

POLIMORFISMO DEL *LOCI PRLR* y *Hsp70-1* EN BOVINO CRIOLLO DEL GOLFO Y SIMMENTAL, EN VERACRUZ, MÉXICO

Submitted: 05/10/2022

Accepted: 04/02/2023

Published: 20/06/2023

POLYMORPHISM OF *LOCI PRLR* and *Hsp70-1* IN GULF CREOLE CATTLE AND SIMMENTAL, IN VERACRUZ, MEXICO

Cervantes P.¹, Hernández A.^{1*}, Romero L.A.¹, Domínguez B.¹, Barrientos M.¹¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.*anhernandez@uv.mx.

The increase in cattle production in rural areas has given rise to the massive introduction of productively superior breeds, where traditionally there were native breeds. Decisions that gave rise to the loss of important genetic material, both from a biological and economic point of view, because indigenous breeds have a better capacity to adapt to adverse climatic environments for their development. In the state of Veracruz, a group of Barcinos bovines, also called brindle, was found in shades of black and red, with short, shiny, sparse fur, which is that observed in bovines adapted to the tropical climate, in addition to meeting the morphological characteristics of *Bos taurus*, characteristic of the Criollo Cattle of the Gulf of Mexico (BCG). Short slippery hair (Slick) is a trait associated with a C/T substitution mutation of the prolactin receptor gene (*PRLR*) located in cattle adapted to the tropics, descended from Creole cattle that arrived with the Spanish colonization in the New World. While the *Hsp70-1* gene is associated with the synthesis of the chaperone protein *HSP70* with cytoprotective action against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heat stroke. The objective is to lay the foundations for a selection program associated with thermotolerance, with the genotypic characterization of the *loci PRLR* and *Hsp70-1*, in BCG and Simmental cattle (SIM), located in a Dual-Purpose Cattle Production Unit in the state of Veracruz. DNA from 46 bovines, 38 of the BCG breed and 8 of the Simmental (SIM) breed, was used to amplify by the ARMS-PCR technique fragments of the *PRLR* gene with the marker SNP-20:39136666 (322 bp, 206 bp/C, and 172 bp/T). From the *Hsp70-1* gene (Grosz et al., 1994), a 441 bp fragment was amplified by PCR-RFLP/Fok I. In both breeds, the frequency of the T *PRLR* allele was higher (0.98), which is interpreted as non-polymorphic, related to the homozygous TT genotype in the 38 BCG, with a frequency of 1.0 of the T allele, strongly associated with the phenotype of the Slick hair, which provides high thermotolerance, considered a product of natural selection in tropical regions; the frequency of the TT genotype in SIM cattle was 0.75 and of the GT 0.25, with a predominance of the T allele (0.875). For *Hsp70* in BCG, the frequency of the AA genotype was 0.39 and AB 0.61, with a predominance of the A allele (0.70). While in the SIM breed, the heterozygous AB (1.0) genotype predominated. The A allele of *Hsp70* is associated with thermotolerance, expressed in normal physiological constants under heat stress conditions. Both genes showed polymorphism in the two groups analyzed and were characterized by presenting the T/*PRLR* and A/*Hsp70* alleles in greater frequency, which are the ones that favor the opportunity to select animals by manipulating this type of markers to regulate the tolerance of the cattle to thermal stress under humid tropic conditions.

Resumen

El incremento de producción ganadera bovina en zonas rústicas ha dado lugar a la introducción masiva de razas productivamente superiores, donde tradicionalmente había razas autóctonas.

Decisiones que dieron lugar a la pérdida de material genético importante, tanto desde el punto de vista biológico como económico, debido a que las razas autóctonas poseen mejor capacidad de adaptación a medios climáticos adversos para su desarrollo. En el

Keywords: Local breeds; Biodiversity; Slick hair coat.

Palabras clave: Razas autóctonas; Biodiversidad; Pelo corto liso.



