Identificación de nuevos polimorfismos dentro de la región codificante del gen slc11a1 en varias razas de las subespecies *Bos taurus taurus* y *Bos taurus indicus*[*]

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes estrategias para reducir la morbilidad y prevalencia de agentes infecciosos como la brucelosis, la tuberculosis y la salmonelosis; entre otras, las asociadas a la utilización de vacunas, que pueden suponer mayores costes de producción, o a la utilización de antibióticos, lo cual puede tener un gran impacto sobre la salud pública y conducir potencialmente al desarrollo de cepas bacterianas resistentes. La mejora de los animales domésticos para incrementar la resistencia a enfermedades se presenta como una opción atractiva para disminuir el efecto negativo del agente patógeno y permite obtener animales resistentes, lo que en combinación con buenas prácticas de higiene ofrece una estrategia fácil y de bajo riesgo para el control de la enfermedad y la colonización por patógenos intracelulares como *Brucella* spp. o *Salmonella* spp. (Wigley, 2004).

El gen de la proteína 1 del macrófago asociada con resistencia natural (NRAMP 1), formalmente llamado *Slc11a1* (Solute carrier family 11 member 1), está asociado con susceptibilidad/resistencia a muchos patógenos intracelulares, tales como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella enterica* y *Leishmania donovani* en un diverso rango de especies de mamíferos que incluyen al ratón, el bovino y el humano (Vidal *et al.*, 1993; Malo y Skamene, 1994; Barton *et al.*, 1995; 1996; Vidal *et al.*, 1995b; Arias *et al.*, 1997; Bellamy, 1999). Este gen codifica un transportador de cationes divalentes localizado en la membrana del fagolisosoma en macrófagos y se ha demostrado que en ratón –además de su influencia sobre la inmunidad adaptativa (Vidal *et al.*, 1995)– puede jugar un papel crítico en la inmunidad innata, favoreciendo la muerte bacteriana por los macrófagos.

[*] Articulo en prensa: Journal of Animal Breeding and Genetics. Aceptado octubre de 2007 (Anexo 8.4). *Traducido de Journal of Animal breeding and Genetics, 2008*

Recientemente, Boriello *et al.* (2006) analizaron la presencia de un polimorfismo, que consiste en una repetición dinucleotídica localizada en la región 3´UTR de este gen en búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), y encontraron dos variantes que se diferenciaban en el número de repeticiones GT (repetición GT de 33 y 36 pb).

Aparte de esto, encontraron una asociación significativa entre el genotipo GT_{36}/GT_{36} y la resistencia a la infección por brucelosis, demostrando que los macrófagos *in vitro* de animales con este genotipo presentan niveles significativamente más altos de trascripción del gen *Slc11a1* que individuos con el otro genotipo y también una habilidad superior para el control de la replicación intracelular de varias especies de *Brucella*.

También han sido identificados otros polimorfismos en la secuencia codificante y no codificante del gen: quince nuevos polimorfismos en el intrón IV, V, el exón V (Ables *et al.*, 2002) y un nuevo polimorfismo dentro del intrón X, el cual parece ser estable y ampliamente distribuido en una población de *Bos taurus* analizada (Coussens *et al.*, 2004).

Estos trabajos muestran la existencia de un elevado nivel de polimorfismo en este gen, por lo que sería de interés llevar a cabo análisis adicionales que permitan encontrar posibles asociaciones entre alelos y resistencia a enfermedades en ganado bovino. El objetivo de este trabajo fue detectar polimorfismos dentro de la región codificante mediante análisis SSCP y posterior secuenciación, estimando las frecuencias de los alelos resultantes y analizando su distribución entre y dentro de diferentes razas bovinas de las subespecies *Bos taurus indicus* y *Bos taurus taurus*.

METODOLOGÍA

Población de animales

Inicialmente, para la detección de polimorfismos dentro del gen *Slc11a1* se utilizó un total de 14 animales: 10 de tipo taurino de la raza bovina criolla colombiana BON (BON) y 4 de tipo cebuíno (Cebú Brahman) previamente evaluados para resistencia a brucelosis (Martínez *et al.*, 2005) mediante un desafío bacteriano *in vitro* de macrófagos, siguiendo la metodología de Templeton *et al.* (1992) y Quereshi *et al.* (1996). Posteriormente, se genotiparon un total de 62 animales no emparentados de siete razas: Cebú (Cebú Brahman n=11), BON (BON, n=11), Romosinuano (ROMO; n=10), Asturiana de los Valles (AV; n=10), Rubia Gallega (RG; n=10), Pirenaica (Pi; n=10) y Holstein (H; n=10).

