



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DEL GEN HSP70A Y PERFILES METABOLICOS
EN CONDICIONES DE ESTRÉS TERMICO EN BOVINOS CRIOLLOS MIXTECOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

NESTOR MENDEZ PALACIOS

TUTOR: RAUL ULLOA ARVIZU

COMITE TUTORAL: MOISES MONTAÑO BERMUDEZ

FRANCISCO GALINDO MALDONADO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Eva y Maximino por ser la fuente de inspiración y de superación constante, por ayudarme, darme siempre ánimos y no perder las esperanzas, por sufragar mis gastos y conseguir el financiamiento para los análisis, los muestreos y el material utilizado. GRACIAS!

A mis hermanas Nelly y Netzi por no dejar que me aburriera nunca, por desestresarme con su compañía y por ser mis hermanas.

A Feli por la ayuda, inspiración, enseñanzas y tantas otras cosas que no podre pagarte.

A Valentina por esa gran sonrisa que me llena, por traer tanta tranquilidad, alegría y fe a mi vida.

Al Dr. Ulloa por aceptarme y confiar siempre en mí, por su valiosa ayuda y amistad.

A mis tutores Dr. Montañón y Dr. Galindo por las grandes aportaciones a este trabajo y por la ayuda brindada en los momentos en los que más los necesite.

A los miembros del jurado Dr. Montaldo y Dr. Alonso por sus enseñanzas y su colaboración en el trabajo.

A Sr. Ezequiel y Sr. Moisés por las facilidades prestadas al dejarnos obtener muestras de sus animales.

A los integrantes del laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ, a Pablo por los buenos ratos de ocio y la ayuda desinteresada, Amanda gracias por las asesorías y enseñanzas, a Rafa (Sapo), Alex, etc.

A Concho por su gran amistad y ayuda para la obtención de las muestras.

A la QFB Socorro por la asesoría y el análisis de muestras.

Al Biólogo Jorge Alejandro por las enseñanzas y el empujón hacia el área molecular.

Al Dr. Eloy Camacho por las atenciones prestadas y permitirme el acceso al laboratorio.

Este proyecto fue en gran parte financiado por la Universidad Autónoma de Puebla.

Ah! Y a los animales que proveyeron el material principal para la elaboración de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Bovino Criollo Mixteco	2
1.1.2 Mixteca Poblana	4
1.1.3 Estrés	7
1.1.4 Indicadores Metabólicos	12
1.1.4.1 Glucosa	12
1.1.4.2 Colesterol	13
1.1.4.3 Ácido Úrico	15
1.1.4.4 Creatinina	16
1.1.4.5 Proteínas Totales	16
1.1.5 Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins)	17
1.1.5.1 Actividad intracelular	19
1.1.5.2 Actividad extracelular	20
1.1.5.3 Expresión de la Hsp70	21
1.1.5.4 Localización de los genes de la Hsp70	21
1.1.6 SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) Polimorfismos de un sólo Nucleótido	24
1.2 Objetivos	26
1.2.1 Objetivos particulares	26
1.3 Hipótesis	26
II MATERIAL Y MÉTODOS	27
2.1 Primera parte: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos	27
2.1.1 Localización	27
2.1.2 Sistema de producción	27

2.1.3 Índice de Temperatura Humedad	28
2.1.4 Muestreo	28
2.1.5 Química Sanguínea	29
2.1.6 Análisis estadístico	29
2.1.6.1 Modelo para la época	29
2.1.6.2 Modelo para los grupos	30
2.2 Segunda parte: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino	30
2.2.1 Muestreo	30
2.2.2 Diseño de iniciadores	31
2.2.3 Secuenciación	31
2.2.4 Obtención de SNP	32
2.2.5 Análisis estadístico	32
2.2.5.1 Diversidad Haplotípica	33
2.2.5.2 Diversidad Nucleotídica	33
2.2.5.3 Diferencias nucleotídicas entre poblaciones	34
2.2.5.4 Sustituciones nucleotídicas	34
2.2.5.5 Coeficiente de diferenciación nucleotídica	35
2.2.5.6 Prueba de neutralidad de Tajima	37
2.2.5.7 Árbol filogenético	37
III RESULTADOS	38
3.1 Primera parte: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos	38
3.2 Segunda parte: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino	43
3.2.1 SNP del promotor del gen Hsp70 A	43
3.2.2 Mutaciones	46
3.2.3 Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP	46
3.2.4 Diversidad Genética	49
3.2.5 Árbol filogenético	51

3.2.6 Prueba de Neutralidad de Tajima	53
IV DISCUSIÓN	54
4.1 Primera parte: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos	54
4.2 Segunda parte: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino	56
4.2.1 Mutaciones	57
4.2.2 Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP	58
4.2.3 Diversidad Genética	59
4.2.4 Árbol filogenético	60
4.2.5 Prueba de Neutralidad de Tajima	61
V CONCLUSIÓN	62
5.1 Primera parte: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos	62
5.2 Segunda parte: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino	62
VI LITERATURA CITADA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.2.1 Localización de la región de la Mixteca Poblana.	6
Figura 1.1.3.1 Respuesta fisiológica al estrés	11
Figura 1.1.5.4.1 Mapa del BOLA en el cromosoma 23	22
Figura 1.1.5.4.2 Secuencia del gen HSP70A (Acceso M98823)	23
Figura 1.1.6.1 Electroferogramas	25
Figura 3.1.1 Índices de temperatura-humedad desde el 1 de enero de 2004 al 24 de julio de 2004	38
Figura 3.1.2 Grafica de cajas de la química sanguínea por época para bovinos criollos	40
Figura 3.1.3 Grafica de cajas de la química sanguínea por grupo	42
Figura 3.2.1.1 Elementos de choque térmico y polimorfismos de la región secuenciada del gen Hsp70A	44
Figura 3.2.5.1 Dendograma tipo Neighbor-Joining de los haplotipos que resume las distancias de Kimura 2-parametros calculadas	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1.5.1 Clasificación de las Proteínas de Choque térmico	18
Cuadro 2.2.2.1 Parámetros de los iniciadores obtenidos	31
Cuadro 3.1.1 Valores mínimos, máximos, medianas, medias de cuadrados mínimos y errores estándar por época para bovinos criollos	39
Cuadro 3.1.2 Cuadrados medios del ANdeVA de las variables evaluadas por época para bovinos criollos	39
Cuadro 3.1.3 Valores mínimos, máximos, medianas, medias de cuadrados mínimos y errores estándar por grupo genético en época de lluvias	41
Cuadro 3.1.4 Cuadrados medios del ANdeVA de las variables evaluadas por grupo genético	41
Cuadro 3.2.1.1 Frecuencias haplotípicas por grupo genético	45
Cuadro 3.2.2.1 Frecuencias y tipos de mutaciones	46
Cuadro 3.2.3.1 Frecuencias genotípicas y posiciones polimórficas por raza	48
Cuadro 3.2.3.2 Frecuencias alélicas por posición por raza	48
Cuadro 3.2.4.1 Diversidad nucleotídica dentro, entre grupos y coeficiente de diferenciación nucleotídica	50
Cuadro 3.2.6.1 Prueba de neutralidad de Tajima en los tres grupos genéticos estudiados	53

ANEXOS

Anexo 1	I
Extracción de ADN a partir de muestras de sangre y estandarización a 50 ng/ μ l	
Anexo 2	II
Amplificación del fragmento promotor del gen Hsp70A	
Anexo 3	III
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	
Anexo 4	IV
Amplificación de secuencia del fragmento promotor del gen Hsp70A	
Anexo 5	V
Alineación de haplotipos con la secuencia de referencia Hsp70A	

I INTRODUCCION

En México, a diferencia de otros países como Brasil o Colombia, no hay una "raza" criolla bien definida ¹; localmente se les conoce como: Chinampo en Baja California, Coreño en Nayarit, Frijolillo en Sonora, Mixteco en Puebla y Oaxaca . En Florida, Estados Unidos, a los bovinos criollos se les conoce como Cracker y en la región de Louisiana, Swamp ².

El bovino criollo mexicano es descendiente de diferentes bovinos españoles que llegaron a partir de 1521 ³, tiene su origen en unos cuantos cientos de cabezas de ganado Español, traídos primeramente a lo que hoy es la República Dominicana y Haití extendiéndose en todo el Continente Americano, excepto Canadá y las Colonias Inglesas ^{3, 4, 5}. Estos bovinos se fueron adaptando a las diferentes regiones del país y con el paso de los años ha sufrido selección natural permitiendo su sobrevivencia ². Es un grupo genético único en el mundo que ha probado su adaptación a los diferentes ecosistemas existentes en México y, por tanto, es un recurso genético muy importante para ser conservado y utilizado.

Parte del estudio tiene por objetivo determinar las diferencias en los perfiles metabólicos en dos épocas en cuanto a estrés de tipo térmico y no estrés, determinados por medición de temperaturas ambientales y análisis de químicas sanguíneas de estos animales.

Poco o casi nada se ha hecho en cuanto a estudios de polimorfismos en bovinos criollos mexicanos, por lo que este estudio se encamina a los posibles cambios en una sola base de la secuencia de la proteína de choque térmico 70A. Las proteínas de choque térmico son muy conservadas ⁶, se han encontrado pocos cambios nucleotídicos entre razas de mamíferos de una misma especie. Donde se han observado mutaciones es en la región de ligamiento de ATP, pero no modifica la función protectora contra estrés térmico u oxidativo ⁷.

Sin embargo mutaciones en la región promotora, principalmente en los elementos de choque térmico (HSE) podrían modificar el nivel de expresión de las proteínas de choque térmico y consecuentemente, diferencias en la protección contra estrés de tipo térmico ^{8,9}.

RESUMEN

Primera parte de estudio: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos

El propósito de este trabajo fue conocer y comparar los valores de la Química Sanguínea entre bovinos criollos y Cebú. Se utilizaron 28 bovinos criollos en dos diferentes épocas del año (Abril y Julio) y 5 cebúes en una época (Julio); se extrajeron 7mL de sangre, con anticoagulante (EDTA). Se determinaron niveles sanguíneos de: Glucosa, Creatinina, Colesterol, Acido Úrico y Proteínas Totales. Se utilizó un modelo estadístico mixto, por la disparidad de muestras y la ausencia de datos de los Cebúes en el primer muestreo. Los datos se procesaron en SPSS V.12. Se calculó el índice de temperatura-humedad (72.81) y (75.31) para Abril y Julio respectivamente con el fin de determinar la existencia de estrés térmico en una de las épocas. Los promedios se encontraron dentro de los parámetros normales, la temperatura corporal tampoco presentó alteraciones. Las medias de cuadrados mínimos para épocas (Abril y Julio), fueron: Glucosa (54.61 y 54.82 ± 1.66 mg/dl), Creatinina, (1.24 y 1.28 ± 0.082 mg/dl), Colesterol (135.68 y 87.82 ± 7.32 mg/dl), Acido Úrico (2.41 y 2.12 ± 0.24 mg/dl), Proteínas Totales (7320 y 6510 ± 260 mg/dl) y Temperatura Corporal (38.81 y 38.64 ± 0.12). Las medias de cuadrados mínimos entre grupos (criollo mixteco y Cebú) fueron: Glucosa (54.82 ± 1.63 y 59.8 ± 3.85 mg/dl), Creatinina (1.28 ± 0.074 y 1.09 ± 0.174 mg/dl), Colesterol (87.82 ± 6.721 y 155.2 ± 15.88 mg/dl), Acido Úrico (2.12 ± 0.26 y 1.98 ± 0.63 mg/dl), Proteínas Totales (6510 ± 330 y 7180 ± 780 mg/dl) y Temperatura Corporal (38.64 ± 0.26 y 38.32 ± 0.30). En los resultados de la comparación de época de secas con época de lluvias, y entre grupos, el colesterol fue significativo ($p < 0.001$) presentando los bovinos criollos valores más bajos durante la época de lluvias. El análisis de las proteínas totales resultó significativo ($p < 0.05$) entre épocas con una concentración menor en la época de lluvias. Las diferencias observadas en el colesterol, concuerda con los resultados de otros estudios, donde se han reportado diferencias según el estado productivo de los animales, probablemente estos cambios son debidos a la descompensación nutricional e hídrica que sufren los bovinos criollos durante el final del periodo de secas hasta el inicio de la época de lluvias. Los resultados encontrados ponen en evidencia las variaciones que se pueden presentar por las diferencias genotípicas, un manejo nutricional e hídrico diferente al observado en los rebaños explotados con sistemas de producción tecnificados, al estado reproductivo de los animales y a los cambios climáticos principalmente.

Palabras clave: Bovinos criollos, Química Sanguínea, Estrés Térmico.

Segunda parte de estudio: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino

El bovino criollo mexicano ha sufrido selección natural permitiendo su sobrevivencia. El estrés térmico severo puede ocasionar pérdida de funcionamiento e inclusive la muerte, una respuesta biológica del organismo animal a ambientes adversos es la producción de sustancias especializadas conocidas como Proteínas de Choque Térmico (Hsp), se encargan del funcionamiento correcto de otras proteínas celulares. Este estudio tiene por objeto evaluar la existencia de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del promotor del gen de la Hsp70A, mediante secuenciación. Se utilizó ADN de 30 individuos; 10 Criollos Mixtecos de Puebla, 10 Guzerat y 10 Holstein. Para el diseño de iniciadores se utilizó la secuencia del gen reportada, con número de acceso M98823 en el GenBank. La reacción de secuenciación se hizo en ambos sentidos y con cada uno de los iniciadores por separado (delante y reverso) para minimizar errores de lectura. El análisis de las secuencias para determinar la estructura y variabilidad genética se realizó con los programas DNAsp v4 y MEGA v3.1. Se detectaron 17 haplotipos y 8 sitios polimórficos en 522pb abarcando toda la región promotora y parte de la región no traducida del gen. Todos los individuos presentaron la delección de 5 bases en la secuencia del promotor y la inserción de 1 base en la región no traducida. La diversidad haplotípica encontrada fue 0.82 ± 0.045 . Los bovinos criollos presentaron una diversidad haplotípica mayor con 0.93 ± 0.042 , los Guzerat 0.67 ± 0.097 y los Holstein 0.82 ± 0.072 , también se encontró una tendencia superior hacia las transiciones con una frecuencia de 0.55 contra 0.45 de transversiones y la proporción de transiciones/transversiones fue 0.9994. El 0.95 de genotipos fueron homocigotos, de los cuales el 0.81 son iguales a la referencia y el 0.19 diferentes de la referencia. El cálculo de la prueba de Neutralidad de Tajima para la población total fue de 0.6165 ± 0.6502 , el promedio de sitios segregantes por sitio tuvo un valor mayor 0.0155 que el coeficiente de diferenciación nucleotídica 0.00412. Ninguno de los grupos mostró significancia estadística ($p > 0.01$) en la prueba de Tajima, además de que existe una variabilidad alta en las poblaciones. De acuerdo con esto no ha habido mutaciones que pudieran favorecer o afectar de alguna manera la expresión del gen debida a los polimorfismos encontrados. Hasta el momento solo se han descrito un par de SNPs para regiones no traducidas de este gen. La mayoría de las mutaciones, se encuentran en la región no traducida que no se ha comprobado afecte la codificación de la proteína. Quizás la principal habilidad del bovino criollo mixteco es que se ha ido adaptando con éxito a las difíciles zonas geográficas como lo es la mixteca y a las condiciones climáticas más adversas del país.

Palabras clave: Bovinos criollos, Polimorfismos, Diversidad Haplotípica, Hsp70A, Estrés Térmico.

SUMMARY

First part of study: Metabolic profiles in Creole Cattle

The intention of this work was to know and to compare the values of Sanguineous Chemistry between Creole bovines and Zebu. 28 Creole bovines at two different times from the year (April and Julio) and 5 Zebus at a time were used (Julio); they were extracted 7mL of blood, with anticoagulant (EDTA). Sanguineous levels were determined of: Total glucose, Creatinina, Cholesterol, Uric Acid and Proteins. A mixed statistical model was used, by the disparity of samples and the absence of data of the Zebus in the first sampling. The data were processed in SPSS V.12. Calculation the index of temperature-humidity (72.81) and (75.31) for April and Julio respectively with the purpose of determining the existence of heat stress in one of the times. The averages were not within the normal parameters, the corporal temperature presented/displayed alterations either. The averages of minimum squares for times (April and Julio), were: Total glucose (54.61 and 54.82 ± 1.66 mg/dl), Creatinina, (1.24 and 1.28 ± 0.082 mg/dl), Cholesterol (13568 and 87.82 ± 7.32 mg/dl), Uric Acid (2.41 and 2.12 ± 0.24 mg/dl), Proteins (7320 and 6510 ± 260 mg/dl) and Corporal Temperature (38.81 and 38.64 ± 0.12). The averages of minimum squares between groups (Creole Mixteco and Zebu) were: Total glucose (54.82 ± 1.63 and 59.8 ± 3.85 mg/dl), Creatinina (1.28 ± 0.074 and 1.09 ± 0.174 mg/dl), Cholesterol (87.82 ± 6.721 and 155.2 ± 15.88 mg/dl), Uric Acid (2.12 ± 0.26 and 1.98 ± 0.63 mg/dl), Proteins (6510 ± 330 and 7180 ± 780 mg/dl) and Corporal Temperature (38.64 ± 0.26 and 38.32 ± 0.30). In the results of the comparison of time of droughts with time of rains, and between groups, the cholesterol was significant ($p < 0.001$) presenting/displaying the Creole bovines lower values during the time of rains. The analysis of total proteins is significant ($p < 0.05$) between times with a smaller concentration at the time of rains. The differences observed in the cholesterol, agree with the results of other studies, where differences have been reported according to the productive state of the animals, probably these changes must be nutritional and hydric to the descompensación which they undergo the Creole bovines during the end of the period of droughts until the beginning of the time of rains. The found results put in evidence the variations that can be displayed by the genotypic differences, a nutritional and hydric handling different from the observed one in the flocks operated with technician production systems, from the reproductive state of the animals and from the climatic changes mainly.

Key words: Creole cattle, Chemistry, Thermal Stress.

Second part of study: Genetic diversity of the promotional region of the gene bovine Hsp70A

The Mexican Creole bovine has undergone natural selection allowing it's survived. Severe heat shock can inflict casualty of operation and including the death, a biological answer of the organism animal to adverse atmospheres is the substance production specialized known like Proteins Heat Shock (Hsp), are in charge of the correct operation of other cellular proteins. This study intends to evaluate the existence of the polymorphisms of a single one nucleotide (SNPs) of the promoter of the gene of the Hsp70A, by means of sequencing. DNA of 30 individuals was used; 10 Mixtecos Creoles of Puebla, 10 Guzerat and 10 Holstein. For the design of initiators the sequence of the reported gene was used, with number of M98823 access in the GenBank. The sequencing reaction took control in both senses and of each one of the initiators separately (forward and reverse) to diminish read errors. The analysis of the sequences to determine the structure and genetic variability was made with the DNAsp programs v4 and MEGA v3.1. 17 polymorphic haplotipos and 8 sites in 522pb were detected including all the promotional region and leaves from the region nontranslated of the gene. All the individuals presented/displayed the deletion of 5 bases in the sequence of the promoter and the insertion of 1 base on the region nontranslated. The found haplotype diversity was 0.82 ± 0.045 . The Creole bovines presented/displayed a greater haplotype diversity with 0.93 ± 0.042 , the Guzerat 0.67 ± 0.097 and the Holstein 0.82 ± 0.072 , also was a superior tendency towards the transitions with a frequency of 0.55 against 0.45 of transversiones and the proportion of transitions/transversiones was 0.9994. The 0.95 of genotypes were homozygotes, of which the 0.81 are equal to the reference and the 0.19 different ones from the reference. The calculation of the test of Neutrality of Tajima for the total population was of 0.6165 ± 0.6502 , the average of segregantes sites by site had a greater value 0.0155 than the coefficient of nucleotidica differentiation 0.00412. None of the groups shown statistical significance ($p > 0.01$) in the Tajima's test, besides which a high variability in the populations. In agreement with this there have been no mutations that could somehow favor or affect the expression of the gene due to the found polymorphisms. Until the single moment they have described a pair of SNPs for regions nontranslated of this gene. Most of the mutations, they are in the region nontranslated that has not been verified affects the codification of the protein. Perhaps the main ability of the Creole bovine mixteco is that it has been adapted successfully to the difficult geographic zones as is it the mixteca and to more adverse the climatic conditions of the country.

Key words: Creole Cattle, Polymorphisms, Haplotype Diversity, Hsp70A, Heat Shock.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Bovino Criollo Mixteco

Los bovinos criollos no son una raza, este nombre "criollo" se le asigna a poblaciones de individuos descendiente de bovinos traídos por los españoles y que han sufrido un proceso de adaptación a los diferentes ambientes que han estado expuestos a través de 500 años de selección natural ¹⁰. De estos primeros individuos, algunos se perdieron o fueron abandonados y a través de los siglos, fueron sacrificados para consumo y otros murieron, esto facilitó la selección natural de los más aptos ¹¹.