Actas Iberoamericanas de
Conservación Animal

ISSN: 2253-9727

<https://aicarevista.jimdo.com>

estado de Veracruz se localizó un grupo de bovinos Barcinos llamados también atigrados en tonos negro y rojo, con pelaje corto, lustroso y ralo, que es el observado en bovinos adaptados al clima tropical, además de cumplir con las características morfológicas de *Bos taurus*, característico del Bovino Criollo del Golfo de México (BCG). El pelo corto resbaladizo (Slick) es un rasgo asociado a una mutación por sustitución de C/T del gen del receptor de prolactina (*PRLR*) localizado en el ganado adaptado al trópico, descendiente de bovinos criollos llegados con la colonización española al Nuevo Mundo. Mientras que, el gen *Hsp70-1* se asocia a las síntesis de la proteína chaperona *HSP70* con acción citoprotectora contra hipertermia, shock circulatorio e isquemia cerebral durante golpe de calor. El objetivo es sentar las bases de un programa de selección asociado a termotolerancia, con la caracterización genotípica del locus de *PRLR* y *Hsp70-1*, en ganado BCG y Simmental (SIM), localizados en una Unidad de Producción de Bovinos de Doble Propósito del estado de Veracruz. Se utilizó ADN de 46 bovinos, 38 de raza BCG y 8 de raza Simmental (SIM) para amplificar por la técnica ARMS-PCR, fragmentos del gen *PRLR* con los marcadores SNP-39136666 (322 pb, 206 pb/C y 172 pb/T). Del gen *Hsp70-1* (Grosz et al., 1994), se amplificó por PCR-RFLP/*Fok I*, un fragmento de 441 pb. En ambas razas, la frecuencia del alelo T *PRLR* fue mayor (0,98), que se interpreta como no polimórfico, relacionada al genotipo TT homocigoto en los 38 BCG, con frecuencia del 1,0 del alelo T, asociado fuertemente al fenotipo del pelo Slick, el cual provee alta termotolerancia, considerada producto de selección natural en las regiones tropicales; la frecuencia del genotipo TT en los bovinos SIM fue de 0,75 y del GT 0,25, con predominio del alelo T (0,875). Para *Hsp70-1* en los BCG la frecuencia del genotipo AA fue de 0,39 y AB 0,61, con predominio del alelo A (0,70). Mientras que en la raza SIM predominó el genotipo heterocigoto AB (1,0). El alelo A de *Hsp70-1* se asocia a termotolerancia, expresada en constantes fisiológicas normales en condiciones de estrés por calor. Ambos genes mostraron polimorfismo en los dos grupos analizados y se caracterizaron por presentar a los alelos T/*PRLR* y A/*Hsp70-1* en mayor frecuencia, que son los que favorecen la oportunidad de seleccionar animales mediante manipulación de este tipo de marcadores para regular la tolerancia del ganado al estrés térmico en condiciones del trópico húmedo.

Introducción

En los sistemas ganaderos se apuesta a la adaptación genética mediante selección de animales con rasgos que abarquen factores genéticos y no genéticos, de estos últimos sobresalen los factores estresantes que en un animal capaz de adaptarse puede reflejar respuestas de compensación a expensas del rendimiento productivo. Algunas medidas de adaptación en bovinos se refieren a las morfológicas tales como poseer el gen Slick que confiere características de pelo corto, liso, delgado y de color claro para mejor disipación del calor, ya sea por enfriamiento conductivo,

convectivo e irradiativo en la interfase pelo-piel, impactando en consecuencia la temperatura corporal (Davila, 2020) y como principal capa de protección frente a efectos directos de la radiación solar; asimismo, se presenta que la densidad de las glándulas sudoríparas y la tasa de sudoración están directamente asociada a termotolerancia. Es conocido también que la expresión del ARNm de las proteínas de choque térmico tal como *HSP70* permite cuantificar el impacto factores estresantes como la exposición a estrés por calor y que el polimorfismo del gen que la regula posee un papel importante en la tolerancia al calor del ganado (Gaughan et al., 2019; Monroy, 2019).

