

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

### GENE EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEINS IN DUAL-PURPOSE CATTLE EXPOSED TO HEAT STRESS CONDITIONS

Vicente Eliezer Vega-Murillo<sup>1a\*</sup>, Angelica Torres-Heredia<sup>1b</sup>, Francisco Tobías Barradas-Piña<sup>2</sup>, Maribel Montero-Lagunes<sup>3a</sup>, Juan Prisciliano Zárate Martínez<sup>3b</sup>, Luis Felipe Guzmán-Rodríguez<sup>4</sup>, Guillermo Martínez-Velázquez<sup>5</sup>, Angel Ríos-Utrera<sup>1c</sup>, Moisés Montaña-Bermúdez<sup>6</sup> y Raymundo Salvador Gudiño-Escandón<sup>1d</sup>

<sup>1a</sup> Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo S/N, esq. Yáñez. CP 91710, Veracruz, México  
<https://orcid.org/0000-0002-0847-8944>

<sup>1b</sup> Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo S/N, esq. Yáñez. CP 91710, Veracruz, México  
<https://orcid.org/0000-0002-9257-7952>

<sup>1c</sup> Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo S/N, esq. Yáñez. CP 91710, Veracruz, México  
<https://orcid.org/0000-0003-3108-1133>

<sup>1d</sup> Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Miguel Ángel de Quevedo S/N, esq. Yáñez. CP 91710, Veracruz, México  
<https://orcid.org/0000-0002-1013-805X>

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Superior de Jesús Carranza. Prolongación Miguel Hidalgo # 1519. Col. Centro, Jesús Carranza, Veracruz, CP 96950, Veracruz, México  
<https://orcid.org/0000-0002-7488-9039>

<sup>3a</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental La Posta. Km 22.5 carretera federal Veracruz-Córdoba, Municipio de Medellín, Veracruz, México. CP 94277  
<https://orcid.org/0000-0003-0450-5404>

<sup>3b</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental La Posta. Km 22.5 carretera federal Veracruz-Córdoba, Municipio de Medellín, Veracruz, México. CP 94277  
<https://orcid.org/0000-0002-5458-1483>

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro Nacional de Recursos Genéticos. Av. de la Biodiversidad No. 2498 Col. Centro Tepatitlán, Jalisco, México. CP. 47600  
<https://orcid.org/0000-0002-1663-3457>

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Km. 6, Carretera Internacional México-Nogales Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. CP. 63600  
<https://orcid.org/0000-0001-6101-1297>

<sup>6</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Genético. Km. 1, Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México. CP. 76280  
<https://orcid.org/0000-0003-3162-6949>

\* Autor para correspondencia: [vvega@uv.mx](mailto:vvega@uv.mx)

## RESUMEN

El aumento de la temperatura ambiental está afectando el ambiente térmico al que está expuesto el ganado, disminuyendo su desempeño productivo y reproductivo. Las proteínas de choque térmico (HSP) han sido utilizadas como el principal indicador de adaptabilidad de los bovinos a las condiciones de estrés calórico. Se analizó la expresión de los genes hsp60, hsp70 y hsp90 en 33 hembras mestizas bovinas (Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú), lactantes y horras. Los animales fueron muestreados dos veces por día en el estado de Veracruz y la expresión de los genes fue realizada mediante PCR de tiempo real con sondas marcadas con fluorescencia. El análisis estadístico de la expresión de los genes se llevó a cabo mediante un modelo de medidas repetidas, utilizando PROC MIXED de SAS. La expresión de los genes hsp60 y hsp70 al medio día fue diferente ( $p < 0,001$  y  $p = 0,01$ , respectivamente) a la manifestada durante la madrugada. Los resultados de la expresión de los genes hsp pueden ayudar a desarrollar futuros programas de cruzamiento al reconocer animales que puedan mantener una mayor homeostasis bajo condiciones de estrés calórico.