Este bovino tiene características especiales para adaptarse al clima y tierra donde se localiza. El haber sobrevivido en desiertos y montañas en condiciones tan adversas en donde ninguna otra raza lo ha podido lograr, soportado sequías, revoluciones sociales y enfermedades sin atención, y sobre todo el haber sido marginados en áreas de forrajes escasos y de mala calidad dio por resultado un animal con adaptabilidad excepcional⁴. El ganado criollo es capaz de consumir forrajes tan toscos con las cuales otras razas sucumbirían, las pocas áreas arboladas que quedan en México pueden ser aprovechadas con el ganado criollo mexicano sin necesidad de ser destruidas ¹². En América Latina se ha cruzado con algunas razas definidas y al resultado de ello se le ha llamado también criollo ¹⁰. Es un animal delgado de talla pequeña, patas largas y fuertes, la parte superior de las caderas es más alta que la de la paleta ¹³, lomo recto, cuerpo elíptico para adaptarse al calor, grupa corta y angosta, extremidades firmes y fuertes, la inserción de la cola alta, espalda fuerte y cabeza en forma de " V " ligeramente cóncava y cuello corto; fosas nasales anchas y suficientemente abiertas, desarrollo del oído y el pulmón, elasticidad y amplitud de costillas delanteras, pecho amplio y hondo, las orejas son cortas y peludas, los cuernos de longitud mediana basalmente fuertes, abiertos, generalmente orientados hacia arriba y adelante ¹⁴, de color negro o blanco con puntas negras, el color de las pezuñas es variable, pero muy fuertes ¹⁵. El tamaño corporal, la conformación y habilidad productiva de leche son

características que varían marcadamente con el ganado de cada región, sin embargo el color de pelo es muy consistente, existiendo primordialmente tres colores, el rubio, bayo y prieto, con una diversidad de variaciones intermedias y con frecuencia se observan animales de color gateado ¹⁴. Su constitución le permite sobrevivir y desempeñarse a edad avanzada ¹³. El temperamento de los toros es siempre a lertas y activos, pero no nerviosos o viciosos y no perezosos ⁵.

Se ha hecho hincapié en que los bovinos criollos presentan características fenotípicas de varias razas Españolas, como son Berrenda y Negra andaluza, Asturiana de los Valles, Asturiana de la montaña, Morucha Salmantina, Avileña negra, Caidelana, Vianesana, Pajuna, Retinta y Rubia Gallega ¹⁶. Sin embargo Robert Bakewell (1725 - 1795) fue el primero en conducir programas sistemáticos de prueba de progenie en ovinos y bovinos, ello condujo a la creación de razas, que luego fueron traídas a América para ser cruzadas entre sí o para aparearse con los animales nativos que surgieron de la sobrevivencia de los más aptos ^{17, 18}.

El ganado bovino criollo existe en las regiones más inaccesibles del país, principalmente, la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, la Sierra Mixteca, Sierra de Juárez, así como, la Península de Baja California ^{3, 4, 5, 10, 11}. En esos sistemas de producción los animales están expuestos a diversos estresores: térmico, nutricional, hídrico y en forma concomitante al ataque de parásitos y microorganismos. Los bovinos, y todos los seres vivos, tienden a mantener su estabilidad, ajustándose continuamente a las condiciones más adecuadas para su supervivencia. Los bovinos criollos han sufrido un proceso de selección natural a diferentes ambientes y alimentos para sobrevivir y reproducirse en donde algunos otros no lo lograron.

Los bovinos criollos son utilizados para trabajar en la agricultura y poder producir en el campo y pueden proporcionar leche en cantidades pequeñas. Estos animales son un factor económico importante en cuanto al ingreso de divisas, por la exportación de novillos para uso deportivo en los Estados Unidos y Canadá ¹⁹. Actualmente, México exporta aproximadamente 35 mil bovinos criollos de rodeo, procedentes de los estados

de Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Zacatecas, con edades entre 8 y 20 meses, los precios fluctúan de 350 a 450 dólares por animal ²⁰.

Estas poblaciones casi no se han estudiado; la mayoría de las investigaciones y recursos se han dirigido para promover productos específicos como leche y carne, sin considerar otros atributos, hoy en día solamente queda una reserva de ganado criollo mixteco que abarca la Sierra Mixteca, dentro de los estados de Guerrero, Oaxaca y Puebla.

1.1.2 Mixteca Poblana

La mixteca poblana tiene una gran variedad de climas donde predominan zonas secas, semiáridas y con baja humedad, se caracterizan por tener condiciones estacionales extremas, con lluvias relativamente escasas y periodos de sequía muy prolongados. Se encuentra localizada al sur del Estado de Puebla, la conforman 47 municipios; a ella pertenecen en su totalidad los distritos de Acatlán y Chiautla de Tapia, y parte de los de Izucar de Matamoros, Tehuacan y Tepexi de Rodríguez. También forma parte de las regiones socioeconómicas VI Izucar de Matamoros y VII Tehuacan; con una superficie total de 10565 km² (1056537 has.), lo que corresponde al 31.15% del estado (figura 1.1.2.1) ²¹.

La región se limita al norte con el altiplano del Estado de Puebla, al sur con los Estados de Oaxaca y Guerrero, al este con la Sierra Negra, y al oeste con el Estado de Morelos.

Está situada entre los paralelos 18° 48' 54" (Municipio de San Juan Atzompa) y 17° 52' 54" (Municipio de Tulcingo) de latitud norte, y los meridianos 97° 10' 36" (Municipio de San José Miahuatlán) y 98° 46' 24" (Municipio de Jolalpan) de longitud este. La altitud de la Mixteca Poblana varía entre los 600 y los 2760 msnm ²¹.

La temperatura media anual de la región varía entre 18° C en la zona norte, y 35° C en el suroeste; la precipitación total anual es de 350 a 950 mm., con un índice de aridez en la mayor parte de la región de semiárido, hasta árido en el valle de Tehuacán y de transición en el centro-sur y suroeste ²¹.

Los climas dominantes son: el templado subhúmedo C(w), con precipitaciones de 650 a 700 mm distribuidas mayoritariamente de Mayo a Octubre, y temperatura media anual de 17 a 19° C; también se presentan los climas semiseco cálido BS1 (h´) con precipitación total anual de 600 a 650 mm de Mayo a Septiembre principalmente y temperatura media anual de 20 a 22° C, y el semiseco templado B S1K similar al anterior, pero con temperatura media anual de 16 a 18° C ²².

Las zonas secas, semiáridas, con baja humedad, se caracterizan por tener condiciones estacionales extremas, con lluvias relativamente escasas y periodos de sequía muy prolongados. Las fluctuaciones en la temperatura son muy amplias, tanto en el día como en la noche, y entre las estaciones, con muy baja humedad relativa la mayor parte del año y una radiación solar intensa debido a la atmósfera seca y cielos despejados. Aunque la precipitación pluvial anual puede estar dentro del rango de 254 a 508 mm, esta puede ser muy intensa en su caída y muy regular en su incidencia ²².

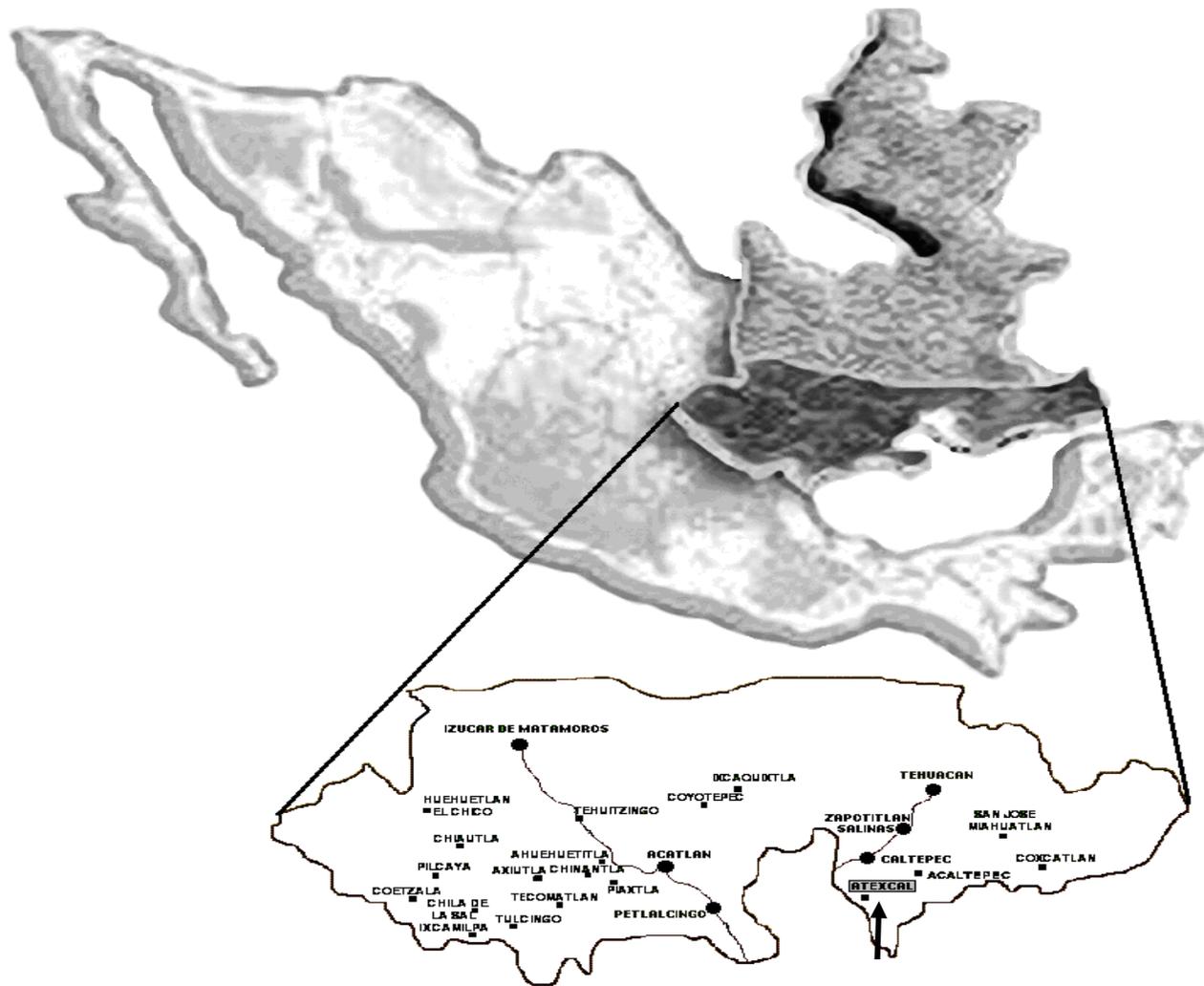


Figura 1.1.2.1 Localización de la región de la Mixteca Poblana. La flecha indica el municipio de Atecal que fue donde se hizo el muestreo

1.1.3 Estrés

El estrés es la suma de reacciones biológicas frente a estímulos adversos, físicos, emocionales, internos o externos que alteran la homeostasis de un organismo ²³. Teniendo un efecto positivo (creando la respuesta del organismo hacia la alteración) o negativo (cuando se desarrolla una patología) en los animales, el medio ambiente hostil es una de las causas más comunes de estas alteraciones fisiológicas. El estrés térmico severo puede ocasionar pérdida de funcionamiento e inclusive la muerte ²⁴.

Todos los organismos ante situaciones estresantes presentan una respuesta de activación generalizada e inespecífica conocida como "Síndrome general de adaptación"; se conoce como los cambios que se producen en el organismo por la presencia, más o menos mantenida de un estresor o situación de estrés.

Existen tres estadios de respuesta del animal frente a estos estresores:

1. Fase de alarma: La función es movilizar los recursos del organismo, mediante el sistema simpático adrenal. Las catecolaminas activan todos los sistemas para que funcionen al límite, adecuándose a las necesidades de un escaso espacio de tiempo, el cortisol segregado colabora en la acción de recuperación aportando energía y produciendo efectos anti-inflamatorios. Aumenta la temperatura, la frecuencia cardíaca, la glucogenolisis y la lipolisis; disminuye la secreción de insulina y el aumento en la secreción de ACTH, de hormona del crecimiento, de hormona tiroidea y de esteroides adrenocorticales ²⁵.
2. Fase de resistencia: El organismo intenta adaptarse al estresor. La activación fisiológica disminuye y la capacidad para resistir está debilitada (deprime sus niveles hormonales y baja su tasa de crecimiento, producción de leche y afecta negativamente la eficiencia reproductiva) ²⁴. El organismo se torna vulnerable a enfermedades que pueden dañar el sistema inmune.

3. Fase de agotamiento: Dependiendo de estos factores un determinado agente estresor podrá provocar distintos tipos de respuesta. Llega un momento en el que el organismo no puede continuar el esfuerzo y el equilibrio interno después de estar amenazado por largo tiempo se rompe, el sistema inmune se ve afectado, la capacidad de resistir a los agentes patógenos de cualquier tipo disminuye. De continuar el estrés, el animal puede llegar a adaptarse o, de caso contrario, arriba a una fase de agotamiento, y puede llegar morir ^{23, 26}.

En los animales, el centro encargado de recibir las sensaciones térmicas se encuentra en el hipotálamo y el medio por el cual el calor se distribuye uniformemente en el cuerpo es la sangre ²⁷.

Cuando en el torrente sanguíneo hay una temperatura superior o inferior al nivel normal, se envían órdenes nerviosas dirigidas a los distintos mecanismos con que cuenta el organismo (regular la cantidad de sangre en la piel, la erección del pelo y la actividad de las glándulas sudoríparas) para perder o conservar calor ²⁸. Al ser la sangre un medio eficaz de transmisión de calor, su afluencia a la superficie corporal eleva la pérdida de calor por radiación, convección y conducción. La frecuencia de los movimientos respiratorios aumenta con el fin de acelerar la velocidad de evaporación y con ello la pérdida de calor ²⁷.

Las temperaturas ambientales altas pueden ocasionar aumentos en la temperatura corporal, inducir la sudoración, disminuir el pH sanguíneo, aumentar el cortisol, puede haber pérdida de agua y electrolitos (sudoración), se incrementa la tasa respiratoria y deprime la actividad metabólica ^{26, 29}. Para que el animal pueda alcanzar la homeostasis ante temperaturas elevadas; disminuye el diferencial de temperatura entre su piel y el núcleo central. Aunque una temperatura más elevada de la piel facilita el flujo de calor desde la piel hacia el ambiente, reduce el paso de calor desde el núcleo central hacia la superficie, disminuyendo a su vez las pérdidas de calor ³⁰.

Para estas condiciones, el animal establece una compensación por medio de una vasodilatación periférica. El incremento del flujo sanguíneo a las zonas periféricas puede considerarse como una reacción termorreguladora ³¹. Aún cuando la misma es debida a los centros termorreguladores que actúan mediante estímulos nerviosos, la acción directa de la temperatura sobre la piel favorece este fenómeno ³⁰. Si la vasodilatación periférica es incapaz de compensar el desequilibrio térmico, se produce un ligero aumento de la respiración seguida por el comienzo de la sudoración. La sudoración se inicia en el bovino con una temperatura de unos 25°C ³². Las glándulas son estimuladas por impulsos que les llegan a través del sistema nervioso simpático desde los centros termorreguladores. La respuesta es gradual, variando el número de glándulas que trabajan en un mismo tiempo. No obstante, la tasa de producción de una zona determinada permanece bastante constante. Cuando las glándulas sudoríparas son estimuladas, producen una lámina de agua sobre la superficie de la piel, que si se evapora con rapidez puede restablecer la temperatura en niveles normales ³².

Cuanto mayor sea el volumen de aire que respire, calentándolo y humedeciéndolo, mayor será la pérdida de calor ³³. La respiración rápida interfiere en el consumo de alimentos y la rumia, además aumenta la producción de calor corporal derivado de la actividad muscular y consume energía que podría utilizarse para fines productivos ²⁷.

El funcionamiento de las glándulas endocrinas también se ve afectado como resultado de la hipertermia. La glándula tiroides ejerce una influencia importante sobre el crecimiento y producción de los animales en ambientes calurosos, directamente a través de su influencia sobre el apetito o indirectamente mediante su papel en la producción de calor. También se puede ver afectada la producción de gonadotropinas en el lóbulo anterior, conduciendo a una deficiente producción de estrógenos o progesterona, y por consiguiente, una baja de la fertilidad ³⁴.

La temperatura rectal de un bovino en condiciones normales es de 38 a 39° C ³⁵, con un pH sanguíneo de 7.3 a 7.5 y una tasa respiratoria de 30 a 32 respiraciones por minuto, cuando el índice de temperatura humedad es menor a 74.7.

En condiciones de estrés térmico la temperatura rectal de las vacas puede llegar a 41.5° C ³⁶. A una temperatura rectal de 42 a 44° C, el pH sanguíneo disminuye hasta 7 y la tasa respiratoria aumenta, esto puede ser letal, ya que las proteínas se desnaturalizan (coagulación térmica), se presenta la inactivación enzimática, el suministro de oxígeno es inadecuado y afecta la estructura de la membrana celular ocasionando la muerte al animal ³⁷. Cuando las condiciones del medio ambiente son estresantes y los animales llegan a manifestar hipertermia, se activan algunos mecanismos fisiológicos y conductuales compensatorios, tales como el incremento en la sed, la disminución del consumo de alimento y en la actividad tiroidea ^{29, 38}.

Al reducir el consumo de alimento, hay disminución en la motilidad ruminal e intestinal y la velocidad de paso es más lenta ³⁹, esto conduce a reducir la tasa metabólica y consecuentemente, la producción de calor y la síntesis de leche ^{24, 38}. Si el organismo no llegase a consolidar la homeostasis se tendría como consecuencia una alteración biológica pudiendo crear un estado prepatológico y una patología desarrollada posterior la que concluiría con la muerte del individuo ⁴⁰ (figura 1.1.3.1).

En general, las modificaciones de los procesos fisiológicos para regular el intercambio de calor modifican el comportamiento del bovino con referencia a los patrones corrientes de postura, movimiento y consumo de alimentos ⁴¹.

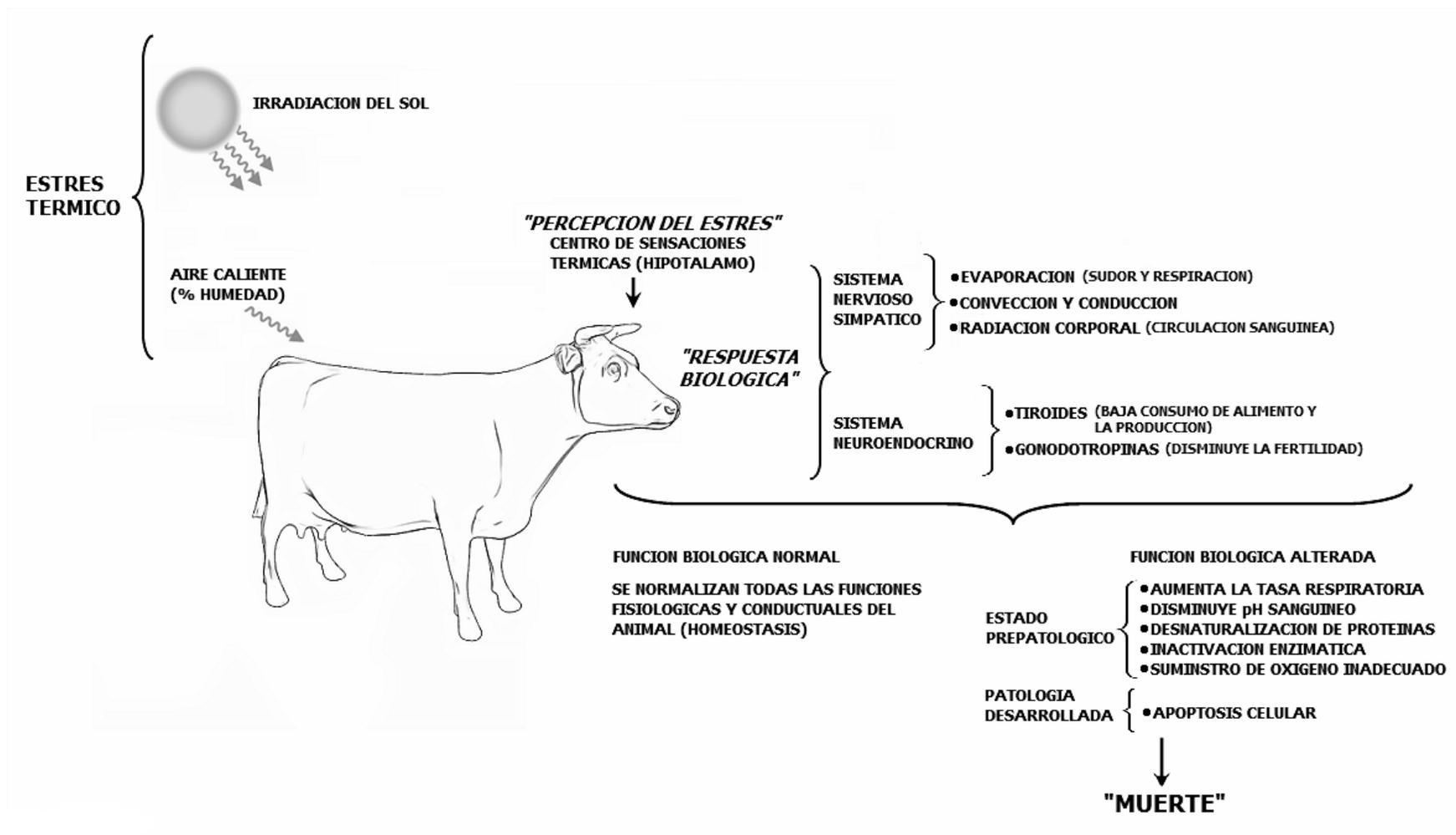


Figura 1.1.3.1 Respuesta fisiológica al estrés

1.1.4 Indicadores Metabólicos

Los perfiles metabólicos se desarrollaron hace aproximadamente 30 años en Inglaterra, donde un simple análisis de sangre que incluía los sustratos adecuados, permiten obtener la mayor cantidad de información relacionada con la nutrición y la sanidad, y determinar la presencia o no de factores de riesgo que puedan incidir en el desempeño productivo del hato ^{42, 43}.

