

# **EXPRESIÓN DE GENES DE CHOQUE TÉRMICO EN BOVINOS DE DOBLE PROPÓSITO EXPUESTOS A ESTRÉS CALÓRICO**

El cambio climático impacta nuestros ecosistemas llevando a los seres vivos a sobrevivir en condiciones cada vez más extremas. El incremento de la temperatura ambiental continúa su curso a pesar de las diferentes medidas que se han tomado para mitigar este problema, el cual afecta al sector ganadero, disminuyendo los índices productivos y reproductivos. La respuesta animal a este evento es intentar una aclimatación exitosa para evitar los estragos que el estrés calórico provoca en el organismo.

Angelica Torres Heredia

La aclimatación es la respuesta fenotípica desarrollada por los animales a una fuente específica de estrés ambiental (Nardone et al., 2010). La termo-tolerancia adquirida es transitoria en la naturaleza y depende principalmente de la severidad inicial del estrés calórico, a mayor dosis inicial de calor, mayor magnitud y duración de la termo-tolerancia (Kregel, 2002).

La identificación de adaptabilidad en las diferentes razas bovinas tiene como finalidad encontrar cual se adapta mejor a un ecosistema específico, así como se ha estado buscado frecuentemente en las zonas tropicales y subtropicales, en donde es muy común la introducción de razas occidentales de animales domésticos y éstas sufran un balance negativo de energía, así como un aumento de temperatura y frecuencia respiratoria causado por estrés calórico (Bañuelos, 2005).

Se han estado utilizando las proteínas de choque térmico (hsp, por sus siglas en inglés) como un indicador de adaptabilidad de los bovinos al estrés calórico, ya que estas proteínas son mediadoras de la respuesta al choque térmico (Hyder et al., 2017).

Una de las primeras funciones fisiológicas asociadas con la acumulación inducida por el estrés de la hsp70 es la termo-tolerancia adquirida. Diversos estudios han demostrado que la inducción de la hsp70 en roedores está asociada con el desarrollo de la tolerancia a una variedad de tipos de estrés, incluyendo hipoxia, isquemia, acidosis, desgaste energético, citoquinas, como el factor de necrosis tumoral, y radiación ultravioleta (Barbe et al., 1988; Marber et al., 1995; Sciandra & Subjeck, 1983).

La estimación de la magnitud de la expresión de genes hsp en bovinos puede ayudar a desarrollar futuros programas de cruzamiento al identificar animales que puedan mantener una mayor integridad celular y homeostasis bajo estrés calórico. Con base en lo anterior, se realizó un estudio en el que se planteó que podrían existir diferencias en la expresión de los genes hsp en relación con la hora de la toma de muestra, el grupo racial, el porcentaje de genes *Bos taurus* y el estado fisiológico de vacas de doble propósito en clima tropical.

Se tomaron muestras de sangre de 33 hembras bovinas cruzadas Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú, en lactación y horras, pertenecientes a un hato de doble propósito

del campo experimental La Posta del INIFAP. Se obtuvieron la temperatura ambiental (T) y la humedad relativa (HR) a través de una estación climatológica y con estos valores se determinó el índice de temperatura-humedad relativa (ITH) para tenerlo como referencia, ya que con un índice de 72 e incluso a veces menor los bovinos comienzan a presentar estrés calórico. El estudio se llevó a cabo en el mes de agosto, cuando la temperatura es más alta. Las muestras se colectaron en dos diferentes periodos del día, en la mañana, de 07:00 a 09:00 horas, y en la tarde, de 13:00 a 15:00 horas.

Se colectaron 5 ml de sangre de la vena coxígea en tubos con EDTA y se mantuvieron en cadena fría hasta su arribo al laboratorio. El mRNA se obtuvo mediante el método comercial SV Total RNA Isolation System de la marca Promega. Posteriormente, la concentración y pureza del mRNA se verificó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop™ 2000 de la marca Thermo Fisher Scientific™. La síntesis del cDNA se realizó por retro-transcripción del mRNA con el método comercial GoScript™ Reverse Transcription System de la marca Promega.

