



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación del marcador de resistencia natural *Nramp1* en Brahman, Criollo y Holstein

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autores:

Karina Marcela Hurtado Bermeo

María Elisa Rosado Rodas

Director:

Guillermo Emilio Guevara Viera

ORCID:  0000-0003-3832-9090

Cuenca, Ecuador

2024-11-14

Resumen

La ganadería bovina es considerada una de las fuentes principales de ingresos económicos en Ecuador. Por esta razón muchos productores se han enfocado en el mejoramiento productivo, mediante cruces genéticos con razas extranjeras, lo cual ha causado la disminución de la población de ganado Criollo endémico y la pérdida de sus propiedades de adaptabilidad asociadas con resistencia a enfermedades bacterianas de importancia en nuestro país. El gen *Nramp1* cuenta con características consideradas determinantes ante la presencia de una infección por diversos patógenos intracelulares. Por esta razón científicos han basado sus investigaciones en determinar si el polimorfismo de este gen puede llegar a explicar la variación racial en la susceptibilidad a distintas enfermedades. Esta investigación evaluó la existencia de polimorfismo puntual en la secuencia de codificación de *Nramp1* entre bovinos de las razas Holstein, Brahman y Criolla. Para esto se utilizaron 30 muestras de ADN total de cada una de las razas mencionadas, el genotipado se llevó a cabo mediante amplificación PCR y SSCA para la detección de polimorfismos de los locus SPN4 y SPN5 de *Nramp1*. Los alelos encontrados para SNP4 expresan un único alelo fijado (A) en todos los individuos homocigotos, y para SNP5 la raza Holstein revela un alelo fijado (A) homocigótico, mientras que en bovinos Brahman y Criollo, alta predominancia de heterocigosidad (AB). En conclusión, se demostró que, si existe variación en la distribución de los alelos que codifican la proteína *Nramp1* entre razas, sin embargo, no se comprobó existencia de polimorfismo puntual.

Palabras clave del autor: bovinos, gen, snp, pcr, polimorfismo



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Cattle farming is considered one of the main sources of economic income in Ecuador. For this reason, many producers have focused on productive improvement through genetic crosses with foreign breeds, which has caused the decrease of the endemic Criollo cattle population, and the loss of its adaptability properties associated with resistance to bacterial diseases of importance in our country. The *Nramp1* gene has characteristics considered determinants in the presence of an infection by various intracellular pathogens. For this reason, scientists have based their research on determining whether the polymorphism of this gene can explain the racial variation in susceptibility to different diseases. This research evaluated the existence of a polymorphism in the coding sequence of the *Nramp1* gene among cattle of the Holstein, Brahman and Criolla breeds. For this purpose, 30 total DNA samples from each of the mentioned breeds were used. Genotyping was carried out by PCR and SSCA for the detection of polymorphisms of the SPN4 and SPN5 loci of *Nramp1*. The alleles found for SNP4 express a single homozygous fixed allele (A) in all homozygous individuals, and for SNP5 the Holstein breed reveals a homozygous fixed allele (A), while in Brahman and Criollo cattle, a high predominance of heterozygosity (AB) was found. In conclusion, it was shown that there is variation in the alleles that encode the *Nramp1* protein between breeds, however, the existence of a polymorphism was not proven.

Author Keywords: cattle, gene, snp, pcr, polymorphism



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenidos

Resumen	2
Abstract.....	3
Índice de contenidos.....	4
Índice de ilustraciones.....	6
Índice de tablas	7
Agradecimiento	8
Dedicatoria.....	9
Abreviaturas	10
Capítulo 1: Introducción	11
Capítulo 2: Objetivos	12
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivos específicos	12
Capítulo 3: Hipótesis.....	12
Capítulo 4: Revisión de Literatura	13
4.1. Importancia de la ganadería en Ecuador.....	13
4.2. Principales enfermedades que afectan al ganado bovino.....	14
4.3. Importancia de los estudios genéticos en las enfermedades bacterianas	15
4.4. Métodos para determinar la resistencia	15
4.5. Diferentes técnicas para determinar resistencia	16
4.6. Gen Nramp1.....	17
4.7. Resultados que asocian Nramp1 con la resistencia a enfermedades.....	18
4.8. Alelos existentes y su posible influencia en resistencia a enfermedades.....	19
4.9. Frecuencia absoluta y relativa.....	20
4.10. Heterocigosis esperada y observada.....	20
4.11. Equilibrio Hardy-Weinberg	21

4.12. Consanguinidad	21
Capítulo 5: Materiales Y Métodos	22
5.1. Área de estudio	22
5.2. Materiales y Métodos.....	22
Capítulo 6: Resultados Y Discusión.....	32
6.1. Análisis estadístico y genético.....	32
6.2. Frecuencias genotípicas y génicas.....	33
6.3. Heterocigosidad observada y esperada, Equilibrio de Hardy-Weinberg y Alelos nulos.	34
6.4. Diferenciación genética, genotípica y génica entre razas e índice de fijación de Wright	35
Conclusiones.....	38
Recomendaciones.....	39
Referencias	40
Anexos	48

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Ubicación del área de estudio (Guayas - Balao)	22
Ilustración 2. Electroforesis de muestras para cebadores SNP4 y SNP5 para determinación de perfil de temperaturas de amplificación.....	29
Ilustración 3 . Muestras de carácter homocigoto de ganado Brahman para SNP4.	32
Ilustración 4. Muestras de carácter heterocigoto de ganado Brahman para SNP5	32

Índice de tablas

Tabla 1. Secuenciación de oligonucleótidos de SNP4 y SNP5 (Martínez et al., 2010).	25
Tabla 2. Componentes utilizados para la mezcla utilizada para amplificación de muestra para PCR de SNP4.	26
Tabla 3. Componentes utilizados para la mezcla utilizada para amplificación de muestra para PCR de SNP5	26
Tabla 4. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR de SNP4.....	27
Tabla 5. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR de SNP5.....	27
Tabla 6. Frecuencias absolutas y relativas del SNP5 en tres razas bovinas.....	33
Tabla 7. Heterocigosidad y homocigosidad esperadas; Equilibrio de Hardy-Weinberg y Frecuencia de alelos nulos para el marcador SNP5.....	34
Tabla 8. Diferenciación genética, genotípica y génica entre las razas e índice de fijación de Wright.....	35
Tabla 9. Diferenciación genotípica y génica entre las razas mediante el Test de Chi Cuadrado.	36

Agradecimiento

Agradezco a mi familia, por creer en mí, por los valores y principios que me inculcaron, por su apoyo incondicional durante todo este camino y motivarme a alcanzar mis metas.

A nuestro director de tesis Dr. Guillermo Guevara, quien con entusiasmo, sabiduría y paciencia nos guio y apoyó en cada paso de este proceso, de igual manera al Dr. Antonio Vallecillo por la asesoría y valiosa colaboración brindada para la ejecución de la parte experimental del presente proyecto.

A mi gran amiga y compañera de tesis, María Elisa, con quien después de un largo camino, con mucho esfuerzo, hemos logrado juntas la culminación de esta etapa.

A la Universidad de Cuenca, y a cada uno de los docentes, compañeros y colegas que aportaron en mi formación académica y profesional.

Karina Marcela Hurtado Bermeo

Hago extenso mi agradecimiento a mis padres, Cristina y Álvaro, y a mi hermano, Andrés, quienes supieron guiarme durante todo este proceso y apoyarme durante todo mi desarrollo personal y profesional, gracias a su confianza he podido alcanzar metas que parecían inalcanzables, Al Doctor Guillermo Guevara, quien desde el inicio de la carrera supo enseñarme y acompañarme hasta este punto siempre con una sonrisa y la mejor predisposición. A mi compañera de tesis, Karina, quien ha cursado conmigo toda esta travesía y más allá de lo académico ha llegado a ser una gran amiga que me ha apoyado en momentos muy duros.

Además, agradezco a mis abuelos Lucia, Wilson, Olga y Juan, a mis amigos y colegas quienes han estado a mi lado para verme triunfar y alcanzar mis metas una a una; cada una de sus enseñanzas y palabras de aliento han sido muy significativas para mí, motivándome todos los días para llegar hasta donde estoy.

Este logro, lo considero colectivo, a todos quienes forman parte de mi vida, mi más sincero agradecimiento.

María Elisa Rosado Rodas

Dedicatoria

A mis padres, Lucía y Teodoro, y mi hermana Vanessa, quienes con su amor y comprensión me han apoyado y motivado en cada paso que doy.

A mis abuelitos, Lastenia y Gilberto, el cariño, el ejemplo, las enseñanzas y los consejos que me han brindado son un pilar fundamental en mi vida.

A mis amadas mascotas Canelita, Tobías y Clarita, quienes son mi más grande inspiración para dedicarme a esta hermosa profesión.

Karina Marcela Hurtado Bermeo

Dedico este trabajo a mi familia, quienes siempre supieron que lograría todo lo que me proponga, quienes han sabido acompañarme en todo momento y verme crecer en cada uno de los aspectos de mi vida, todos mis triunfos son para ustedes.

Para mis amigos y colegas, que de alguna manera han formado parte de este proceso, cada uno de ha aportado un granito en mi experiencia, ya sea mediante conocimientos compartidos, consejos valiosos o simplemente compañía en situaciones difíciles.

María Elisa Rosado Rodas

Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena polimerasa
SSCA	Análisis de conformación monocatenaria
Taq	polimerasa termoestable
x g	Fuerza centrífuga relativa
h	hora
min	minuto
seg	segundo
mm	milímetro
ml	mililitro
μl	microlitro
mM	miliMolar
g	gramo
mg	miligramo
TAE	Tris acetato EDTA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MgSO₄	Sulfato de magnesio
Ho	Hipótesis nula
Hi	Hipótesis alternativa
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
dNTP's	desoxirribonucleótidos trifosfatos

Capítulo 1: Introducción

La producción bovina es una actividad trascendental en Ecuador, siendo una fuente económica importante y a su vez contribuyendo con los productos para la alimentación de los ecuatorianos (Burgasí et al., 2014). En los últimos años el mejoramiento genético bovino se ha enfocado en la intensificación productiva, por lo tanto, se han introducido razas extranjeras que destacan en distintas líneas productivas, tal es el caso de la raza Holstein para producción de leche y la raza Brahman para la producción de carne (DAD-IS, 2020); pero se debe tomar en cuenta que al hablar de productos que son aptos para el consumo, es importante la sanidad animal, en el Ecuador existen enfermedades infecciosas que afectan de manera recurrente en los hatos, muchas de ellas de carácter zoonótico y por ende van a ser importantes para la salud pública de nuestro país (Díaz, 2003).