El metabolismo es un proceso trascendental, permite a las células mantener su integridad, defenderse de agentes externos, reparar daños, controlar y regular funciones en la célula, etc. Una de las maneras de descubrir algunas alteraciones ocasionadas por estrés térmico es mediante evaluación de algunos indicadores metabólicos como: glucosa, colesterol, ácido urico, creatinina y proteínas totales ⁴². Dependiendo de la temperatura del medio ambiente, la temperatura corporal puede incrementar el metabolismo del animal hasta un 10%, disipando el calor para restablecerse ⁴⁴. Una de las complicaciones asociadas con la respuesta al calor es que puede aumentar la temperatura corporal principalmente en ambientes con temperaturas elevadas, la habilidad para deshacerse del calor es mediante pérdida de agua y de iones, comprometiendo al organismo a un estado de deshidratación ⁴⁴.

Los profesionales nacionales interesados especialmente en los problemas de la clínica, salud y nutrición animal, recurren frecuentemente, como fuente de información básica, a publicaciones especializadas de investigaciones realizadas sobre animales manejados y explotados con métodos muy diferentes a los acostumbrados en México y en condiciones geográficas, ambientales y climáticas diferentes a las del país.

1.1.4.1 Glucosa

Es la principal azúcar de la sangre, refleja las condiciones nutricionales, emocionales y endocrinas del animal. Después de la comida aumenta (hiperglucemia alimentaria) en

animales monogástricos, pero no en rumiantes ⁴⁵. Durante la excitación aumenta probablemente como efecto de la liberación de la norepinefrina ⁴².

La concentración de glucosa en los eritrocitos se aproxima a la concentración de glucosa plasmática en la mayoría de los monogástricos y rumiantes jóvenes. La glucosa de los eritrocitos disminuye durante los tres primeros meses de vida posuterina de los rumiantes. La glucosa es transformada por la glucosa oxidasa (GOD), en ácido glucónico y en peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa (POD), oxida el cromógeno (4-aminofenazonal/fenol), convirtiéndolo en un compuesto de color rojo ^{42, 46}.

La glucosa aumenta, por norepinefrina, epinefrina, glucagón (sustancias glucogenolíticas) y por glucocorticoides que inhiben la utilización de la glucosa y estimulan la gluconeogénesis. El ayuno, el ejercicio prolongado, el exceso de insulina, toxemia, inanición y lesiones hepáticas disminuyen la concentración de glucosa ⁴⁶. La deshidratación, disminución en el consumo de agua, cambios bruscos en la temperatura ambiental y enfermedades emergentes pueden ser causas de un aumento en la glucosa sanguínea ⁴⁷.

1.1.4.2 Colesterol

El colesterol y los ésteres de colesterol son lípidos importantes en la dieta y provienen de las grasas y fosfolípidos de las plantas. El colesterol es el esteroide más abundante en los tejidos animales, tanto libre como esterificado. Es un derivado del ciclohexanoperhidrofenantreno que posee un OH del C₃ en la posición cis o beta y una doble ligadura entre el C₅₋₆. Para fines patológicos, el colesterol se valora en el plasma como colesterol total y se divide en dos fracciones "libres" y esterificadas. El colesterol libre está unido a lípidos no esterificados ⁴⁸. El acetil-CoA sirve como único precursor para la biosíntesis del colesterol. Aunque el hígado es el lugar principal de la síntesis del colesterol, se sabe que otros muchos tejidos sintetizan este esteroide, por

ejemplo: intestino, piel, corteza adrenal, pared arterial y otros. La biosíntesis está regulada en parte por el aporte de colesterol ⁴⁸.

Niveles dietéticos altos de colesterol o la presencia de precursores del mismo, dan lugar a una depresión de su síntesis hepática. Los factores que causan disminución en los niveles de colesterol sirven para estímulo de la biosíntesis ⁴⁹. En la regulación del nivel de colesterol tienen importancia las hormonas tiroideas ya que afectan a todos los aspectos del metabolismo de los lípidos, su efecto más acentuado es en la lipólisis. Uno de los efectos particulares de las hormonas tiroideas es la tendencia a disminuir el colesterol del plasma. Esto incluye dos efectos: por un lado hay un aumento en la absorción celular de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con las moléculas de colesterol relacionadas y por otro una tendencia para incrementar la degradación del colesterol y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ^{46, 48}.

Es usual que estos efectos sobre el metabolismo de los lípidos se observen en situaciones fisiopatológicas relacionadas con una hipersecreción de hormonas tiroideas o en estado de deficiencia tiroidea, en los cuales la hipercolesterolemia es una de las características de la misma. Refiriéndonos al colesterol, éste se halla principalmente formando la LDL junto a la apoproteína B-100 y la HDL con las proteínas Apo-A (I II), Apo-C, Apo-D y Apo-E ⁴⁷. Ambas lipoproteínas están involucradas en el transporte de lípidos endógenos. Se encuentra en todas las fracciones lipídicas de la sangre. El colesterol procedente de las lipoproteínas captadas y degradadas por los hepatocitos es utilizado para la síntesis de ácidos biliares y secretado por la bilis hacia el intestino ⁵⁰. La mayoría de los animales pueden tener niveles elevados de colesterol después de alimentarse.

La disfunción hepática y las temperaturas ambientales elevadas disminuyen el consumo de alimento, esto puede reducir los niveles de colesterol, pero generar su biosíntesis a partir de otros lípidos, pudiendo disminuir la energía vital del animal, puesto que la destrucción de células hepáticas trae como consecuencia una baja en la

actividad metabólica del hígado y se reduce la degradación del colesterol, mas que su síntesis, por lo que los niveles en sangre aumentan ⁴⁵.

La adición de una molécula de acil-CoA trae consigo la formación de colil-CoA, molécula intermediaria en la síntesis de las dos sales biliares m ayoritarias, el ácido taurocólico y el ácido glicólico, debido a la fisiología especial que presentan los rumiantes, donde aproximadamente un 90% de la glucosa es producida por el hígado, la existencia de un déficit energético en la ración puede ser compen sada movilizand o las reservas energéticas almacenadas en el tejido lipídico ⁴⁷. Cabe señalar entonces la importancia que tienen el nivel energético de la ración y la actividad metabólica del hígado. Se ha observado que la concentración de colesterol en san gre es menor en vacas con patologías que en vacas sanas.

1.1.4.3 Ácido Úrico

Este compuesto es el producto final del catabolismo de las purinas y pirimidinas en mamíferos ⁴⁸. No se conoce bien la significación de la elevación del ácido úrico en la sangre de los mamíferos. Como el ácido úrico se convierte en alantoína en el hígado en todas las especies, excepto en el hombre, los primates inferiores y el perro dálmata, se ha sugerido que su medición es una prueba sensible de función hepática ⁴⁷.

La retención de ácido úrico en sangre refleja el mal funcionamiento renal globalmente, aunque se ve afectado por la dieta rica en proteínas, por el funcionamiento hepático y por estados catabólicos ⁵¹. Además, en el túbulo, el ácido úrico acompaña al agua, de modo que, si la diuresis esta elevada, la excreción de agua es mayor y por tanto se eliminará más ácido urico. Por el contrario si la excreción de agua es menor, se presenta una diuresis baja debida a deshidratación, hemorragia, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, obstrucción de vías urinarias, destrucción de proteínas por estados de hipertermia, toxicidad, dis minución en el consumo de agua, etc. ⁴⁸. En concentraciones altas, el ácido urico desnaturaliza proteínas con la formación

de productos tóxicos ⁴⁵. El ácido úrico se elimina principalmente por los riñones, pero una porción de ella por la piel, sobre todo en los animales que sudan. El descenso en los niveles de ácido urico son raros, teóricamente pueden presentarse en asociación con graves enfermedades hepáticas o malnutrición ^{47, 51}.

1.1.4.4 Creatinina

La creatinina es una sustancia de origen muscular constituida por tres aminoácidos. Está en el cuerpo principalmente en forma de fosfato de alta energía ⁴⁷. La cantidad de creatinina que aparece en la sangre depende de su masa muscular, por tanto, esta concentración será constante para cada animal si no varía su masa muscular ⁵². La creatinina sufre filtración glomerular pero no se reabsorbe y su secreción tubular es mínima. Según esto, el aumento de creatinina en sangre indicaría un gran recambio muscular patológico, porque el músculo se está "rompiendo" ; o un recambio fisiológico, si el individuo presenta una gran masa muscular ⁴³. Por otro lado, el aumento de creatinina en sangre puede ser debido a una mala filtración glomerular. En animales jóvenes en crecimiento se encuentra en mayores cantidades ⁴⁷. Es una sustancia muy difusible y distribuida de manera uniforme en el agua corporal. La excreción de creatinina es importante, los niveles séricos de creatinina casi no son afectados por la creatinina exógena de los alimentos, la edad, el sexo, el ejercicio o la dieta ; por lo cual los niveles elevados se presentan cuando se altera la función renal ⁴⁷. La medición de los niveles en sangre proporciona diagnóstico y pronóstico de la función renal, por medición del nitrógeno ureico ⁴⁶.

1.1.4.5 Proteínas Totales

Las proteínas totales por ser un parámetro que indirectamente mide el grado de nutrición. Los principales constituyentes a la presencia osmótica del plasma sanguíneo son los iones y en pequeña proporción las proteínas, la baja concentración de la presión osmótica es vital para el mantenimiento del sistema cardiovascular ⁴⁶.

Se distinguen dos grandes grupos de proteínas del plasma: las albúminas y las globulinas. La albúmina de la sangre y las globulinas con excepción de algunas gammaglobulinas, son sintetizadas en el hígado. La producción de anticuerpos puede ocasionar algunos cambios en la concentración de gamma-globulina; sin embargo el cambio es más cualitativo que cuantitativo ^{48, 51}.

El incremento en las proteínas totales puede deberse a la deshidratación ; puede haber un aumento en el nivel de globulina cuando no existe deshidratación ocasionada por enfermedades hepáticas avanzadas, infecciones crónicas y en algunos casos por neoplasias ⁵¹. Una disminución en los niveles de las proteínas totales se debe a un nivel bajo de la albúmina o por un incremento en el nivel de globulina que es menor que el descenso en el nivel de albúmina ⁴⁸. Esto puede ocurrir por pérdida de albúmina en orina por nefrosis, pérdida de proteínas plasmáticas por hemorragias, incapacidad del hígado para producir albúmina por hepatitis o cirrosis hepática ⁴⁶. Un bajo nivel de proteínas en la sangre origina una reducción en la presión osmótica coloidal del plasma que puede producir edema ⁴⁶.

1.1.5 Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins)

El estrés puede provocar varias respuestas biológicas, ya sean favorables o en contra de la homeostasis del animal ²⁶. Una de estas respuestas biológicas del organismo animal a ambientes adversos es la producción de ciertas sustancias especializadas conocidas como Proteínas de Choque Térmico (Hsp), se encargan del funcionamiento correcto de las proteínas celulares y que estas cumplan con la homeostasis del animal ²⁶. Las Hsp son muy importantes para la supervivencia celular ^{53, 54, 55, 56, 57}. La familia de las proteínas del choque térmico comprende un gran número de proteínas (Cuadro 1.1.5.1), que son distinguibles por el peso molecular de cada una de estas, la Hsp70 tiene un peso molecular promedio de 70 kDa, en la mayoría de las especies ⁵⁸.

Cuadro 1.1.5.1 Clasificación de las Proteínas de Choque térmico

Peso molecular aproximado (kDa)	Proteínas eucarióticas	Función
10kDa	Hsp10	Función de chaperonina.
20-30 kDa	El grupo HspB incluye a la Hsp27 o HspB1	Bloquea la agregación; está implicada en la regulación del montaje y desmontaje de la actina.
40 kDa	Hsp40	Inducida solo en tejidos reproductivos.
70kDa	El grupo HspA incluye a la Hsp71, Hsc70, Hsp72, Grp78, BiP	Proporciona termotolerancia a la célula cuando es expuesta a estrés térmico. También previene el mal doblamiento de las proteínas.
90kDa	El grupo HspC incluye a la Hsp90, Grp94	Ayuda al mantenimiento de receptores esteroidales y los factores de la transcripción.
100 kDa	Hsp104, Hsp110	Tolerancia a temperaturas extremas.

Algunas de ellas solo se expresan bajo ciertas condiciones (estrictamente inducidas), algunas están presentes en células bajo condiciones de crecimiento normal ⁷.

Las proteínas de choque térmico (Hsp), también conocidas como proteínas del estrés ⁷, son un grupo de proteínas que están presentes en todas las células de los organismos vivos ⁷. La familia de la Hsp70 representan entre el 2 al 3% del total de las proteínas en las células normales, se compone de múltiples miembros y puede ser la Hsp más abundante, induce respuesta celular para el 20% de la proteína celular total, después de un estímulo de tipo térmico ⁵⁹. La Hsp70 se localiza en el núcleo, citosol, mitocondria, retículo endoplasmico, etc. ⁶⁰. Son estimuladas cuando la célula sufre varios tipos de ambiente estresante como: hipoglucemia, anoxia, calor, frío, etanol, peróxido de hidrógeno, iones de metales pesados, arsenicales, infecciones con ciertos virus, radiación ultravioleta, radiación electromagnética de baja frecuencia y campos bajos e intensos de radiación gamma, etc. Actúan como chaperonas, es decir, evitan la agregación de las proteínas y ayudan a su desdoblamiento, asegurándose que las proteínas celulares funcionen en forma adecuada, en el lugar y el momento correcto ⁷. Se sintetizan en organismos eucarióticos y bacterias en respuesta a alteraciones ambientales ^{60, 61}. Algunas de sus funciones sugieren evidencia de que sus constituyentes tienen un rol en el desmontaje de clatras e incluso pueden participar en la postraducción transmembranal de proteínas a los organelos celulares ^{7, 61}.

Se cree que las proteínas de choque térmico juegan un papel importante en la exteriorización de fracciones de proteínas (o péptidos) a la superficie celular para ayudar al sistema inmunológico a reconocer células enfermas. Activan la respuesta inmune a través de actividades que ocurren tanto dentro de la célula como fuera de ella. La actividad de la Hsp70 es dependiente de ATP ⁶². No se expresa en cualquier tipo de células, pero se expresa a niveles altos en condiciones de estrés, participa en la traducción, la translocación de proteínas, proteólisis y plegamiento de proteínas, mientras suprime la agregación y reactiva las proteínas desnaturalizadas. Se pueden encontrar niveles de Hsp70 altos en suero después de insolación o trauma severo, también en enfermedad vascular, renal o periférica ⁶¹.

El estrés térmico no letal puede provocar termotolerancia, es decir, la habilidad de las células pre-expuestas a temperaturas elevadas, para sobrevivir a subsecuentes exposiciones de estrés térmico ^{63, 64, 65, 66}. Las células resistentes al calor expresan altas cantidades de Hsp de las cuales las Hsp70 son las que más correlacionan con la resistencia permanente o temporal al calor y realizan las funciones esenciales de supervivencia celular ^{7, 67}. Está claro que la Hsp70 tiene características citoprotectoras y puede prevenir apoptosis inducida por estrés, no se sabe cómo se logra esto. La Hsp70 ha demostrado que afecta los procesos que regulan la señalización apoptótica ⁶⁸. Existen diferencias genéticas en la resistencia al calor entre razas de bovinos ^{69, 70}. También se han mencionado diferencias en la expresión de las proteínas Hsp. El mecanismo de las Hsp70 no es el único mecanismo que promueve la termotolerancia ⁷¹, los niveles extremadamente altos Hsp70 disminuyen la resistencia al calor ⁷².

1.1.5.1 Actividad intracelular

El papel principal de la Hsp70 es la asistencia de doblamiento apropiado de cadenas polipeptídicas nacientes como desnaturalizadas (adquieran la estructura tridimensional) ^{7, 73, 74}.

La siguiente lista muestra otros procesos importantes dados por las Hsp70:

- Translocación de membrana. Las Hsp70 mitocondriales ligan los segmentos de proteínas que son translocados por la membrana y este doblamiento impide al polipéptido desplazarse hacia atrás.
- Contribuye en la degradación de proteínas.
- Favorece la presentación de antígenos ⁹.

La respuesta a estrés térmico se regula cuidadosamente para asegurarse de que una vez que la cantidad adecuada de Hsp70 se sintetice, la transcripción del gen Hsp70 es atenuada rápidamente ⁷⁵. Las Hsp pueden encontrarse unidas a la célula o en una cadena larga de péptidos dentro de todas las células ⁵⁸. Las proteínas de choque térmico toman péptidos y los llevan con otros grupos de moléculas de un organelo a otro, estas otras moléculas toman los péptidos anormales que sólo se encuentran en las células enfermas y los mueven de la célula a la superficie celular ⁶². Cuando los péptidos anormales son separados de esta forma, advierten al sistema inmunológico que la célula se ha puesto enferma ⁷. Estos péptidos anormales se conocen también como antígenos, un término que describe cualquier sustancia capaz de activar una respuesta inmune ⁷³.

1.1.5.2 Actividad extracelular

Normalmente las proteínas de choque térmico se encuentran dentro de las células. Cuando están fuera de la célula, indican que la célula está muerta y ha expuesto su contenido (necrosis), sólo ocurre cuando algo está mal dentro de la célula y el organismo ⁶⁶. Las proteínas de choque térmico son una de las sustancias más poderosas para enviar señales de peligro al sistema inmunológico y generar respuesta a una infección o enfermedad si se encuentran extracelularmente ⁷³.

1.1.5.3 Expresión de la Hsp70

La expresión del gen es regulada por la familia de los factores de transcripción de choque térmico (HSF) que son una serie de monómeros dentro del citoplasma que por medio de señalizaciones externas (estrés) o por activación de otras proteínas, interaccionan con los elementos reguladores conocidos como elementos de choque térmico (HSE), en la región promotora del gen Hsp ^{76, 77}. Posteriormente se desencadena una multimerización del HSF que tiene lugar en el citoplasma y da como resultado una fosforilación adicional, los multímeros migran al núcleo y se ligan a segmentos de ADN (elementos de choque térmico, heat shock elements (HSE)) los cuales se localizan en la región flanqueante 5' de los genes de la Hsp70, se caracterizan por ser repetidos de 5 nucleótidos nGAAn ("n" denota el nucleótido menos conservado) ^{7, 8, 62, 69}. El HSF1 constituye la respuesta principal al estrés en las células de los mamíferos ^{8, 77, 78}. Aunque el proceso de activación es todavía poco entendido, implica la oligomerización del HSF1 de monómeros a trímeros y está asociada con la hiperfosforilación del complejo proteínico ^{8, 77, 78}. El factor de choque térmico se caracteriza por ser el mejor regulador de la transcripción de los genes de la proteína de choque térmico, requerido por todas las células para sobrevivir en periodos de estrés ⁸⁰. Evidencias recientes sugieren que el HSF1 también regula la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo bajo condiciones fisiológicas normales ⁸⁰.

1.1.5.4 Localización de los genes de la Hsp70

Los genes que codifican para este grupo de proteínas se localizan en varios cromosomas. En bovinos la Hsp70A y Hsp70B se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad o Bola (bovine leucocyte antigen) ⁹ del cromosoma 23 regiones q2.1-q2.2 y pertenecen a los genes de la clase III (figura 1.1.5.4.1). La Hsp70-3 se encuentra en el cromosoma 10 región q3.4 y la Hsp70 -4 en el cromosoma 3 región q1.3 ^{6, 81, 82}.