**Palabras clave:** Termo-tolerancia, hsp70, aclimatación.

## ABSTRACT

The increase in environmental temperature is affecting the thermal environment to which cattle are exposed, decreasing productive and reproductive performance. Heat shock proteins (HSP) have been used as the main indicator of bovine adaptability to heat stress conditions. The expression of hsp60, hsp70, and hsp90 genes was analyzed in 33 crossbred female cattle (Holstein x Zebu and Brown Swiss x Zebu), lactating, and non-lactating. Animals were sampled two times per day in the state of Veracruz, and expression was estimated by using real-time PCR with fluorescently labeled probes. Statistical analysis of gene expression was carried out by a repeated measures model using PROC MIXED of SAS. The expression of hsp60 and hsp70 genes at midday was different ( $p < 0,001$  and  $p = 0,01$ , respectively) from that manifested during the early morning. The results of hsp gene expression may help in developing future crossbreeding programs by recognizing animals that can maintain higher homeostasis under heat stress conditions.

**Keywords:** Thermo-tolerance, hsp70, acclimatation.

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la temperatura ambiental continúa su curso a pesar de las diferentes medidas que se han tomado para mitigar este problema, afectando al sector ganadero bovino directa e indirectamente, resultando en una disminución del desempeño productivo y reproductivo. La respuesta animal a este evento es intentar una aclimatación exitosa para evitar los estragos que el estrés calórico provoca en el organismo (Bernabucci, 2019).

El estrés calórico genera cambios en los parámetros fisiológicos y en la productividad del ganado (Alves et al., 2017; Sariçiçek et al., 2022). En efecto, se ha demostrado que el estrés calórico afecta negativamente a los animales irrumpiendo procesos metabólicos y hormonales que están relacionados con el consumo de alimento y la rumia generando desórdenes metabólicos, alteraciones del sistema inmunitario, disminución de la eficiencia productiva y reproductiva (Kim et al., 2020). Es por ello que el incremento de la temperatura ambiental junto con la prolongación

de la temporada de sequía son factores que ponen en riesgo la sostenibilidad de la producción del ganado bovino, especialmente en climas tropicales (Cardoso et al., 2015). Para mantener la productividad del ganado en condiciones de estrés calórico, se deben identificar las características más relevantes de adaptabilidad (Hooper et al., 2019) e implementar medidas que permitan a los animales mantener un adecuado balance térmico. Ciertamente, el estrés calórico es un desafío para la producción de ganado bovino en los climas tropicales, en especial para el ganado *Bos taurus*, por lo que se necesita una mayor habilidad de sobrevivencia y adaptabilidad para mantener la homeostasis celular (Bharati et al., 2017).

Las estrategias para mitigar los estragos causados por el estrés calórico son difíciles de implementar en sistemas de producción semi-intensivos ya que constan de la instalación de sombreaderos, ventiladores y enfriamiento evaporativo los cuales implican una gran inversión económica por parte de los productores (Hyder et al., 2017a). Por ello, el poder identificar animales que se adaptan mejor es relevante. En este sentido

las proteínas de choque térmico (*hsp*, por sus siglas en inglés) han sido utilizadas como un indicador de adaptabilidad de los bovinos al estrés calórico, ya que estas proteínas son mediadoras de la respuesta al choque térmico (Hyder et al., 2017b). Las proteínas de choque térmico ayudan al animal, a nivel celular, a combatir los daños causados por el estrés calórico, encargándose de proteger a la célula de agregaciones proteicas ocasionadas por un mal plegamiento de las proteínas. También se encargan del replegamiento de las proteínas, mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y señalización (Singh et al., 2020). Se ha demostrado que los factores estresantes aumentan la expresión de los genes *hsp*, estos pueden ser debido a la variación en la temperatura ambiental, compuestos químicos, rayos UV, inflamación o hipoxia, entre otros. Así entonces, la diferencia de la capacidad de adaptación entre individuos puede ser debido a la variación presente en los genes *hsp* y en su expresión (Tripathy et al., 2021).