De acuerdo con los datos planteados por el INEC, es notable el incremento de la línea genética mestiza, lo cual puede ser indicativo de que hay un aumento en la cantidad de cruces para mejoramiento genético con la finalidad de aumentar los índices productivos (INEC, 2021). En consecuencia, el ganado criollo se ha visto afectado, ya que ha provocado la pérdida progresiva de sus propias cualidades genéticas y la disminución de la población de este genotipo (DAD-IS, 2020). Los procesos de cruzamiento con otras razas conllevan a un incremento de ganado con bajos niveles de adaptabilidad y resistencia a diversos agentes ambientales (Parra et al., 2021).

Al pasar los años, profesionales tienen la necesidad de indagar acerca de la heredabilidad de los genes y predominio de los mismos en distintas razas de ganado, muchos de ellos concuerdan en la herencia de un gen específico *Nramp1*, quien promueve la eliminación de bacterias por parte de los macrófagos debido a su función de transporte de membrana (Vidal et al., 1995); en varios estudios, este gen ha sido asociado con la resistencia a ciertas enfermedades infecciosas (Martínez et al., 2005), entre ellas, Brucelosis (Paixao et al., 2007), Tuberculosis (González et al., 2018), y Mastitis (Schulman et al., 2004), enfermedades de importancia crítica en nuestro país, dos de ellas de notificación obligatoria ante Agrocalidad.

La identificación de la herencia de este gen en bovinos criollos (Martínez et al., 2010) podría considerarse una herramienta estratégica de prevención para reducir la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, y por tanto el impacto de negativo en la población animal, atribuyéndole importancia así a este genotipo, y promoviendo la conservación de esta línea genética.

Capítulo 2: Objetivos

2.1. Objetivo general

- 2.1.1. Evaluar la existencia de polimorfismo puntual en la secuencia de codificación Slc11A1 del gen *Nramp1* entre bovinos de las razas Holstein, Brahman y Criolla.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Determinar la frecuencia génica y genotípica de los alelos A y B pertenecientes a la proteína *Nramp1* en 3 razas bovinas.
- 2.2.2. Comparar la frecuencia génica y genotípica de los alelos A y B pertenecientes a la proteína *Nramp1* entre las 3 razas bovinas.

Capítulo 3: Hipótesis

¿Existe variación en la frecuencia de los alelos que codifican la proteína *Nramp1* entre las razas bovinas Holstein, Brahman y Criolla?

Capítulo 4: Revisión de Literatura

4.1. Importancia de la ganadería en Ecuador

La ganadería desempeña un papel fundamental dentro del sector agropecuario del Ecuador, y es de vital importancia para la economía y la seguridad alimentaria de la población, según datos oficiales del Banco Mundial (2023), el sector agropecuario aportó un 8,8 % al Producto Interno Bruto (PIB) del país durante el año 2022.

Dentro del sector ganadero, se destaca el ganado bovino, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), se registraron 3.9 millones de cabezas de ganado a nivel nacional, el mayor porcentaje se concentra en la región Sierra (53,0 %), seguida de la Costa (38,5 %) y la Amazonía (8,5 %). La producción bovina en las regiones costa y oriente produce el mayor porcentaje de ganado de carne, mientras que la región sierra se enfoca en la producción lechera (INEC, 2023).

En Ecuador, la diversidad de razas de ganado bovino es notable, reflejando la adaptación a diferentes climas y condiciones geográficas del país. El genotipo predominante en el país corresponde a bovinos mestizos, representando el 36,7 % del total nacional, seguidos por los genotipos criollos (23,3 %), otras razas que se encuentran en un porcentaje menor, pero considerable, que incluyen Brahman (14,9 %), Holstein (9,5 %), Brown Swiss (6,6 %) y Jersey (3,0 %) (INEC, 2021).

De las razas mencionadas, el ganado de raza Brahman es más adecuado para producción de carne en condiciones climáticas cálidas, por otro lado, el Holstein y Jersey se destacan por su alta producción de leche de buena calidad; el ganado Brown Swiss se describe como una raza de doble propósito con mayor tendencia a la leche (Cuellar, 2021).

El genotipo criollo se puede describir como ganado de triple propósito: leche, carne y trabajo (Sánchez, 2003). Cevallos (2017), menciona que los criollos son muy valiosos por su rusticidad, excelente adaptación al clima y a la topografía irregular y resistencia a enfermedades. Estas características se presentan debido a que los bovinos criollos de América Latina se encuentran en este territorio hace más de 500 años, y evolucionaron por selección natural, lo cual les otorgó aptitudes únicas para sobrevivir y reproducirse en diversos ecosistemas (Parra et al., 2021)

En cuanto a los mestizos, son el resultado del cruce de varias razas, cuya población es mayoritaria y va en aumento, debido a que, en las últimas décadas, uno de los mayores enfoques de la industria ganadera ha sido el mejoramiento genético orientado hacia la intensificación productiva, por lo que se han introducido varias razas extranjeras que destacan en líneas productivas (Mendoza et al., 2022).

Estos procesos de cruzamiento con otras razas han traído como consecuencia la disminución de la población de ganado Criollo, el cual es endémica del territorio, y con ellos la pérdida progresiva de su rusticidad y sus cualidades genéticas, por lo tanto, incremento de ganado con bajos niveles de adaptabilidad y resistencia a diversos agentes ambientales (DAD-IS, 2020; Parra et al., 2021). Según datos obtenidos por Cevallos (2017), se puede considerar al ganado de raza Criolla ecuatoriano, en una situación de extremo riesgo de perderse. La relevancia de preservar el ganado bovino Criollo reside en su condición de valioso recurso genético generado en el ecosistema sudamericano y en su habilidad para adaptarse a ambientes con condiciones extremas, caracterizados por escasez de nutrientes en los pastos y condiciones climáticas variables, donde la crianza de razas foráneas sería insostenible (Mendoza et al., 2022).

Con base a lo antes mencionado, se puede señalar que, al dirigir todos los esfuerzos de mejoramiento genético en parámetros productivos, se está restando importancia a otros aspectos igual o más trascendentales para la sostenibilidad de la industria ganadera, tales como la adaptabilidad del ganado, y la prevención y resistencia a enfermedades infecciosas y no infecciosas. Según Díaz (2003) en el Ecuador existen enfermedades infecciosas que afectan de manera recurrente en los hatos causando pérdidas económicas en la ganadería, muchas de ellas de carácter zoonótico y considerables para la salud pública.

4.2. Principales enfermedades que afectan al ganado bovino

Según un estudio realizado por la Universidad de Oxford (2023), las enfermedades del ganado causan una pérdida de 358.000 millones de dólares al año mundialmente, entre las más importantes se mencionan: la Fiebre Aftosa, Brucelosis (*Brucella abortus*), Tuberculosis (Complejo *Mycobacterium tuberculosis*) y parasitosis por *Echinococcus granulosus*.

Se han implementado varias medidas de prevención, control y erradicación de enfermedades tales como mantener un calendario sanitario de vacunación y desparasitación, control continuo de la bioseguridad y las condiciones higiénico-sanitarias de toda la granja, manejo adecuado de pastos, nutrición balanceada, realizar pruebas diagnósticas a los animales que van a ser introducidos al hato y aplicar cuarentena obligatoria, entre otras (Villaamil, 2022).

Sin embargo, en Ecuador, se siguen observando casos positivos de enfermedades bacterianas como Brucelosis, Tuberculosis, Mastitis y Leptospirosis bovina, que están afectando a los procesos productivos y reproductivos que determinan pérdidas económicas y riesgo de transmisión a las personas involucradas en el manejo del ganado (Román-Cárdenas & Chávez-Valdivieso, 2017).

El diagnóstico temprano de enfermedades del ganado bovino es esencial para poder implementar medidas de control y tratamiento adecuado, y así evitar la propagación de estas. En Ecuador, se utilizan una variedad de métodos diagnósticos, que incluyen técnicas de biología molecular, cultivos bacterianos y pruebas serológicas como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Rosa de Bengala (RB), seroaglutinación lenta (SAT) utilizadas para detección de brucelosis y la prueba de Micro aglutinación (MAT) para casos que se sospechosos de Leptospirosis (Román-Cárdenas & Chávez-Valdivieso, 2017).

Las técnicas de diagnóstico que se basan en Biología Molecular son un gran avance y han llegado a facilitar y agilizar el diagnóstico de enfermedades infecciosas; la prueba PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es la más sensible y permite la caracterización más específica, rápida y exhaustiva de los aislamientos bacterianos (Álvarez et al., 2016).

4.3. Importancia de los estudios genéticos en las enfermedades bacterianas

Los estudios genéticos como los estudios de asociación de todo el genoma han logrado identificar miles de variantes genómicas relacionadas con enfermedades recientemente, lo que ha mejorado la comprensión de muchas enfermedades complejas (González et al., 2018). Muchas especies, entre ellas humanos, ratones, ciervos y ganado, han documentado resistencia a Tuberculosis (Allen et al., 2010; Urén et al., 2017). La variabilidad individual en la resistencia del hospedadero a la Tuberculosis se fomenta en una gran base genética, según los valores de heredabilidad estimados en poblaciones pertenecientes al Reino Unido e Irlanda. (Bermingham et al., 2010). Otros estudios han encontrado que la resistencia del ganado a la Tuberculosis varía genéticamente (Broderstone et al., 2010); existe evidencia de que *Bos indicus*, tiene mayor resistencia que *Bos taurus* (Ameni et al., 2007).

4.4. Métodos para determinar la resistencia

En la actualidad los marcadores genéticos son utilizados por sus características con la finalidad de asociar enfermedades con un definido gen, en medicina humana estos se utilizan para rastrear la herencia de un gen no identificado aún, pero con una conocida localización aproximada. Los mismos pueden llegar a ser parte de un gen o pueden no tener ninguna función (National Human Genome Research Institute, 2024).

Los marcadores genéticos cumplen la función de señalar regiones del genoma con distintas finalidades: para encontrar la posición e identidad de un gen, evidenciar polimorfismos de secuenciación en ADN, identificar regiones codificantes y no codificantes del genoma, etc. Entre ellos existe una clasificación de 3 tipos:

- Tipo 1: Directos, codifican proteínas y estarán asociados a rasgos productivos (variación fenotípica)
- Tipo 2: Microsatélites, utilizados comúnmente para el estudio de distintas poblaciones
- Tipo 3: Polimorfismos de un solo nucleótido, utilizados con finalidad diagnóstica de rasgos a nivel productivo y enfermedades genéticas (Armijo, 2022).