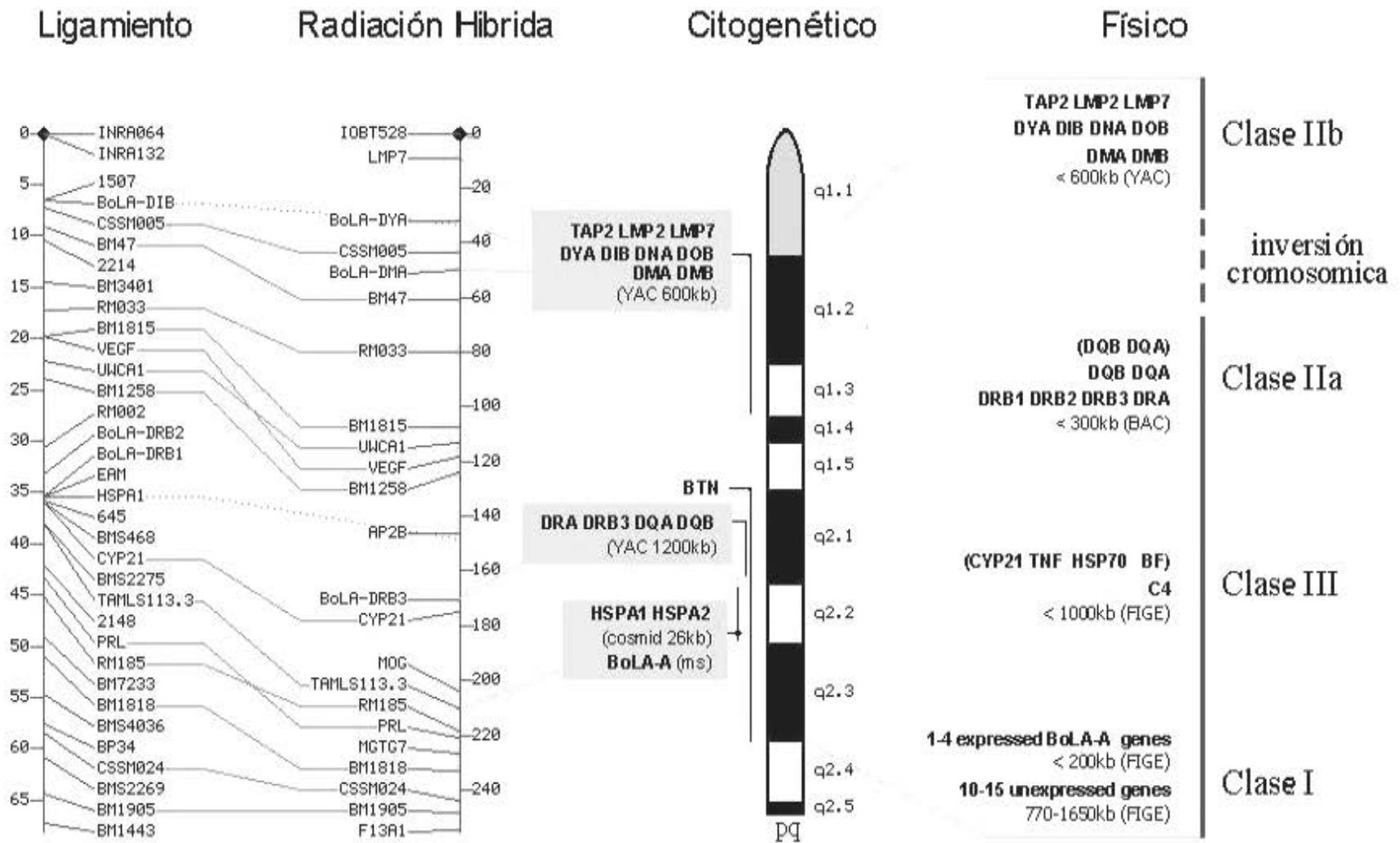


Figura 1.1.5.4.1 Mapa del BOLA en el cromosoma 23

El gen de la proteína Hsp70A está constituido por 1315pb, el promotor va de la posición 700 a la 1006, el gen de la 1025 a la 1315, la región no traducida de la 1025 a la 1231 y la región codificante de la 1232 a la 1315, la caja se encuentra TATA en la posición 991 a la 994, no posee intrones ⁸³. Los elementos de choque térmico (HSE, "nGAA") se presentan en la región del promotor. El gen que codifica para el factor de transcripción HSF1 en bovinos se localiza en el cromosoma 14 ⁸² (Figura1.1.5.4.2).

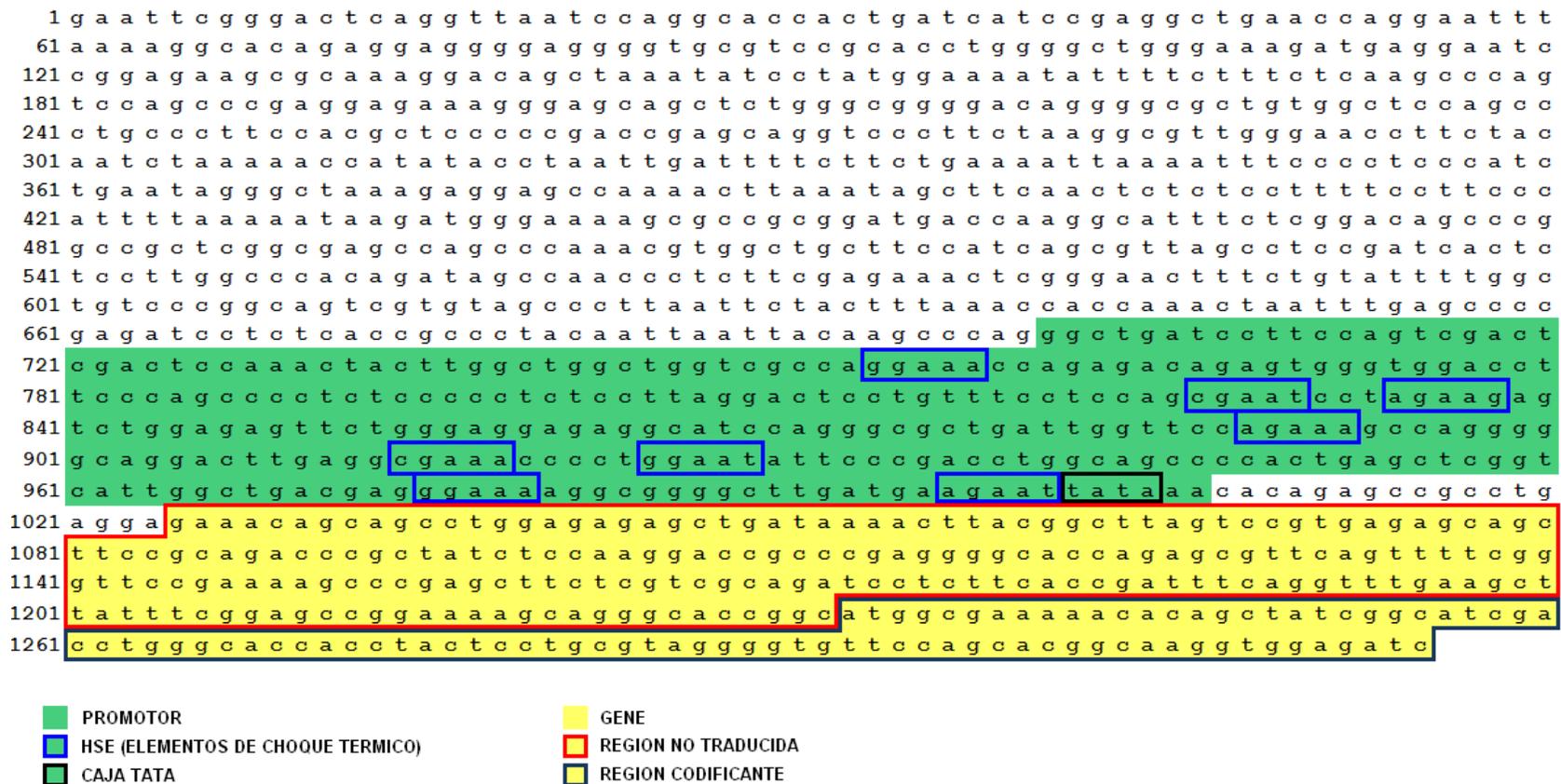


Figura1.1.5.4.2 Secuencia del gen HSP70A (Acceso M98823)

1.1.6 Polimorfismo de un sólo Nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphism)

Los polimorfismos de un solo nucleótido son la forma más frecuente de variación del ADN en el genoma ⁸⁴. Los SNP son los recursos más abundantes de variación genética entre individuos de una misma especie ⁸⁵.

Debido a su abundancia, la explotación de SNP para análisis como marcadores tiene el potencial de proporcionar respuestas importantes a una gran cantidad de preguntas biológicas, genéticas, farmacológicas y médicas ⁸⁶. La identificación de SNP ha progresado marcadamente en los últimos años y se han ideado múltiples análisis ⁸⁷. Actualmente los SNP están en el centro de interés para los estudios del genoma ⁸⁸ y la evolución humana ⁸⁹. Sin embargo, la mayor parte de estos análisis requieren equipo y químicos especializados y costosos para el análisis ⁸⁶.

Un SNP generalmente es descubierto mediante el ordenamiento de fragmentos homólogos de ADN genómico ⁹⁰. Pueden darse hasta en cientos de pares de bases, con la opción de tener dos nucleótidos posibles en una sola posición, se estima que ocurre con una frecuencia del 1% o mayor, aunque pueden presentarse cualquiera de las cuatro posibles bases en una misma posición, con una probabilidad menor ^{91, 92}. A menudo solamente un subconjunto pequeño de SNP es suficiente para capturar la información completa del haplotipo, se clasifican según sus frecuencias (en forma descendiente) ⁹². Los SNP tienen baja frecuencia, se estima puede estar entre 1×10^{-9} y 5×10^{-9} por nucleótido, por año en mamíferos. Sin embargo la probabilidad de que ocurran dos cambios en forma independiente en una misma posición, es muy baja ^{64, 93}.

En los mecanismos de mutación se ven implicadas las transiciones: purina-purina (A-G) o pirimidina-pirimidina (C-T) y transversiones: purina-pirimidina o pirimidina-purina (A-C, A-T, G-C, G-T). Las transiciones y transversiones, deberían tener la misma proporción 0.5 si es que las mutaciones son aleatorias ⁹⁴.

En una secuencia diploide es difícil dar una resolución en cuanto a la existencia de un SNP por lo que es indispensable tener ambas secuencias (adelante y reversa), no siempre es posible distinguir entre artefactos y los verdaderos polimorfismos de la secuencia cuando hay picos dobles (figura 1.1.6.1) ⁹⁴.

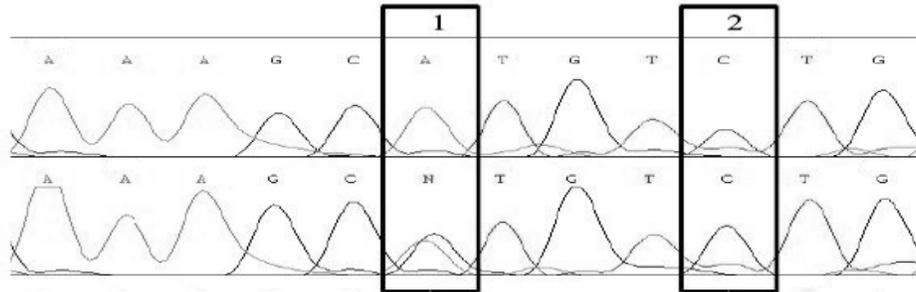


Figura 1.1.6.1 Electroferogramas de dos secuencias que muestran un homocigoto y un heterocigoto.

El rectángulo 1 la secuencia de arriba presenta un homocigoto AA y abajo un heterocigoto AG, en el rectángulo 2 ambas son homocigotos CC, pero si solo tuviéramos una de las secuencias (adelante o reversa) este dato no nos serviría y tendríamos problemas para decidir si es heterocigoto u homocigoto.

Los principales métodos para analizar SNP están basados en la comparación de sitios específicos en las secuencias ⁹⁴. El procedimiento más sencillo, es definir la región en estudio de los genes de interés y se efectúa secuenciación directa de los productos de PCR genómicos obtenidos de los diferentes individuos. Los SNP se limitan a regiones con una secuencia diploide en la cual no siempre es fácil distinguir los SNP ⁹¹.

1.2 Objetivos

Conocer los cambios en los perfiles metabólicos del Bovino Criollo Mixteco ante estrés térmico y compararlo con bovinos cebú, mediante la evaluación de la química sanguínea.

Evaluar la existencia de polimorfismos de un solo nucleótido del promotor del gen de la Hsp70A como factor de tolerancia a estrés térmico, mediante secuenciación .

1.2.1 Objetivos particulares

- a) Obtener marcadores genéticos tipo SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) en la región flanqueante 5' del promotor del gen de la proteína de choque térmico 70A (HSP70A) en bovinos criollos mixtecos.
- b) Comparar los SNP de los animales criollos con SNP de animales de razas de diferente grado de tolerancia al estrés térmico , existentes en México.
- c) Evaluar los perfiles metabólicos del bovino criollo mixteco en dos épocas, (estrés térmico y no estrés térmico).

1.3 Hipótesis

Debido a que los Bovinos Criollos han sufrido adaptaciones climáticas en la Mixteca Poblana por cerca de 500 años, resistiendo a las temperaturas elevadas sin afectar sus perfiles metabólicos, a diferencia de otras razas de bovinos y probablemente posean gran variabilidad genética en el promotor del gen Hsp70A, por lo que los genotipos del bovino criollo mixteco y el perfil metabólico son distintos a otros bovinos.

II MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se dividió en dos partes: la primera parte fue un estudio observacional, prospectiva, longitudinal y comparativo, con el objetivo de comparar los cambios en los perfiles metabólicos en dos épocas y en comparación con la raza cebú. La segunda parte fue un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo (encuesta comparativa, según Méndez et al., 1991⁹⁵). Se compararon las secuencias con el fin de descubrir el polimorfismo genético del promotor del gen de la proteína de choque térmico 70-1 en 3 grupos genéticos (Criollo Mixteco de Puebla, Guzarat y Holstein).

2.1 Primera parte de estudio: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos

2.1.1 Localización

Para este estudio se utilizaron bovinos criollos, localizados en el municipio de Atexcal, este se encuentra en la parte sur del Estado de Puebla; sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 16' 36" y 18° 31' 06" de latitud norte y los meridianos 97° 35' 06" y 97° 49' 24" de longitud occidental. Tiene una altitud de 1800 msnm. Tiene un clima cálido seco con una temperatura media anual que varía entre 18° C en la zona norte, y 35° C en el suroeste; con una temperatura máxima de 40° C en el mes más caluroso y una mínima de 15° C en el mes más frío, con tierra poco fértil. Colinda con los municipios de Tlaxiaco de Guerrero y Coyotepec, por el Poniente; con Tehuacan, por el Oriente; con Juan N. Méndez, por el Norte y con el Estado de Oaxaca, por el Sur²¹.

2.1.2 Sistema de producción

Los bovinos en época de secas (noviembre a mayo) están encerrados en terrenos de siembra, después de la cosecha, se alimentan de rastrojo de maíz y frijol, y ramoneo de algunos arbustos y árboles de la región. El consumo de agua lo realizan cada 48 horas, sólo 4 horas con acceso libre, suplementados con sales minerales.

En época de lluvias (junio a octubre) se encuentran libres en los cerros, el alimento lo obtienen del pastoreo y ramoneo de algunos árboles, y arbustos. El agua que beben es de barrancas y jagüeyes, y rara vez son suplementados con sales minerales.

2.1.3 Índice de Temperatura Humedad

Los valores de temperatura y humedad relativa se obtuvieron del servicio meteorológico de la Comisión Nacional del Agua (CNA) con unidad de lectura climática ambiental ubicada en la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, Puebla. Para el cálculo del Índice de Temperatura Humedad (ITH) se utilizó la siguiente fórmula:

$$ITH = (1,8 \cdot T + 32) - (0,55 - 0,55 \cdot HR/100)(1,8 \cdot T - 26) \text{ }^{96}$$

Donde:

T temperatura (° C)

HR humedad relativa (%)

Para corroborar que había la presencia de estrés térmico en una de las épocas en estudio (julio), se debió contrastar los valores calculados con el siguiente criterio establecido:

FASE	ITH
NORMAL	70-74.5
ALERTA	74.7-78.7
PELIGRO	78.8-83.5
EMERGENCIA	83.6>

2.1.4 Muestreo

Se utilizaron 33 bovinos, de dos hatos; 28 bovinos criollos mixtecos y 5 bovinos de tipo cebú de edades variadas. Fueron identificados con aretes y se les midió la temperatura rectal. La toma de muestra sanguínea se hizo en la vena caudal ⁴⁷.

Se obtuvieron de 10 a 15 ml de sangre en tubos vacutainer con y sin EDTA, los cuales fueron transportados en una hielera con refrigerantes a una temperatura aproximada de 4° C, hasta la separación de suero, para lo que se debió esperar la retracción del coágulo por al menos 6 horas a temperatura ambiente después de la obtención de sangre y se congelaron (-20° C) para su posterior evaluación.

Para el examen de la química sanguínea y purificación de ADN, se realizaron dos tomas de muestras de sangre; la primera en época de secas solo en criollos (Abril) y la segunda en época de lluvias para criollos y cebú (Julio).

2.1.5 Química Sanguínea

Se determinaron en la química sanguínea: Glucosa, Creatinina, Ácido Úrico, Colesterol y Proteínas Totales. Para realizar las pruebas químicas se utilizó un Analizador de Química Sanguínea RA -50 de Bayer® y el kit Sera Pak® 2003.

2.1.6 Análisis estadístico

Para evaluar los cambios de la química sanguínea a través del tiempo se utilizaron 28 bovinos criollos, cuya información fue analizada con el siguiente modelo:

2.1.6.1 Modelo para la época

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + I_{j(i)} + e_{ijk}$$

Donde:

μ es la media de glucosa, creatinina, proteínas totales, colesterol o ácido úrico

P_i es el efecto de la época (1= Abril, 2= Julio)

$I_{j(i)}$ es el efecto aleatorio del animal

e_{ijk} es el error aleatorio

Para evaluar los cambios de la química sanguínea entre grupos, la información fue analizada con el siguiente modelo:

2.1.6.2 Modelo para los grupos

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Donde:

μ es la media de glucosa, creatinina, proteínas totales, colesterol o ácido úrico

G_i es el efecto del grupo genético (1= criollo, 2= cebú)

e_{ij} es el error aleatorio

Todos los datos obtenidos de la química sanguínea se procesaron a través de los paquetes estadísticos SPSS, v12.0 y JMP v5.

2.2 Segunda parte de estudio: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino

Esta parte del estudio tuvo por objeto encontrar las diferencias nucleotídicas de la región promotora del gen HSP70A del Bovino Criollo Mixteco en comparación con razas tolerantes al calor (Guzerat) y razas sensibles (Holstein).

2.2.1 Muestreo

Se usó ADN de 10 individuos de cada una de los siguientes bovinos:

- Criollo Mixteco de Puebla
- Guzerat
- Holstein

El ADN de los bovinos Guzerat y Holstein fue obtenido del banco de ADN del Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Parte del ADN de los Bovinos Criollos Mixtecos fue obtenido de los animales muestreados en Atexcal y se extrajo siguiendo el protocolo de Miller et al., 1988⁹⁷ (anexo 1). También se incluyeron muestras de bovinos criollos del banco de ADN del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y que fueron muestreados en otras regiones de la Mixteca Poblana. Las muestras de ADN fueron estandarizadas a 50ng/μl por medio de un fluorometro y se comprobó su integridad mediante geles de agarosa.

2.2.2 Diseño de iniciadores

Para el diseño de iniciadores se utilizó la información obtenida de la secuencia del gen reportada por Kowalski et al., 1993⁸³ con numero de acceso M98823 en el Genbank. En el cuadro 2.2.2.1 se presentan los parámetros utilizados para el diseño de iniciadores. Se empleó el programa Clone Manager Suite 7.0®.

Cuadro 2.2.2.1 Parámetros de los iniciadores obtenidos

PARAMETRO	ADELANTE	REVERSO
Longitud	22	21
Posición	570	1188
% GC	50	47
Extensión ° C	61	60
Estabilidad 5' vs 3' (kcal)	2.1	1.9
Hibridación ° C	37	54
Secuencia	5' CGAGAAACTCGGGAACCTTCTG 3'	5' CAGATCCTCTTCACCGATTTC 3'

2.2.3 Secuenciación

Se realizó una reacción de PCR con el cóctel de iniciadores, para amplificar el fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb) de ADN, se usaron 50ng/ μl de ADN para un volumen final de 50 μl (anexo 2). El fragmento amplificado fue observado

en geles de agarosa y posteriormente aislado para una repurificación con perlas de sílica (anexo 3), después fue cuantificado por fluorometría. Ya teniendo purificado el fragmento de ADN, se hizo nuevamente una reacción de PCR con el kit Big Dye® v3.1 y con cada uno de los iniciadores (adelante y reverso) para hacer la secuencia en ambos sentidos y minimizar errores de lectura o errores de secuenciación, y se utilizaron 60ng de ADN por cada reacción en un volumen final de 20 µl (anexo 4). La lectura se realizó con un secuenciador automático ABIPRISM 370 (Applied Biosystems®).

2.2.4 Obtención de SNP

La edición de secuencias se hizo con el programa Chromas Pro 1.33 creando un consenso (contig) para ensamblar la secuencia delante con la reversa y crear una sola secuencia para minimizar o eliminar errores de lectura del secuenciador, esto también sirvió para estandarizarlas a un mismo tamaño que fue de 522pb y que además tuvieran los mismos sitios de inicio (613) y fin (1134) de la secuencia. Posteriormente con el programa Clone Manager Suite 7 se hizo una alineación global de todas las secuencias consenso comparándolas con la secuencia que se usó de referencia obtenida del GenBank con acceso M98823 para encontrar las diferencias nucleotídicas que hay en la región promotora flanqueante 5' del inicio del gen HSP70A. Para descubrir los SNP se hizo inspección visual de las alineaciones, tomándose como criterios la presencia de picos dobles en una misma posición en los electroferogramas de las secuencias (adelante y reverso). Los sitios de la alineación que contenían gaps (sitios con datos faltantes) no se utilizaron para el análisis (estos sitios se excluyeron totalmente).