Las regiones tropicales por la variabilidad de sus ecosistemas y características climáticas, se consideran fuente importante en la producción de alimentos, sin embargo, la incertidumbre del efecto de alteraciones del clima adversos sobre la producción de ganado, lleva a investigar acerca del análisis y la comprensión de la respuesta animal y las estrategias de manejo, así como, la selección de ejemplares con genes que les permitan buena respuesta de adaptación y mitigación para mantenerse productivos, por la consideración de que son en la mayoría de los casos, la principal fuente de ingresos de los productores ganaderos en los países en desarrollo y, sin lugar a dudas, ahora en las regiones templadas y ambientalmente favorables, deberán establecer a corto y mediano plazo estrategias de mitigación ante el impacto del cambio climático. La investigación que hace décadas se hace para genes de termotolerancia no pierde vigencia, las diversas razas de ganado en los diversos ambientes climáticos donde se crían requieren contar con información actualizada para realizar la selección de animales con rasgos no sólo productivos sino de resistencia al calor, enfermedades y adaptación fisiológica, que incluyan mejores programas asertivos de mitigación, manejo nutricional, reproductivo y ambiental ante lo cambiante del clima y el compromiso de la seguridad alimentaria.

Es conocido que el ganado adaptado tropicalmente mantiene su capacidad de tolerar el estrés térmico, sin perder la capacidad de producción láctea, reproducción y resistencia a enfermedades. El estrés por calor es uno de los determinantes ambientales más significativos que limitan la productividad del ganado, y que, en las regiones tropicales, enfatiza sus efectos debido al elevado índice de humedad. Debido a las variaciones presentes y a futuro, surge cada vez la preocupación de realizar estudios que permitan seleccionar animales con mayor capacidad de adaptación para mejorar la productividad y desarrollo pese a condiciones ambientales adversas (Hernández et al., 2018). Se utilizan diversos marcadores genéticos para la selección de animales o razas adaptadas como es el caso del gen *Hsp70-1* que regula la síntesis de las proteínas HSP (Heat shock proteins, por sus siglas en inglés), que se activan cuando las células están expuestas a diversas condiciones de estrés y su polimorfismo se asocia al rasgo de termotolerancia. La activación y aumento en la producción de proteínas *HSP70* son esenciales para mantener la

homeostasis proteica y el correcto funcionamiento celular ante situaciones estresantes (Boopathy et al., 2022). Las *Hsp70* son una subfamilia altamente conservada que actúan contra el daño por calor protegiendo a la célula de la apoptosis, previniendo la desnaturalización y en la eliminación de proteínas mal plegadas, por lo que su alto nivel de expresión indica una mayor tolerancia térmica (Abdelnour et al., 2019). La caracterización y polimorfismo del gen que regula la síntesis de las *Hsp70-1*, se emplea como marcador genético que puede ser utilizado en el proceso de selección de razas termotolerantes (Archana et al., 2017). De entre las características fenotípicas de termotolerancia, se atribuye a la capa de pelo liso (SLICK) un papel importante en algunas razas adaptadas, este rasgo se considera producto de la selección natural, así como del criterio moderno de selección para muchos criadores en climas tropicales y subtropicales (Huson et al., 2014). El fenotipo de pelo liso en el ganado se debe a una serie de mutaciones en el receptor de prolactina (*PRLR*) que surgieron en bovinos tipo Criollo. Las mutaciones provocan el truncamiento de la región C terminal de la proteína involucrada en la activación de STAT5 durante la señalización de la prolactina. El pelo SLICK se describe como un pelaje muy corto y elegante que se observa principalmente en el ganado *Bos taurus* tropical de ascendencia criolla en América Central y del Sur en comparación con el pelaje más largo comúnmente observado de *Bos taurus* de otras zonas climáticas. Está documentado que, a causa de sus adaptaciones genéticas y fisiológicas, las razas de ganado autóctonas presentan una mejor capacidad de adaptabilidad (Rojas-Downing et al., 2017), y que en ganado de zonas tropicales y subtropicales, este tipo de pelo se relaciona a capacidad termorreguladora, productividad y defensa contra ectoparásitos (Landaeta et al., 2021). Un estudio en vaquillas Criollo Limonero Venezolano que portan una mutación del gen *PRLR* con el fenotipo de pelo liso y un grupo con pelo normal, evaluaron la respuesta de variables fisiológicas a estrés por calor y encontraron que fenotipo pelo liso influyó en la frecuencia respiratoria, temperatura rectal y el recuento de linfocitos, y exhibieron los valores más bajos que las de pelo normal y que en el caso del fenotipo pelo liso la capacidad de pérdida de calor es más eficiente tanto por los rasgos particulares de la piel, como la longitud y el color del pelo, el tamaño más grande de las glándulas sudoríparas y el aumento de la irrigación sanguínea de la piel (Landaeta-Hernández et al. 2011; Landaeta et al., 2021). Por lo expuesto, el objetivo fue caracterizar las frecuencias genotípicas del locus de *PRLR* y *Hsp70-1*, en ganado BCG y Simmental (SIM) que permitan sentar las bases de un programa de selección asociada a termotolerancia y el loci estudiado.