Los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) son considerados variaciones genómicas estructurales de base única del ADN, los mismos son estudiados para evidenciar la influencia de diferentes genomas en la salud tanto de seres humanos como de animales; es decir una de las bases nitrogenadas de un nucleótido en la cadena de ADN es alterada y por consiguiente se altera la secuencia del genoma (Sánchez, 2012).

En Medicina veterinaria, los polimorfismos de un solo nucleótido han sido utilizados para evidenciar la correlación de distintos genes con la susceptibilidad a ciertas enfermedades bacterianas. Cuando los objetivos de estudio se basan en identificar un polimorfismo de un gen asociado a una enfermedad, pueden emplearse varias estrategias. Como principal característica es de importancia tener evidencias de que al menos una fracción de la patología se encuentra determinada genéticamente; posterior a esto se debe identificar en qué lugar se encuentran los genes de interés para la misma, obteniendo como resultado varios genes de interés con millones de polimorfismos responsables. Una vez identificado el gen y los polimorfismos, se realizan estudios de asociación, en los cuales se comparará la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos, es decir los SNP (Llorca et al., 2005).

4.5. Diferentes técnicas para determinar resistencia

En ganado cebú fueron descubiertos dos alelos que han sido relacionados significativamente con la baja de prevalencia de Tuberculosis en una región microsatélite del gen *Nramp1* (Hernández et al., 2014; Meade et al., 2007). Igualmente, en dos microsatélites en *Bos taurus* (europeo) fuertemente relacionados con respuestas positivas a pruebas de tuberculina (Driscoll et al., 2011), uno de ellos (INRA111) igualmente relacionado con una mayor probabilidad de desarrollar mastitis (Schulman et al., 2004).

También se ha usado con éxito el escaneo del genoma completo en ganado Holstein, encontrando tres polimorfismos (SNP) de un solo nucleótido ubicado en el cromosoma 22, relacionado a la susceptibilidad de Tuberculosis (Finlay et al., 2012), de igual manera se encontró correlación significativa entre esta susceptibilidad y el receptor TLR1 en el sitio TLR1-G1596A (Sun et al., 2012).

Otro estudio reciente concluyó el análisis de varios fenotipos (animales que reaccionaron a la tuberculina con lesiones visibles y aislamiento de *Mycobacterium bovis* mediante cultivo) en la susceptibilidad a este patógeno se encontraron dos SNP en los cromosomas 2 y 23 son significativamente relacionados con distintos rasgos de susceptibilidad, los cuales se convierten en posibles marcadores, para posteriormente seleccionar individuos susceptibles y separarlos de aquellos con mayor potencial de resistencia (Raphaka et al., 2017).

La resistencia a otros patógenos ha sido asociada a la activación de genes similares, patógenos como *Brucella abortus*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium paratuberculosis* (Bermingham et al., 2009). Por lo tanto, cuando se seleccionan animales con resistencia a la Tuberculosis, se está apoyando al control de las enfermedades que son causadas por dichas bacterias; aprovechando mencionar que estos genes junto con Vdr y Tlr2, se han asociado con la respuesta inmune, obteniendo un doble beneficio (Bukhari et al., 2015).

4.6. Gen *Nramp1*

El gen *Slc11A1* o *Nramp1*, pertenece a la superfamilia de genes transportadores de solutos (SLC), quienes son capaces de codificar ciertas proteínas integrales de membrana que incluyen transportadores acoplados a iones, transportadores pasivos e intercambiadores que trafican compuestos esenciales tanto dentro como fuera de la célula y de los organelos (Forbes & Gros, 2003); a su vez este gen es miembro de la familia S11 que codifican transportadores de iones metálicos acoplados a protones (Vidal et al., 1995).

El *NRAMP1* es considerado una proteína de membrana integral politópica (Feng et al., 1996) de macrófagos, modulada por la exposición al lipopolisacárido bacteriano, asociado a la resistencia natural (Adams & Schutta, 2010). Se encuentra formada por 10 a 12 dominios transmembrana, que a su vez contienen 548 aminoácidos con 3 lugares putativos de fosforilación, 2 motivos de unión al dominio SH3 y un único sitio de glicosilación fuera de la célula (Feng et al., 1996).

Nramp1 es altamente conservado ya que cuenta con ortólogos, es decir, que encuentra cierta similitud en la secuenciación (Adams & Schutta, 2010) que codifica una proteína integral de membrana homóloga estructuralmente con los sistemas de transporte (Vidal et al., 1993) encontrados tanto en células eucariotas como en procariotas (Adams & Schutta, 2010). Los homólogos eucariotas de *Nramp* transportan cationes divalentes como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} . Por lo que se propone que cumple una función de transporte de membrana específica de macrófagos (Vidal et al., 1993). Su expresión en macrófagos se sugiere que es inducida por el Interferón gamma (Agranoff et al., 1999), al igual que por la exposición a agentes patógenos bacterianos (Forbes & Gros, 2003).

4.7. Resultados que asocian *Nramp1* con la resistencia a enfermedades

Ciertos homólogos de *Nramp1* son considerados determinantes ante la presencia de una infección por diversos patógenos intracelulares (Barton et al., 1999). Con esta información científicos han basado sus investigaciones en determinar si el polimorfismo de este gen en diferentes especies puede llegar a explicar la variación racial en la susceptibilidad a distintas enfermedades, tales como la Tuberculosis en el ser humano (Lara et al., 2008). En animales domésticos, los homólogos para *Nramp1*, se han identificado, secuenciado y mapeado en bovinos (Feng et al., 1996), *Gallus gallus domesticus* (Hu et al., 1996), *Sus crofa domesticus* (Tuggle et al., 1997), *Ovis orientalis aries* (Pitel et al., 1994); pero de estas investigaciones solo se ha podido documentar cierta asociación con resistencia natural en bovinos y pollos (Feng et al., 1996). Aunque autores exponen que la resistencia puede estar asociada a un solo gen, lo más común es que se encuentre asociada a varios genes. Como consecuencia de esto, los estudios que se basan en el control genético de la resistencia a enfermedades en los animales domésticos van a depender en gran medida de la metodología, incluidos factores como la naturaleza de la exposición al patógeno, los métodos a utilizar para evaluar esta resistencia y el análisis genético utilizado (Adams & Schutta, 2010).

En el ganado bovino este gen ha sido asociado con la susceptibilidad y resistencia contra *Brucella abortus* (Adams & Templeton, 1998; Feng et al., 1996). Estos autores toman a la Brucelosis bovina como modelo prototipo de enfermedad intracelular; a finales de la década de 1970 se realizaban estudios para determinar si la susceptibilidad a *Brucella abortus* era de carácter hereditario y, de igual manera, la identificación de genes con la capacidad de controlar la resistencia a la misma (Adams & Schutta, 2010).

Esta resistencia se ha vinculado con polimorfismos dentro de la región 3' no traducida (3-UTR) (GT) microsatélite del gen *Nramp1*, mismos que pueden detectarse mediante un análisis conformacional monocatenario (Adams & Templeton, 1998). Los estudios realizados explican que estos polimorfismos están asociados con una variación en el número de repeticiones del microsatélite (GT) lo que posiblemente determina la resistencia a Brucelosis al reducir la replicación intracelular de *Brucella abortus* dentro de los macrófagos (Barthel et al., 2001).

Por otro lado, Borriello et al. (2006) realizaron un estudio en búfalos de agua en el cual describieron polimorfismos en la secuencia de *Nramp1* y detectaron una correlación entre el genotipo *Nramp1* y la resistencia a la infección por *Brucella abortus* y mencionaron que la selección genética para dicho genotipo puede significar un mecanismo prometedor para incrementar la resistencia a la Brucelosis en el ganado, que ayudaría a controlar la diseminación de esta enfermedad, sobretodo en áreas donde la misma es endémica y un problema económico grave.

En otra investigación realizada para comparar la frecuencia de alelos bovinos *Nramp1* en razas Holstein y Cebú, se encontró que los bovinos Holstein tuvieron un genotipo extremadamente homogéneo (GT13). Mientras que las razas Cebú (Nelore y Guzará) tenían el genotipo más heterogéneo con varias combinaciones alélicas (GT13, GT14, GT15), demostrando una diferencia significativa entre polimorfismos *Nramp1* 3' UTR con respecto a la raza Holstein, los autores concluyeron que estos resultados podrían significar que las razas Cebú pueden tener factores de resistencia adicionales que resultaron en una menor presión selectiva a favor del alelo GT13, por lo cual este hallazgo puede resultar muy útil en el futuro para planificar estrategias de mejoramiento para la selección de ganado resistente a algunas enfermedades bacterianas (Paixão et al., 2006).

4.8. Alelos existentes y su posible influencia en resistencia a enfermedades

Algunos autores han registrado distintos resultados de una supuesta asociación entre ciertos alelos del gen *Nramp1* con la susceptibilidad a ciertas enfermedades, basándose en su propiedad de acción de los macrófagos que limitan a la reproducción de algunas especies de bacterias.

Holder et al., (2020) demostraron que *Nramp1* influye negativamente en la supervivencia de patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* mediante el secuestro de Hierro, al evaluar 5 polimorfismos de un solo nucleótido, solo SNP4 se encuentra presente en Brown Swiss, Holstein y Sahiwal; se sugiere que un alelo alternativo BB homocigótico en SNP4 tiene mayor expresión de *Nramp1* y por lo tanto mayor resistencia a la Tuberculosis.

Ateya et al. (2022) resaltan la importancia de *Nramp1* como marcador genético y factor predisponente para tolerancia/susceptibilidad a mastitis en Holstein y Brown Swiss y recomiendan tomar como referencia este gen con la finalidad de predecir el mayor riesgo de aparición de la enfermedad.

Okuni et al. (2021) evidencian que el genotipo AA homocigótico está asociado con infecciones por *Mycobacterium avium paratuberculosis* y los SNP de *Nramp1* son marcadores potenciales para detectar ganado resistente a esta bacteria. Se recomienda de igual manera usar estos polimorfismos en una población más grande con la finalidad de garantizar mejores resultados.

4.9. Frecuencia absoluta y relativa

La frecuencia absoluta se refiere a la cantidad de veces que aparece un valor específico en un conjunto de datos. La frecuencia relativa, por otro lado, es la proporción o fracción que representa la cantidad de veces que un valor se presenta en relación con el total de todos los valores. Para calcular las frecuencias relativas, se divide cada frecuencia absoluta por el total de datos, pudiendo expresarse como fracciones, porcentajes o decimales (Dean & Illowsky, 2022).