En síntesis, la estimación de la magnitud de la expresión de genes *hsp* en bovinos en sistema de producción de doble propósito en el trópico puede ayudar a desarrollar futuros programas de cruzamiento identificando animales que puedan mantener una mayor integridad celular y homeostasis bajo condiciones de estrés calórico ya que existe escasa información bajo este sistema. Con base en lo anterior, se hipotetiza que podrían existir diferencias en la expresión de los genes *hsp* en relación con la hora de la toma de muestra, el grupo racial, el porcentaje de genes *Bos taurus* y el estado fisiológico de vacas de doble propósito en clima tropical.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental La Posta, INIFAP, km 22,5 carretera

federal Veracruz-Córdoba, Paso del Toro, Municipio de Medellín, 94277. Veracruz, México (Tabla 1). Se colectaron muestras de sangre de 33 hembras bovinas mestizas Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú, en lactación y horras (sin cría al pie, secas), pertenecientes a un hato de doble propósito. Las variables de temperatura ambiental (T) y la humedad relativa (HR) fueron obtenidas de una estación climatológica ubicada en el municipio de Medellín. Con estos valores se estimaron los valores del índice de temperatura-humedad (ITH) para describir el ambiente térmico al momento de las muestras y asociarlo con las variables respuesta. Al respecto la literatura señala que a valores de ITH = 72, e incluso a veces menor, los bovinos comienzan a presentar signos de estrés calórico. El estudio se llevó a cabo en el mes de agosto, cuando la temperatura ambiental es más alta. Las muestras de sangre, frecuencia respiratoria y temperatura corporal se colectaron en dos diferentes periodos del día, en la mañana, de 07:00 a 09:00 horas, y en la tarde, de 13:00 a 15:00 horas, durante dos días.

La frecuencia respiratoria se obtuvo mediante el conteo de los movimientos de la caja torácica durante 15 segundos y, posteriormente, se multiplicaron por cuatro para estimar la frecuencia por minuto. La temperatura corporal se midió mediante un termómetro infrarrojo como el promedio de mediciones en el lagrimal, hocico, oreja por la mañana y tarde.

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

Tabla 1. Número de animales por condición fisiológica, grupo racial y porcentaje de genes *Bos taurus*.

Table 1. Number of animals by physiological condition, racial group, and percentage of *Bos taurus* genes.

Grupo racial		Porcentaje de genes <i>Bos taurus</i>		
		0,625	0,750	Total
Horra	HO-x	6	6	12
	SP-x	1	3	4
	Total	7	9	16
Ordeña	HO-x	4	3	7
	SP-x	3	7	10
	Total	7	10	17

Ho-x: Holstein x Cebú, SP-x: Suizo Pardo x Cebú.

transcripción del mRNA con el método comercial GoScript™ Reverse Transcription System de la marca Promega. El análisis de la expresión de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* se utilizó el gen endógeno  $\beta$ -actina como gen constitutivo de referencia. Los genes se amplificaron por qPCR dúplex (StepOnePlus™ Real-Time System) con iniciadores y sondas marcadas con fluorescencia (Tabla 2). Las sondas de los genes *hsp* se marcaron con el fluoróforo FAM y el gen  $\beta$ -actina con el fluoróforo HEX. El silenciador empleado en todas las sondas fue TAMRA.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 15  $\mu$ L, con 1X de TaqMan® (Fast Advanced Master Mix, Thermo Fisher Scientific™), 400 nM de los iniciadores sentido y antisentido, 200 nM de sonda marcada y 200 ng de DNA. Para el gen *hsp60*, las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y alineamiento/ extensión a 65°C durante 60 segundos, mientras que para los genes *hsp70* y *hsp90* fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, alineamiento a 65 y 62 °C, respectivamente y extensión a 72°C durante 40 segundos.

La expresión de los genes *hsp* se determinó con el método comparativo  $\Delta\Delta$ Ct (método de cuantificación relativa), usando el gen  $\beta$ -actina de referencia, comparado contra un animal de referencia. El método de cuantificación permite conocer la concentración presente en una

muestra, es decir, el número de copias que se van a expresar de ese gen en la muestra. Entre menor sea el número de ciclos del gen existe mayor expresión, por lo tanto, el  $\Delta\Delta$ Ct será menor cuando exista un incremento de dichos ciclos.

#### Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de la expresión de los genes *hsp60*, *hsp90* y *hsp70* se llevó a cabo con un modelo de medidas repetidas, utilizando PROC MIXED de SAS, versión 9,3 (SAS Institute Inc, 2011). En el análisis se consideraron los animales a partir de los cuales se obtuvo amplificación del gen *hsp* y el gen de referencia  $\beta$ -actina, con valores  $\Delta\Delta$ Ct menores a 40. Se descartaron aquellos que no cumplieron con estos criterios. Se determinó la estructura de covarianzas adecuada para el ajuste de los datos probando ocho diferentes estructuras de covarianzas: simple, simetría compuesta, autorregresiva de primer orden, Toeplitz, componentes de varianza, autorregresiva de primer orden heterogénea, simetría compuesta heterogénea y Toeplitz heterogénea. La selección de la mejor estructura de covarianzas se basó en los criterios de información de ajuste de Akaike, de segundo orden y Bayesiano de Schwarz. Los efectos incluidos en el modelo estadístico fueron periodo del día, grupo racial, estatus productivo (en ordeña o horra), edad, porcentaje de genes *Bos taurus* y la interacción de los factores con periodo del día. Para obtener los modelos definitivos, se eliminaron las interacciones que no fueron significativas ( $P > 0,05$ ) en los análisis preliminares, previa selección de la estructura

**Tabla 2. Descripción de los iniciadores y sondas empleadas en la amplificación de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* en bovinos cruzados de doble propósito.**

**Table 2. Description of primers and probes used in the amplification of *hsp60*, *hsp70*, and *hsp90* genes in dual-purpose crossbred cattle.**

Gen	Secuencia del oligonucleótido (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>hsp60</i>	F- GCGCTAAACTTGTTC AAGATGTTGC	159	65
	R- CTAACATCACACCTCTCCTGATTTC		
	P- CGGGGGATGGCACC ACTACTGCT		
<i>hsp90</i>	F- TGCAGGAGGGTCC TTCACAG	102	65
	R- CTCCAGGTACTCAGTCTGGTC		
	P- CACAGGAGAACCAATGGGACGTGGAA		
<i>hsp70</i>	F- CGAAAAACATGGCTATCGGCATC	135	62
	R- CTACGTGGCCTTACC GATAAC		
	P- GTTCCAGCACGGCAAGGTGGAGATC		
$\beta$ -actina	F- ACTCGTACGTGGGGGATGAG	94	62 y 65
	R- TCCATGTTCGTCCAGTTGGTG		
	P- GAGAGGCATCCTGACCCTCAAGTAC		

F: iniciador sentido, R: iniciador antisentido, P: sonda.

de covarianzas que causó el mejor ajuste en el modelo. La comparación de medias se realizó con la prueba de comparaciones múltiples de t protegida de Fisher.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio de la frecuencia respiratoria, la temperatura corporal y la expresión de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* de los bovinos Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú, en lactación y horras, se muestran en la Tabla 3.

Los valores mínimo, máximo y promedio para el ITH fueron 72,64, 77,24 y 74,81 para las mediciones realizadas en la mañana y 81,83, 91,03 y 86,58 para las mediciones realizadas durante las tardes, respectivamente. Los ITH observados en las mañanas se pueden considerar como moderados y los observados en las tardes como severos.

La estructura de covarianza que dio el mejor ajuste de los datos, basado en los criterios de información de ajuste de Akaike, de segundo orden y bayesiano de Schwarz, fue la autorregresiva de primer orden. Los niveles de significancia de los efectos considerados en los diferentes modelos se presentan en la Tabla 4. El efecto del periodo del día (AM o PM) fue importante para *hsp60* y *hsp70*, temperatura corporal y frecuencia respiratoria, el grupo racial lo fue para *hsp70* y la condición fisiológica (en ordeña o horra) para *hsp90*.

Las medias de cuadrados mínimos y errores estándar para los efectos considerados en los modelos se presentan en la Tabla 5. Las medias de la expresión de los genes estudiados presentaron diferencia entre la mañana y la tarde, con excepción del gen *hsp90*, cuya diferencia fue menor. Los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* tuvieron mayor expresión en los animales donde el porcentaje de genes *Bos taurus* fue mayor (0,75). Sin embargo, esta diferencia fue significativa únicamente para el gen *hsp70*. La producción de leche de las vacas HO-x y de las SP-x en ordeña fue de  $7,70 \pm 2,14$  y  $8,20 \pm 1,81$  en la mañana y  $3,73 \pm 1,05$  y  $4,08 \pm 1,36$