Material y métodos

El estudio incluyó 46 bovinos sanos, 38 de raza BCG y 8 de raza Simmental (SIM) criados en las mismas condiciones ambientales de los BCG, localizados en una Unidad de Producción de Bovinos de Doble Propósito del estado de Veracruz. Para la extracción de ADN

se utilizó el Kit de purificación genómica Wizard Genomic DNA (Promega®) desde sangre entera extraída por venopunción coccígea en tubos con anticoagulante EDTA (7.2 mg) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El análisis del polimorfismo del gen *Hsp70-1* fue por Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) con los oligonucleótidos específicos (Forward 5'-CCGGCCTACTTCAACGACTC-3' y Reverse 5'-CAAGCTCCCGTAGCTGAAGA-3') (Grosz et al., 1994), para obtener un fragmento de 441 pb (Lamb et al., 2006). El genotipado del gen *PRLR* fue por la técnica de tetra primer ARMS-PCR, los cebadores internos en concentración 15 pmol fueron: Forward (alelo C, 206 pb) 5'-AAGCCTGACCAAGACACGGTGTGGCAAC-3', Reverse (Alelo T, 172 pb) 5'-AGATCAAGGGGGTTTTGTCTTGGGGGCA-3'; los cebadores externos en concentración 2.5 pmol Forward externo 5'-ACCACAGCCACTTCGCTGGACCAAACAG-3' y Reverse externo 5'-CAGGATGTTGCTATCTGTCACCCGGGA-3', para un fragmento común de 322 pb. (Faza et al., 2021). Cada reacción tuvo un volumen final de 35 µl, compuesto por 5 µl de ADN, 17.5 µl de GoTaq Green Master Mix Kit (Promega®), 1 µl de cada oligonucleótido (Forward y Reverse) y 10.5 µl de agua libre de nucleasas. Se utilizó un control negativo con cada ensayo. El protocolo de amplificación por PCR para el gen *Hsp70-1* fue de acuerdo con Lamb et al. (2006) y de Faza et al. (2021), para *PRLR*. El amplicón *Hsp70-1* de 441 pb se sometió a digestión con la enzima de restricción *Fok I*/37°C, el tamaño de los fragmentos obtenidos fue: 441 pb fragmento del gen no alélico (pb), fragmentos por sitios de restricción de 172 y 269 pb. El genotipo AA corresponde a 172 y 269 pb; genotipo BB 441 pb -fragmento sin digerir y genotipo AB 440, 172 y 269 pb. En ambos genes la amplificación y tamaño del amplicón se comprobó electroforesis en gel de agarosa al 2 % y el producto digerido por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, (Bromuro de etidio (0.5 µl/100 ml de TBE 1X) y marcador de peso molecular pBR322 DNA-*Msp I* Digest (NEB®). Se utilizó un control negativo con cada ensayo. Las frecuencias génicas y genotípicas del loci se estimaron por conteo directo.