2.2.5 Análisis estadístico

El análisis de las secuencias para determinar la estructura y variabilidad genética se realizó con el programa DNAsp v4.0 y MEGA v3.1. Existen varios métodos para estimar la variabilidad genética de las secuencias de DNA, en este trabajo utilizamos las medidas más comunes.

2.2.5.1 Diversidad Haplotípica

Esta medida es equivalente a la heterocigosis esperada o obtenida de datos diploides, y se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes ⁹⁸.

$$\hat{h} = 2m(1 - \sum X_i^2)/(2m - 1)$$

Donde:

X_i es la frecuencia poblacional del i-ésimo alelo

m número de secuencias

2.2.5.2 Diversidad Nucleotídica

Es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes, esta medida es equivalente a la diversidad haplotípica, pero a nivel nucleótido ^{99, 100}.

$$\pi_x = \frac{q}{q-1} \sum \hat{x}_i \hat{x}_j d_{ij}$$

Donde:

q es el número total de alelos

\hat{x}_i es frecuencia muestral de la i-ésima secuencia

\hat{x}_j es la frecuencia muestral de la j-ésima secuencia

d_{ij} es el número de sustituciones nucleotídicas por sitio, entre la i-ésima y la j-ésima secuencia. d_{ij} se estima de la siguiente manera:

$$d = -(1/2)\ln(1 - 2P - Q) - (1/4)\ln(1 - 2Q) \quad ^{101}$$

2.2.5.3 Diferencias nucleotídicas entre poblaciones

Cuando dos secuencias de ADN son originadas de un ancestro común, las secuencias descendientes gradualmente difieren por sustituciones nucleotídicas. Una manera sencilla de medir el grado de diferencias en la secuencia, es la proporción de sitios nucleotídicos (p), donde una de las dos secuencias es diferente ¹⁰². Esta proporción se estima mediante la siguiente ecuación:

$$\rho = n_d / n$$

Donde:

n_d es el número de nucleótidos diferentes

n es el número de nucleótidos examinados

2.2.5.4 Sustituciones nucleotídicas

El número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre los alelos de dos poblaciones ¹⁰² se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\hat{d}_{xy} = \sum_{ij}^q x_i y_j \hat{d}_{ij}$$

Donde:

x_i es frecuencia muestral de la i -ésima secuencia en la población X

\hat{y}_j es la frecuencia muestral de la j -ésima secuencia en la población Y

\hat{d}_{ij} es el número de sustituciones nucleotídicas por sitio, entre el i -ésimo alelo del grupo genético X y el j -ésimo alelo del grupo genético Y ¹⁰³.

El número total de sustituciones nucleotídicas entre dos poblaciones ¹⁰² es estimado por:

$$\hat{d}_A = \hat{d}_{xy} - (\hat{d}_x + \hat{d}_y) / 2$$

Donde:

\hat{d}_{xy} es el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre los alelos de dos poblaciones

\hat{d}_x es el promedio de sustituciones nucleotídicas para cada par de alelos escogidos aleatoriamente en la población X

\hat{d}_y es el promedio de sustituciones nucleotídicas para cada par de alelos escogidos aleatoriamente en la población Y

2.2.5.5 Coeficiente de diferenciación nucleotídica

Cuando tenemos muchas poblaciones es útil medir la diferenciación entre poblaciones ^{100, 104, 105}. Se estima la diversidad nucleotídica promedio dentro de poblaciones mediante:

$$\pi_s = \sum_{k=1}^s w_k \pi_k$$

Donde:

s número de subpoblaciones

w_k es el tamaño relativo de la k-ésima subpoblación ($w_k = 1/s$)

π_k es la heterocigocidad a nivel nucleótido en la k-ésima subpoblación

La diversidad nucleotídica para una metapoblación se calcula con la formula siguiente:

$$\pi_T = \frac{q}{q-1} \sum_{i,j} \bar{x}_i \bar{x}_j \hat{d}_{ij}$$

Donde:

q es el número de alelos examinados

\bar{x}_i es la frecuencia promedio del i-ésimo alelo en la población

\bar{x}_j es la frecuencia promedio del j-ésimo alelo en la población

\hat{d}_{ij} es el número de sustituciones nucleotídicas por sitio, entre el i-ésimo y el j-ésimo alelo de la población

La diversidad nucleotídica interpoblacional está dada por:

$$\hat{\delta}_{ST} = \hat{\pi}_T - \hat{\pi}_S$$

Donde:

$\hat{\pi}_T$ es la diversidad nucleotídica promedio de las subpoblaciones

$\hat{\pi}_S$ es la diversidad nucleotídica en metapoblaciones

La proporción de la diversidad interpoblacional (coeficiente de diferenciación nucleotídica) se estima por:

$$\hat{N}_{ST} = \hat{\delta}_{ST} / \hat{\pi}_T$$

Donde:

$\hat{\delta}_{ST}$ es la diversidad nucleotídica interpoblacional

$\hat{\pi}_T$ es la diversidad nucleotídica total

2.2.5.6 Prueba de neutralidad de Tajima

Sirve para comparar la relación entre el número de sitios polimórficos con la diversidad nucleotídica ¹⁰⁶. (Un sitio se considera polimórfico si hay dos o más nucleótidos en ese sitio; la diversidad nucleotídica se define como el número promedio de las diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias).

$$D = \frac{\hat{k} - S / a_1}{[V(\hat{k} - S / a_1)]^{1/2}}$$

Donde:

\hat{k} es la diversidad nucleotídica por secuencia

S número de sitios polimórficos por secuencia

$a_1 = 1 + 2^{-1} + 3^{-1} + \dots + (m-1)^{-1}$. [m es el número de secuencias]

2.2.5.7 Árbol filogenético

Se hizo un árbol filogenético Neighbor -Joining con 1000 replicas de tipo bootstraps de los 17 haplotipos encontrados en el programa MEGA v3.1.

III RESULTADOS

3.1 Primera parte de estudio: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos

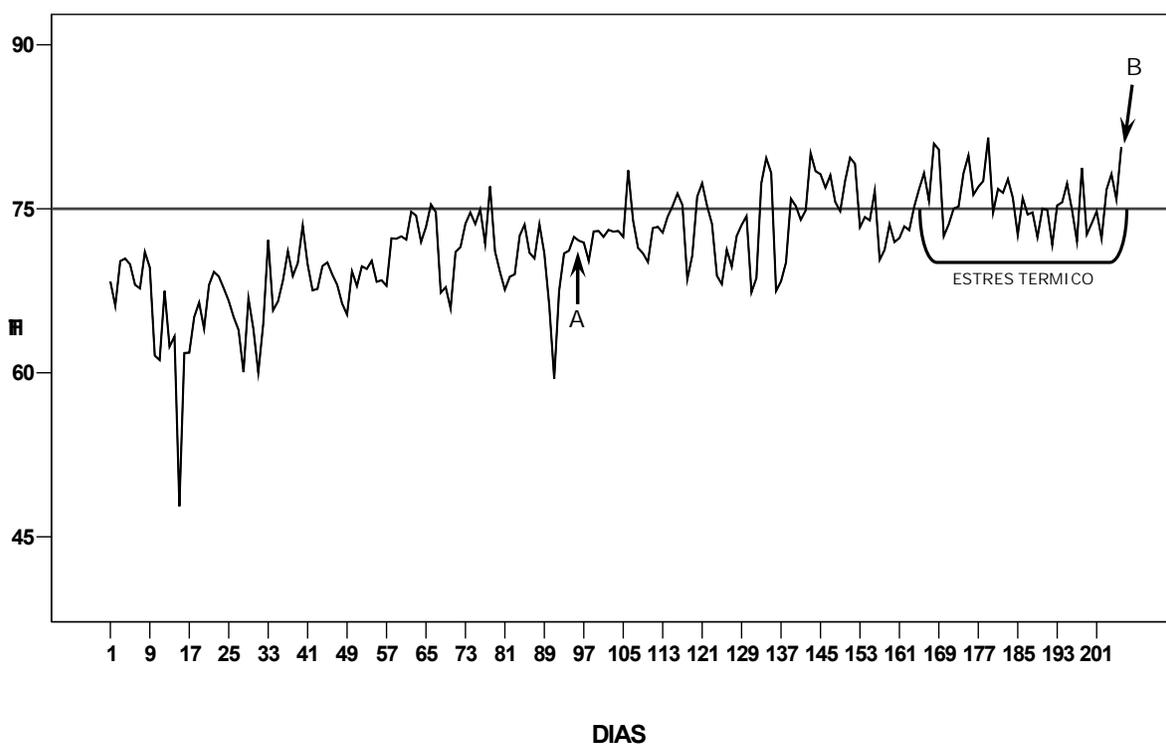


Figura 3.1.1 Índices de temperatura-humedad desde el 1 de enero de 2004 al 24 de julio de 2004

En la figura 3.1.1 se observa la evolución del índice de temperatura-humedad calculados. La flecha A señala el primer muestreo el 4 de abril y la flecha B marca el segundo muestreo (24 de julio). En la mayor parte del mes de junio y julio hay valores de ITH mayores a 75, lo que indica la presencia de estrés térmico (del día 165 al día 206 que fue el segundo muestreo).

En el cuadro 3.1.1 y en la figura 3.1.2 se presentan las estadísticas descriptivas y los medias de cuadrados mínimos de las 5 variables de la química sanguínea clasificada por mes de muestreo.

Los valores de colesterol y de proteínas totales resultaron ser afectadas por el efecto de la época ($P < 0.05$) (cuadro 3.1.2.). En ambas variables los valores fueron menores en el mes de julio (cuadro 3.1.1.).

Cuadro 3.1.1. Valores mínimos, máximos, medianas, medias de cuadrados mínimos y errores estándar por época para bovinos criollos

Variable mg/dl	Época	N	Mín	Máx	Mediana	Medias de cuadrados mínimos	Rangos establecidos
Glucosa	Abril	28	42	72	53	54.6±1.7	42.1-74.5
	Julio	28	39	75	53	54.8±1.7	
Creatinina	Abril	28	0	2.1	1.3	1.2±0.1	0.6-1.8
	Julio	28	0	1.9	1.3	1.3±0.1	
Colesterol	Abril	28	65	217	136	135.7±7.3	62.1-192.5
	Julio	28	13	154	90.5	87.8±7.3	
Ácido Úrico	Abril	28	0.2	4.5	2.8	2.4±0.2	2.6-30
	Julio	28	0.2	5.2	2.2	2.1±0.2	
Proteínas Totales	Abril	28	5600	8500	7400	7320±262	6200-8200
	Julio	28	1200	12200	6500	6510±262	
Temp Corp ° C	Abril	28	38	40	38.7	38.8±0.1	38-39
	Julio	28	37	40	39	38.6±0.1	

Cuadro 3.1.2. Cuadrados medios del ANDeVA las variables evaluadas por época para bovinos criollos

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios					
		Glu	Creat	Col	Aci Uri	Prot Tot	Temp Corp
Época (secas y lluvias)	1	0.643	0.017	32064.3*	1.230	9202*	0.394
Error	54	76.644	0.190	1498.5	1.608	1915	0.379

*Diferencia Significativa $p < 0.05$

Si bien la temperatura corporal no fue afectada por el ITH, se puede observar que el 50 % de los animales presentaron temperaturas de 39 -40 (figura 3.1.2).

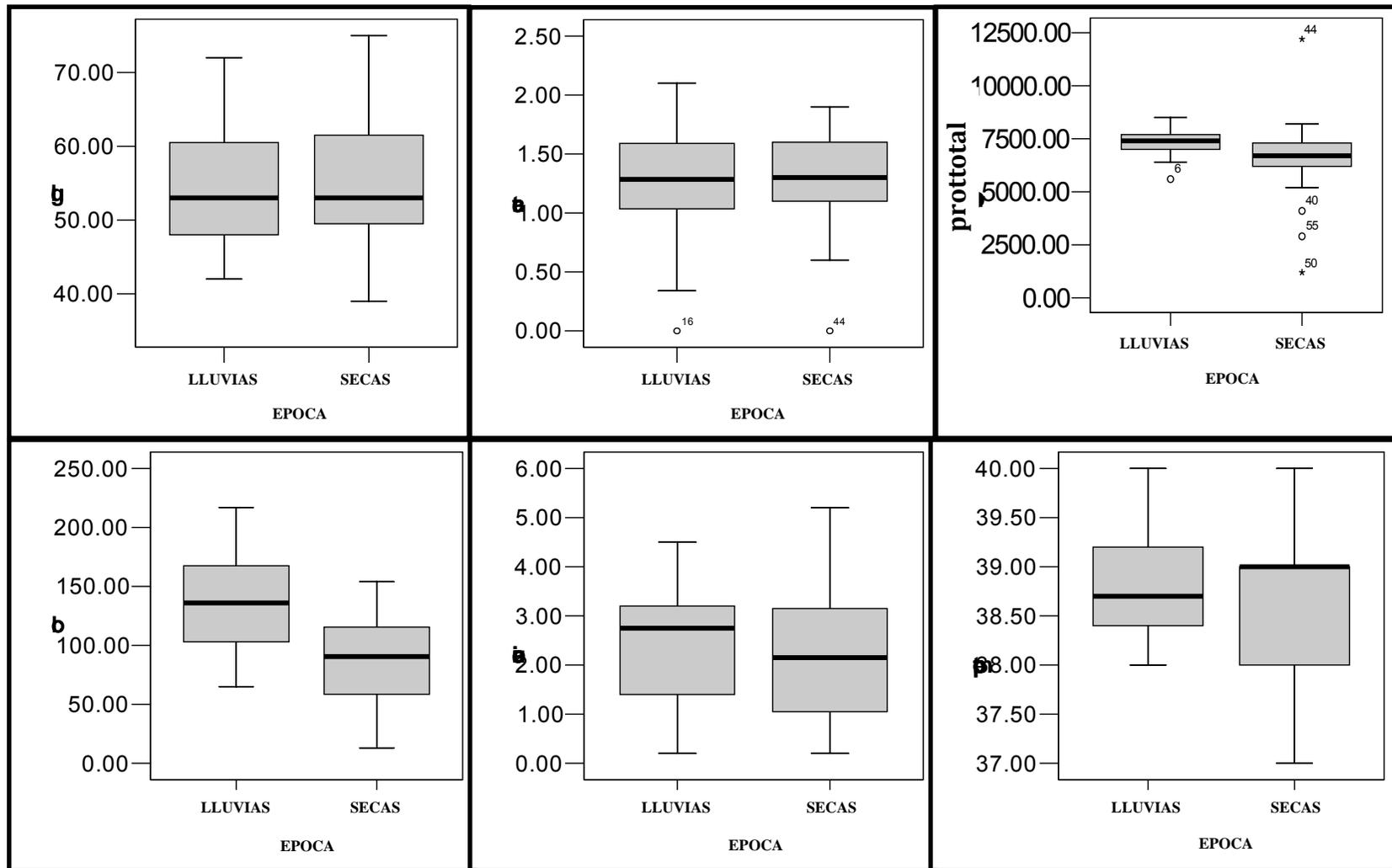


Figura 3.1.2 Grafica de cajas de la química sanguínea por época para bovinos criollos

En el análisis entre grupos raciales se utilizaron las mediciones de 28 bovinos criollos contra 5 bovinos cebú en el mes de julio. En el cuadro 3.1.3., se muestran los valores mínimos, máximos, medianas, medias de cuadrados mínimos y errores estándar de las variables evaluadas por grupo genético (criollo y cebú) en época de lluvias (Julio).

Cuadro 3.1.3. Valores mínimos, máximos, medianas, medias de cuadrados mínimos y errores estándar por grupo genético en época de lluvias

Variable mg/dl	Grupo	N	Mín	Máx	Mediana	Medias de cuadrados mínimos
Glucosa	Criollo	28	39	75	53	54.8±1.6
	Cebú	5	52	70	58	59.8±3.9
Creatinina	Criollo	28	0	1.9	1.3	1.3±0.1
	Cebú	5	0.9	1.3	1.1	1.1±0.2
Colesterol	Criollo	28	13	154	90.5	87.8±6.7
	Cebú	5	118	183	156	155.2±15.9
Ácido Úrico	Criollo	28	0.2	5.2	2.2	2.1±0.3
	Cebú	5	0	4.3	2.4	2±0.6
Proteínas Totales	Criollo	28	1200	12200	6500	6510±330
	Cebú	5	6500	7700	7200	7180±780
Temp Corp ° C	Criollo	28	37	40	39	38.6±0.1
	Cebú	5	37.8	39.2	38.2	38.3±0.3

Solo hubo diferencia en el colesterol ($p < 0.001$); el criollo presentó un valor más bajo (87.8 ± 6.7) que los cebúes (155.2 ± 15.9) (Cuadro 3.1.3 y Figura 3.1.3).

Los promedios de los metabolitos, así como los valores mínimos y máximos de los bovinos criollos y los cebúes están dentro de los parámetros normales, la temperatura corporal tampoco presenta alteraciones en ninguno de los dos grupos genéticos. El cuadro 3.1.4 se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza entre grupos para el colesterol y muestran las diferencias significativas ($p < 0.001$) para grupos genéticos.

Cuadro 3.1.4. Cuadrados medios del ANDeVA de las variables evaluadas por grupo genético

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios					
		Glu	Creat	Col	Aci Uri	Prot Tot	Temp Corp
Época de Lluvias	1	105.153	0.148	19260.1*	0.081	1921	0.442
Error	31	74.158	0.151	1260.3	1.951	3043	0.439

*Diferencia Significativa

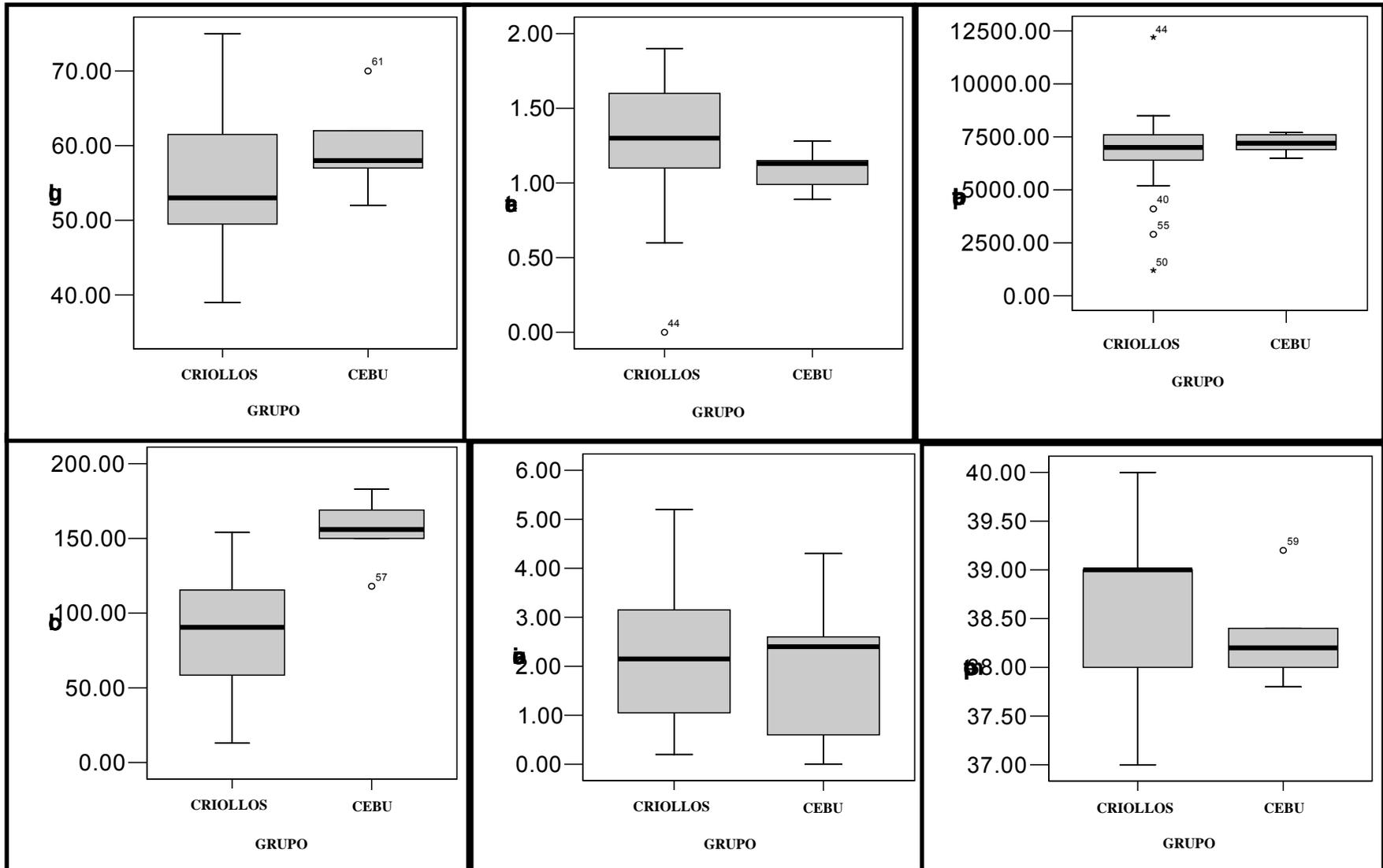


Figura 3.1.3. Grafica de cajas de la química sanguínea por grupo

3.2 Segunda parte de estudio: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino

3.2.1 SNP del promotor del gen Hsp70A

El iniciador que va hacia delante comienza en la posición 570 y el reverso en la posición 1188 de la secuencia reportada por Kowalski et al., 1993⁸³ con número de acceso M98823 en el GenBank, las secuencias editadas inician en la posición 613 y terminan en la posición 1134, el promotor del gen Hsp70A va de la posición 700 a la 1006, el gen comienza en la posición 1025 y termina en la posición 1315, la región no traducida del gen va de la posición 1025 a la 1231 y la región que codifica a la proteína de la posición 1232 a la 1315, las posiciones de todos los datos son presentados en cuanto a la posición de la secuencia de referencia. No se secuenció la región del gen que codifica para la proteína Hsp70A. Las alineaciones donde se presentan todos los hallazgos se muestran en el anexo 5.