Tanto la temperatura corporal como la frecuencia respiratoria fueron mayores en la tarde que en la mañana ( $p < 0,001$ ). El valor medio de la frecuencia respiratoria, durante la tarde, se encuentra elevado, pero dentro de los valores normales para un bovino coincidiendo con lo reportado por Amamou et al. (2019) en vacas Holstein bajo condiciones termoneutrales. El valor medio de la temperatura corporal se encuentra dentro de los valores estimados normales, sin embargo, la temperatura corporal durante el periodo de la tarde concuerda con la temperatura rectal observada en ganado bajo condiciones de estrés calórico (Dalcin et al., 2016; Amamou et al., 2019; Ouellet et al., 2021).

Los valores de expresión del gen *hsp70* que se muestran en el Tabla 5 concuerdan con lo hallado en diferentes estudios realizados en distintas

Tabla 3. Estadísticas descriptivas de las variables estudiadas.

Table 3. Descriptive statistics of the studied variables.

Variable	N	Media	DE	Mínimo	Máximo
Frecuencia respiratoria	62	24,38	2,62	19,00	29,00
<i>hsp60</i>	59	1,23	2,40	0,01	12,55
<i>hsp70</i>	60	0,64	1,30	0,00	5,51
<i>hsp90</i>	54	1,04	2,92	0,01	18,98
Temperatura corporal	55	38,69	1,07	36,10	40,45

Tabla 4. Niveles de significancia (p) para los efectos incluidos en los modelos de análisis de *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*.

Table 4. Significance levels (p) for the effects included in the *hsp60*, *hsp70* and *hsp90* analysis models.

Efecto	P				
	<i>hsp60</i>	<i>hsp70</i>	<i>hsp90</i>	Temperatura corporal	Frecuencia respiratoria
Periodo del día	<0,001	0,01	0,19	<0,0001	<0,001
Porcentaje de genes	0,41	0,48	0,07	0,58	0,72
Grupo racial	0,07	0,02	0,95	0,47	0,90
Condición fisiológica	0,74	0,86	0,01	0,74	0,20

**Tabla 5. Medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para la expresión relativa normalizada de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*, y temperatura corporal y frecuencia respiratoria en vacas de doble propósito por efecto incluido en el modelo estadístico.**

**Table 5. Least square means and their standard errors for normalized relative expression of *hsp60*, *hsp70* and *hsp90* genes, and body temperature and respiratory rate in dual-purpose cows by effect included in the statistical model.**

Efecto	<i>hsp60</i>	<i>hsp70</i>	<i>hsp90</i>	Temperatura corporal	Frecuencia respiratoria
Periodo del día					
AM	1,61 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,18 <sup>a</sup>	37,96 ± 0,16 <sup>a</sup>	23,13 ± 0,39 <sup>a</sup>
PM	0,96 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	39,45 ± 0,11 <sup>b</sup>	25,64 ± 0,43 <sup>b</sup>
Porcentaje de genes					
0,625	0,95 ± 0,61 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	38,66 ± 0,13 <sup>a</sup>	24,31 ± 0,39 <sup>a</sup>
0,750	1,63 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,26 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,13 <sup>a</sup>	38,75 ± 0,12 <sup>a</sup>	25,64 ± 0,43 <sup>a</sup>
Grupo racial					
Ho-x	0,45 ± 0,53 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,14 <sup>a</sup>	38,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	24,44 ± 0,44 <sup>a</sup>
SP-x	2,13 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,12 <sup>a</sup>	38,64 ± 0,14 <sup>a</sup>	24,26 ± 0,32 <sup>a</sup>
Estado fisiológico					
Horra	1,15 ± 0,59 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,12 <sup>a</sup>	38,68 ± 0,14 <sup>a</sup>	23,99 ± 0,45 <sup>a</sup>
Lactando	1,43 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,13 <sup>b</sup>	38,74 ± 0,12 <sup>a</sup>	24,71 ± 0,32 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Medias con distinta literal son diferentes ( $p < 0,05$ ). Ho-x: Holstein x Cebú, SP-x: Suizo Pardo x Cebú.

razas bovinas y búfalos que comparaban la expresión de los genes *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* frente a estrés calórico (Kumar et al., 2015; Hu et al., 2016; Hooper et al., 2019; Shandilya et al., 2020; Guzmán et al., 2023). No obstante, también se ha demostrado una expresión mayor del gen *hsp60* durante el golpe de calor, mientras éste aumentaba, la expresión de los genes *hsp70* y *hsp90* disminuía (Hooper et al., 2019).