El análisis de la expresión se llevó a cabo en los genes hsp60, hsp70 y hsp90, para lo que se utilizó el gen endógeno  $\beta$ -actina como gen constitutivo de referencia. Los genes se amplificaron por qPCR dúplex en un equipo StepOnePlus™ Real-Time System con iniciadores y sondas marcadas con fluorescencia. Las sondas de los genes hsp se marcaron con el fluoróforo FAM y el gen  $\beta$ -actina con el fluoróforo HEX. El silenciador empleado en todas las sondas fue TAMRA.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 15  $\mu$ L, con 1X de TaqMan® Fast Advanced Master Mix de la marca Thermo Fisher Scientific™, 400 nM de los iniciadores sentido y antisentido, 200 nM de sonda marcada y 200 ng de DNA.

Para el gen hsp60, las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y alineamiento/extensión a 65°C durante 60 segundos, mientras que para los genes hsp70 y hsp90 fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, alineamiento a 65 y 62°C, respectivamente y extensión a 72°C durante 40 segundos.

La expresión de los genes hsp se determinó con el método comparativo  $\Delta\Delta$ Ct (método de cuantificación relativa), usando el gen  $\beta$ -actina de referencia, comparado contra un animal de referencia. El método de cuantificación permite conocer la concentración presente en una muestra, es decir, el número de copias que se van a expresar de ese gen en la muestra. Entre menor sea el número de ciclos del gen existe mayor expresión, por lo tanto, el  $\Delta\Delta$ Ct será menor cuando exista un incremento de dichos ciclos.

El análisis estadístico de la expresión de los genes hsp60, hsp90 y hsp70 se llevó a cabo con un modelo de mediciones repetidas, utilizando PROC MIXED de SAS, versión 9.3 (SAS Institute Inc, 2013). En el análisis estadístico se consideraron los animales a partir de los cuales se obtuvo amplificación del gen hsp y el gen de referencia  $\beta$ -actina, con valores Ct menores a 40; se descartaron aquellos que no cumplieron con estos criterios. Se determinó la estructura de covarianzas adecuada para el ajuste de los datos probando 8 diferentes estructuras de covarianzas: simple, simetría compuesta, autorregresiva de primer orden, Toeplitz, componentes de varianza, autorregresiva de primer orden heterogénea, simetría compuesta heterogénea y Toeplitz heterogénea. La selección de la mejor estructura de covarianzas se basó en los criterios de información de ajuste de

Akaike, de segundo orden y bayesiano de Schwarz.

Los efectos incluidos en el modelo estadístico fueron hora del día, grupo racial, estatus productivo (en ordeña o horra), edad, porcentaje de genes *Bos taurus* y la interacción de los factores con la hora del día. Para obtener los modelos definitivos, se eliminaron las interacciones que no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) en los análisis preliminares, previa selección de la estructura de covarianzas que causó el mejor ajuste en el modelo. La comparación de medias se realizó con la prueba de comparaciones múltiples de t protegida de Fisher.

## Resultados

Los valores promedio de la frecuencia respiratoria, la temperatura corporal y la expresión de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* de los bovinos Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú, en lactación y horas, se muestran en el Cuadro 1

**Cuadro 1.** Estadísticas descriptivas de las variables estudiadas.

| Variable                | N  | Media | DE   | Mínimo | Máximo |
|-------------------------|----|-------|------|--------|--------|
| Frecuencia respiratoria | 62 | 24.38 | 2.62 | 19.00  | 29.00  |
| <i>hsp60</i>            | 59 | 1.23  | 2.40 | 0.01   | 12.55  |
| <i>hsp70</i>            | 60 | 0.64  | 1.30 | 0.00   | 5.51   |
| <i>hsp90</i>            | 54 | 1.04  | 2.92 | 0.01   | 18.98  |
| Temperatura corporal    | 55 | 38.69 | 1.07 | 36.10  | 40.45  |

Los valores mínimo, máximo y promedio para el ITH fueron 72.64, 77.24 y 74.81 para las mediciones realizadas en la mañana y 81.83, 91.03 y 86.58 para las mediciones realizadas durante las tardes, respectivamente. Los ITH

observados en las mañanas se pueden considerar como moderados y los observados en las tardes como severos.