En este tipo de estudios, las distribuciones de frecuencias se utilizan para organizar la información disponible con la finalidad de describir una población observada con respecto a una variable de interés; es decir, es la especificación de las frecuencias que corresponden a cada valor o categoría. La frecuencia absoluta se conoce como el número de veces que se repite un dato y la frecuencia relativa se refiere a la proporción que representa la frecuencia absoluta con relación al total de datos o una muestra. Como variable cuantitativa, se procede a realizar una tabla de distribución de frecuencias ordenando los valores de las distintas variables acompañado de la frecuencia de estas (Garriga et al., 2010).

4.10. Heterocigosis esperada y observada

Tripp (2009) define la heterocigosis esperada como: “proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo un binomio al cuadrado $(p + q)^2$, en donde p y q son las frecuencias alélicas y $2pq$ corresponderá a la frecuencia de heterocigotos”.

La heterocigosidad observada hace referencia a la proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional (Tripp, 2009).

4.11. Equilibrio Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg se basa en relacionar frecuencias alélicas y genotípicas que pertenecen a una población, la misma busca que las frecuencias se mantienen constantes a través del paso entre generaciones, es decir, se encuentren equilibradas. Este equilibrio indica que la alteración genética de una población puede darse sólo por factores como mutaciones, selección natural, influencias casuales, convergencias o divergencias individuales, de manera que cualquier cambio genético que se lleve a cabo va a implicar una perturbación en el equilibrio establecido por esta ley (Sanchez, 2012). Es raro que una población real se adapte perfectamente al modelo de Hardy-Weinberg y que las frecuencias alélicas y genotípicas permanezcan inalteradas de generación en generación (Klug, 2016).

“En otra aplicación, la ley de Hardy-Weinberg nos permite estimar la frecuencia de los heterocigotos de una población. La frecuencia de un carácter recesivo puede determinarse usualmente contando los correspondientes individuos dentro de una muestra de la población. Con esta información y la ley de Hardy-Weinberg, podemos calcular las frecuencias alélicas y fenotípicas” (Klug, 2016).

4.12. Consanguinidad

Consanguinidad o endogamia se refiere a la relación sanguínea que tiene un individuo con otro cuando se encuentran emparentados entre sí, es decir, que tienen antepasados en común. Cuando más cercana sea esta relación, la consanguinidad será mayor, debido a que llegan a compartir más características heredadas de sus ancestros. Esta endogamia disminuirá la frecuencia de individuos heterocigóticos y aumenta la frecuencia de genes recesivos, lo cual puede llevar a desordenes genéticos o afectar de manera negativa la supervivencia, reproducción o aptitudes funcionales generales de los animales (Piñeira et al., 2020).

Capítulo 5: Materiales Y Métodos

5.1. Área de estudio

Las muestras de ADN utilizadas, formaron parte de la investigación: “Caracterización genética de ganado criollo y Holstein de las tierras altas tropicales del sur ecuatoriano por análisis de microsatélites”, obtenidas a partir de muestras sanguíneas, provenientes de bovinos fenotípicamente considerados criollos de hatos localizados en Dugdug, Paute, El Pan, Tarqui, Huachi, Trigo Pampa y Girón, y de bovinos Holstein pertenecientes a tres hatos ubicados en la misma provincia del Azuay, las mismas permanecen almacenadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Las muestras de ganado Brahman, fueron extraídas de la Hacienda “Bemsh” (Latitud: -2.976667; Longitud: -78.9655763) ubicada en el cantón Balao, provincia del Guayas a 10 metros sobre el nivel del mar (msnm), con una temperatura promedio de 28°C y una precipitación anual es 798 mm. El procesamiento de muestras y análisis para la caracterización genética del gen *Nramp1*, mediante PCR - SSCP se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca, ubicada en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

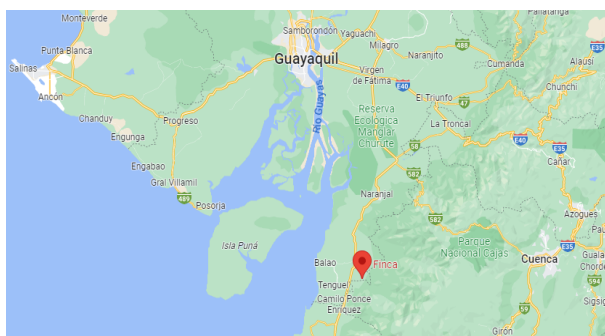


Ilustración 1. Ubicación del área de estudio (Guayas - Balao)

5.2. Materiales y Métodos

Actividad 1: Extracción y recolección de muestras

Materiales físicos y equipos:

- Tubo tapa Lila con EDTA K2 de 4 ml
- Aguja con sistema vacutainer 20G
- Capuchón para sistema vacutainer
- Caja térmica
- Alcohol
- Algodón

Materiales Químicos:

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

Materiales biológicos:

Bovinos raza Brahman

Procedimiento:

Paso N° 1. Identificación de tubos con el N° del bovino a muestrear.

Paso N° 2. Limpieza y desinfección de la zona ventral de la cola.

Paso N° 3. Identificación de la vena coccígea del bovino.

Paso N° 4. Inserción de la aguja con capuchón.

Paso N° 5 Recolección de 4ml de sangre entera en tubo al vacío.

Paso N° 6 Almacenamiento y transporte de muestras hacia el laboratorio de biotecnología.

Actividad 2: Extracción de ADN

Materiales físicos y equipos:

Tubos eppendorf

Vortex

Refrigerador

Pipetas

Centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5430 R*

Termociclador Nexus

Incubadora

Cabina de bioseguridad

Guantes

Mandil

Materiales Químicos:

Agua destilada

PBS

Buffer de lisis (CTAB 2%, Tris -HCl 100mM, EDTA. 20mM, NaCl 1.4 M, ph 7,5)

Proteinasa K

Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1)

Etanol frío al 100%

Tris acetato EDTA (TAE)

Materiales biológicos:

Muestras de sangre entera

Procedimiento:

Paso N° 1. En un tubo de 1,5 ml se colocaron 500 µl de una muestra de sangre en EDTA y se congeló a -80 °C por un tiempo mínimo de 20 minutos.

Paso N° 2. Se descongeló a temperatura ambiente, se añadió 1ml de agua destilada de grado biología molecular y se agitó las muestras por 5 minutos en un vortex.

Paso N° 3. Se comprobó que exista lisis completa de eritrocitos y luego se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos.

Paso N° 4. Se retiró el sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet y se repitió nuevamente los pasos anteriores.

Paso N° 5. Se resuspendió el pellet en 500 µl de PBS y se mezcló por inmersión.

Paso N° 6. Se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

Paso N° 7. Se repitió los pasos 5 y 6

Paso N° 8. Se adicionó 1ml de Buffer de lisis, 10 µl de Proteinasa K (20 mg/mL) y se homogeneizó mediante vortex para incubar con agitación a 70 °C por 1 hora.

Paso N° 9. Nuevamente se homogeneizó por agitación y se llevó a incubar a 95°C por 10 minutos para inactivar la Proteinasa K.

Paso N° 10. Se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos y se colocó el sobrenadante (1 mL) en un nuevo tubo de 2 mL.

Paso N° 11. Se colocó 700 µl de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) y se homogeneizó mediante un orbital para centrifugar a 12000 x g por 15 minutos

Paso N° 12. Se removió el sobrenadante y se colocó en un nuevo microtubo de 1,5 mL. Se completó el volumen del tubo con etanol frío al 100 % y se mezcló suavemente invirtiendo los tubos, para dejar reposar 30 minutos a 20 °C.

Paso N° 13. Se recolectó las cadenas de ácidos nucleicos por centrifugación a 14.000 x g por 30 minutos a 4 °C y se descartó con pipeta el sobrenadante.

Paso N° 14. Se lavó el pellet con 500 µl de etanol al 70 % frío y se centrifugó a 14.000 x g por 15 minutos

Paso N° 15. Se descartó el sobrenadante, y se dejó secar el pellet dentro de la cabina de bioseguridad por 20 minutos hasta que el Etanol se haya evaporado.

Paso N° 16. Se diluyó el pellet en 100 µl de Tris EDTA (TE), con agitación a 65 °C por 20 minutos. Finalmente, se almacenaron las cadenas de ácidos nucleicos a -20 °C.

Actividad 3: Amplificación (PCR SNP4 Y SNP5)

Materiales físicos y equipos:

Micropipetas

Guantes de Nitrilo

Tubos eppendorf

Termociclador PCR *Mastercycler nexus GSX1*

Materiales Químicos:

Agua de grado biología molecular

Buffer de ampificación 10X

Solución de enhancer 10X

Solución de NTP's

Solución de MgSO₄

Oligonucleótidos / Cebadores (Tabla 1.)

Enzima Pfx ADN polimerasa

Tabla 1. Secuenciación de oligonucleótidos de SNP4 y SNP5 (Martínez et al., 2010).

SNP4	F	5'GGCTTGGAGGTCTGATTTTC
	R	5'CGTTGGCTTGCTTACTCCTT
SNP5	F	5'CAAGGAGTAAGCAAGCCAAC
	R	5'GCTGCCTTAAGGATCAAGGA

Materiales biológicos:

Muestras de ADN total

Procedimiento:

Paso N° 1. Se realizaron las mezclas detalladas en las tablas 2 y 3, con cada una de las muestras de ADN, tanto para marcador genético SNP4 como para SNP5.

Tabla 2. Componentes utilizados para la mezcla utilizada para amplificación de muestra para PCR de SNP4.

Agua Grado Biología Molecular	80,75 µL
Buffer de amplificación 10X	12,5 µL
Solución de enhancer 10X	12,5 µL
Solución de MgSO ₄	5 µL
Solución de NTP's	1,25 µL
Oligonucleótido SNP-4F	1 µL
Oligonucleótido SNP-4R	1 µL
Enzima Pfx ADN polimerasa	1 µL
Muestra ADN total	10 µL
Volumen final	125 µL

Tabla 3. Componentes utilizados para la mezcla utilizada para amplificación de muestra para PCR de SNP5

Agua Grado Biología Molecular	80,75 µL
Buffer de amplificación 10X	12,5 µL
Solución de enhancer 10X	12,5 µL
Solución de MgSO ₄	5 µL
Solución de NTP's	1,25 µL
Oligonucleotido SNP-5F	1 µL
Oligonucleotido SNP-5R	1 µL
Enzima Pfx ADN polimerasa	1 µL
Muestra ADN total	10 µL
Volumen final	125 µL

Paso N° 2. Se realizó el perfil de temperaturas de amplificación, con una curva de temperatura de alineamiento indicados en la tabla 4 para SNP4 y tabla 5 para SNP5.