Genotipado de poblaciones

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando dos fuentes: 1) La secuencia disponible de un clon CH240-22N9 de ADN genómico de la subespecie *Bos taurus taurus* (GenBank, número de acceso AC149748), que incluyó la secuencia completa; y 2) La información proporcionada por Coussens *et al.* (2004) sobre la estructura del gen y las uniones intrón-exón.

Todos los oligonucleótidos iniciadores usados en el presente estudio fueron analizados para potencial estructura secundaria y dimerización usando el programa JellyFish (JellyFish v 3.0, LabVelocity Inc.). La amplificación de los fragmentos fue realizada usando la enzima Biotools Taq DNA Polimerasa (Madrid, España).

Para la detección de los polimorfismos se usaron 20–100 ng de los productos de amplificación por análisis de SSCP. La electroforesis se llevó a cabo a una temperatura constante de 10 °C y 4W durante 15 horas, y los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991, modificado en Barroso *et al.*, 1997).

Los fragmentos de PCR que presentaron polimorfismo fueron purificados en columnas (Roche Diagnostics) y secuenciados usando el kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) en un equipo de electroforesis capilar ABI 310 usando ambos cebadores. Para la edición y alineamiento de las secuencias se utilizó el programa SeqScape® (Software formutation profiling v2.6) y estas fueron comparadas con la secuencia de Feng *et al.* (1996) (Gen Bank, número de acceso U12862).

Las secuencias de proteína correspondientes a las nuevas variantes identificadas fueron alineadas con la secuencia de proteína del ratón (NP_038640), humano (NP000569), ovino (AAC28241) y bovino (AAA82582), usando el programa ClustalW (Higgins *et al.*, 1994). Los 72 individuos no emparentados se genotiparon para los diferentes SNP localizados en la región promotora en los exones 2, 9, 10, 11 y 15, usando la técnica de SSCP; las frecuencias alélicas y haplotípicas fueron computadas por raza, usando el programa Arlequin [v. 3.01 (Excoffier, 2006)].

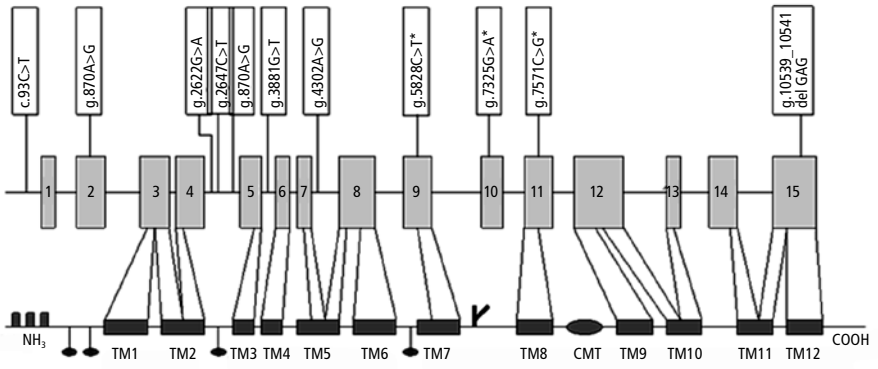
RESULTADOS

La mayoría de los fragmentos de PCR necesitaron una digestión enzimática para generar productos con un tamaño adecuado (inferiores a 500 pb) para

ser utilizados en el análisis de SSCP. Este procedimiento permitió la identificación de once bandas informativas en nueve regiones diferentes, que posteriormente fueron secuenciadas. Las nuevas secuencias obtenidas de un grupo de 14 individuos de las razas BON (*Bos taurus taurus*) y Cebú Brahman (*Bos taurus indicus*) se enviaron al GenBank y están disponibles con los números de acceso DQ493965 y DQ493966.

