroGen Sequencing Services (MacroGen Inc.) para su purificación y secuenciación directa, los electroferogramas resultantes fueron editados, analizados y comparados usando la aplicación DNABaser (DNABaser, 2012). A partir de la secuencia obtenida se determinó el genotipo de la muestra, mediante conteo directo de las repeticiones del dinucleótido GT. Los grupos de análisis SSCP fueron tipificados de acuerdo al genotipo asignado a las muestras representativas de cada grupo.

Análisis estadístico

Los archivos de secuencias FASTA fueron revisados con la aplicación TextPad 5.2 (2008)

y mediante la aplicación Bioedit (Hall, 1999) se obtuvieron seis secuencias consenso a partir de los archivos FASTA correspondientes a las muestras secuenciadas dentro de cada uno de los grupos de análisis SSCP. La herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2000) fue usada para alinear y comparar las secuencias consenso con la secuencia de referencia NM_001285694.1 almacenada en NCBI RefSeq (Pruitt *et al.*, 2004), de esta forma se verificó la identidad de los amplicones obtenidos y la calidad del ensayo.

Las matrices de datos genotípicos se construyeron usando TextPad 5.2 (2008) y fueron procesadas mediante la aplicación CONVERT (Glaubitz, 2004) para generar archivos de datos compatibles con el formato de entrada de las aplicaciones POPGEN32 (Yeh y Boyle, 1997), FSTAT (Goudet, 1995) y GENEPOP V4 (Rousset, 2008). Las frecuencias genotípicas se estimaron por conteo directo de los patrones SSCP y su relación con los genotipos del microsatélite “A” obtenidos a partir de los electroferogramas. Las frecuencias alélicas, proporciones de Hardy-Weinberg (HW), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) y el coeficiente de endogamia (Fis) fueron calculados a partir de las frecuencias genotípicas usando las aplicaciones arriba mencionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis SSCP del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* puso en evidencia la presencia

Cuadro 1. Patrones SSCP, frecuencias genotípicas y alélicas del dinucleótido GT presente en el microsatélite “A” del extremo 3’UTR del gen SLC11A1 en cabras Criollas.

Patrón SSCP (bandas en gel)	Individuos identificados	Genotipo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
D (3)	1	GT12/GT17	0,016	GT12	0,0161
B (3)	1	GT12/GT13	0,016	GT13	0,4113
A (2)	1	GT13/GT13	0,016	GT15	0,1452
F (4)	18	GT13/GT15	0,290	GT16	0,3306
E (4)	30	GT13/GT16	0,483	GT17	0,0081
C (3)	11	GT16/GT18	0,177	GT18	0,0887

En bovinos, el alelo GT13 del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* presenta la mayor frecuencia de aparición y se ha reportado su asociación con resistencia natural a la brucelosis (Barthel *et al.*, 2001). La alta proporción de este alelo en las cabras Criollas representaría una oportunidad para evaluar la asociación de este alelo del gen *SLC11A1* con la resistencia natural a la brucelosis, lo cual pudiera tener un impacto positivo en la salud pública, dando un valor agregado a la raza para lograr su inclusión en los planes de mejoramiento genético sanitario de las razas foráneas comúnmente explotadas en el país.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis genético-estadístico y se observa que la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg indica que el microsatélite “A” se encuentra en desequilibrio, observándose un exceso de heterocigotos ($H_o:98,39\%$), de igual manera, el índice de fijación F_{is} toma un valor negativo (-0,41) debido al exceso de heterocigotos (Allendorf y Luikart, 2007) y esto puede indicar el apareamiento entre individuos no consanguíneos, situación esperada en esta población artificial donde la intervención del hombre tiene como estrategia disminuir la ganancia de endogamia a través del tiempo. El contenido de información polimórfica del microsatélite “A” (0,6390) revela que este marcador es altamente informativo para esta población y puede ser usado en estudios poblacionales y de cartografía genética relacionados con la cabra Criolla venezolana.

CONCLUSIONES

El microsatélite de la región “A” del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* analizado en este trabajo resultó ser altamente polimórfico lo que indica una oportunidad para desarrollar estudios de asociación de los alelos observados en la cabra Criolla venezolana con la resistencia natural a patógenos de interés en esta especie, de acuerdo a los reportes de investigación citados.

Por otra parte, sería conveniente revisar la estructura genética del extremo 3’UTR del gen *SLC11A1* en la población de caprinos de raza Canaria presentes en el país, puesto que esta raza además de contribuir al origen de las cabras Criollas venezolanas, también resulta ser uno de los grupos foráneos con mayor presencia e impacto en la producción caprina de Venezuela.