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

El gen *hsp70* se ha identificado como un mejor indicador de estrés calórico que el gen *hsp90* debido al poco o nulo aumento de su expresión durante eventos de estrés calórico (Kumar et al., 2018). Se ha sugerido que la expresión del gen *hsp70* es importante para la protección prolongada de las células y que a nivel celular está asociada con el desarrollo de la tolerancia, debido a que se sintetiza rápidamente bajo situaciones de estrés calórico (Hu et al., 2016). Animales menos adaptados muestran una expresión mayor de este gen, por lo que puede ser utilizado como un indicador de animales con mayor capacidad de

adaptabilidad (Bretanha et al., 2019).

Se ha observado en búfalos Murrah (*Bubalus bubalis*) en clima subtropical en la India que el gen *hsp70* presentó una expresión mayor en verano que en invierno y primavera. Se observaron mutaciones en el gen que tenían influencia en la regulación de la expresión de éste, las cuales pueden afectar diferentes características de importancia económica. Dichas características pueden ser la tolerancia al calor, parámetros productivos y reproductivos. Se pueden utilizar estos marcadores como criterio de selección para aumentar la productividad durante la comparación de sementales. Estas mutaciones también se han encontrado en ganado *Bos taurus* (Angus), *Bos indicus* (Brahman) y sus cruza, indicando que es heredable (Kumar et al., 2019).

Las proteínas de estrés y sus polimorfismos se han asociado con el descenso de la fertilidad. Se ha detectado la expresión de *hsp* en gametos y embriones lo cual sugiere que la expresión de los genes *hsp* está relacionada con la viabilidad del embrión y por lo tanto que éste llegue a término. A pesar de ser una respuesta inducida por el estrés, se han encontrado cantidades de proteína *hsp70* en muestras de suero provenientes de vacas que se encontraban bajo condiciones normales y libres de cualquier tipo de estrés de diferentes edades. Se ha sugerido durante el desarrollo de los gametos que estos se encuentran expuestos a condiciones no idóneas durante el proceso de maduración, generando ovocitos

dañados, lo cual podría disminuir su índice reproductivo (Rosenkrans et al., 2010). Asimismo, se ha demostrado que los embriones de ganado Brahman tienen mejor índice de supervivencia ante la exposición a altas temperaturas que los embriones de las razas Angus y Holstein debido a los mecanismos de la raza a nivel celular para evitar los efectos deletéreos causados por el estrés calórico (Paula-Lopes et al., 2003).

A pesar de que el método estándar para la obtención de las concentraciones de los genes de *hsp* de la sangre es el PCR, también se han estudiado otros métodos como la identificación del gen *hsp70* en la saliva de vacas lecheras, encontrando que las vacas que tenían mayor producción de leche y que fueron expuestas a estrés calórico presentaban mayor concentración que las vacas con menor producción de leche y expuestas a las mismas condiciones climáticas. El uso de la saliva para la identificación del gen lo vuelve un método no invasivo que se puede utilizar en futuras investigaciones (Lamy et al., 2017).

## CONCLUSIONES

La expresión de los genes *hsp60* y *hsp70* en bovinos Holstein x Cebú y Suizo Pardo x Cebú, en lactación y horras, en un sistema de producción de doble propósito en el trópico de México presentó diferencias entre las mediciones en mañana y la tarde. Los animales con mayor porcentaje de genes *Bos taurus* (0,75) mostraron mayor expresión de los genes *hsp60* y *hsp90*. No se encontraron diferencias en la expresión de estos genes de entre animales cruzados con Holstein o Suizo Pardo.