Identificación de variantes SNP en regiones codificantes del gen *Slc11a1*

En este trabajo se encontró que cinco de los SNP identificados se encontraron en zona codificante, otro en la región promotora y cinco en los intrones (Gráfico 6.2.), correspondiendo a siete transiciones, dos transversiones y una deleción. Tres polimorfismos fueron detectados en secuencias no codificantes en el intrón IV (g.2622G>A, g.2647C>T, g.3582C>T), además de dos variantes ubicadas en los intrones V y VI que corresponden a las mutaciones g.3881G>A y g.4302G>A.



* Los rectángulos indican exones, y las líneas de unión entre ellos indican intrones. Los SNP se indican de acuerdo con su posición en la secuencia (DQ493965) y estructura de la proteína. (TM: dominio transmembrana; CTM: motivo de transporte consenso).

Gráfico 6.2. Estructura genómica y polimorfismos del gen *Slc11a1*.

Tres de los nuevos polimorfismos descritos en el gen *Slc11a1* inducen un cambio aminoacídico de alanina a valina en la posición 272 (exón 9) de ácido aspártico a asparagina en la posición 321 en el exón 10 y de prolina a alanina en la posición 356 correspondiente al exón 11. Por último, una deleción de tres nucleótidos en la posición 542 causa una deleción de una glutamina en el exón terminal 15. La única mutación sinónima es un polimorfismo A>G en el exón 2.

Análisis de variaciones en la secuencia de la proteína

Mediante el uso del programa nnPredict *(Donald, 2006)* se identificaron cambios en la estructura secundaria predicha de la proteína NRAMP1, debido a los cambios ocurridos en el exón 9 y 11: el primero localizado entre el dominio transmembrana 6 y 7 produce una cadena en un sitio sin estructura secundaria predicha, cambiando la estructura de hélice; y el exón 11, localizado dentro del dominio transmembrana 8, genera una variación corriente abajo, cambiando una cadena por una estructura de doble hélice. Finalmente, los polimorfismos en el exón 10 (entre el dominio transmembrana 7 y 8) y en el exón 15 (cerca al dominio transmembrana 10) están localizados en sitios sin una estructura secundaria predicha.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos para el gen *Slc11a1* en bovinos (*Bos taurus taurus, Bos taurus indicus*), humanos, ovejas y ratón (Gráfico 6.3) muestra el cambio de aminoácido en las posiciones 321 y 356 en *Bos taurus taurus* pero no en *Bos taurus indicus*, que presenta el mismo aminoácido de las demás especies incluidas en el análisis. Por el contrario, el cambio de aminoácido en la posición 272 se encontró en *Bos taurus indicus* y también en *Mus musculus,* pero no en las otras especies, y la deleción en la posición 542 del exón terminal 15 ha sido también encontrada en humanos.

El análisis de la secuencia aminoacídica indica una mayor similitud entre las especies bovina y ovina, pero menor con la secuencia de la proteína NRAMP1 de ratón (Gráfico 6.3).

Frecuencias alélicas y genotípicas en varias razas

También se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas en dos razas criollas colombianas [BON (BON) y Romosinuano (ROMO)], tres razas autóctonas españolas [Rubia Gallega (RG), Asturiana de Valles (AV) y Pirenaica (Pi)] y en dos razas comerciales ampliamente distribuidas, una cebuína [Cebú Brahman] y otra taurina [Holstein Friesian (H)]. Solamente dos SNP (SNP2 (0,26 ± 0,052) y SNP5 (0,22 ± 0,049) aparecieron en homocigosis con una frecuencia superior a 0,20 (Tabla 6.4.), encontrándose los genotipos heterocigotos en frecuencia muy baja, con la excepción del SNP5 en el exón 11 (0,25 ± 0,051). Los homocigotos tipo salvaje siempre estuvieron en frecuencias superiores a 0,50.