En lo referente a la variabilidad genética, este estudio muestra que a pesar de ser una población reducida, las cabras Criollas venezolanas muestran un alto grado de heterocigosidad y variabilidad genética, resultado de la colección de individuos provenientes de diversos rebaños tipificados como criollos, como parte del programa de conservación y rescate del recurso genético que se desarrolla en el INIA-Lara.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan gratitud a la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

(INIA) por el apoyo material y financiero para la ejecución de este trabajo experimental.

LITERATURA CITADA

- Ables, G., M. Nishibori, M. Kanemaki and T. Watanabe. 2002. Sequence analysis of the NRAMP1 genes from different bovine and buffalo breeds. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(11): 1081-1083.
- Adams, G., and J. Templeton. 1998. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 17(1): 200-219.
- Alejua, H., y M. Rodríguez. 2006. Caracterización del circuito caprino en el sector villa Araure (estado Lara, Venezuela). *Agroalimentaria*, 11: 111-121.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers and D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410. doi: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.
- Allendorf, F. and G. Luikart. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. 642 pp. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing.
- Barthel, R., J. Feng, J. Piedrahita, D. McMurray, W. Templeton, and G. Adams. 2001. Stable Transfection of the Bovine NRAMP1 Gene into Murine RAW 264.7 Cells: Effect on *Brucella abortus* Survival. *Infection and Immunity*, 69(5): 3110-3119.
- Barthel, R., J. Piedrahita, D. McMurray, J. Payeur, D. Baca, F. Güemes, V. Perumaalla, T. Ficht, J. Templeton and G. Adams. 2000. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 61(9): 1140-1144.
- Bastos, E., A. Cravador, J. Azevedo and H. Guedes-Pinto. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in the Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5(1): 7-15.
- Benson, D., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. Lipman, J. Ostell and E. Sayers. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D36-D42.
- Blackwell, J., T. Goswami, C. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J. White, S. Searle, E.N. Miller, C. Peacock, H. Mohammed and M. Ibrahim. 2001. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cellular Microbiology*, 3(12): 773-784.
- Borriello, G., R. Capparelli, M. Bianco, D. Fenizia, F. Alfano, F. Capuano, D. Ercolini, A. Parisi, S. Roperto and D. Lannelli. 2006. Genetic Resistance to *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity*, 74(4): 2115-2120.
- Capote, J., A. Tejera, M. Amills, A. Argüello, M. Fresno and J. López. 2004. Influencia histórica y actual de los genotipos canarios en la población caprina americana. *Animal Genetic Resources / Ressources génétiques animales / Recursos genéticos animales*, 35: 49-60. doi: doi:10.1017/S1014233900001802.
- Capparelli, R., F. Alfano, M. Amoroso, G. Borriello, D. Fenizia, A. Bianco, S. Roperto, F. Roperto and D. Lannelli. 2007a. Protective Effect of the *Nramp1* BB Genotype against *Brucella abortus* in the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity*, 75(2): 988-996.
- Capparelli, R., G. Borriello, R. Marabelli, S. Roperto, F. Roperto and D. Lannelli. 2007b. The *Nramp1*AA genotype confers susceptibility to *Brucella abortus* in water buffalo. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 18(2): 137-143.
- Cellier, M., P. Courville and C. Champion. 2007. *Nramp1* phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9(14-15): 1662-1670.
- Cerquera, F., O. Toro y G. Alberto. 2009. Frecuencias alélicas para variantes SNP en el gen *Nramp1* en bovinos infectados