Los resultados indican que la expresión de los genes *hsp* es un buen indicador para identificar bovinos de doble propósito termotolerantes bajo condiciones de trópico húmedo, lo cual tendría como consecuencia menos efectos negativos por el aumento de las temperaturas y mayores índices de productividad en los hatos. Este tipo de mediciones potencialmente podrían incorporarse en programas de mejoramiento genético relacionados con tolerancia al estrés calórico.

## LITERATURA CITADA

Alves, J.R.A., T.A. Adriano De Andrade, D. De Medeiros Assis, T.A. Gurjão, L.R. Bezerra De Melo, and B.B. De Souza. 2017. Productive and reproductive performance, behavior and physiology of cattle under heat stress conditions. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 5(3): 91-96.

- Amamou, H., Y. Beckers, M. Mahouachi, and H. Hammami. 2019. Thermotolerance indicators related to production and physiological responses to heat stress of holstein cows. *Journal of Thermal Biology* 82: 90-98.
- Bernabucci, U. 2019. Climate change: impact on livestock and how can we adapt. *Animal Frontiers* 9(1): 3-5. doi: <https://doi.org/10.1093/af/vfy039>
- Bharati, J., S.S. Dangi, S. Bag, V.P. Maurya, G. Singh, P. Kumar, et al. 2017. Expression dynamics of HSP90 and nitric oxide synthase (NOS) isoforms during heat stress acclimation in Tharparkar cattle. *International Journal of Biometeorology* 61(8):1461-1469. doi: 10.1007/s00484-017-1323-37
- Bretanha, F., M.M. Renata, A. de Cássia, I.C. Gervásio, A.M. Guaratini, T.R. Santos, et al. 2019. Differential expression of HSF1 and HSPA6 genes and physiological responses in Angus and Simmental cattle breeds. *Journal of Thermal Biology* 84:92-98. doi: 10.1016/j.jtherbio.2019.06.002
- Cardoso, C.C., V. Peripolli, S.A. Amador, E.G. Brandão, G.I.F. Esteves, C.M.Z. Sousa, et al. 2015. Physiological and thermographic response to heat stress in zebu cattle. *Livestock Science* 182: 83-92. doi: 10.1016/j.livsci.2015.10.022
- Dalcin, V.C., V. Fischer, D. dos S. Daltro, E.P.M. Alfonzo, M.T. Stumpf, G.J. Kolling, M.V.G.B. Da Silva, C. and McManus. 2016. Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* 45(8): 458-465. doi: <https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000800006>
- Guzmán, L., F. Villaseñor, V. Vega, S. Roman, y M. Bermúdez. 2019. Expresión del gen *hsp60* en bovinos simbrah expuestos a estrés calórico en el trópico mexicano. XII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para Las Américas y El Caribe. Uruguay.
- Guzman, L., G. Martinez, F. Villaseñor, J. Fránquez, A. Utrera, M. Bermúdez, et al. 2021. Expresión del gen *hsp60* en bovinos simbrah expuestos a estrés calórico en el trópico mexicano. LVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México. [https://www.researchgate.net/publication/356694462\\_EXPRESION\\_DEL\\_GEN\\_HSP60\\_EN\\_BOVINOS\\_SIMBRAH\\_EXPUESTOS\\_A\\_ESTRES\\_CALORICO\\_EN\\_EL\\_TROPICO\\_MEXICANO](https://www.researchgate.net/publication/356694462_EXPRESION_DEL_GEN_HSP60_EN_BOVINOS_SIMBRAH_EXPUESTOS_A_ESTRES_CALORICO_EN_EL_TROPICO_MEXICANO)
- Guzmán, L., G. Martinez-Velázquez, F. Villaseñor-González, V. Vega-Murillo, J. Palacios-Fránquez, A. Utrera, et al. 2023. Expression of heat shock protein genes in Simmental cattle exposed to heat stress. *Animal Bioscience* 35(5): 704-709. doi: 10.5713/ab.22.0266.