Varios alelos mutados presentaron bajas frecuencias, con valores entre 0,09 para el alelo T en el SNP3 y 0,34 para el alelo C en el SNP5, ambos inducen

Bos taurus	MSGDTGPPKQGGTRYGSISSPPS---PEPQQAPPGGTYLSEKIPIPDTESGTFSLRKLWA 57
Bos indicus	MSGDTGPPKQGGTRYGSISSPPS---PEPQQAPPGGTYLSEKIPIPDTESGTFSLRKLWA 57
Ovisaries	MSGDTGTPNQGGTRYGSISSPPS---PGPQQAPPGGTYLSEKIPIPDTESGAFSLRKLWA 57
Homo sapiens	MTGDKGPQRLSGSSYGSISSPTSPTSPGPQQAPPRETYLSEKIPIPDTKPGTFSLRKLWA 60
Mus musculus	MISDKSPPRLSRPSYGSISSLPG---PAPQPAPCRETYLSEKIPIPSADQGTFSLRKLWA 57
Bos taurus	LLQAVGIIGAIIMPHNIYLHSSLVKSREVDRSRRADIREANMYFLIEATIALSVSFLINL 297
Bos indicus	LLQAVGIIGAIIMPHNIYLHSSLVKSREVDRSRRVDIREANMYFLIEATIALSVSFLINL 297
Ovisaries	LLQAVGIVGAIIMPHNIYLHSSLVKSREVDRSRRADIREANMYFLIEATIALSVSFFINL 297
Homo sapiens	LLQAVGIVGAIIMPHNIYLHSALVKSREIDRARRADIREANMYFLIEATIALSVSFIINL 300
Mus musculus	LLQAVGIVGAIIMPHNIYLHSALVKSREVDRTRRVDVREANMYFLIEATIALSVSFIINL 297
Bos taurus	FVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICADSSLHDYAPIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPPA 357
Bos indicus	FVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLHDYAPIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPAA 357
Ovisaries	FVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLHDYATIFPRDNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPAA 357
Homo sapiens	FVMAVFGQAFYQKTNQAAFNICANSSLHDYAKIFPMNNATVAVDIYQGGVILGCLFGPAA 360
Mus musculus	FVMAVFGQAFYQQTNEEAFNICANSSLQNYAKIFPRDNNTVSVDIYQGGVILGCLFGPAA 357
Bostaurus	EEDQEKGRTSG 548
Bos indicus	EEDQ –KGRTSG 547
Ovisaries	GEDQEEGRTSG 548
Homo sapiens	EEDQ –KGETSG 550
Mus musculus	NEEQGGVQGSG 548

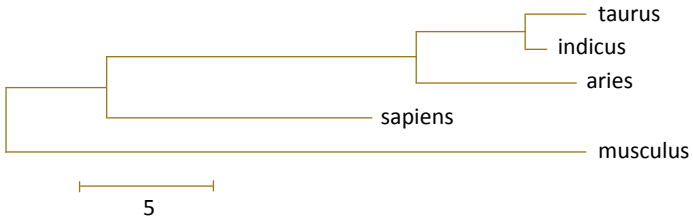


Gráfico 6.3. Variabilidad aminoacídica entre especies para la proteína NRAMP1 codificada por el gen *Slc11a1*.

una sustitución de aminoácidos. También se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) para las frecuencias de alelos y genotipos entre razas. En el SNP1 el alelo C presentó frecuencias extremas, variando entre la ausencia en Cebú y la fijación en las diferentes razas taurinas.

Igualmente, el alelo A para el SNP2 varió desde 0,09 en Cebú a 1,0 en H. Sin embargo, en el SNP3 localizado en el exón 9 se presentó una baja variabilidad entre razas, siendo solamente Cebú y BON las razas donde el tipo salvaje (C) no fue fijado. El alelo G en el SNP4 no se encontró en los animales de origen Cebú analizados, en los que el alelo A está fijado; no obstante, solamente apareció en una de las razas taurinas analizadas, la raza BON.

Tabla 6.4. Frecuencias genotípicas para los seis marcadores tipo SNP que fueron genotipados en una población de 72 individuos de siete razas.