Resultados y discusión

Con el método de RFLPs de *Hsp70-1* se obtuvieron fragmentos de un solo sitio de restricción que generó los dos fragmentos esperados de 172 y 269 pb para el alelo B, el alelo A no tuvo ningún sitio de restricción quedando un fragmento completo de 441 pb. En los BCG las frecuencias genotípicas fueron AA con 0,39 y de AB 0,61, con predominio del alelo A (0,70). En la raza SIM se encontró el genotipo heterocigoto AB (1,0). La expresión del gen *Hsp70-1* con rasgos de adaptación en el ganado bovino le convirtió en un biomarcador con implicaciones significativas en el desarrollo de genotipos tolerantes al calor y al frío en el contexto del cambio climático y se considera al alelo A el que favorece la

termotolerancia, expresada en constantes fisiológicas normales en condiciones de estrés por calor (Osei-Amponsah et al., 2019). Del locus *PRLR* en ambas razas se obtuvo frecuencia del alelo T mayor (0,98), que se interpreta como no polimórfico, este valor se relacionó a que el genotipo de los 38 BCG fue homocigoto TT, con frecuencia del 1,0 del alelo T, mientras que la frecuencia del genotipo TT en los bovinos SIM fue de 0,75 y del GT 0,25, con predominio del alelo T (0,875). El alelo T se asocia fuertemente al fenotipo del pelo Slick, el cual provee alta termotolerancia y que se considera producto de selección natural en las regiones tropicales (Faza et al., 2021), aunque otros autores mencionan que aunque los portadores de la variante Slick tienen una temperatura central más baja que los contemporáneos que no son Slick, esto podría deberse más a una mayor producción de sudor que a la longitud reducida y densidad del pelo, además de que en diversas razas criollas analizadas se han encontrado hasta seis variantes de mutaciones del gen *PRL-R* con la capacidad de crear codones de terminación prematuros y aumentar la tolerancia al calor. (Passamonti et al., 2021). En el ganado Simmental se encontró al comparar con otras razas europeas, que, aunque es menos termotolerante que las razas cebuinas, en condiciones de estrés por calor expresan respuestas fisiológicas tales como frecuencia respiratoria y temperaturas corporal y rectal menores y de las moleculares, mejor expresión del gen *HSPA6* (*Hsp70-1*), por lo que esta raza se consideró fisiológicamente adaptada en las condiciones de clima subtropical (Rocha et al., 2019). En esta investigación ambos genes mostraron el polimorfismo deseado en los dos grupos analizados que se caracterizó por presentar a los alelos *T/PRLR* y *A/Hsp70-1* en mayor frecuencia, que alienta a la oportunidad de seleccionar animales mediante manipulación de este tipo de marcadores para regular la tolerancia del ganado al estrés térmico en condiciones del trópico húmedo.

Conclusiones

El ganado analizado en esta investigación aporta información de genotipos favorables del gen *SLICK* y *Hsp70-1*, que deberá complementarse con la respuesta fisiológica animal en diferentes condiciones de temperatura y humedad, mayor población y comparaciones entre las diferentes razas utilizadas en la ganadería de la zona de estudio considerada trópico húmedo. La identificación del alelo T sienta las bases para la selección de bovinos de la raza Romosinuano con rasgos de tolerancia al calor en clima tropical.

Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración del personal administrativo y demás trabajadores de la Empresa Santa Rita y de la UPP "Rancho Palmira" de Veracruz, México.