La estructura de covarianza que dio el mejor ajuste de los datos, basado en los criterios de información de ajuste de Akaike, de segundo orden y bayesiano de Schwarz, fue la autorregresiva de primer orden. El efecto de la hora del día (AM o PM) tuvo un impacto significativo en la expresión de los genes *hsp60* y *hsp70*, así como en la temperatura corporal y frecuencia respiratoria, ya que estas variables se encontraban elevadas en las muestras tomadas en la tarde, indicando que la hora de muestreo influye en la expresión de los genes *hsp*. Los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* tuvieron mayor expresión en los animales donde el porcentaje de genes *Bos taurus* fue mayor (0.75), sin embargo, esta diferencia fue estadísticamente significativa únicamente para el gen *hsp70*. El efecto del estado fisiológico (en ordeña o horra) fue significativo únicamente para la expresión del gen *hsp90*. Las medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para las variables estudiadas se presentan en el Cuadro 2.

Los valores de expresión del gen *hsp70* obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos en estudios realizados en distintas razas bovinas y búfalos que comparaban la expresión de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* (Kumar et al., 2015; Hu et al., 2016; Hooper et al., 2019; Shandilya et al., 2020). También se ha demostrado una expresión mayor del gen *hsp60* en comparación con la

**Cuadro 2.**

Medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para la expresión relativa normalizada de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* y temperatura corporal y frecuencia respiratoria en vacas de doble propósito, por efecto incluido en el modelo estadístico.

| Efecto              |                    | <i>hsp60</i>             | <i>hsp70</i>             | <i>hsp90</i>             | Temperatura corporal      | Frecuencia respiratoria   |
|---------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Hora del día        | AM                 | 1.61 ± 0.41 <sup>a</sup> | 0.99 ± 0.23 <sup>a</sup> | 0.36 ± 0.18 <sup>a</sup> | 37.96 ± 0.16 <sup>a</sup> | 23.13 ± 0.39 <sup>a</sup> |
|                     | PM                 | 0.96 ± 0.41 <sup>b</sup> | 0.45 ± 0.22 <sup>b</sup> | 0.17 ± 0.06 <sup>a</sup> | 39.45 ± 0.11 <sup>b</sup> | 25.64 ± 0.43 <sup>b</sup> |
| Porcentaje de genes | 0.63               | 0.95 ± 0.61 <sup>a</sup> | 0.57 ± 0.32 <sup>a</sup> | 0.37 ± 0.13 <sup>a</sup> | 38.66 ± 0.13 <sup>a</sup> | 24.31 ± 0.39 <sup>a</sup> |
|                     | 0.75               | 1.63 ± 0.52 <sup>a</sup> | 0.87 ± 0.26 <sup>b</sup> | 0.16 ± 0.13 <sup>a</sup> | 38.75 ± 0.12 <sup>a</sup> | 25.64 ± 0.43 <sup>a</sup> |
| Grupo racial        | Holstein x Cebú    | 0.45 ± 0.53 <sup>a</sup> | 0.16 ± 0.27 <sup>a</sup> | 0.27 ± 0.14 <sup>a</sup> | 38.77 ± 0.12 <sup>a</sup> | 24.44 ± 0.44 <sup>a</sup> |
|                     | Suizo Pardo x Cebú | 2.13 ± 0.64 <sup>a</sup> | 1.28 ± 0.32 <sup>b</sup> | 0.26 ± 0.12 <sup>a</sup> | 38.64 ± 0.14 <sup>a</sup> | 24.26 ± 0.32 <sup>a</sup> |
| Estado fisiológico  | Horra              | 1.15 ± 0.59 <sup>a</sup> | 0.76 ± 0.30 <sup>a</sup> | 0.09 ± 0.12 <sup>a</sup> | 38.68 ± 0.14 <sup>a</sup> | 23.99 ± 0.45 <sup>a</sup> |
|                     | Lactando           | 1.43 ± 0.55 <sup>a</sup> | 0.68 ± 0.28 <sup>a</sup> | 0.43 ± 0.13 <sup>b</sup> | 38.74 ± 0.12 <sup>a</sup> | 24.71 ± 0.32 <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Medias con distinta literal son diferentes (P<0.05)