Tabla 4. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR de SNP4.

Paso	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 35			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo	4min	30seg	25seg	25seg	5min	∞
Temperatura °C	94,0 °C	94,0 °C	56,1 °C	68,0 °C	68,0 °C	37,8 °C

Tabla 5. Perfil de temperatura empleado en los ensayos de PCR de SNP5.

Paso	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 35			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo	4min	30seg	25seg	25seg	5min	∞
Temperatura °C	94,0 °C	94,0 °C	52,5 °C	68,0 °C	68,0 °C	37,0 °C

Paso N° 3. Se colocaron las mezclas con cada una de las muestras de ADN en tubos eppendorf, en el termociclador con los parámetros anteriormente marcados.

Paso N° 4. Se realizaron los pasos 1, 2 y 3 con cada una de las muestras, para cada marcador genético, tanto para el marcador SNP4 como para SNP5, respectivamente

Paso N° 5 Se verificó la amplificación mediante electroforesis.

Actividad 4: Verificación de la amplificación mediante electroforesis

Materiales físicos y equipos:

Matraz de 250 mL
 Probeta 100 mL
 Micropipetas
 Microondas
 Cámara de electroforesis horizontal
 Guantes de nitrilo
 Balanza analítica
 Biorad Molecular Imager Gel Doc XR+

Software Image Lab (Versión 5.2.1 build 11) de Bio Rad Laboratories

Materiales Químicos:

Agarosa

Tris Acetato EDTA (Buffer TAE 1X)

Bromuro de etidio

Buffer de carga 6X

Marcador de Peso Molecular

Materiales biológicos:

Producto de la amplificación PCR

Procedimiento:

Paso N° 1. El gel de agarosa se preparó al 1,2 %, diluyendo 0,36 gramos de agarosa en 30 ml de buffer de TAE 1X.

Paso N° 2. Se calentó en el microondas por intervalos de 15 segundos, agitando la solución hasta que se obtuvo una mezcla homogénea y transparente.

Paso N° 3. Se dejó enfriar la mezcla 1 minuto y se colocó 1 µl de bromuro de etidio.

Paso N° 4. Se vació la mezcla en un molde Caster Gel y se dejó reposar la mezcla en el molde por 20 minutos aproximadamente hasta su polimerización.

Paso N° 5. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis.

Paso N° 6. Se incorporó 5 µl de muestra y 3 µl de buffer de carga, dando como resultado 8 µl mezcla que se colocó en cada pozo del gel, en el último pozo de cada gel se colocó 5 µl de marcador de peso molecular.

Paso N° 7. Una vez colocadas las muestras en los pocillos, se sometió el gel a electroforesis a 80 Voltios por una hora.

Paso N° 8. Se colocó el gel en el equipo Biorad Molecular Imager Gel Doc XR+ para fotodocumentar los resultados con el software Image Lab (Versión 5.2.1 build 11) de Bio Rad Laboratories.

Interpretación:

Una vez fotodocumentados los resultados se comprobó que en todas las muestras se obtuvo, como producto de PCR el amplicón de la longitud esperada de 176 bp en el caso del SNP4 y 350 bp para SNP5.

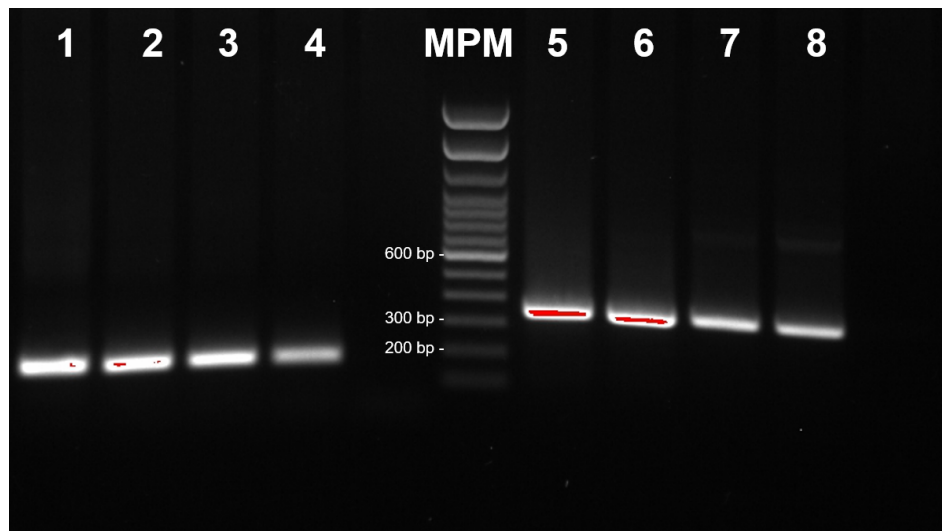


Ilustración 2. Electroforesis de muestras para cebadores SNP4 y SNP5 para determinación de perfil de temperaturas de amplificación. Carriles 1, 2, 3 y 4: Productos de PCR para SNP4 con una longitud similar a la esperada, se utilizó el perfil de temperaturas correspondiente al carril 3 (176 bp). MPM: marcador de peso molecular. Carriles 5, 6, 7 y 8: Productos de PCR para SNP5 con una longitud similar a la esperada, se utilizó el perfil de temperaturas correspondiente al carril 6 (350 bp).

Actividad 5: Análisis de conformación monocatenaria SSCP

Materiales físicos y equipos:

- Recipientes de plástico
- Cronómetro
- Probeta de 100 ml.
- Micropipetas electrónicas
- Balanza
- Agitador magnético
- Sistema completo de electroforesis Eco-Mini Biometra (R) para 2 geles de 8,75 cm de longitud

Materiales Químicos:

- Ácido acético al 7,5 %
- Agua destilada
- TBE Buffer 5X 1 Litro (54 g. Tris Base, 27,5 g. Ácido Bórico, 20 µl EDTA 0,5 M ph 8,0)
- Solución de Nitrato de plata 0,2 %
- Glucosa al 8 %
- Ácido bórico 100 mM
- Hidróxido de sodio 250 mM
- Solución de EDTA al 5 %

Glicerol al 10 %

Acrilamida al 5,5 %

Persulfato de amonio

TEMED (tetrametiletilendiamina) al 10 %

Buffer de carga 10 ml (95 % Formaldehído, 0,5 mM NaOH, 0,1 % Xylene cyanol, 0,1 % Azul de Bromofenol)

Biorad Molecular Imager Gel Doc XR+ con el software Image Lab (Versión 5.2.1 build 11) de Bio Rad Laboratories

Materiales biológicos:

Muestras de ADN

Procedimiento:

Elaboración del gel de poliacrilamida

Paso N°1. Se diluyó la solución de TBE Buffer 5X a TBE Buffer 1X, mezclando 200 ml. de Buffer 5X y 800 ml. de agua destilada.

Paso N° 2. Se preparó la mezcla de 10,225 ml. de agua destilada, 4 ml. de TBE Buffer 1X, 2 ml. de glicerol al 10 % agregado lentamente, 3,666 ml. de acrilamida al 5,5 %, 75 µl de Persulfato de amonio y 7,5 µl de TEMED. Esta mezcla rindió para la elaboración de dos geles.

Paso N° 2. Se homogeneizó la mezcla y enseguida se colocó en el molde vertical hasta que se polimeriza.

Paso N°3. Se colocó en un microtubo Eppendorf, correctamente numerado e identificado por cada muestra, 5 µl de muestra de estudio y 5 µl de Buffer de carga, y se homogeneizó cada uno.

Paso N° 4. Se colocaron los tubos en el termociclador y se procesaron en un ciclo de 5 min (94 °C y bajar a 4 °C) para desnaturalizar el ADN.

Paso N° 5. Enseguida se colocó con una micropipeta 5 µl de cada muestra en el fondo de cada uno de los pocillos del gel poliacrilamida.

Paso N° 6. Se corrió el gel a 40 Voltios durante 8 horas.

Tinción del gel de poliacrilamida

Paso N° 1. Se fijó el gel con 50 ml de una solución de ácido acético al 7,5 % por 10 minutos en agitación.

Paso N° 2. Se lavó el gel 3 veces con agua destilada, cada lavado por 5 minutos.

Paso N° 3. Se trató los geles por 5 minutos con la solución de nitrato de plata al 0,2 %.

Paso N° 4. Se lavó dos veces por 30 segundos con agua destilada.

Paso N° 5. Se sumergió el gel en una solución de Glucosa 8 %, Ácido bórico 100 mM y 250 mM de Hidróxido de sodio de 8 a 10 minutos.

Paso N° 6. Posterior a la reducción de la plata, se sumergió el gel en solución de EDTA al 5 % por 5 minutos para detener la reacción.

Paso N° 7. Se foto documentaron los resultados en el equipo Biorad Molecular Imager Gel Doc XR+ con el software Image Lab (Versión 5.2.1 build 11) de Bio Rad Laboratories

Capítulo 6: Resultados Y Discusión

6.1. Análisis estadístico y genético

Se realizaron análisis estadísticos para estudiar genotipos homocigotos y heterocigotos en el gen *Nramp1*. Las frecuencias génicas y genotípicas se determinaron mediante conteo directo en las imágenes fotodocumentadas de los productos de las muestras para SNP4 y SNP5 sometidas a PCR y análisis de conformación monocatenaria SSCP (Ilustración 3 y 4)

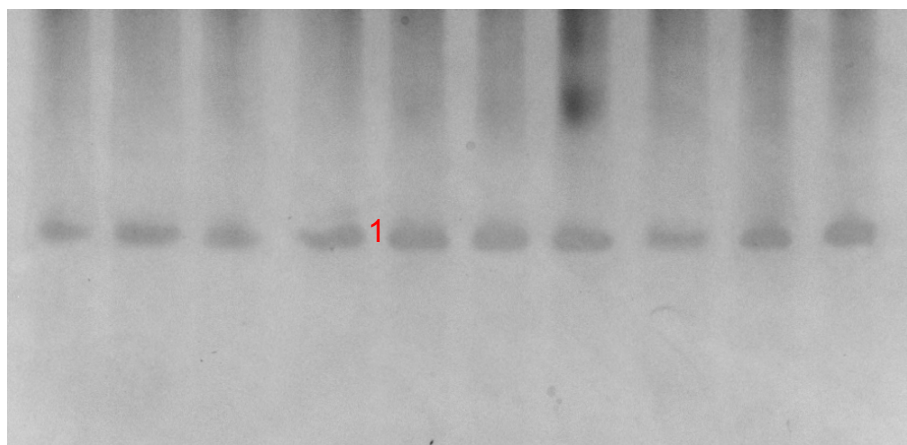


Ilustración 3 . Muestras de carácter homocigoto de ganado Brahman para SNP4.