De los 60 cromosomas analizados se detectaron 17 haplotipos abarcando la región promotora del gen Hsp70A, fueron distinguibles 8 sitios polimórficos, al compararlos con la secuencia de referencia mostraron estas variaciones. Ninguno de los polimorfismos encontrados afectan a los elementos de choque térmico, aunque se encontró que los animales criollos presentan más polimorfismo en la zona del promotor, 4 individuos presentan al menos un cambio en la posición 704 y 768, 2 individuos de la raza Guzerat tienen un cambio en la posición 768 y ningún Holstein presenta polimorfismos en el promotor del gen, también se encontraron polimorfismos en la región 5' no traducida del gen, estos datos se presentan en la figura 3.2.1.1 La proporción de polimorfismos en la región promotora (0.25) fue menor que en la región no traducida (0.75).

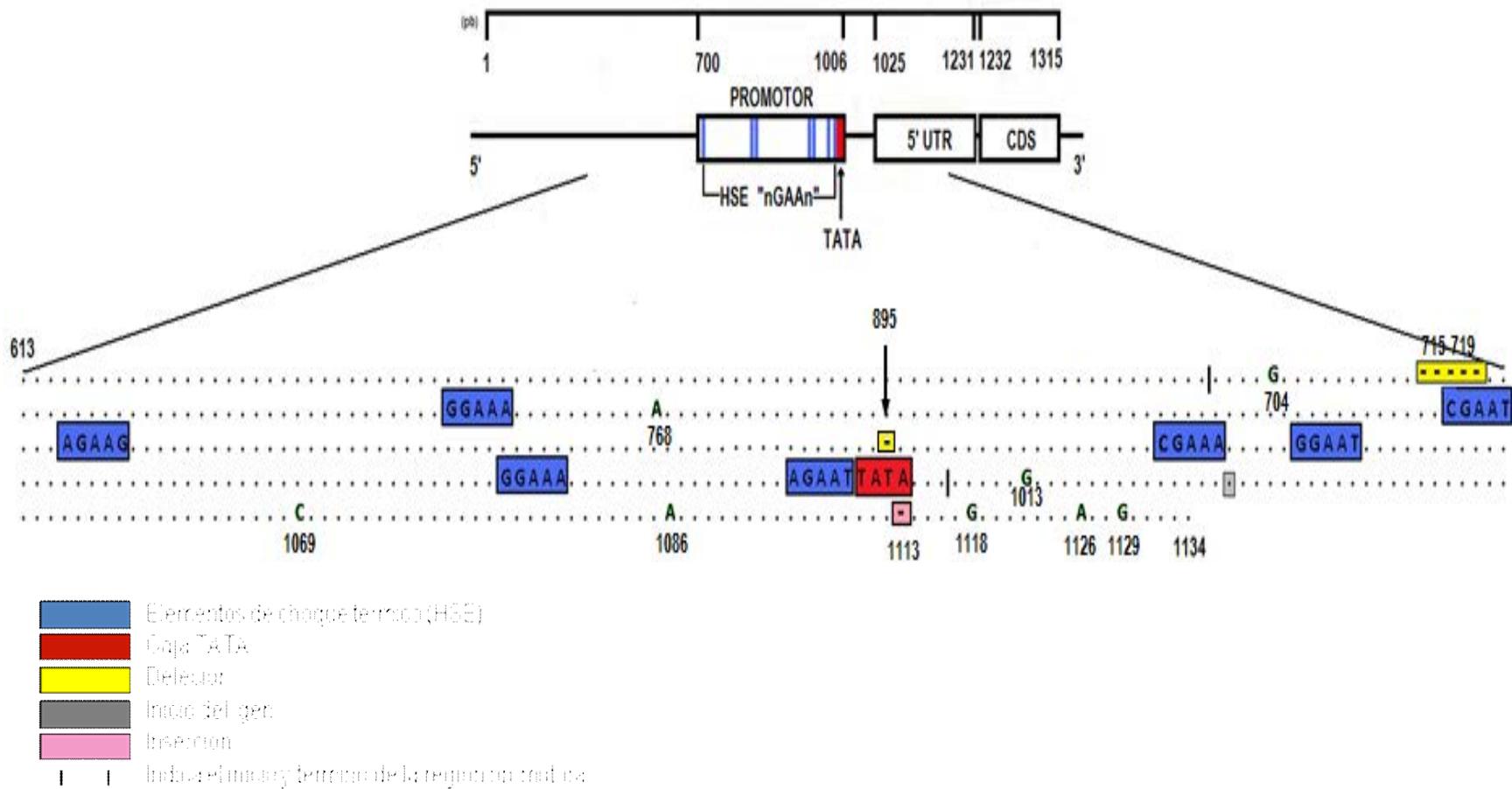


Figura 3.2.1.1 Elementos de choque térmico y polimorfismos de la región secuenciada del gen Hsp70A

Se encontraron 7 elementos de choque térmico (HSE), los números indican las posiciones de los polimorfismos de una base principalmente (2 polimorfismos en el promotor y 6 en la región no traducida), 7 "gaps"; delección de 1 base ("C") en la posición 895 de un bovino criollo, delección de 5 bases ("TCGAC") de la posición 715-719 en todas las secuencias e inserción de una base ("C") en la posición 1113 también en todas las secuencias.

Los haplotipos fueron clasificados de acuerdo a su frecuencia y no al número de diferencias en las secuencias, el haplotipo uno que es el de mayor frecuencia (0.4) es el haplotipo más parecido al de referencia, ya que todos los individuos presentaron la delección de 5 bases que es un repetido en la secuencia del promotor y la inserción de una sola base en la región no traducida.

La proporción del haplotipo uno (Hap1) fue mayor en Guzerat 0.183, en Holstein 0.1333 y en criollo 0.0833. Sin embargo los bovinos criollos fueron los que presentaron el mayor número de haplotipos diferentes con 13 y 9 individuos comparten los 7 haplotipos únicos, los Guzerat 5 y 2 haplotipos únicos en 5 individuos, los Holstein 8 haplotipos y 2 haplotipos únicos en 2 individuos, esto habla de porque los criollos tienen una diversidad haplotípica mayor 0.93 ± 0.042 (cuadro 3.2.1.1).

Cuadro 3.2.1.1 Frecuencias haplotípicas por grupo genético

HAPLOTIPO	POSICION								FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS POR RAZA			FRECUENCIA TOTAL
	7	7	0	0	0	1	1	1	CRIO	GUZE	HOLS	
	0	6	1	6	9	1	2	2				
M98823	G	A	G	C	A	G	A	G				
Hap1	0.25	0.55	0.4	0.4
Hap2	A	.	.	0.1	0	0.15	0.0833
Hap3	A	C	T	0.05	0.1	0.1	0.0833
Hap4	.	.	.	T	.	A	C	.	0.05	0.1	0.1	0.0833
Hap5	.	T	.	T	.	A	C	.	0	0.2	0	0.0667
Hap6	A	C	.	0.05	0	0.1	0.05
Hap7	A	T	.	T	.	A	C	.	0.1	0	0	0.0333
Hap8	.	.	.	T	.	A	.	.	0.05	0	0.05	0.0333
Hap9	C	T	0.1	0	0	0.0333
Hap10	A	A	C	T	0.05	0	0	0.0167
Hap11	G	A	C	.	0.05	0	0	0.0167
Hap12	.	.	.	T	G	A	C	.	0.05	0	0	0.0167
Hap13	.	.	.	T	.	A	C	T	0	0	0.05	0.0167
Hap14	.	.	.	T	0	0.05	0	0.0167
Hap15	.	T	0.05	0	0	0.0167
Hap16	.	T	.	.	.	A	.	.	0.05	0	0	0.0167
Hap17	.	.	A	.	.	A	C	T	0	0	0.05	0.0167
N = 60		TOTAL							1	1	1	1
DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA									0.93 ± 0.042	0.67 ± 0.097	0.82 ± 0.072	0.82 ± 0.045

3.2.2 Mutaciones

El número total de mutaciones halladas fue de 8. Se encontró 1.71 como promedio de sitios polimórficos por secuencia. Se identificaron mutaciones transicionales así como de tipo transversión, se encontró una tendencia alta hacia las transiciones con una frecuencia de 0.55 contra 0.45 de transversiones, el tipo de transición que tuvo la mayor frecuencia es la g X a con 36. La transversión que se presentó más veces, en total 26, fue a X c. En el cuadro 3.2.2.1 se muestran las frecuencias y los tipos de mutación.

La proporción de transiciones/transversiones (\bar{R}) fue 0.9994.

Cuadro 3.2.2.1 Frecuencias y tipos de mutaciones

Tipo de mutación	Sustitución nucleotídica	Posición	No. de sitios polimórficos	Cambios totales	Frecuencia
Transición	a X g	1096	1	2	0.0204
	c X t	1069	1	16	0.1633
	g X a	704 1013 1118	3	36	0.3673
Transversión	a X c	1126	1	26	0.2653
	a X t	768	1	8	0.0816
	g X t	1129	1	10	0.1020
Total			8	98	1

3.2.3 Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP

La alineación de secuencias y detección de haplotipos sirvió para identificar 8 SNP (heterocigotos) de los individuos en estudio. Una vez reconocidos los sitios con SNP, pudimos derivar los genotipos y calcular la frecuencia de cada uno de los sitios polimórficos del fragmento secuenciado por cada una de las razas analizadas, aunque en algunas de las posiciones se observan genotipos únicos para alguna de las razas estudiadas; en la posición 704 encontramos los 3 posibles genotipos únicamente en bovinos criollos, en la posición 768 los criollos presentan las 3 diferentes combinaciones de los genotipos y los Guzerat solo los homocigotos, la posición 1013 presenta al

homocigoto de referencia y al heterocigoto exclusivamente en los Holstein, en la 1069 hay las 3 combinaciones en criollo y Guzarat, y en Holstein el homocigoto de referencia y el heterocigoto, la posición 1096 presenta el homocigoto de referencia y al heterocigoto en criollos, la 1118 solo los homocigotos para todas las razas, en la posición 1126 los homocigotos para todas las razas y en la posición 1129 los homocigotos para las 3 razas, las frecuencias genotípicas son mayores para el homocigoto de referencia (cuadro 3.2.3.1).

De los sitios polimórficos encontrados el 0.95 de genotipos fueron homocigotos, de los cuales el 0.81 son iguales a la referencia y el 0.19 diferentes de la referencia, la frecuencia de individuos heterocigotos fue de 0.05.

Cuadro 3.2.3.1 Frecuencias genotípicas y posiciones polimórficas por raza

POSICION	704			768			1013			1069			1096			1118			1126			1129		
GENOTIPO	GG	AG	AA	AA	AT	TT	GG	AG	AA	CC	CT	TT	AA	AG	GG	GG	AG	AA	AA	AC	CC	GG	GT	TT
CRIOLLO	0.8	0.1	0.1	0.7	0.20	0.1	1	0	0	0.6	0.3	0.1	0.9	0	0.1	0.4	0	0.6	0.5	0	0.5	0.8	0	0.2
GUZERAT	1	0	0	0.8	0.00	0.2	1	0	0	0.6	0.1	0.3	1	0	0	0.6	0	0.4	0.6	0	0.4	0.9	0	0.1
HOLSTEIN	1	0	0	1	0.00	0	0.9	0.1	0	0.6	0.4	0	1	0	0	0.4	0	0.6	0.6	0	0.4	0.8	0	0.2

Cuadro 3.2.3.2 Frecuencias alélicas por posición por raza

POSICION	704		768		1013		1069		1096		1118		1126		1129	
ALELO	G	A	A	T	G	A	C	T	A	G	G	A	A	C	G	T
CRIOLLO	0.85	0.15	0.80	0.20	1	0	0.75	0.25	0.9	0.1	0.4	0.6	0.5	0.5	0.8	0.2
GUZERAT	1	0	0.80	0.20	1	0	0.65	0.35	1	0	0.6	0.4	0.6	0.4	0.9	0.1
HOLSTEIN	1	0	1	0	0.95	0.05	0.8	0.2	1	0	0.4	0.6	0.6	0.4	0.8	0.2

Las frecuencias genotípicas por raza: en el homocigoto de referencia se presentaron de la siguiente manera; criollo 0.31, Guzerat 0.35 y Holstein 0.34. Los homocigotos nuevos; criollo 0.4, Guzerat 0.33 y Holstein 0.28. Y los heterocigotos; criollo 0.5, Guzerat 0.08 y Holstein 0.42.

De los SNP detectados se desglosan 16 alelos distintos en 8 sitios polimórficos, se calculó la frecuencia de cada alelo y por cada raza en estudio, estos datos se presentan en el cuadro 3.2.3.2. El 0.8 de los alelos encontrados son iguales, mientras el 0.2 difiere de la referencia. Los bovinos criollos presentan 2 alelos diferentes en promedio, mientras los Holstein y Guzerat 1.45 alelos diferentes en promedio por secuencia.

Del mismo modo que los genotipos, los alelos presentan frecuencias más altas para el alelo de referencia que para los alelos nuevos en casi todas las posiciones, excepto la posición 1118 que en los criollos y Holstein presentan frecuencias más altas (0.6) para los alelos nuevos. Las frecuencias de los alelos que son semejantes a la de referencia es la siguiente; criollos 0.750, Guzerat y Holstein 0.819.

3.2.4 Diversidad Genética

Diversidad haplotípica: una medida de variabilidad importante se conoce como diversidad haplotípica (h) en este estudio se encontró 0.82 ± 0.045 , casi un haplotipo diferente para toda la población por secuencia.

Diferencias nucleotídicas entre poblaciones: Se encontró 0.0155 de diferencias nucleotídicas (p) entre poblaciones del total de sitios examinados. Esta medida es equivalente al promedio de sitios segregantes por sitio, utilizada en la prueba de Tajima.

Diversidad nucleotídica dentro de poblaciones: La variabilidad que se presenta a nivel nucleótido fue significativamente mayor en los bovinos criollos que en las demás razas estudiadas. El cuadro 3.2.4.1 muestra la diversidad nucleotídica (π_x) y error estándar dentro de grupos genéticos, también presenta las sustituciones nucleotídicas por sitio entre alelos de dos poblaciones (\tilde{d}_{xy}) (debajo la diagonal), teniendo el valor más alto en la comparación entre bovinos criollos contra Guzerat. La diversidad nucleotídica entre estas dos razas es mayor, pudiendo acercar a los criollos con los Holstein.

Cuadro 3.2.4.1 Diversidad nucleotídica dentro, entre grupos y coeficiente de diferenciación nucleotídica

GRUPO GENÉTICO	CRIOLLO	GUZERAT	HOLSTEIN
CRIOLLO	4.98±1.9		
GUZERAT	4.43±1.7	3.92±1.7	
HOLSTEIN	4.18±1.6	3.74±1.6	3.47±1.6
$\hat{\pi}_T=4.12\pm 1.67$	$\hat{\pi}_S=4.13\pm 1.66$	$\delta_{ST}=-0.01\pm 0.04$	$\bar{N}_{ST}=-1.41\pm 11.19$

Los valores fueron multiplicados por 10^3 . En la diagonal se presenta la diversidad nucleotídica dentro de poblaciones (π_x), debajo de la diagonal las sustituciones nucleotídicas por sitio entre alelos de dos poblaciones (\tilde{d}_{xy}) con sus respectivos errores estándar.

$\hat{\pi}_S$ Es el promedio de las diferencias nucleotídicas dentro de poblaciones.

$\hat{\pi}_T$ Es el promedio de la diferenciación nucleotídica para una metapoblación.

δ_{ST} Es la diversidad nucleotídica interpoblacional.

\bar{N}_{ST} Es la proporción interpoblacional de la diversidad nucleotídica de la metapoblación.

El promedio de las diferencias nucleotídicas dentro de poblaciones ($\hat{\pi}_S$) y el promedio de diferenciación nucleotídica para una metapoblación ($\hat{\pi}_T$) fueron iguales 0.0041, por lo que la diversidad nucleotídica interpoblacional (δ_{ST}) presenta un valor de cero. Del mismo modo la proporción interpoblacional de la diversidad nucleotídica de la metapoblación (\bar{N}_{ST}) es cero.

3.2.5 Árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético se hizo con los 17 haplotipos y la secuencia de referencia, (figura 3.2.5.1), su confiabilidad fue estimada usando el método de bootstrap con 1000 repeticiones, no se definió una raíz inicial del árbol.

Los números junto a los nodos son los valores de bootstrap que indican la confiabilidad de la topología de cada brazo (el porcentaje de 1000 repeticiones en donde esas secuencias aparecieron juntas) . La flecha indica la escala lineal relaciona la longitud de los brazos en unidades de las distancias de Kimura 2 -parametros.

Las agrupaciones mostradas en el dendograma muestran la relación existente entre los haplotipos más comunes con el haplotipo de referencia, podemos observar que los haplotipos se separan en dos grupos.

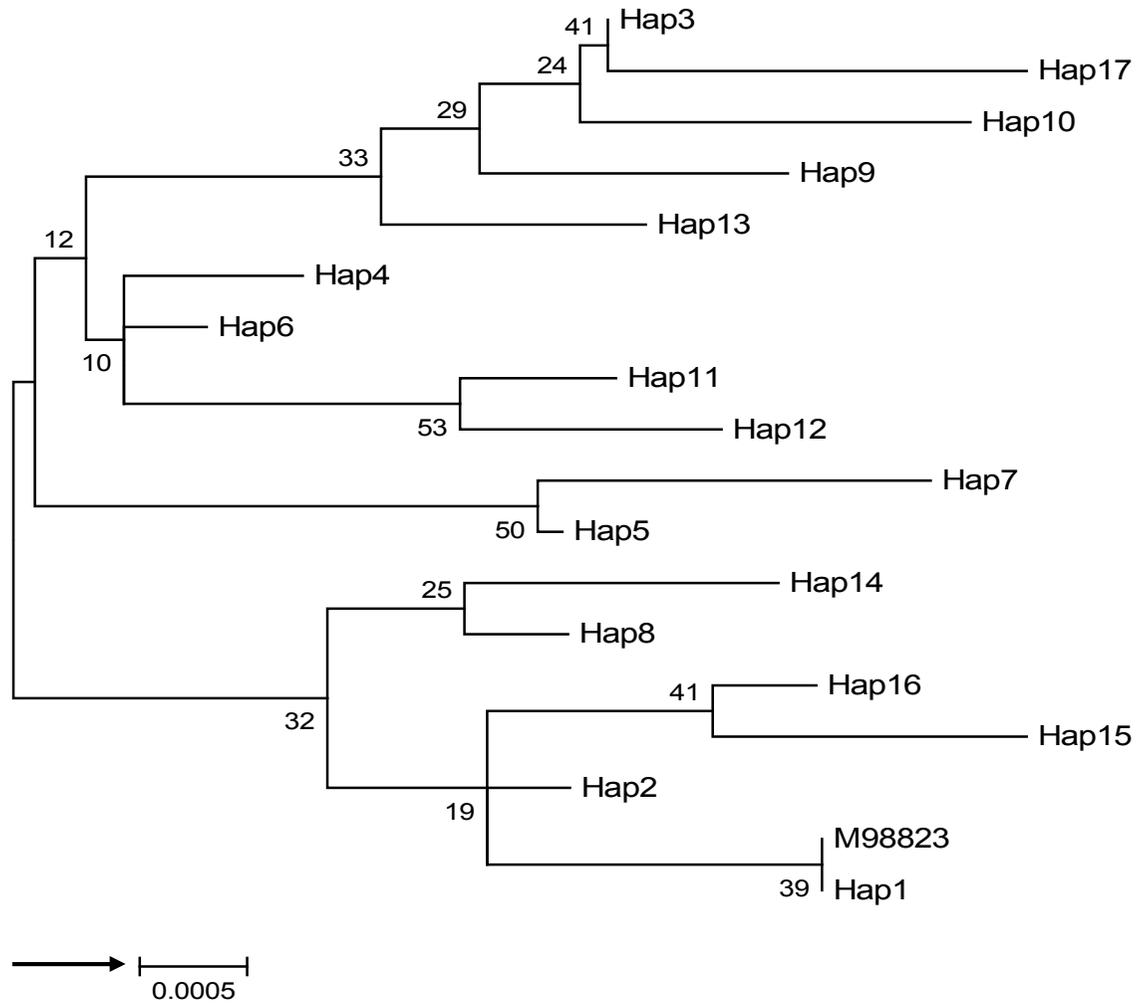


Figura 3.2.5.1 Dendrograma tipo Neighbor-Joining de los haplotipos que resume las distancias de Kimura 2-parametros calculadas

3.2.6 Prueba de Neutralidad de Tajima

El cálculo de la prueba para la población total fue de 0.6165 ± 0.6502 , el promedio de sitios segregantes por sitio (P_s) tuvo un valor mayor 0.0155 que el coeficiente de diferenciación nucleotídica 0.00412. Los criollos poseen más sitios segregantes (S) que las demás razas estudiadas, por tanto el valor promedio de sitios segregantes por sitio también fue mayor. En la prueba de neutralidad de Tajima el valor de los Guzerat fue mayor, el resultado de P_s es más alto que el de la diversidad nucleotídica ($\hat{\pi}$) en los criollos, estos datos podrían confirmar la existencia de alelos deletéreos. Sin embargo ninguno de los grupos mostro significancia estadística ($p > 0.01$) en la prueba de Tajima, además de que existe una variabilidad alta en las poblaciones. En el cuadro 3.2.6.1 se muestran los datos de la prueba de neutralidad de Tajima para cada raza.