expresión de los genes *hsp70* y *hsp90* (Hooper et al., 2019).

La variación de la expresión de los genes *hsp* entre animales puede deberse a diferencias en adaptabilidad individual y a la manera de responder ante el estrés calórico Kumar et al.

(2018) identificaron al gen *hsp70* como un mejor marcador del estrés calórico que el gen *hsp90*. Animales menos adaptados muestran una expresión mayor del gen *hsp70*, sugiriendo que puede ser un indicador de animales con mayor adaptabilidad (Bretanha et al., 2019).

Durante un estudio realizado con bovinos Simbrah de diferentes localidades tropicales del territorio mexicano, se encontró que la expresión del gen *hsp60* fue mayor en las muestras de sangre tomadas al medio día que en las muestras tomadas en la madrugada (Guzmán et al., 2021). Por otra parte, en un estudio previo en la misma raza no se encontraron diferencias entre los individuos y la expresión del gen *hsp60*, aunque si hubo diferencias entre los valores de las muestras tomadas en la madrugada y al medio día (Guzmán et al., 2019).

Se han observado mutaciones en el gen *hsp70* que tienen influencia en características de importancia económica, como tolerancia al calor y producción de leche, que posteriormente pueden ser identificadas para su uso como marcadores genéticos para obtener características específicas. Estas mutaciones se han encontrado en ganado Bos Taurus (Angus), Bos Indicus (Brahman) y sus cruza, indicando que estas mutaciones pueden ser heredadas (Kumar et al., 2019).

Los genes de proteínas de choque térmico y sus variaciones (polimorfismos) se han asociado con el descenso de la fertilidad. Se ha detectado la expresión de *hsp* en los gametos y en embriones, lo cual quiere decir que está relacionada con la supervivencia del embrión, para que éste llegue a término. Se ha sugerido que debido al tiempo en el que se desarrollan los gametos, están expuestos a condiciones adversas durante su maduración, lo cual puede resultar en un mal desarrollo y maduración del óvulo, lo cual podría afectar la reproducción (Rosenkrans et al., 2010). Por otro lado, Paula-Lopes et al. (2003) demostraron que embriones de ganado Brahman tienen mejor índice de supervivencia ante la exposición a altas temperaturas que embriones de Angus y Holstein.

A pesar de que el método estándar para cuantificar la expresión de los genes de *hsp* es la PCR, también se ha utilizado la prueba de ELISA para determinar la expresión del gen *hsp70* en la saliva de vacas lecheras, encontrando que las vacas con mayor producción de leche expuestas a estrés calórico presentaban mayor

concentración que las vacas con menor producción de leche expuestas a las mismas condiciones climáticas. El análisis de la saliva con la prueba de ELISA para la identificación del gen es un método no invasivo que se puede utilizar en futuras investigaciones (Lamy et al., 2017).

En conclusión, la expresión de los genes hsp son un buen indicador para identificar bovinos para termo-tolerancia lo cual tendría como consecuencia menos estragos por el aumento de las temperaturas y mayores índices de productividad en los hatos.

Literatura citada

Fuente.

<https://www.ganaderia.com/destacado/expresion-de-genes-de-choque-termico-en-bovinos-de-doble-proposito-expuestos-a-estres-calorico>

**Clic Fuente**