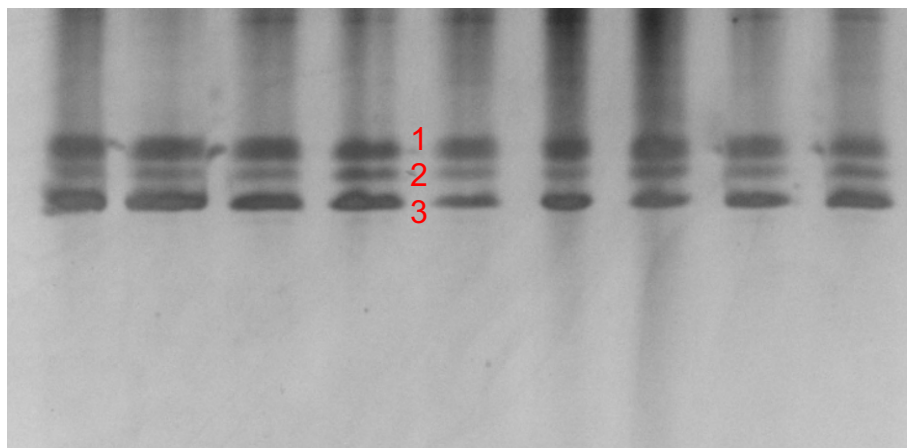


Ilustración 4. Muestras de carácter heterocigoto de ganado Brahman para SNP5

La evaluación de parámetros estadísticos genéticos se realizó mediante el programa informático Genepop versión 4.5, el cual analiza el equilibrio Hardy-Weinberg, la presencia de alelos nulos, estadísticos F de Wright, así como la heterocigosidad esperada y observada.

6.2. Frecuencias genotípicas y génicas.

Las frecuencias genotípicas y génicas del gen *Nramp1*, se obtuvieron mediante un recuento directo y se presentan en la Tabla 6.

Los SNP analizados fueron:

SNP4: Holder et al. (2020), indican la importancia del mismo en un análisis de secuenciación de esta región codificante, comprobando que el genotipo BB se asocia a una mayor expresión de *Nramp1*, concluyendo que el ganado que lo presente, tenga mayor resistencia a Tuberculosis por mostrar una mayor expresión en sus macrófagos. Martínez et al. (2010) en bovinos de la raza Blanco Ojinegro y Cebú desafiados a la infección de *Brucella abortus*, observaron que SNP4 genotipo AA tuvo un efecto significativo en el aumento de la supervivencia bacteriana in vitro, siendo los heterocigotos los que tenían mayor capacidad de control del crecimiento bacteriano.

SNP5: Liu et al. (2016) en su estudio asociaron *Nramp1* con la susceptibilidad a Tuberculosis en vacas Holstein Chinas y este polimorfismo resulta significativo, al igual que Ruiz-Larrañaga et al. (2010) quienes asociaron el gen *Nramp1* con la resistencia de bovinos a *Mycobacterium avium*, obteniendo resultados que sugieren que SNP5 es la región causante de la variación en la respuesta de la proteína involucrada en la inmunidad innata. Martínez et al. (2010) cuantitativamente observaron un valor mayor en crecimiento bacteriano de *Brucella abortus* en genotipos homocigotos AA, sin embargo, no representó un resultado estadísticamente significativo, lo cual indica que este polimorfismo es un marcador potencial que necesita mayor exploración.

Tabla 6. Frecuencias absolutas y relativas del SNP5 en tres razas bovinas.

Razas	Frecuencias genotípicas						Frecuencias génicas			
	AA		AB		BB		A(p)		B(q)	
	Di	di	Hi	hi	Ri	ri	Pi	pi	Qi	qi
Holstein Friesian	30	1,00	0	0,000	0	0,000	60	1,000	0	0,000
Brahman	6	0,200	24	0,800	0	0,000	12	0,200	48	0,800
Criollo Ecuatoriano	1	0,033	29	0,967	0	0,000	2	0,033	58	0,967

Para el SNP4 las frecuencias genotípicas en todas las razas presentaron el mismo alelo, el cual se encuentra fijado. El 100 % de los genotipos en las tres razas son AA y solamente está

presente el alelo A homocigótico. Los resultados en SNP5 mostraron que en este marcador tampoco hay heterocigosidad en la raza Holstein, presentando como frecuencia génica absoluta predominio el alelo A. Al contrario de las razas Brahman y Criollo, en las cuales predomina el genotipo AB heterocigoto presentando una frecuencia génica superior para el alelo B.

Martínez et al. (2008) obtuvieron un resultado similar, en la cual caracterizó las frecuencias génicas y genotípicas de regiones codificantes de *Nramp1* en diferentes razas de *Bos taurus* y *Bos indicus*, entre ellas Cebú, Blanco Orejinegro, Romosinuano, Holstein, Austriana del valle, Rubia Gallega y Pirenaica; como resultado obtuvieron en SNP4 encontró homocigosidad en todas las razas bovinas de su investigación, y en SNP5 fue la única región en donde encontró heterocigosidad.

6.3. Heterocigosidad observada y esperada, Equilibrio de Hardy-Weinberg y Alelos nulos.

Tabla 7. Heterocigosidad y homocigosidad esperadas; Equilibrio de Hardy-Weinberg y Frecuencia de alelos nulos para el marcador SNP5.

Población	Heterocigotos esperados	Heterocigotos observados	Homocigotos esperados	Homocigotos observados	EHW (P-valor)	Frecuencia estimada de alelos nulos
Brahman	24,52	24	5,49	6	0,761 (N.S)	0,0004
Criollo Ecuatoriano	29,00	29	1,00	1	0,000 ($p<0.05$)	0,0004

La heterocigosidad esperada en ambas razas fue muy similar a la observada e igualmente los homocigotos esperados y observados. Hay un marcado déficit de homocigotos en los bovinos criollos ecuatorianos.

Para el SNP5, se observó mayor heterocigosidad en bovinos Criollos, además la heterocigosidad observada (H_o), fue mayor que la esperada (H_e), lo que de igual manera indica que existe mayor heterocigosidad, con respecto a ganado Brahman y Holstein.

De acuerdo con los resultados los bovinos de raza Brahman se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Por el contrario, en ganado Criollo no se encuentra equilibrio, esto puede deberse a la introducción de otras razas para mejoramiento con fines productivos, lo que ha traído consecuencias de inestabilidad poblacional en términos genéticos. Llorca et al. (2005)

mencionan que la falta de información sobre una raza, pueda ser la causa de que H_o y H_e resulten cercanos y no exista desviación aparente, por lo que, se puede suponer que se encuentra en equilibrio o que la muestra es muy pequeña para realizar una prueba significativa.

La frecuencia de alelos nulos es relevante en genética de poblaciones y puede identificar la presencia de alelos recesivos o raros; en ambos casos, la frecuencia es baja, lo que sugiere que la probabilidad de que existan alelos nulos es muy baja.

6.4. Diferenciación genética, genotípica y génica entre razas e índice de fijación de Wright

Tabla 8. Diferenciación genética, genotípica y génica entre las razas e índice de fijación de Wright.

Diferenciación genética			F de Wright		
Raza	Q _{intra}	Q _{inter}	F _{is}	F _{st}	F _{it}
Brahman	0,200	0,183	-0,094	-	-
Criollo Ecuatoriano	0,033	0,033	0,000	-	-
Total	0,108	0,117	-0,0798	0,0467	-0,0294

El parámetro Q-intra se expresa bajo en Brahman y muy bajo en Criollo ecuatoriano, lo que indica que prácticamente no hay diversidad dentro de los individuos. El Q-inter es la diferenciación genotípica y génica entre las razas. Los resultados indican que hay mayor variación dentro de los propios individuos de la raza Brahman, que entre ellos y los Criollos.

El ganado Criollo ecuatoriano del Azuay puede haber disminuido su diversidad debido a que las poblaciones se han visto afectadas con el paso de los años por la sustitución en sus territorios por otras razas con mayores niveles productivos para distintos propósitos, principalmente por la Holstein para producción de leche, lo que ha llevado a un mestizaje con la misma, perdiendo así sus características de rusticidad, adaptabilidad y resistencia (DAD-IS, 2020; Parra et al., 2021). Concordando con Cevallos (2017), quien indica que se puede considerar al ganado de raza Criolla ecuatoriano, en una situación de extremo riesgo de pérdida.

Los estadísticos F de Wright al ser bajos y negativos, indican que no hay endogamia entre los individuos de cada una de las poblaciones, de igual manera se rechaza consanguinidad considerando a toda la población. De acuerdo con el F_{st} hay un grado moderado de

subdivisión fundamentalmente por la raza Brahman, pues en ganado Criollo la subdivisión es muy baja, lo que indica que existe una baja diferenciación genética entre las poblaciones.

Tabla 9. Diferenciación genotípica y génica entre las razas mediante el Test de Chi Cuadrado.

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	Chí-Cuadrado	p-valor	Rhost
Genotípica	4,58	0,101	0,047
Génica	4,35	0,113	

No hay diferenciación genotípica, ni génica entre estas razas, pues el *p*-valor no es significativo. Se puede apreciar la poca diferenciación genética entre ambas poblaciones.

Estos resultados tienen implicaciones importantes para la genética de poblaciones y la selección genética en las diferentes razas bovinas estudiadas. La fijación genética en SNP4 de todas las razas sugiere un posible efecto de selección positiva o deriva genética. Por otro lado, la heterocigosidad en SNP5 de Brahman y Criollo indica una mayor diversidad genética con respecto a la raza Holstein. Se podría decir que el estudio de las frecuencias de este gen entre diferentes razas bovinas revela patrones de variabilidad y fijación genéticas, lo cual podría ser beneficioso para la adaptabilidad y resistencia a enfermedades en estas poblaciones.

Martínez et al. (2008) propusieron que la crianza de animales domésticos con la finalidad de controlarlos genéticamente para que se adapten y sean más resistentes a distintas patologías, es una modalidad atractiva para disminuir la mortalidad y pérdidas económicas para los productores; su estudio se basa en la identificación y caracterización de diferentes razas (*Bos indicus* y *Bos taurus*) y los alelos de *Nramp1* pertenecientes a las mismas para poder asociarlos con la probabilidad de resistencia a *Brucella abortus*, una enfermedad de importancia sanitaria en la zona en donde se realiza este estudio, en su análisis encontró variabilidad en dos tipos de razas (Cebú y Blanco Orejinegro). Posteriormente Martínez et al. (2010) en base a su primera investigación, evalúan estas dos razas solamente, y llegaron a la conclusión de que para los polimorfismos de un solo nucleótido 4 y 5 existe variabilidad, pero entre razas no se encuentra significancia.