GENOTIPO	SNP1 nt151 (promotor)*			SNP2 aa29*			SNP3 aa272*			SNP4 aa321*		SNP5 aa356*			SNP6 aa_del_542*		
RAZA	C	C/T	T	A	A/G	G	C	C/T	T	G	A	C	C/G	G	GAG	GAG/del	-----
BON	0.73	0,18	0,09	0,82	0,18	0,00	0.73	0,27	0,00	0,73	0,27	0,64	0,00	0,36	1,00	0,00	0,00
CEBÚ	0.00	0,09	0,91	0,09	0,09	0,82	0,64	0,00	0.36	0.00	1,00	0,18	0,09	0,73	0,27	0,27	0,45
RG	1,00	0.00	0.00	0,90	0,00	0,10	1,00	0.00	0.00	1.00	0,00	0,30	0,50	0,20	0,30	0,40	0,30
AV	0.90	0.00	0,10	0.70	0.00	0.30	0.90	0.00	0.10	1.00	0.00	0,80	0.20	0,00	1,00	0.00	0,00
Pi	1,00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.60	1.00	0.00	0,00	1.00	0.00	0.30	0.50	0.20	0.70	0.30	0,00
H	1,00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0,00	1.00	0.00	0.00
ROMO	1,00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.50	0.50	0,00	1.00	0,00	0,00
Freq ±S D.	0.78 ±0.0 5	0.04 ±0.0 2	0,17 ±0.0 4	0.69 ±0.0 5	0.04 ±0.0 2	0.26 ±0.0 5	0.89 ±0.0 4	0.04 ±0.0 2	0.07 ±0.0 3	0.82 ±0.0 4	0.18 ±0.0 4	0.22 ±0.0 5	0.25 ±0.0 5	0.52 ±0.0 6	0.75 ±0.0 5	0.14 ±0.0 4	0.11± 0.03
Frec alelic	0.80 2		0,18 8	0.71 5		0.28 8	0.90 9		0.09 0	0.81 9	0,18 0	0.65 2		0.34 7	0.81 9		0,180

BON: Blanco Orejinegro, CEBU: Cebú Brahman, RG: Rubia Gallega. AV: Avileña negra Ibérica. Pi: Pirenaica. H: Holstein. ROMO: Romosinuano. 'Localización en la secuencia (nt: posición del nucleótido; aa: posición del aminoácido)

Tabla 6.5. Descripción de los ocho haplotipos más frecuentes y las frecuencias dentro y entre razas.

Haplotipo\ Raza	BON	CEBU	AV	RG	PI	H	ROMO	Frecuencia
CACGCTCAGGAGAAG	|0.43±0,13 |	0	0.50±0,165	0.35±0.11	0,13±0 09	1.00±0.00	0.66±0,12	0,40±0,04
CACGGTCAGGAGAAG	0,07±0,07	0	0,16±0,11	0,05±0,05	0,20±0,10	0	0,33±0,12	0,12±0,03
CGCGCTCAGGAGAA G	0	0	0,16±0,11	0	0,26±0,13	0	0	0,06±0,02
CACGGTCAG - - - AAG	0	0	0	0,29±0,11	0	0	0	0,05±0,02
CACGCTCAG - - - AAG	0	0	0	0,17±0,09	0,13±0,09	0	0	0,05±0,02
CGCGGTCAGGAGAAG	0	0	0	0,05±0,05	0.20±0,10	0	0	0,04±0,02
TGTAGTCAGGA G AAG	0,07±0,07	0,13±0,11	0	0	0	0	0	0,04±0,02
TGCAGTCAG - - - AAG	0	0,20±0,10	0	0	0	0	0	0,03±0,01

Los genotipos heterocigotos presentaron en general bajas frecuencias, con excepción del SNP5 en las razas autóctonas españolas y la raza ROMO, y el SNP6 en la raza cebuína y la taurina Rubia Gallega. El SNP4 no presentó individuos con genotipos heterocigotos en ninguna de las razas. Por otra parte, la raza BON presentó frecuencias de genotipos heterocigotos entre 0,18 y 0,27 en los tres primeros SNP (Tabla 6.4).

Los genotipos SNP analizados se utilizaron para la construcción de haplotipos mediante el programa Arlequin v3.01 (Excoffier 2006). Los 24 haplotipos descritos presentaron frecuencias bajas, inferiores a 0,10, excepto el haplotipo 1 (0,40 ± 0,04 -28 individuos) y el haplotipo 2 (0,12 ± 0,03 - 9 individuos). En la Tabla 6.5 se presentan los resultados para los ocho haplotipos más frecuentes.