Bibliografía

- Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Taha, A. E. y Noreldin, A. E. (2019). Stress biomarkers and proteomics alteration to thermal stress in ruminants: A review. *Journal of Thermal Biology*, 79: 120–134. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2018.12.013>.
- Archana, P. R., Aleena, J., Pragna, P., Vidya, M. K., Niyas, A. P. A., Bagath, M. y Bhatta, R. (2017). Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *J Dairy Vet Anim Res*, 5(1): 1-8.
- Boopathy, L. R. A., Jacob-Tomas, S., Alecki, C., & Vera, M. (2022). Mechanisms tailoring the expression of heat shock proteins to proteostasis challenges. *Journal of Biological Chemistry*, 101796.
- Davila, K. M. S. (2020). Genetic Dissection of Thermotolerance in Beef Cattle (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Faza, D. R. L. R., Pereira, H. P., Egito, A. A., Torres Júnior, R. D. A., Kim, E. S., Sonstegard, T. S., ... & Machado, M. A. (2021). Development of tetra-primer ARMS-PCR protocol to genotype the prolactin receptor SNP 39136666 and assessment of this SNP in Brazilian locally adapted cattle breeds. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73, 534-538.
- Gaughan, J. B., Sejian, V., Mader, T. L., & Dunshea, F. R. (2019). Adaptation strategies: ruminants. *Animal Frontiers*, 9(1), 47-53.
- Grosz, M. D., Skow, L. C., and Stone, R. T. (1994). An *AluI* polymorphism at the bovine 70 kD heat shock protein-1 (*HSP70-1*) locus. *Anim. Genet.* 25:196.
- Hernández Beltrán Antonio, Cervantes Acosta Patricia, Domínguez Mancera Belisario, Barrientos Morales Manuel y García Ramírez Pedro J. 2018. Confort térmico reducido en vacas de lechería tropical en Veracruz. En: Compendio de Trabajos Presentados en el 6º Simposio Internacional de Bienestar Animal y 1º de Bioética y Etología Animal. Editorial CBBA. CD. México.
- Huson, H. J., Kim, E. S., Godfrey, R. W., Olson, T. A., McClure, M. C., Chase, C. C., ... & Sonstegard, T. S. (2014). Genome-wide association study and ancestral origins of the slick-hair coat in tropically adapted cattle. *Frontiers in Genetics*, 5, 101.
- Landaeta-Hernández, A., Zambrano-Nava, S., Hernández-Fonseca, J.P., Godoy, R., Calles, M., Iragorri, J.L., Añez, L., Polanco, M., Montero-Urdaneta, M., Olson, T., 2011. Variability of hair coat and skin traits as related to adaptation in Criollo Limonero cattle, *Tropical Animal Health and Production*, 43, 657-663.
- Landaeta-Hernández, A. J., Zambrano-Nava, S., Verde, O., Pinto-Santini, L., Montero-Urdaneta, M., Hernández-Fonseca, J. P., Fuenmayor-Morales C., Sonstegard T.S., & Olson, T. A. (2021). Heat stress response in slick vs normal-haired Criollo Limonero heifers in a tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*, 53(4), 1-9.
- Monroy, H. I. (2019). Polimorfismo de Locus *Hsp70* y respuesta al estrés por calor en dos grupos genéticos bovinos, locales adaptados e introducidos. Tesis de maestría, Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Región Veracruz.

- Osei-Amponsah, R., Chauhan, S. S., Leury, B. J., Cheng, L., Cullen, B., Clarke, I. J., & Dunshea, F. R. (2019). Genetic selection for thermotolerance in ruminants. *Animals*, 9(11), 948.
- Passamonti, M. M., Somenzi, E., Barbato, M., Chillemi, G., Colli, L., Joost, S., ... & Ajmone-Marsan, P. (2021). The Quest for Genes Involved in Adaptation to Climate Change in Ruminant Livestock. *Animals*, 11(10), 2833.
- Rocha, R. D. F. B., Baena, M. M., de Cássia Estopa, A., Gervásio, I. C., Ibelli, A. M. G., Gionbelli, T. R. S., Gionbelli M.P., Fonseca de Freitas R.T., & Meirelles, S. L. C. (2019). Differential expression of HSF1 and HSPA6 genes and physiological responses in Angus and Simmental cattle breeds. *Journal of thermal biology*, 84, 92-98.
- Differential expression of HSF1 and HSPA6 genes and physiological responses in Angus and Simmental cattle breeds. *J Therm Biol*, 84 (2019), pp. 92-98
- Rojas-Downing, M. M., Nejadhashemi, A. P., Harrigan, T. y Woznicki, S. A. (2017). Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Climate Risk Management*, 16: 145–163.