- con *Brucella abortus* o clasificados por resistencia al patógeno. *Revista Corpoica* (Colombia), 10: 43-50.
- Coussens, P., M. Coussens, B. Tooker and W. Nobis. 2004. Structure of the bovine natural resistance associated macrophage protein (NRAMP 1) gene and identification of a novel polymorphism. *Mitochondrial DNA*, 15(1): 15-25.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez y L. Dickson. 2014. Polimorfismos del gen *Slc11a1* en cabras criollas. Un estudio inicial de la resistencia natural a Paratuberculosis. *Observador del Conocimiento*, 2(1): 189-194.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez, G. Seijas y L. Dickson. 2013. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. Paper presented at the 2do Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. LOCTI - PEII, Caracas.
- Díaz, S., M. Ripoli, P. Peral y G. Giovambattista. 2005. 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*, vol. 25, no. 1.
- Dickson, L. y G. Muñoz (Eds.). 2007. *Manual de Producción de Caprinos y Ovinos* (2 ed.). Barquisimeto. Lara: FUNDACITE LARA.
- Dickson, L., G. Torres, C. Becerril, F. González, R. Rangel y E. García. 2001. Evaluación productiva y reproductiva de dos grupos de cabras triple mestizas bajo condiciones de confinamiento en el trópico seco de Venezuela. *Veterinaria México OA*, 32 (001).
- DNABaser, S.A. 2012. DNA Baser Sequence Assembler. Romania: Heracle BioSoft SRL. Retrieved from: <http://www.DnaBaser.com>.
- Estrada-Cuzcano, A., J. Sandoval, M. Guevara-Fujita y R. Fujita. 2013. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de biología*, 12(3): 349-358.
- Ganguly, I., A. Sharma, R. Singh, S. Deb, D. Singh and A. Mitra. 2008. Association of microsatellite (GT)_n polymorphism at 3'UTR of NRAMP1 with the macrophage function following challenge with *Brucella* LPS in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Microbiology*, 129 (1-2): 188-196.
- Gasser, R., M. Hu, N. Chilton, B. Campbell, A. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Beveridge and X. Zhu. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. [© 2007 Nature Publishing Group]. *Nature Protocols*, 1(6): 3121-3128.
- Glaubitz, J. 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4(2): 309-310.
- González, J., O. Saldarriaga, A. López-Herrera, N. Bermúdez, W. Zapata, J. Ossa, M. Rugeles y G. Bedoya. 2006. Polymorphism in 1908STR1934 locus of the 3 UTR of the *Nramp1* bovine gene in eight cattle breeds. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(1): 11-17.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6): 485-486.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* (Nº 41): 95 - 98.
- Hasenauer, F., M. Caffaro, C. Czibener, D. Comerci, M. Poli and C. Rossetti. 2013. Genetic analysis of the 3' untranslated region of the bovine *SLC11A1* gene reveals novel polymorphisms. *Molecular Biology Reports*, 40(1): 545-552.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1(1): 34-38.
- Helios Software Solutions. 2008. TextPad, Version 5.2 [Software].
- Horín, P., I. Rychlík, J. Templeton and G. Adams. 1999. A complex pattern of microsatellite

- polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *European Journal of Immunogenetics*, 26(4): 311-313.
- Iacoboni, P. A., F. C. Hasenauer, M. E. Caffaro, A. Gaido, C. Rossetto, R. D. Neumann, A. Salatin, E. Bertoni, M. A. Poli and C. A. Rossetti. 2014. Polymorphisms at the 3' untranslated region of SLC11A1 gene are associated with protection to *Brucella* infection in goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3-4): 230-234. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.05.007.
- Kadarmideen, H., A. Ali, P. Thomson, B. Müller and J. Zinsstag. 2011. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. [© 2011 The Authors, *Animal Genetics* © 2011 Stichting International Foundation for Animal Genetics]. *Animal Genetics*, 42(6): 656-658.
- Korou, L., E. Liandris, M. Gazouli and J. Ikonomopoulos. 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.
- Kumar, N., I. Ganguly, R. Singh, S. Deb, S. Kumar, A. Sharma and A. Mitra. 2011. DNA Polymorphism in SLC11A1 Gene and its Association with Brucellosis Resistance in Indian zebu (*Bos indicus*) and Crossbred (*Bos indicus* X *Bos taurus*) Cattle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(7): 898-904.
- Kumar, N., A. Mitra, I. Ganguly, R. Singh, S. Deb, S. Srivastava and A. Sharma. 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* x *Bos taurus*) cattle. *Veterinary Microbiology*, 111(1): 139-143.
- Liandris, E., M. Gazouli and J. Ikonomopoulos. 2009. Characterization of caprine (*Capra hircus*) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis. *Online Journal of Veterinary Research*, 13(1): 41-52.
- Martínez, R., S. Dunner, G. Barrera and J. Cañón. 2008a. Novel variants within the coding regions of the SLC11A1 gene identified in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(1): 57-62.
- Martínez, R., S. Dunner, R. Toro, J. Tobón, J. Gallego and J. Cañón. 2010. Effect of polymorphisms in the SLC11a1 coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two *Bos* breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and Molecular Biology*, 33(3): 463-470.
- Martínez, R., R. Toro, F. Montoya, M. Burbano, J. Tobón, J. Gallego, S. Dunner and J. Cañón. 2008b. 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): 271-279.
- Matthews, G., and A. Crawford. 1998. Cloning, sequencing and linkage mapping of the NRAMP1 gene of sheep and deer. *Animal Genetics*, 29(1): 1-6.
- Mellado, M. 1997. La cabra criolla en América Latina. *Veterinaria Mexico*, 28(4): 333-343.
- Muñoz, G., A. Albornoz y C. Araque. 2008. La Cabra Criolla: Su preservacion en áreas comunales. *Revista Agrotécnico* 39-41.
- O'Brien, B., N. Archer, A. Simpson, F. Torpy and N. Nassif. 2008. Association of SLC11A1 promoter polymorphisms with the incidence of autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Journal of Autoimmunity*, 31(1): 42-51.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8): 2766-2770.
- Paixão, T., C. Ferreira, A. Borges, D. Oliveira, A. Lage and R. Santos. 2006. Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein

- and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2): 37-42.
- Paixão, T., R. Martinez and R. Santos. 2012. Polymorphisms of the coding region of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64: 1081-1084.
- Paixao, T., F. Poester, A. Neta, Á. Borges, A. Lage and R. Santos. 2007. NRAMP1 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity*, 75(5): 2493-2499.
- Pariacote, F., L. Ruiz, D. D'Ascencao, C. Borges and X. Pimentel. 2004. Morphological traits of venezuelan Creole goat. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 12(4s1): 16-21.
- Pazzola, M., M. Dettori, M. Atzeni, F. Balia and G. Vacca. 2010. Genetic diversity of NRAMP1 3'-UTR microsatellite in cattle breeds reared in Sardinia. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2s): 126-128.
- Pinedo, P., C. Buergelt, G. Donovan, P. Melendez, L. Morel, R. Wu, T. Langae and D. Rae. 2009. Candidate gene polymorphisms (*BoIFNG*, *TLR4*, *SLC11A1*) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4): 189-196.
- Pitel, F., I. Lantier, J. Riquet, I. Lanneluc, K. Tabet-Aoul, N. Saidi-Mehtar, F. Lantier and J. Gellin. 1994. Cloning, sequencing, and localization of an ovine fragment of the NRAMP gene, a candidate for the ITY/LSH/BCG gene. *Mammalian Genome*, 5(12): 834-835.
- Pruitt, K.D., T. Tatusova and D.R. Maglott. 2004. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue): D501-D504. doi: 10.1093/nar/gki025
- Ranjan, R., C. Bhong, K. Chavan, S. Parmar and C. Joshi. 2011. DNA polymorphism of 3'UTR of *Nramp1* gene in Malvi breed of cattle. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 1(3): 105-108.
- Reddacliff, L., K. Beh, H. McGregor and R. Whittington. 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Australian veterinary journal*, 83(7): 435-441.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1): 103-106.
- Ruiz-Larrañaga, O., J. Garrido, C. Manzano, M. Iriando, E. Molina, A. Gil, A. Koets, V. Rutten, R. Juste and A. Estonba. 2010. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (*SLC11A1*) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 93(4): 1713-1721.
- Sunnucks, P., A. Wilson, L. Beheregaray, K. Zenger, J. French and A. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9(11): 1699-1710.
- Taka, S., E. Liandris, M. Gazouli, K. Sotirakoglou, G. Theodoropoulos, M. Bountouri, M. Andreadou and J. Ikonomopoulos. 2013. In vitro expression of the *SLC11A1* gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 17: 8-15.
- Techau, M., J. Valdez-Taubas, J. Popoff, R. Francis, M. Seaman and J. Blackwell. 2007. Evolution of differences in transport function in *Slc11a* family members. *The Journal of biological chemistry*, 282(49): 35646-35656.
- Trujillo, E. y Y. Valderrama. 2009. Genotipificación de la región 3'UTR del gen *Nramp1*, en ganado Holstein y en criollo Hartón del

- Valle. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4): 401-406.
- Vacca, G., M. Pazzola, C. Pisano, V. Carcangiu, M. Diaz, M. Nieddu, R. Robledo, R. Mezzanotte and M.L. Dettori. 2011. Chromosomal localisation and genetic variation of the SLC11A1 gene in goats (*Capra hircus*). *Veterinary journal* (London, England: 1997), 190(1): 60-65. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.028
- Vázquez, F., R. Alonso, N. Villegas, C. Arriaga, A. Pereira, R. Mancilla and C. Estrada. 2006. A microsatellite study of bovine solute carrier family 11 a1 (Slc11a1) gene diversity in Mexico in relation to bovine tuberculosis. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3): 503-507.
- Vidal, S., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3): 469-485.
- Yeh, F. and T. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*(129): 157.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 7(1-2): 203-214. doi: 10.1089/10665270050081478.