Puede observarse que todas las razas taurinas presentan un haplotipo común, con frecuencias superiores a 0,2, excepto para la raza Pirenaica, en la que la frecuencia de este haplotipo fue inferior (0,13). En la raza Holstein este haplotipo común se encontró fijado, mientras apareció con frecuencias relativamente elevadas y similares en ROMO (0,66 ± 0,12), BON (0,43 ± 0,13) y Avileña (0,50 ± 0,16). El haplotipo más común que apareció en los individuos de la raza cebuína presentó la deleción en el exón 15 (0,20 ± 0,14). Por su parte, la raza cebuína presentó varios haplotipos que no fueron encontrados en las otras razas taurinas.

DISCUSIÓN

Identificación de variantes SNP en regiones codificantes del gen *Slc11a1*

Se identificaron once SNP en un total de 10665 pb, lo que significa que en promedio existe un SNP cada 969 pb, valor mucho más bajo que lo descrito para la especie humana, en la que se encuentra un promedio de un SNP cada 300 pb (Nelson *et al.*, 2004) en secuencias codificantes o comparado con un SNP cada 250 pb para el gen PRKAG3 en la especie porcina (Roux *et al.*, 2006) o 189 bp en el gen de la leptina en bovinos (Konfortov *et al.*, 1999). La frecuencia de SNP es muy variable entre regiones de ADN, siendo las regiones codificantes particularmente más estables probablemente a causa de la presión de selección a la que pueden estar sometidas. En la especie bovina, varios genes para citoquinas han sido evaluados para presencia de SNP, re-

velando una frecuencia de variaciones similar o aún más alta que un SNP por cada 75-237 bp (Heaton *et al.*, 2001). Por lo tanto, el reducido valor de variabilidad encontrado en nuestro trabajo podría ser explicado por una elevada presión de selección sobre el gen *Slc11a1* en bovinos.

Cinco de las variantes tipo SNP identificados en el gen *Slc11a1* se encontraron en exones, de los cuales son siete transiciones, dos transversiones y una deleción, polimorfismos que no han sido previamente reportados, aunque algunas de las variaciones de secuencia ubicadas en los intrones V y VI (g.3881G>A y g.4302G>A) fueron previamente descritas por Pandey *et al.* (2005) (GenBank, número de acceso AY840991, AY840992). Otros polimorfismos que fueron detectados en este trabajo en secuencias no codificantes (g.2622G>A, g.2647C>T, g.3582C>T) no habían sido descritos anteriormente por Ables *et al.* (2002), quienes analizaron la misma región de este gen. Otras dos mutaciones previamente identificadas en el intrón VI (deleción A/-; GenBank, número de acceso AY840992) y en el intrón X (Coussens *et al.*, 2004) tampoco fueron encontradas en este estudio. Ambos alelos fueron descritos por Coussens *et al.* (2004) como una variante estable y ampliamente distribuida en las poblaciones de *Bos taurus taurus* con frecuencias de 0,65 y 0,35 para los alelos salvaje y mutados respectivamente.

Análisis de variaciones en la secuencia de la proteína

Solamente tres de las variantes descritas inducen un cambio aminoacídico; además, se reporta una deleción de tres nucleótidos, que ocasiona la pérdida de una glutamina en la posición 542 de la proteína y la única mutación sinónima es un polimorfismo A>G en el exón 2. Ables *et al.* (2002) encontraron un cambio de un aminoácido en la posición 1202 en el exón 5, codificando para treonina (en tres razas) en lugar de una Isoleucina (otras tres razas de *Bos taurus taurus* y *Bubalus bubalis*), pero este polimorfismo no fue detectado en este estudio. Debido al elevado grado de conservación entre especies, se hubiera esperado encontrar el cambio de un residuo de glicina en la posición 169 en el exón 7 por una asparagina, que corresponde al fenotipo sensible como ocurre en ratón (Malo *et al.*, 1994); sin embargo, como fue reportado por Feng *et al.* (1996), todos los animales analizados en su estudio presentaron un residuo de glicina.