La importancia de determinar los alelos de estos marcadores genéticos y la homocigosidad o heterocigosidad de los mismos en cada raza, radica en que, como se mencionó anteriormente, varios estudios han sugerido que esto puede ser un aspecto que definiría la susceptibilidad o resistencia de los bovinos a enfermedades bacterianas intracelulares.

Paixao et al. (2012) en su investigación acerca de la región codificante del gen *Nramp1* asociado a la resistencia natural de bovinos a brucelosis, en la cual utiliza los mismos primers o marcadores genéticos que los utilizados en el presente estudio, obtuvo que los genotipos homocigotos AA, tanto en SNP4 como en SNP5, eran más frecuentes en vacas susceptibles a esa enfermedad infectadas invitro y experimentalmente; en mayor proporción en SNP5, en bovinos infectados naturalmente alcanzando una frecuencia muy alta (80 %) en bovinos susceptibles. Por el contrario, en los genotipos AB y BB la susceptibilidad es baja (15,6 % y 13,6 %). Esto permite suponer que el alelo B de SPN5 puede contribuir a reducir la susceptibilidad a la enfermedad.

Como se puede observar en los resultados, encontramos un predominio de alelos AA en ganado Holstein; que es notable en la zona austral debido a su alta productividad. Este predominio podría estar relacionado con la susceptibilidad a enfermedades que se presentan recurrentemente en la región, tales como Tuberculosis, Brucelosis, Mastitis, entre otras enfermedades bacterianas. En contraste, los alelos BB predominan en el ganado Criollo, lo cual, según Martínez et al. (2010) y Paixao et al. (2012), podría ser beneficioso en términos de resistencia a tales enfermedades. En este contexto, esta investigación sugiere una posible relación que abre la puerta a futuras investigaciones, destacando la importancia de desarrollar protocolos de selección genética resistente, aunque aún se requieren investigaciones más profundas para obtener conclusiones definitivas. Así este estudio marca el inicio de un perfil de investigación en la región sobre la relación entre la genética y la resistencia a enfermedades.

Conclusiones

Mediante el proceso de amplificación de dos diferentes marcadores genéticos (SNP4 y SNP5) del gen *Nramp1*, se concluyó que:

- No se comprobó existencia de polimorfismo puntual, se evidenció la presencia de dialelismo.
- El marcador SNP4 mostró que en todas las razas expresa un único alelo fijado (A), por lo tanto, se consideran a todos los individuos homocigóticos.
- El marcador SNP5 reveló en la raza Holstein un alelo fijado (A), mientras que en bovinos Brahman y Criollo, predominancia alta de heterocigosidad (AB). Demostrando que si existe variación genotípica en los alelos que codifican la proteína *Nramp1*.

Recomendaciones

Tomar en cuenta la importancia del marcador SNP5 del gen *Nramp1* para futuras investigaciones sobre la asociación con resistencia a múltiples enfermedades bacterianas de relevancia en nuestro país.

Resaltar la importancia de esta asociación con el ganado criollo autóctono de nuestro país, con la finalidad de preservar esta línea genética, ya que como se observa en los resultados la misma tiene alta afinidad a portar un gen de resistencia que podría servir para identificar su estado de salud y predecir el riesgo de aparición de enfermedades.

Los SNP's de *Nramp1* podrían llegar a ser marcadores potenciales para detectar ganado con menor susceptibilidad a distintas enfermedades bacterianas.

Referencias

- Adams, L. G., & Schutta, C. J. (2010). Natural Resistance Against Brucellosis: A Review. *OVJ*, 4(1), 61-71. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010061>
- Adams LG, Templeton JW. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev Sci Tech*. 1998 Apr;17(1):200-19. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1085>
- Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D., & Krishna, S. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* Expresses a Novel Ph-Dependent Divalent Cation Transporter Belonging to the Nramp Family. *JEM*, 190(5), 717 - 724. <https://doi.org/10.1084/jem.190.5.717>
- Allen, H. A., Donato, J., Wang, H. H., Cloud, K., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. 8, 251-259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Álvarez, L. P., Mignaqui, A. C., & Robles, C. A. (2016). Diagnóstico de enfermedades del ganado utilizando técnicas moleculares. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/80136/CONICET_Digital_Nro.7b327744-c790-4dc8-a597-d454e99f9849_D.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Ameni, G., Aseffa, A., Engers, H., Young, D., Gordon, S., Hewinson, G., & Vordermeier, M. (2007). High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *CVI*, 14(10), 1356–1361. <https://doi.org/10.1128/CVI.00205-07>
- Armijo, Y. (2022). Universidad tecnica de Babahoyo. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/11388/E-UTB-FACIAG-MVZ-000070.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ateya, A. I., Ibrahim, S. S., & Al-Sharif, M. M. (2022). Single Nucleotide Polymorphisms, Gene Expression and Economic Evaluation of Parameters Associated with Mastitis Susceptibility in European Cattle Breeds. *Vet. Sci*, 9(6), 294. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060294>
- Banco Mundial. (2023). Indicador % PIB Ecuador. <https://datos.bancomundial.org/indicador/NV.AGR.TOTL.ZS?locations=EC>

- Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, McMurray DN, Templeton JW, Adams LG. Stable transfection of the bovine *NRAMP1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect Immun*. 2001 May; 69(5):3110-9. doi: 10.1128/IAI.69.5.3110-3119.2001.
- Barton, C. H., Biggs, T. E., Baker, S. T., Bowen, H., & Atkinson, P. G. P. (1999). Nramp 1: A link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.*, 66(5), 757–762. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.757>
- Bermingham, M. L., More, S. J., Good, M., Cromie, A. R., Higgins, I. M., Brotherstone, S., & Berry, D. P. (2009). Genetics of tuberculosis in Irish Holstein-Friesian dairy herds. *J of Dairy Sci.*, 92(7), 3447–3456. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1848>
- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, Ercolini D, Parisi A, Roperto S, Iannelli D. Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect Immun*. 2006 Apr;74(4):2115-20. <https://doi.org/10.1128/iai.74.4.2115-2120.2006>
- Brotherstone, S., White, I. M., Coffey, M., Downs, S. H., Mitchell, A. P., Clifton-Hadley, R. S., More, S. J., Good, M., & Woolliams, J. A. (2010). Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J of Dairy Sci.*, 93(3), 1234–1242. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2609>
- Bukhari, M., Aslam, M. A., Khan, A., Iram, Q., Akbar, A., Naz, A. G., Ahmad, S., Ahmad, M. M., Ashfaq, U. A., Aziz, H., & Ali, M. (2015). TLR8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern Punjab of Pakistan: an association study with pulmonary tuberculosis. *IJI*, 42(1), 46–51. <https://doi.org/10.1111/iji.12170>
- Burgasí Cruz, E.G., Rodríguez I., L. F., Clavijo, F. y Godoy, A. (2014). Determinación de la prevalencia de las principales enfermedades infecciosas y endoparasitarias, en hatos lecheros de pequeños productores, en las comunidades de Taxojaló y Guantualó, del cantón Sigchos provincia de Cotopaxi. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Ganadería. (Boletín Divulgativo no. 438). <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4905/1/iniapscbd438.pdf>
- Cevallos Falquez, O. F. (2017). Caracterización morfométrica y molecular del bovino criollo en la provincia de Manabí (Ecuador). Universidad de Córdoba. <https://helvia.uco.es/handle/10396/14825>

- Cuellar, J. (2021). Razas bovinas especializadas en leche. Veterinaria Digital. <https://www.veterinariadigital.com/articulos/razas-bovinas-especializadas-en-leche/>
- DAD-IS (2020) Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS). Local Breeds at Risk of Extinction. <https://www.fao.org/dad-is/es/>
- De la Cruz Naranjo, L. N. (2024). Análisis del índice de selección del programa de mejoramiento genético sostenible de bovinos de leche de la parroquia Tanicuchi periodo 2023. Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC). <https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/12155/1/PC-003280.pdf>
- Dean, S. & Illowsky, B. (2022). Introductory Statistics. Houston: Open Stax Textbooks. <https://openstax.org/books/introducci%C3%B3n-estad%C3%ADstica/pages/1-3-frecuencia-tablas-de-frecuencia-y-niveles-de-medicion>
- Díaz, C. (2003). Manual de enfermedades infecciosas en el ganado bovino de la zona central del Litoral ecuatoriano. Quevedo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa de Ganadería Bovina y Pastos. (Manual no.53). <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1625>
- Driscoll, E. E., Hoffman, J. I., Green, L. E., Medley, G. F., & Amos, W. (2011). A preliminary study of genetic factors that influence susceptibility to bovine tuberculosis in the british cattle herd. PLoS ONE, 6(4), e18806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018806>
- Finlay, E. K., Berry, D. P., Wickham, B., Gormley, E. P., & Bradley, D. G. (2012). A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. PloS one, 7(2), e30545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030545>
- Feng, J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams, L., & Templeton, J. (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. Genome research, 6(10), 956-964. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.956>
- Forbes, J. R., & Gros, P. (2003). Iron, manganese, and cobalt transport by *Nramp1* (Slc11a1) and *Nramp2* (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. Blood, 102(5), 1884-1892. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0425>
- Garriga Trillo, A. J. G., Lubin Pigouche, P. L., Merino, J. M. M., Padilla Suárez, M. P., Recio Saboya, P. R., & Suárez Falcón, J. C. S. (2010). Introducción al análisis de datos (3.a ed.). Editorial UNED.