- Hooper, H.B., C.G. Titto, A.M. Gonella-Díaz, F.L. Henrique, L.F. Pulido-Rodríguez, A.L.S. Longo, et al. 2019. Heat loss efficiency and HSPs gene expression of Nellore cows in tropical climate conditions. *International Journal of Biometeorology* 63(11):1475–1486. doi: 10.1007/s00484-018-1576-5
- Hu, H., Y. Zhang, N. Zheng, J. Cheng, and J. Wang. 2016. The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. *Animal Science Journal* 87(1): 84–91. doi: 10.1111/asj.12375
- Hyder, I., V. Sejian, R. Bhatta, and J.B. Gaughan. 2017a. Biological role of melatonin during summer season related heat stress in livestock. *Biological Rhythm Research* 48(2):297–314. doi: 10.1080/09291016.2016.1262999
- Hyder, I., M. Pasumarti, P.R. Reddy, C.S. Prasad, K.A. Kumar, and V. Sejian. 2017b. Thermotolerance in Domestic Ruminants: A HSP70 Perspective. p. 3–35. doi:10.1007/978-3-319-73377-7\_1
- Kim, W.S., J.G. Nejad, S.G. Roh, and H.G. Lee. 2020. Heat-shock proteins gene expression in peripheral blood mononuclear cells as an indicator of heat stress in beef calves. *Animals* 10(5): 895. doi: 10.3390/ani10050895
- Kumar, A., S. Ashraf, T.S. Goud, A. Grewal, S.V. Singh, B.R. Yadav, et al. 2015. Expression profiling of major heat shock protein genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic condition. *Journal of Thermal Biology* 51: 55–64. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.03.006
- Kumar J, A.K Madan, M. Kumar, R. Sirohi, B. Yadav, A.V. Reddy, and D.K. Swain. 2018. Impact of season on antioxidants, nutritional metabolic status, cortisol and heat shock proteins in haryana and sahiwal cattle. *Biological Rhythm Research* 49(1):29–38. doi: 10.1080/09291016.2017.1332842
- Kumar, B., A.K. Sahoo, S. Dayal, A.K. Das, S. Taraphder, S. Batabyal, et al. 2019. Genetic profiling of Hsp70 gene in Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) under sub-tropical climate of India. *Cell Stress and Chaperones* 24(6):1187–1195. doi: 10.1007/s12192-019-01042-7
- Lamy, E., V. Jurkovich, L. Rodrigues, A. Geraldo, L. Cachucho, F. Silva, et al. 2017. Detection of 70 kDa heat shock protein in the saliva of dairy cows. *Journal of Dairy Research* 84(3): 280–282. doi: 10.1017/S0022029917000280
- Ouellet, V., I.M. Toledo, B. Dado-Senn, G.E. Dahl, and J. Laporta. 2021. Critical temperature-humidity index thresholds for dry cows in a subtropical climate. *Frontiers in Animal Science* 2: 706636. doi: 10.3389/fanim.2021.706636
- Paula-Lopes, F.F., C.C. Jr. Chase, Y.M. Al-Katanani, C.E. 3rd Krininger, R.M. Rivera, S. Tekin, et al. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 125(2):285–294. doi: 10.1530/rep.0.1250285
- Rosenkrans, C., A. Banks, S. Reiter, and M. Looper. 2010. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. *Animal Reproduction Science* 119(3–4): 178–182. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.02.005
- Sarıçiçek, Z. 2022. The effects of climate change on animal nutrition, production and product quality and solution suggestions. *Black Sea Journal of Agriculture* 5(4): 491–509. doi: <https://doi.org/10.47115/bsagriculture.1169680>
- SAS. Statistical Analysis System. SAS User's guide. SAS/STAT R, Version 9.3. Cary, NC, USA; SAS Institute Inc., 2011.
- Shandilya, U.K., A. Sharma, M. Sodhi, and M. Mukesh. 2020. Heat stress modulates differential response in skin fibroblast cells of native cattle (*Bos indicus*) and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Bioscience Reports* 40(2). doi: 10.1042/BSR20191544
- Singh, P., B. Unik, A. Puri, G. Nagpal, B. Singh, A. Gautam, and D. Sharma. 2020. HSPMdb: A computational repository of heat shock protein modulators. *Database* 2020. doi: 10.1093/database/baaa003
- Tripathy, K., M. Sodhi, R.S. Kataria, M. Chopra, and M. Mukes. 2021. In silico analysis of HSP70 Gene family in bovine genome. *Biochemical Genetics* 59(1): 134–158. doi: 10.1007/s10528-020-09994-7