Las variantes ubicadas en los exones 9,10 y 11 pueden ocasionar cambios en la estructura secundaria predicha de la proteína NRAMP1, debido a que los

cambios se dan en secuencia codificante y esto puede afectar la funcionalidad de la misma. La única mutación silenciosa en la secuencia codificante afecta la tercera posición del codón y no ocasiona un cambio en la secuencia de la proteína, pero como en mamíferos hay una preferencia por finalizar los codones con G o C (Porter *et al.*, 1995) esta podría influir en la eficiencia de la traducción. No obstante, es necesario realizar análisis adicionales para ver si tanto la mutación silente o alguna de las mutaciones codificantes alteran la eficiencia en la traducción, el plegamiento o la actividad de la proteína.

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos del gen *Slc11a1* en bovinos (*Bos taurus, Bos indicus*), humano, ovino y ratón, indicó que en las variantes de los aminoácidos 321 y 356 presentaron en *Bos taurus* el mismo aminoácido de las demás especies, pero en la posición 272 la variante solo se compartió entre *Bos indicus* y *Mus musculus,* y la deleción en la posición 542 también se presentó en humanos. Estos resultados indican la existencia de mutaciones conservadas entre las especies analizadas que no habían sido detectadas en *Bos taurus taurus*, y posiblemente estas variantes provoquen cambios importantes en los dominios transmembrana de la proteína que codifican.

Frecuencias alélicas y genotípicas en varias razas

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron analizadas en dos razas criollas colombianas; tres razas autóctonas españolas; y dos razas comerciales ampliamente distribuidas, una cebuína y otra taurina. Se encontró que las variantes SNP2 y SNP5 aparecieron en homocigosis con una frecuencia superior a 0,20 y una frecuencia de heterocigotos muy baja. Solamente el SNP5 presentó homocigotos tipo salvaje en alta frecuencia, pero en general los alelos mutados presentaron bajas frecuencias y tres de ellos indujeron una sustitución de aminoácidos. De forma similar, Roux *et al.* (2006) encontraron que una baja frecuencia alélica para un SNP (<1%) se da cuando esta induce una sustitución aminoacídica; como regla general, SNP en regiones codificantes y especialmente SNP no sinónimos ocurren menos a menudo y se encuentran a más bajas frecuencias que las variaciones presentes en intrones (Cargill *et al.*, 1999), lo que puede indicar una selección negativa contra alelos deletéreos durante la evolución. Sin embargo, estos resultados sugieren que los aminoácidos de las posiciones mencionadas podrían explicar un nivel diferente de resistencia a brucelosis en las diferentes razas analizadas, por lo que sería necesario probar una posible asociación entre estas mutaciones y la resistencia medida a través de un ensayo de desafío infeccioso de macrófagos *in vitro*.

En general se presentaron diferencias significativas para las frecuencias de alelos y genotipos entre razas, y los genotipos heterocigotos presentaron bajas frecuencias, con excepción del SNP5 en las razas autóctonas españolas y la raza ROMO, y el SNP6 en la raza Cebú y la raza taurina Rubia Gallega. En el análisis de haplotipos se encontró que todas las razas taurinas presentan un haplotipo común, que es diferente al encontrado en la raza cebuína, que presentó varios haplotipos que no fueron encontrados en las otras razas taurinas.

En resumen, se encontró una moderada variabilidad en la secuencia codificante del gen *Slc11a1* en ganado bovino, lo cual podría ser un signo de la presión selectiva sobre este gen. Previamente, se había demostrado que este gen parece jugar un papel importante en el control de la infección contra algunos agentes patógenos en ganado bovino (Feng *et al.*, 1996; Barthel *et al.*, 2001; Horin *et al.*, 1999) y en búfalos (Boriello *et al.*, 2006).

Sin embargo, el polimorfismo 3'UTR localizado en dicho gen no había permitido establecer una clara asociación con resistencia a brucelosis en poblaciones *Bos taurus indicus* y *Bos taurus taurus x Bos taurus indicus* (Kumar *et al.*, 2005). Por lo tanto, una caracterización más completa del gen *Slc11a1* que permita incorporar información sobre nuevos polimorfismos, algunos de ellos no sinónimos, en diferentes razas con diferentes niveles de resistencia a brucelosis, puede contribuir a identificar los mecanismos mediante los cuales un individuo perteneciente a una raza de origen taurino o cebuíno presentaría resistencia cuando se enfrenta a una infección con *Brucella abortus*.