- González, S., Cantó, J., Rodríguez-Hernández, E., Flores, S., Román, S. & Milián, F. (2018). "Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión". RMCP. 9, núm. 2, 328-345. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4396>
- Health for Animals & Oxford Analytica (2023) Animal health and sustainability: A global data analysis. Health for Animals, global animal health association. <https://healthforanimals.org/resources/publications/publications/full-report-animal-health-and-sustainability-a-global-data-analysis/>
- Hernandez-Marin, J., Cortez-Romero, C., Clemente-Sanchez, F., Gallegos, J., Salazar-Ortiz, J., & Tarango-Arámbula, L. (2014). Risk of transmission of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (Map) in domestic and wild species. AGRO Productividad, 65-70.
- Holder, A., Garty, R., Elder, C., Mesnard, P., Laquerbe, C., Bartens, M. C., Salavati, M., Shabbir, M. Z., Tzelos, T., Connelly, T., Villarreal-Ramos, B., & Werling, D. (2020). Analysis of genetic variation in the bovine SLC11A1 gene, its influence on the expression of *NRAMP1* and potential association with resistance to bovine tuberculosis. Front. in Microbiol., 11(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01420>
- Hořín, P., Rychlík, I., Templeton, J. W., & Adams, L. G. (1999). A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine *NRAMP1* gene. EJI., 26(4), 311–313. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2370.1999.00148.x>
- Hu, J., Bumstead, N., Burke, D., Ponce de León, F. A., Skamene, E., Gros, P., & Malo, D. (1995). Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) in chicken. Mammalian genome, 6(11), 809–815. <https://doi.org/10.1007/BF00539010>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). 2021. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). 2023. Boletín Técnico Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/Bolet%C3%ADn_tecnico_ESPAC_2022.pdf

- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2013). *Conceptos de genética*. Pearson Educación: Madrid
- Lara Reyes, J. A. L., Contreras Huerta, S. C., Gamboa Flores, E. G., Andrade Bonilla, A. C. A., López Huerta, S. L., Carranza González, D. C., & Méndez Pérez, A. M. (2008). Análisis del polimorfismo del gen NRAMP 1 y susceptibilidad genética a tuberculosis en población de Coyopolan, municipio de Ixhuacán de los Reyes. *Rev. Méd. UV.*, 8(1), 14-18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2008/muv081a.pdf>
- Llorca, Javier, Prieto-Salceda, Dolores, Combarros, Onofre, Dierssen-Sotos, Trinidad, & Berciano, José. (2005). Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *SCI.*, 19(4), 321-324. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112005000400009&lng=es&tlng=es.
- Liu, K., Zhang, B., Teng, Z., Wang, Y., Dong, G., Xu, C., Qin, B., Song, C., Chai, J., Li, Y., Shi, X., Shu, X., & Zhang, Y. (2017). Association between SLC11A1 (*NRAMP1*) polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Chinese Holstein cattle. *Tuberculosis*, 103. 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.11.003>
- Martínez, R. (2008). Resistencia genética a brucelosis en ganado bovino criollo colombiano Blanco Orejinegro y Cebú Brahman. UCM: Madrid. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/18530>
- Martínez, R., Dunner, S., Barrera, G., & Cañon, J. (2008). Novel variants within the coding regions of the Slc11A1 gene identified in Bos taurus and Bos indicus breeds. *JABG.*, 125(1), 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2007.00690.x>
- Martinez, R., Dunner, S., Toro, R., Tobón, J., Gallego, J., & Cañón, J. (2010). Efecto de polimorfismos en la región codificante de Slc11a1 sobre la resistencia a la brucelosis por macrófagos in vitro y después del desafío en dos razas Bos (Blanco Orejinegro y Cebú). *Gen. Biol. Mol.*, 33(3), 463-470. 10.1590/S1415-47572010000300014
- Martínez, R., Toro, R., Montoya, F., Burbano, M., Tobon, J., Gallego, J., & Ariza, F. (2005). Evaluación genética para resistencia a brucelosis en ganado criollo colombiano BON. *AZ.*, 54(206-207), 333-340. ISSN: 0004-0592. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49520735>

- Meade, K. G., Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., O'Farrelly, C., Costello, E., Keane, J., Zhao, Y., & MacHugh, D. E. (2007). Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BMC genomics*, 8, 400. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-400>
- Mendoza, D., Marini, P., & Zambrano, J. (2022). Los bovinos criollos un recurso zoogenético de seguridad alimentaria para Ecuador y Latinoamérica. *RRCP*, 4(2), 175–185. Recuperado a partir de <https://www.editorialalema.org/index.php/pentaciencias/article/view/83>
- National Human Genome Research. (2024). TFG. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Marcador#:~:text=Definición,azar%2C%20variantes%20genómicas%20o%20genes>.
- Okuni JB, Afayoa M and Ojok L (2021) Survey of candidate single-nucleotide polymorphisms in SLC11A1, TLR4, NOD2, PGLYRP1, and IFN γ in ankole longhorn cattle in central region of Uganda to determine their role in *Mycobacterium avium* *Subspecies paratuberculosis* Infection Outcome. *Front. Vet. Sci.* 8:614518. doi: 10.3389/fvets.2021.614518
- Paixão, T. A., Martinez, R., & Santos, R. L. (2012). Polymorphisms of the coding region of Slc11a1 (*Nramp1*) gene associated to natural resistance against bovine brucellosis. *ABMVZ.*, 64(4), 1081–1084. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000400041>
- Paixão, Tatiane A., Ferreira, C., Borges, Á. M., Oliveira, D. A. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2006). Frequency of bovine *Nramp1* (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet. Immunol. Immunopat.*, 109(1–2), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.018>
- Paixao, T. A., Poester, F. P., Carvalho Neta, A. V., Borges, A. M., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2007). *NRAMP1* 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *I&I*, 75(5), 2493-2499. DOI: 10.1128/IAI.01855-06
- Parra, R., Martínez, G., & Valderrama-Rodas, M. (2021). “Situación actual y perspectivas de la ganadería de bovinos criollos en américa latina: situación actual y perspectivas de los bovinos criollos”. *LAAAP.*, 29 (3-4), 79-90. <https://doi.org/10.53588/alpa.293401>

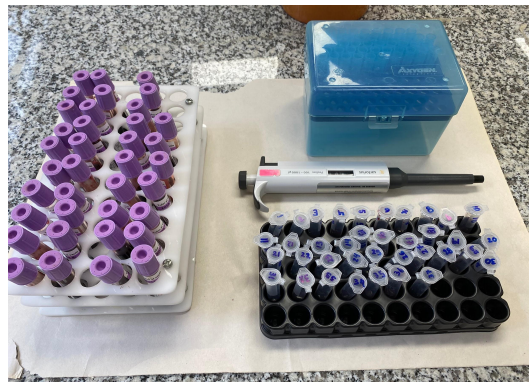
- Piñeira V., Jaime, Tapia, Marilyn, Gebauer M., Francisco (2020). ¿Qué es la consanguinidad? [en línea]. Coyhaique: Informativo INIA Tamel Aike. no. 45. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/5005>
- Pitel, F., Lantier, I., Riquet, J., Lanneluc, I., Tabet-Aoul, K., Saïdi-Mehtar, N., Lantier, F., & Gellin, J. (1994). Cloning, sequencing, and localization of an ovine fragment of the NRAMP gene, a candidate for the ITY/LSH/BCG gene. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 5(12), 834–835. <https://doi.org/10.1007/BF00292035>
- Raphaka, K., Oswald, M., Sánchez-Molano, E., Raphael, M., Coffey, M., Riggio, V., Banos, G. (2017). Genomic regions underlying susceptibility to bovine tuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *BMC Genetics*, 18:27. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0493-7>
- Román-Cárdenas, F., & Chávez-Valdivieso, R. (2017). Prevalencia de enfermedades que afectan la reproducción en ganado bovino lechero del cantón Loja. *CEDAMAZ*, 6(1). <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/65>
- Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Manzano, C., Iriondo, M., Molina, E., Gil, A., Koets, A. P., Rutten, V. P., Juste, R. A., & Estonba, A. (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*. *J. dai. Sci.*, 93(4), 1713–1721. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2438>
- Sanchez, M. (2012). Inferencia estadística para el equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de genotipado con datos faltantes. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/2099.1/17483/1/memoria.pdf>
- Sánchez Reyes, C. (2003). Cría y mejoramiento del ganado vacuno lechero. Lima (Perú): Ediciones Ripalme.
- Schulman, N. F., Viitala, S. M., de Koning, D. J., Virta, J., Mäki-Tanila, A., & Vilkki, J. H. (2004). Quantitative trait Loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *Journal of dairy science*, 87(2), 443–449. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73183-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73183-5)
- Sun, L., Song, Y., Riaz, H., Yang, H., Hua, G., Guo, A., & Yang, L. (2012). Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Vet. Immunol. Immunopat.*, 147(3-4), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.016>

- Tripp, M. (2009). Análisis de la estructura genética poblacional del Dorado (*Coryphaena hippurus*; Linnaeus, 1758) en el noroeste del Pacífico mexicano y golfo de California mediante el uso de microsatélites. In Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/263>
- Tuggle, C. K., Schmitz, C. B., & Gingerich-Feil, D. (1997). Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (*NRAMP1*) cDNA. *JAS.*, 75(1), 277. <https://doi.org/10.2527/1997.751277x>
- Uren C., Henn B. M., Franke A., Wittig M., Van Helden P. D., Hoal E. G. et al.. (2017). A post-GWAS analysis of predicted regulatory variants and tuberculosis susceptibility. *PLoS ONE* 12:e0174738. [10.1371/journal.pone.0174738](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174738)
- Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., & Gros, P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3), 469–485. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90135-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90135-D)
- Vidal, S., Gros, P., & Skamene, E. (1995). Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies *Nramp1* as the Bcg/Ity/Lsh locus. *JLB.*, 58(4), 382-390. <https://doi.org/10.1002/jlb.58.4.382>
- Villaamil Rodríguez, F. J. (2022). Medidas de bioseguridad y su relación con el estatus sanitario frente a enfermedades infecciosas endémicas en granjas de vacuno lechero. Universidade de Santiago de Compostela. <http://hdl.handle.net/10347/28880>

Anexos



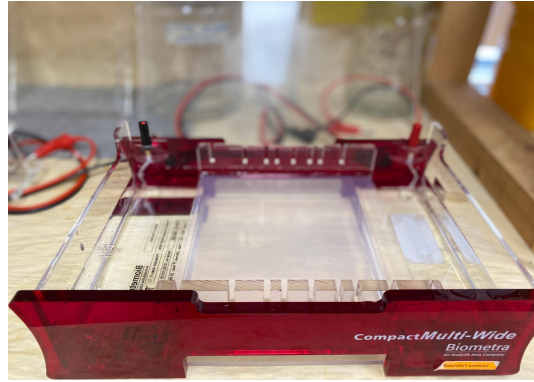
Anexo A. Toma recolección de muestras



Anexo B. Organización de muestras en laboratorio



Anexo C. Proceso de extracción de ADN



Anexo D. Materiales para elaboración del gel de Agarosa



Anexo E. Elaboración y lectura del gel de Agarosa



Anexo F. Elaboración del gel de Poliacrilamida



Anexo G. Tinción del gel de poliacrilamida



Anexo H. Foto documentación y lectura de los geles de poliacrilamida