El promedio de sitios segregantes por sitio (P_s) fue de 0.0065 para el promotor y de 0.055 para la región no traducida.

Cuadro 3.2.6.1 Prueba de neutralidad de Tajima en los tres grupos genéticos estudiados

	S	P_s	$\hat{\pi}$	D
CRIOLLO	7	0.01357	0.004957	0.9745
HOLSTEIN	5	0.00967	0.003451	0.8139
GUZERAT	5	0.00967	0.003899	1.3166

$p > 0.01$

S Sitios segregantes

$\hat{\pi}$ Diversidad nucleotídica

P_s Promedio de sitios segregantes por sitio

D Estadístico de la prueba de neutralidad de Tajima

IV DISCUSIÓN

4.1 Primera parte de estudio: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos

De acuerdo con lo encontrado pensamos que el bovino criollo tiene tendencia a movilizar sus reservas rápidamente para mantenerse en la época seca y recuperarse en la época de lluvias.

Las medias de los resultados que se obtuvieron se encuentran dentro de los rangos de referencia descritos para razas de bovinos en trópico ^{47, 107, 108, 109}. Se presentan en el cuadro 3.1.1.

Los valores para la concentración del colesterol entre épocas ($p < 0.0001$) y grupos ($p < 0.005$) fueron muy diferentes en los bovinos criollos. Las diferencias observadas en el colesterol, concuerda con los resultados de otros estudios, donde se han reportado diferencias según el estado productivo de los animales, que obedecen principalmente a cambios en la alimentación según el estado fisiológico, pudiendo presentarse un balance positivo para algunos nutrientes, como energía, entre otros, dando lugar a una mayor concentración de colesterol ^{110, 111}.

Se ha observado que los bovinos presentan una serie de adaptaciones metabólicas previo al inicio de la época de escasez; encontrando dentro de estas una intensa movilización de grasa como consecuencia de un déficit energético, producido por una disminución en el consumo voluntario o involuntario de materia seca y el inicio en la preparación para la lactancia ^{111, 112}, lo que conlleva a la hipocolesterolemia ¹¹³. En el caso del bovino criollo no consideraríamos una baja en el consumo voluntario de alimento, más bien una falta de alimento y agua en la época de secas, lo que repercute en la concentración de colesterol.

Al aumentar el consumo de materia seca, la colesterolemia aumenta gradualmente, lo que refleja una mayor exigencia energética impuesta para la recuperación fisiológica del animal ^{113, 114}, es por eso que los bovinos criollos presentan valores más bajos de colesterol en el inicio de la época de lluvias que es la de mayor índice de temperatura humedad.

La disminución de las proteínas totales fue otro de los metabolitos que presentaron cambios estadísticamente significativo ($p < 0.03$) en bovinos criollos mixtecos durante la época de lluvias (Julio) comparada con la época de secas (Abril). La alta concentración de proteínas totales observada obedece principalmente al aumento en la concentración de globulinas, ya que éstas son su principal fuente de variación ¹¹⁵, la hiperglobulinemia se debe a la presencia de infecciones inespecíficas oportunistas ^{116, 117} durante épocas de estiaje. No se sabe con seguridad que es lo que podría ocasionar este aumento en la concentración de proteínas ya que el ácido urico y creatinina que son elementos muy ligados a las proteínas se encontraron en concentraciones normales.

La disminución del ácido urico estaría en relación con un bajo consumo de proteína en la ración, descartándose su disminución por hepatopatías, ya que se encontró dentro del intervalo de referencia ^{47, 107, 108, 109}. Las anomalías de las proteínas plasmáticas no indican una enfermedad específica sino un estado que altera el balance entre síntesis de proteínas y el catabolismo ⁴⁷. El aumento o disminución del catabolismo proteico es ocasionado por condiciones de estrés, calor, deshidratación, fiebre, infecciones, traumatismos, gestación ^{42, 118}. Las evidencias de este estudio y las observaciones durante el muestreo indican que esta alta concentración de proteínas totales es debida a la deshidratación, por el casi nulo consumo de agua y las temperaturas ambientales.

Los bovinos criollos mixtecos no presentan alteraciones cuestionables en la mayoría de sus metabolitos y la temperatura corporal. Los resultados encontrados ponen en evidencia las variaciones que se pueden presentar por las diferencias genóticas, un

manejo nutricional e hídrico diferente al observado en los rebaños explotados con sistemas de producción tecnificados, al estado reproductivo de los animales y a los cambios climáticos principalmente.

4.2 Segunda parte de estudio: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino

Un incremento en la tolerancia a estrés se asocia con un incremento en la expresión genética, dando un mejoramiento en la función del fenotipo ¹¹⁹.

Adamowicz et al., 2005 ¹²⁰ demostraron que el gen Hsp70.1 está de igual manera conservado tanto en *B. taurus* como en *B. indicus*. Ciertas observaciones sugieren, que las variantes del promotor no se comportan de manera neutral ¹¹⁹.

Las evidencias encontradas en bovinos en cuanto al polimorfismo genético de los genes que codifican a las proteínas de choque térmico son muy escasas. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son los recursos más abundantes de variación genética entre individuos de una misma especie ⁸⁵.

Hasta el momento solo se han descrito un par de SNP por Grosz et al., 1994 ⁵⁹ y Adamowicz et al., 2005 ¹²⁰ para regiones no traducidas de este gen.

Un SNP por cada 300-500pb es la densidad de SNP estimada para el genoma humano y otros mamíferos ¹²¹. A menudo solamente un subconjunto pequeño de SNP es suficiente para capturar la información completa del haplotipo ⁹² de esta manera se logro diferenciar a los individuos heterocigotos y homocigotos diferentes a los reportados por Kowalski et al., 1993 ⁸³ y Schwerin et al., 2001⁹. La clasificación de los haplotipos se presenta en el cuadro 3.2.1.1.

Los haplotipos diferentes al reportado por Kowalski et al., 1993⁸³ fueron considerados como mutantes. De las 60 secuencias, 24 fueron iguales a la reportada.

Una secuencia de bovino criollo presenta la delección de una "C" en la posición 895 que afecta a la caja AP2 (activa al promotor para la transcripción) Schwerin et al., 2001⁹ reportaron esta misma mutación y evidenciaron la existencia de efectos negativos en la activación de la transcripción y un comportamiento no neutral en respuesta a la selección.

4.2.1 Mutaciones

En caso de que las mutaciones fueran aleatorias se esperaría un 0.5 para cada una (transiciones y transversiones),⁹⁴. El índice de mutación en general para locus neutrales es de 2×10^{-4} mutaciones por gameto por generación dando por resultado un nuevo alelo¹²². La transición g X a es el tipo de mutación con mayor frecuencia encontrado en estudios de SNP^{88, 123}, en este trabajo también es la mutación que se presenta con mayor frecuencia 0.3673, mientras la transversión más frecuente es la a X c 0.2653. Las demás frecuencias y tipos de mutaciones encontradas en este estudio se presentan en el cuadro 3.2.2.1.

En las proteínas de choque térmico existen dos genes, el Hsp70.1 y Hsp70.3 que codifican para una proteína idéntica, pero difieren completamente en la secuencia de la región no traducida 3'^{124, 125, 126}. Se ha visto que muchos de los SNP se localizan en las regiones no traducidas, aunque un gran número de mutaciones que corresponden a sitios codificantes han sido asociadas a la expresión tanto negativa como positiva del fenotipo.

4.2.2 Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP

Actualmente los SNP están en el centro de interés para los estudios del genoma y la evolución humana ^{88, 89}. Aunque los SNP se identificaron a simple vista, fue necesaria la ayuda de programas computacionales para analizar los datos completos de las secuencias, y saber si realmente las secuencias estudiadas pertenecían a la secuencia de referencia. A pesar del gran potencial de los SNP en estudios evolutivos, en particular para deducir los parámetros genéticos de la población, los análisis de SNP están limitados casi exclusivamente a seres humanos y a organismos utilizados como modelos genómicos para humanos ⁸⁵, es por ello que los SNP publicados en bovinos son muy escasos.

La variabilidad genética entre individuos o sea su polimorfismo es aún menor, alrededor del 0.1%. Ello representa 3×10^6 pares de bases susceptibles de presentar cambios de un solo nucleótido o el de polimorfismos múltiples ¹²⁷. Adamowicz et al., 2005 ¹²⁰ reportaron 6 genotipos diferentes y 4 alelos en dos sitios polimórficos para 253pb en la región no traducida 3' tanto en *bos taurus* como en *bos indicus*. De los sitios polimórficos encontrados el 0.95 de genotipos fueron homocigotos, de los cuales el 0.81 son iguales a la referencia y el 0.19 diferentes a los de la referencia, la frecuencia de individuos heterocigotos fue de 0.5. Se ha reportado que la frecuencia de homocigotos es por encima del 0.9 ¹²⁰ muy similar a lo encontrado en nuestro estudio. En 4 de los 8 sitios polimórficos se observó un exceso de homocigotos, ya que no hubo coincidencia con los genotipos esperados probablemente a la existencia de alelos deletéreos o debida a una selección artificial donde se pudiera dar la utilización de progenitores emparentados. En el cuadro 3.2.3.1 se detallan las frecuencias de los genotipos por raza.

Los bovinos criollos presentaron 15 alelos diferentes, los Holstein y Guzerat 13 alelos distintos cada uno (cuadro 3.2.3.2). Los genotipos y alelos de referencia fueron descritos en *bos taurus*, esperábamos que los bovinos criollos y Holstein presentarían

mayor afinidad, pero de acuerdo a los genotipos y alelos encontrados son más parecidos entre si los Guzerat (*bos indicus*) y los Holstein (*bos taurus*). Los criollos presentaron la menor semejanza a los genotipos y alelos ya descritos.

4.2.3 Diversidad Genética

Diversidad haplotípica: la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes se conoce como diversidad haplotípica ¹⁰⁰. La diversidad haplotípica mayor fue en los bovinos criollos con 0.93 ± 0.042 , esto se explica porque tienen el mayor número de haplotipos diferentes (cuadro 3.2.1.1). Solo se han descrito diversidades haplotípicas para el complejo mayor de histocompatibilidad y otros genes en humanos, donde se han encontrado arriba del 0.75 de diversidad haplotípica.

Diferencias nucleotídicas entre poblaciones: este cálculo se hizo para demostrar si los pares de secuencias de ADN comparadas son originadas de un ancestro común, las secuencias descendientes gradualmente difieren por sustituciones nucleotídicas ¹²⁸. La manera en que se midió el grado de diferencias de las secuencias, fue calculando la proporción de sitios nucleotídicos (p), donde una de las dos secuencias es diferente. Para la región no traducida 3' Adamowicz et al., 2005 ¹²⁰ reportaron 0.0158 de diferencias nucleotídicas entre poblaciones, usando animales *bos taurus* y *bos indicus*. Encontramos un valor similar de p 0.0155, pero para la región no traducida 5' del promotor del gen Hsp70A.

Diversidad nucleotídica dentro de poblaciones: La medición del polimorfismo de ADN no depende del tamaño de la muestra, si no del número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias ¹⁰². El promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre dos secuencias, es la probabilidad de que dos nucleótidos con la misma posición tomados al azar sean diferentes, cuanto más altos sean estos valores más alta es la variabilidad genética de la población. Los bovinos criollos presentaron una mayor diversidad nucleotídica 0.00498 que las demás razas

estudiadas. En el cuadro 3.2.4.1 se muestra la diversidad nucleotídica por población. En recientes estudios han encontrado valores menores a 0.003 de diversidad nucleotídica tanto en bos taurus como en bos indicus, para otros genes, sin embargo Konfortov et al., 1999 ¹²⁹ reportó 0.0093 de diversidad nucleotídica para el gen de leptina en bos taurus.

Sustituciones nucleotídicas: la frecuencia de las sustituciones nucleotídicas por sitio es de 2×10^{-9} ¹²² para regiones no traducidas 5' y 3'. La comparación entre criollos y Guzerat es mayor que en las demás comparaciones posibles, es decir, el criollo y Guzerat tienen un considerable grado de diferenciación genética si se compararan nucleótido por nucleótido, por ende la diferencia es también mayor a lo ya reportado.

Los valores para la diversidad nucleotídica fueron menores a cero, una de las causas podría ser el tamaño de la población, aunque si fuera este el caso, la variabilidad también sería muy baja. Si estos valores fueran altos pudieran ser atribuidos al contacto entre razas alopátricas previamente diferenciadas, o bien a una población estable con una larga historia evolutiva. Esto confirma que las poblaciones no han estado sujetas a una selección balanceada.

4.2.4 Árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético está basada en el método de algoritmos Neighbor-Joining ¹³⁰. El método de bootstrap genera las comparaciones entre cada base en forma aleatoria y toma la que con mayor frecuencia fue repetida dentro de esas comparaciones. En cada bootstrap se estima la distancia de Kimura 2 -parametros y la desviación estándar de los datos originales ¹²⁸. La razón por la que no se definió una raíz inicial del árbol fue porque no hay una secuencia representativa de la que se pudieran desprender las ramas del árbol (Figura 3.2.5.1). La mayoría de los haplotipos únicos del criollo y los de Holstein se encuentran más alejados de la referencia esto

contrasta con los resultados de diversidad, donde los criollos y Holstein presentan mayores diferencias con la referencia y los Guzerat.

4.2.5 Prueba de Neutralidad de Tajima

Las consecuencias fenotípicas de un cambio en la regulación de la expresión de un gen son el mecanismo principal de evolución. La prueba de neutralidad de Tajima es utilizada para probar la hipótesis nula de equilibrio evolutivo y del tamaño constante en una población con selección balanceada ^{106, 122}. La prueba es positiva en el caso de sobredominancia, cero para sitios neutrales (no mutaciones) y negativa en selección balanceada. Los alelos deletéreos afectan la selección balanceada ¹⁰⁶ si el valor de pS aumenta con respecto a la diversidad nucleotídica se considera que hay alelos deletéreos y si aumenta el valor de la diversidad nucleotídica con respecto al promedio de sitios segregantes por sitio, se dice que hay selección balanceada.

Los valores calculados para la prueba no fueron estadísticamente significativos para afirmar que en estas poblaciones existe o existió un equilibrio entre deriva -mutación o la posibilidad de selección balanceada, es decir que la variabilidad de los alelos no ha sido selectivamente neutral. De acuerdo con esto no ha habido mutaciones que pudieran favorecer o afectar de alguna manera la expresión del gen debida a los polimorfismos encontrados. En la figura 3.2.1.1 podemos ver claramente que no hay mutaciones en los elementos de choque térmico y solo 2 en todo el promotor, a pesar de que la mayoría de las mutaciones, se encuentran en la región no traducida que no se ha comprobado afecte la codificación de la proteína.

V CONCLUSIÓN

5.1 Primera parte de estudio: Perfiles Metabólicos en Bovinos Criollos

Las diferencias observadas en los valores analizados de Colesterol y Proteínas Totales durante el segundo período y entre grupos genéticos, indican que los bovinos criollos se han adaptado de manera diferente que los Cebú a los cambios climáticos de su entorno para lograr sobrevivir.

Los valores encontrados sugieren que el bovino criollo mixteco tiene un rango metabólico más amplio, con valores más bajos y por arriba a los reportados en otras razas de bovinos, probablemente por la deficiencia de alimento y agua, con un manejo muy diferente a las razas definidas que comúnmente son explotadas en condiciones y sistemas controlados

5.2 Segunda parte de estudio: Diversidad genética de la región promotora del gen Hsp70A bovino

Se ha visto que ciertos cambios en la región promotora confieren termoresistencia, principalmente cuando se afectan los elementos de choque térmico, la mayoría de las mutaciones, se encuentran en la región no traducida que no se ha comprobado afecte la codificación de la proteína.

Lo que llama mucho la atención fue el hallazgo de una delección en la caja AP2 (activa al promotor para la transcripción), ya reportada por otros autores, en donde evidenciaron efectos negativos en la activación de la transcripción, aunque posiblemente exista una interacción con otros genes para producir la proteína en forma adecuada. Un incremento en la tolerancia a estrés se asocia con el mejoramiento de la expresión genética, quizás esta sea la principal habilidad del bovino criollo mixteco que se ha ido adaptando con éxito a las difíciles zonas geográficas y climas adversos de la mixteca poblana.

VI LITERATURA CITADA

1. De Alba J. Recursos genéticos animales en América Latina. Ganado Criollo y especies de altura. FAO. Roma, Italia, 1981.
2. Rouse JE. World Cattle, Cattle of North America, explains the names, used in Mexico. Breeds of livestock Corriente Cattle. Animal science. 1996;3:1 -2.
3. Ulloa AR. Estimación de la Heterogeneidad genética en Poblaciones de Bovinos Criollos Mexicanos utilizando marcadores moleculares. (Tesis de Doctorado). UNAM, México DF, 2001.
4. Rodríguez AF, Ríos RJG, Fernández R y Ortega JA. Programa de investigación sobre ganado de rodeo en el estado de Chihuahua. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México, 1998.
5. Fierro LC y Pamenes D. El ganado de rodeo en los estados de Durango, IV Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas, 1998. Baja California Sur, México.
6. Lindquist S and Craig E. The heat Shock Proteins. Annual Review of Genetics. 1988;22:631-677.
7. Li GC and Mivechi NF. Heat Shock Protein 70. In Ed. DS. Latchman. Stress Proteins Springer-Verlag. New York, 1999.
8. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. Cell. 1991;65:363-366.
9. Schwerin MS, Maak C, Kalbe and Fuerbass R. Functional promoter variants of highly conserved inducible hsp70 genes significantly affect stress response. Biochimica et Biophysica Acta 2001;1522:108-111.
10. De Alba J. Criollo Cattle in Latin America. Global Genetic Resources, C.G. Hickman Editor, 1987;5:111.
11. Espinoza VJL. Producción y Comercialización del ganado Chinampo en Baja California Sur, México, 1998.
12. Ortiz LIC. Conservación de los Recursos Genéticos Criollos y su utilidad económica. Memorias de Recursos Genéticos Animales en América Latina, 1998. FAO -ALPA-CATIE. Santiago de Chile.
13. Schuartz K. Texas Longhorn más que cuernos pura carne. Acontecer Bovino. Ediciones pecuarias de México. México DF 1987;2:20.23.
14. Duarte OA, Tewolde A y García LF. Análisis de DNA del Ganado Criollo Mexicano: un estudio de caso. IV Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas; 1998. Tampico, Tamaulipas, México.
15. Ríos RJG, Rodríguez AF, Espinoza V. J. L. y Fierro L. C. Los Criollos para rodeo y su contribución hacia la sustentabilidad de los sistemas de producción. IV Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas, 1998. Tampico, Tamaulipas, México.
16. Beteta OM. Las razas autóctonas españolas y su participación en los bovinos criollos iberoamericanos. Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto. Madrid, España 1999.
17. Rice VA, Andrews FN, Warnick EJ, and Legates LE. Breeding and improvement of Farm Animals. 6th edition. Mc Graw Hill Book Company, USA, 1967.
18. Johansson IJ and Rendel J. Genetics and Animal Breeding. W. H. Freeman and Company, 1968.
19. Ríos RJG. El ganado criollo, un autentico producto de exportación. III Congreso Iberoamericana de Razas Autóctonas y Criollas, 1997. Tamaulipas, México.

20. Food and Agriculture Organization (FAO). Informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios (RPG) de México. Capitulo 2002;1:1 -22.
21. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Cuadernos de Cartografía y Climatología. Puebla, México, 2005.
22. SAGARPA. Delegación Federal en el Estado de Puebla; Dirección de Planeación, 2000.
23. De Dios VO. Ecofisiología de los bovinos en sistemas de producción del trópico húmedo. Colección José N. Rovirosa. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2001.
24. Moberg GP. The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. Eds. Moberg GP and Mench JA, USA, 2000.
25. Valdés M y Flores T. Stress: vida o muerte. Como controlarlo. 2ª ed. Carisma Ediciones. México, 1985.
26. Abdelatir AM y Ahmed, MMM. Thermoregulation, water balance and plasma constituents in Sudanese desert sheep: responses to diet and solar radiation. *Journal of Arid Environments* 1992;25:387-395.
27. Church DC. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Nutrición. Editorial Acribia, Zaragoza, 1974.
28. Findlay JD. Los efectos de temperatura, humedad, movimiento del aire y radiación solar sobre la fisiología y comportamiento de los animales de granja. *Hannah Dairy Research. Institute Bull*, 1950.
29. Mason JW. Emotion as Reflected in Patterns of Endocrine Integrations. In: Levi, L. Ed. *Emotions-Their Parameters and Measurements*. Raven, New York, 1975.
30. Kolb E. Fisiología veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1971.
31. Hafez ESE. The behaviour of domestic animals. Department of Animal Science. Washington State University. Pullman, Washington, USA, 1969.
32. Mc Dowell RE, Douglas HK y Schein M. Comparación de la tolerancia al calor de Jersey y cruzamientos Sindhi por Jersey. *J. Animal Science*, 1952;11:796-97.
33. Riggs JK. Influencias ambientales sobre el ganado vacuno. CAFADE, Bs.As Santiago AA. El Cebú, Uthea, México, 1961.
34. Hafez ESE. Capacidad reproductora de algunos animales domésticos con relación al clima y la nutrición. *Rev. de Zootecnia y Reproducción*, 1973.
35. Hafez ESE. Aspectos Ecológicos y Bioclimáticos. Adaptación de los animales de granja. Editorial Herrero, México, 1970.
36. Yousef MKL, Hahn HD and Johnson. Adaptación del ganado vacuno. Adaptación de los animales de granja. Editorial Herrero. México, 1970.
37. Schimdt-Nielsen K. *Animal Physiology. Adaptation and environment*. 5th edition. Cambridge University Press, New York, USA, 1998.
38. Elsasser TH, Klasing KC, Filipov N and Thompson F. The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities of nutrients use. In: *The Biology of Animal Stress*, edited by Moberg G and Mench J. New York, 2000.
39. Silanikove N. Impact of shelter in hot Mediterranean climate on feed intake, feed utilization and body fluid distribution in sheep. *Appetite*. 1987;9:207-215.
40. Moberg GP. When does stress become distress? *Laboratory animals*. 1999;28:22-26.
41. Lee Douglas HK. Tolerancia de los animales al calor. Manual de Estudios de Campo. Cuadernos de Fomento, FAO, Roma, 1953.
42. Ceballos A. El perfil metabólico y su uso para establecer desbalances nutricionales en bovinos lecheros. Primer Seminario Internacional en Reproducción y Metabolismo de la Vaca Lechera; 1998. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

43. Wildeman ZB and Hoitman D. Manual de Laboratorio de Química sanguínea Veterinaria. Universidad De Antioquia, Colombia, 1999.
44. Kluger MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiological reviews*. 1991;71-108.
45. Jubb KUF, Peter C, and Kennedy. *Pathology of domestic animals*. Academic Press, New York, 1973.
46. Marcano PRJ. La sangre, las plaquetas, el laboratorio y clínica del paciente. La sangre componentes y funciones. Caracas, Venezuela, 2001.
47. Benjamin MM. Compendio de patología clínica veterinaria. Ed Continental, México 1997.
48. Medway W, Prier JE y Wilkinson JS. Patología Clínica Veterinaria, Ed UTEHA, México, 1990.
49. Luna GL. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. The Bickister Division. Mc Graw Hill Company, USA, 1987.
50. Leeson CR, Lesson, A and Paparo A. Atlas De Histología, 2da Edición, Editorial Interamericana, México, DF, 1991.
51. Aiquel F. Análisis Clínicos. 4a ed. México. Ed Panamericana. Psychopharmacology, 1977.
52. Wilkinson MP. Patología Clínica Veterinaria, Editorial Hispano Americana. México, 1986.
53. Pelham HRB. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins. *Cell*. 1986;46:959-961.
54. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature, London*. 1987;328:378-379.
55. Ellis RJ and Hemmingsen SM. Molecular chaperones: proteins essential for biogenesis of some macromolecular structures. *Trends. Biochem. Sci*. 1989;14: 339-342.
56. Morimoto RI and Milarski KL. Expression and function of vertebrate hsp70 genes. *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
57. Pechan PM. Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Letters* 1991;280:1-4.
58. Grosz MD, Womack JE and Skow LC. Syntenic conservation of HSP70 genes in cattle and humans. *Genomics* 1992;14: 863-868.
59. Grosz MD, Skow LC, and Stone RT. An AluI polymorphism at the bovine 70 kD heat shock protein-1 (HSP70-1) locus. *Anim. Genet*. 1994;25:196-199.
60. Bukau B and Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998;92:351-366.
61. Feige U and Polla BS. Heat shock proteins: the Hsp70 family. *Experientia* 1994;50:979-985.
62. Hartl UF. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996;381: 571-580.
63. Angelidis CE, Lazaridis I and Pagoulatos GN. Constitutive expression of heat shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. Journal Biochem*. 1991;199:35-39.
64. Li WH, Gojobori T and Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature*. 1981;292:237-239.
65. Parsell DA, Taulien J, and Lindquist S. The role of heatshock proteins in thermotolerance. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci*. 1993;339:279 -285.
66. Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C. *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1990.
67. Hohfeld J, Minami Y, Hartl EU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 1995;83:589-598.
68. Mosser DD, Caron WA, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI and Massie B. The Chaperone Function of hsp70 is Required for Protection against Stress -Induced Apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2002;20:7146-7159.

69. Rassow J, Von Achsen O, Bomer U and Pfanner N. Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends in Cell Biol* 1997;7:129-133.
70. Pottinger TG. Genetic selection to reduce stress in animal: In Eds Moberg GP and Mench JA. *The biology of animal stress*. CAB International New York, USA, 2000.
71. Feder ME, Bedford TBC, Albright DR, and Michalak P. Evolvability of Hsp70 expression under artificial selection for inducible thermotolerance in independent populations of *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Biochem. Zool.* 2002;75:325–334.
72. Krebs RA, Feder ME, and Lee J. Heritability of expression of the 70 -kD heat-shock protein in *Drosophila melanogaster* and its relevance to the evolution of thermotolerance. *Evolution.* 1998;52:841–847.
73. Kelley WL. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochem. Sc.* 1998;23:222-227.
74. Winter AA, Alzinger and Fries R. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine DGAT1. *Genomics.* 2004;83:172–180.
75. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998;12:3788–3796.
76. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J and Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 1991;88:6906–6910.
77. Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C and Morimoto RI. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA -binding ability. *Genes dev.* 1991;5:1902-1911.
78. Morimoto RI, Sarge KD, and Abravaya K. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* 1992;267:21987 –21990.
79. Morimoto RI. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science,* 1993;269:1409-1410.
80. Walker GA, Thompson FJ, Brawley A, Scanlon T and Devaney E. Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal.* 2003;17:1960-1962.
81. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, López -Corrales NL and Beattie CW. A second generation linkage map of bovine genome. *Genome Research,* 1997;7:235-249.
82. Gallagher DS, Grosz MD, Womack JE and Skow LC. Chromosomal localization of HSP70 genes in cattle. *Mammalian Genome* 1993;4:388-390.
83. Kowalski J, Gilbert SA, van Drunen-Little van den Hurk S, van den Hurk J, Babiuk LA and Zamb TJ. Heat shock promoter-driven synthesis of secreted bovine herpesvirus glycoproteins in transfected cells. *Vaccine.* 1993;11:1100-1108.
84. Brookes AJ. The essence of SNP. *Gene,* 1998;234:177-186.
85. Nicod JC and Largiadè RC. SNP by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non - model organisms. *Nucleic Acids Research.* 2003;31:1 -5.
86. Thiel T, Kota R, Grosse I, Stein N and Graner A. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Research.* 2004; 32:1 -5.
87. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by highthroughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 2001;47:164 -172.
88. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Gh andour G, Perkins N, Winchester E and Spencer J. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science,* 1998;280:1077-1082.

89. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms: from the evolutionary past. *Nature*. 2001;409:821-822.
90. Qingbo L, Zhaowei L, Monroe H and Culliat CT. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 2002;23:1499-1511.
91. Jenkins S and Gibson N. High-throughput SNP genotyping. *Comp Funct Genom* 2002;3:57-66.
92. Ke X and Cardon LR. Efficient selective screening of haplotype tag SNP's. *Bioinformatics Applications Note*. 2003;19:287-288.
93. Martinez-Arias R, Calafell F, Mateu E, Comas D, Andres A and Bertranpetit J. Sequence variability of a human pseudogene, *Genome Res*. 2001;1:1071-1085.
94. Vignal A, Milan D, San Cristobal M And Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Vol*. 2002;34:275-305.
95. Méndez RI, Namihira GN, Moreno AL y Sosa MC. *El Protocolo De Investigación. Lineamientos para su Elaboración y Análisis*. Trillas, 2ª Edición. México, DF, 1991.
96. Ingraham RH, Stanley RW, Wagner WC. Relationship of temperature and humidity to pregnancy rate of Holstein cows in Hawaii. *J Dairy Sci* 1975; 59:2086:2090.
97. Miller SA, Dykes DD y Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting AND from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16:1215.
98. Nei M and Roychoudhury AK. Genetic variation within and between the three major races of man, caucasoids, negroids and mongoloids. *Am. J. Hum. Genet*. 1974;26:421-443.
99. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 1983;105:437-460.
100. Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press, New York, USA, 1987.
101. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*. 1980;16:111-120.
102. Nei M and Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1979;76:5269-5273.
103. Jukes TH and Cantor CR. *Evolution of protein molecules. Mammalian proteins metabolism*. Academic Press, New York, 1969.
104. Takahata N and Palumbi SR. Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics*, 1985;109:441-457.
105. Panell JR and Charlesworth B. Neutral genetic diversity in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evolution*, 1999;53:664-676.
106. Tajima F. Statical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polimorfism. *Genetics*, 1989;123:585-595.
107. Ceballos A, Villa AN, Bohórquez A, Quiceno J, Jaramillo M y Giraldo G. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos en lecherías del trópico alto del eje cafetero Colombiano. *Rev. Col. Cienc. Pec*. Vol. 2002;15:19-33.
108. Swanson MJ. *Physiological properties and cellular and chemical constituents of blood. Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Ed. Cornell University Press, London, 1984.
109. Paterson F. *Análisis Clínicos; 4a edición*, Ed. Panamericana. Zaragoza, España, 1993.
110. Calamari L, Bertoni G, Maianti MG and Cappa V. Sull utilità di nuovi parametri ematochimici nella valutazione del profilo metabolico delle lattifere. *Zoot. Nutri. anim*. 1989;15:191-210.
111. Webster J. *Understanding the dairy cow*. 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, USA, 1993.

112. Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 1995;73:2804-2819.
113. Sommer H. The role of metabolic profile test in the control of cattle feeding. *Magyar Állatorvosok Lapja.* 1995;10:714-717.
114. Herrera E. *Bioquímica, Biología Molecular y Bioquímica Fisiológica.* 2ª Edición, Editorial Interamericana, 1996;2.
115. Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5th ed, Academic Press, San Diego, 1997.
116. Oyarzún JL. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos obtenidos de rebaños lecheros en el sur de Chile, 1986-1996. (Tesis de pregrado) Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 1987.
117. Payne JM and Payne S. *The metabolic profile test.* Oxford University Press, New York, USA, 1987.
118. Srikandakumar A and Jonson EH. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking zebu cows. *Tropical animal health and production.* 2004;7:685-692.
119. Schwerin M, Sanftleben H and Grupe S. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2-binding site in the promoter of the stress protein 70.1 encoding gene in cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 2003;46:177-185.
120. Adamowicz T, Pers E and Lechniak D. A New SNP in the 3' UTR of the hsp 70 -1 Gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Biochemical Genetics* 2005;43:623-627.
121. Nielsen R. Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. *Genetics*, 2000;154:931-942.
122. Kimura M. *The neutral theory of molecular evolution.* Cambridge University. Press, Carbridge, Massachusetts, 1983.
123. Cooper DN and Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum. Genet.* 1989;83:181-188.
124. Dworniczak B and Mirault M. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kDa heats shock "cognate" protein. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:5181-5197.
125. Milner CM and Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*, 1990;32:247-251.
126. Harrison GS, Drabkin HA, Kao F, Hartz J, Hartz IM, Chu EHY and Lim L. Localization of a human heat shock HSP70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic cell hybrid and restriction length polymorphism analysis. *Hum. Genet.* 1987;75:119-130.
127. Taillon, Miller P, Piernot EE and Kwok PY. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome Res.* 1999;9:499-505.
128. Nei N and Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford University Press, New York, USA, 2000.
129. Konfortov BA, Licence VE and Miller JR. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mamm. Genome* 1999;10:1142-1145.
130. Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4:406-425.

Anexo 1

Extracción de ADN a partir de muestras de sangre y estandarización a 50 ng/ μ l

Tomar de los viales con las muestras, 700 μ L de sangre y transferir a tubos de 2 mL.

Agregar 1 mL de agua bidestilada estéril, agitar con vórtex y centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min, después, retirar el sobrenadante. Repetir ahora con 1.5 mL de agua.

Agregar 500 μ L de solución de lisis (Tris-HCl pH 8.0 10 mM; NaCl 400 mM; EDTA pH 8.0 20 mM; SDS 0.5%) resuspendiendo perfectamente el botón de células ayudándose del vórtex y pipeta.

Agregar ARNasa a una concentración final de 10 μ g/mL, mezclar e incubar a 37° C durante 1 hr. Posteriormente, agregar Proteinasa K a una concentración final de 50 μ g/mL, mezclar perfectamente con vórtex e incubar a 50° C durante la noche.

Agregar NaCl a una concentración final de 2M, agitar y centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.

Recuperar sobrenadante y agregar 1 volumen de isopropanol absoluto, mezclar suavemente hasta observar una malla blanquecina, centrifugar 5 minutos a 8 000 rpm. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%.

Secar la pastilla y resuspenderla en 50 a 100 μ l de agua bidestilada estéril (inyectable).

Cuantificar por fluorometría (Fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200) empleando el flourocromo Hoechst 33258.

Estandarizar el ADN obtenido a una concentración final de 50 ng/mL utilizando la siguiente fórmula:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

Donde:

V1= Volumen obtenido de ADN (50 o 100 μ l o según en lo que se haya resuspendido la pastilla)

C1= Lectura obtenida por el fluorómetro (en ng/ μ l)

V2= ¿? (dato a ser calculado)

C2=50 ng/ μ l

Para verificar la integridad del ADN, así como la uniformidad de las diluciones, se corren 200 ng de ADN (4 μ l) en un gel de agarosa al 1% empleando el buffer TAE 1X.

Anexo 2

Amplificación del fragmento promotor del gen Hsp70A.

Para el primer ensayo de PCR, se utilizaron iniciadores diseñados a partir de la secuencia del gen HSP70A encontrada en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>; accession M98823, Kowalski et al., 1993). El iniciador hacia delante 5' CGAGAACTCGGGAAGTTTCTG 3' y reverso 5' CAGATCCTCTTCACCGATTTC 3'. El protocolo empleado para llevar a cabo la PCR fue el siguiente: Mg Cl₂ 1.5 mM; dNTP 0.2mM; iniciadores 0.6 μM c/u; Taq ADN polimerasa 1U/rx y ADN genómico 50ng. Se manejaron volúmenes de 40 μL por reacción. Las condiciones de amplificación empleadas en el termociclador (PCRexpress, Hybaid Limited), fueron las siguientes: 94° C 3 minutos (1 ciclo); 94° C 30 segundos, 63° C 30 segundos, 72° C 30 segundos (30 ciclos) y 72° C 5 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% con buffer TAE (0.04 M Tris - acetato; 0.001M EDTA). Fue empleado bromuro de etidio para observar el ADN en un fotodocumentador con luz ultravioleta (transiluminador UVP GDS 7500 Darkroom). Esquemáticamente, los productos esperados amplificados por PCR, representados en un gel de agarosa al 2%, se observarían como en la Figura 1, en la que se observan bandas de un tamaño aproximado a 618 pb.

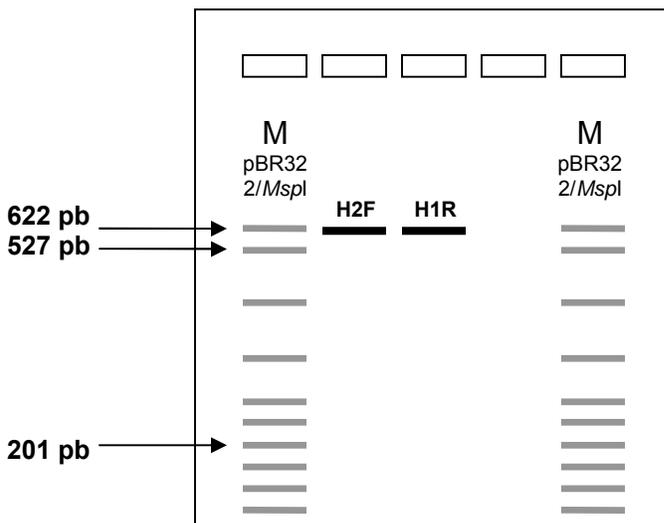


Fig. 1 Representación esquemática de la vista de un gel de agarosa al 2% TAE1X, donde se observa la banda de un tamaño aproximado a 618pb para lo cual se diseñaron los iniciadores.

Anexo 3

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Realizar la electroforesis en agarosa con TAE.

Recortar la banda observandola mediante luz ultravioleta.

Pesarla la banda y adicionar 3 volúmenes de NaI 6M.

Incubar de 5 a 10 minutos a 55° C o hasta que la agarosa se disuelva.

Adicionar 15µL de perlas de sílica e incubar 30 a 60 minutos a 4° C.

Centrifugar 4 minutos a 12000 r.p.m. a 4° C.

Decantar y lavar dos veces con 500µL de solución de lavado, centrifugar 4 minutos a 12000 r.p.m. a 4° C.

Decantar y secar la pastilla por calor.

Resuspender en 30µL de agua bidestilada estéril e incubar a 55° C por 5 minutos.

Centrifugar 4 minutos a 12000 r.p.m. a temperatura ambiente.

Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.

Solución de lavado:

- NaCl 50mM, Tris HCl pH 7.5 10mM, EDTA 2.5mM, Etanol 5% v/v.

Perlas de sílica:

- Preparar una suspensión de sílica a 100mg/ml en PBS, centrifugar 2 minutos.

Anexo 4

Amplificación de secuencia del fragmento promotor del gen Hsp70A.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para llevar a cabo la PCR son: hacia delante 5' CGAGAACTCGGGAAGTTTCTG 3' y reverso 5' CAGATCCTCTTCACCGATTTC 3'. El protocolo y condiciones para la reacción de secuencia se hizo para cada tubo de muestra en forma separada, adicionando cada uno de los siguientes componentes:

Mezcla Mínima para la Reacción de Secuencia		
Reactivo	Concentración	Volumen
Ready Reaction Premix	2.5X	4 μ L
Big Dye Sequencing Buffer	5X	2 μ L
Iniciador	2pM/ μ L	1.6 μ L
ADN	60ng/ μ L	Según concentración de ADN
H ₂ O	c.b.p.	c.b.p.
Volumen Final	1X	20 μ L

Se trabajó en volúmenes de 20 μ L y la PCR se llevó a cabo en el termociclador (PCRexpress, Hybaid) dando una desnaturalización inicial de 10 segundos a 96° C, la hibridación fue a 50° C durante 5 segundos y 60° C por 4 minutos de extensión final.

Los productos obtenidos se pasaron por columnas con sephadex G50 previamente equilibradas, se centrifugan durante 4 minutos a 2700 rpm y, a continuación, se secaron en un speedvac durante 45 minutos a temperatura y velocidad máxima.

Finalmente las muestras se prepararon para ser analizadas en un secuenciador automático (Abi Prism 310). Para ello, se resuspendieron en un buffer específico denominado TSR (Template Suspension Reagent). Tras una centrifugación breve, se desnaturalizaron las muestras a 95° C durante 3 minutos, se volvió a centrifugar y las muestras se trasvasaron a los tubos del secuenciador. El secuenciador realiza una electroforesis capilar de manera que es capaz de separar las cadenas de ADN obtenidas en la PCR de secuencia. El láser va leyendo la secuencia según la longitud de onda que van emitiendo los fluorocromos, asociando cada longitud de onda a una determinada base nitrogenada.

Hap13
Hap14
Hap15
Hap16
Hap17	A.....

BOVHSP70A	TTAGTCCGTG	AGAGCAGCTT	CCGCAGACCC	GCTATCTCCA	AGGACCGCCC	-GAGGGGCAC	CAGAGCGTTC	AG
Hap1	C.....
Hap2	C...A...
Hap3	C...A...	...C..T...	..
Hap4T...	C...A...	...C.....	..
Hap5T...	C...A...	...C.....	..
Hap6	C...A...	...C.....	..
Hap7T...	C...A...	...C.....	..
Hap8T...	C...A...
Hap9	C.....	...C..T...	..
Hap10	C...A...	...C..T...	..
Hap11G.....	C...A...	...C.....	..
Hap12T...G.....	C...A...	...C.....	..
Hap13T...	C...A...	...C..T...	..
Hap14T...	C.....
Hap15	C.....
Hap16	C...A...
Hap17	C...A...	...C..T...	..