



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

POLIMORFISMOS DE Hsp Y BoLA EN LAS RAZAS JERSEY Y CRIOLLO LECHERO TROPICAL DE MÉXICO

TESIS

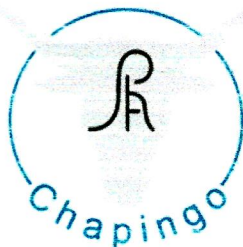
Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

MARICELA RUIZ ORTEGA

Bajo la supervisión de: RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE Ph. D.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Julio de 2016

Chapingo, Estado de México

POLIMORFISMOS DE HSP Y BOLA EN LAS RAZAS JERSEY Y CRIOLLO LECHERO TROPICAL DE MÉXICO

Tesis realizada por **MARICELA RUIZ ORTEGA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph.D. RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE

ASESOR:



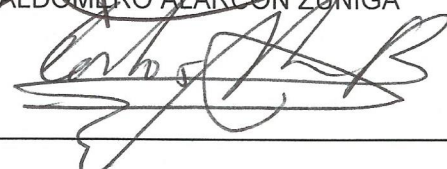
Ph.D. RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ

ASESOR:



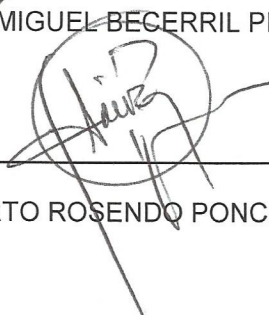
Ph.D. BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA

ASESOR:



Ph.D. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

ASESOR:



Ph.D. ADALBERTO ROSENDO PONCE

CONTENIDO

Contenido	i
Lista de cuadros	iv
Lista de figuras	vi
ABREVIATURAS USADAS	viii
DEDICATORIA.....	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1 Revisión de Literatura.....	4
1.1 Estrés por calor en bovinos.....	4
1.1.1 Zona termoneutral y temperaturas críticas del ganado bovino	4
1.1.2 Sistemas de termorregulación en el ganado bovino	5
1.1.3 Mecanismos de intercambio del calor entre la vaca y el ambiente	6
1.2 Proteínas de choque térmico	6
1.2.1 Familia HSP.....	7
1.2.2 Familia HSP de bajo peso molecular.....	8
1.2.3 La familia HSP40	8
1.2.4 La familia de HSP60	9
1.2.5 La familia de HSP70	9

1.2.6	La familia HSP90	9
1.2.7	La familia HSP100/110	10
1.2.8	Mecanismo de acción de las HSP	10
1.3	HSP y el estrés por calor.....	12
1.4	Literatura citada	13
2	Genetic Architecture and Structure of Antigen of Leukocyte Bovine (BoLA) and their Association with Diseases – A Review	17
2.1	Introduction	18
2.2	History of Major Histocompatibility Complex (MHC).....	19
2.3	Antigen of leukocyte bovine (BoLA)	20
2.4	Genetic Architecture and Structure of BoLA.....	21
2.4.1	Class I.....	21
2.4.2	Class II.....	23
2.4.3	Class III.....	25
2.5	Polymorphism of BoLA.....	25
2.6	Influence of BoLA genes in disease and resistance of cattle	27
2.7	Conclusions.....	29
2.8	References.....	29
2.9	Tables	42
3	Polymorphism of the BoLA gene in the Jersey and the Tropical Milking Criollo bovine breeds in Mexico.....	45
3.1	Introduction	46
3.2	Materials and Methods.....	47
3.2.1	Genetic Material.....	47
3.2.2	Selection of SNP primers.....	48

3.2.3	Genotyping of DNA.....	48
3.2.4	Data analysis	49
3.3	Results and Discussion	49
3.4	References.....	52
3.5	Tables	59
4	Indicadores de estrés por calor asociados con polimorfismos del gen HSP en bovinos Jersey y Criollo Lechero Tropical EN México.....	61
4.1	Introducción.....	62
4.2	Materiales y métodos	64
4.2.1	Muestreos en animales y ambiente	65
4.2.2	Extracción de ADN	67
4.2.3	Selección de los SNP y determinación de alelos.....	67
4.3	Análisis estadísticos.....	68
4.4	Resultados y discusión.....	71
4.5	Conclusiones.....	83
4.6	Conclusiones generales e implicaciones.....	83
4.7	Literatura citada	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Localización celular y función de la familia de HSP en mamíferos.....	10
Table 2. DRB allele frequency associated with diseases in different cattle breeds.....	42
Table 2. DRB allele frequency associated with diseases in different cattle breeds (continuation).....	43
Table 3. DRB allele frequency associated with resistance to tick bovine breeds.....	44
Table 4. SNP sequence (5´/3´ near sequence 50bp) for comparative sequencing of BoLA-Class I gene in Tropical Milking Criollo and Jersey cattle.....	59
Table 5. Allelic and genotypic frequencies of the BoLA-Class I gene in Tropical Milking Criollo (TMC) and Jersey (JE) cattle.....	60
Cuadro 6. Estadísticos descriptivos para variables ambientales y fisiológicas de los animales en los hatos de Chapingo, Estado de México; Villaflores, Chiapas; y Veracruz.....	66
Cuadro 7. Secuencias por SNP (5´/3´ secuencia cercana a 50bp) para comparar polimorfismos del gen para proteínas de estrés por calor (HSP) en bovinos Jersey y Criollo Lechero Tropical.....	68
Cuadro 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en bovinos Jersey (JE) y Criollo Lechero Tropical (CLT), el número dentro del paréntesis indica el número de animales.....	72

Cuadro 9. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ E.E.) y probabilidades (P) de significancia para las comparaciones (genotipo*genotipo) entre ellas para frecuencia respiratoria (FR) por SNP en hatos de animales Jersey (Chapingo y Chiapas) y Criollo Lechero Tropical (Veracruz).....78

Cuadro 10. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ E.E.) y probabilidades (P) de significancia para las comparaciones (genotipo*genotipo) entre ellas para temperatura rectal (TR) por SNP en hatos de animales Jersey en Chapingo y Chiapas.....79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de activación del gen HSP	11
Figura 2. Frecuencia respiratoria de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chapingo (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	74
Figura 3. Frecuencia respiratoria de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chiapas (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	74
Figura 4. Frecuencia respiratoria de animales Criollo Lechero Tropical como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Veracruz (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	75
Figura 5. Temperatura rectal de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chapingo (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	76
Figura 6. Temperatura rectal de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chiapas (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	76
Figura 7. Frecuencia respiratoria de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP5 en el hato de Chapingo (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....	80
Figura 8. Temperatura rectal de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP5 en el hato de Chapingo	

(líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....80

Figura 9. Frecuencia respiratoria de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP1 en el hato de Chiapas (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....81

Figura 10. Frecuencia respiratoria de animales Criollo Lechero Tropical como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP1 en el hato de Veracruz (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).....82

ABREVIATURAS USADAS

BoLA = antígeno de leucocitos bovino

CV = coeficiente de variación

CLT = Criollo Lechero Tropical

FR = frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto, rpm)

J = Jersey

MHC = complejo mayor de histocompatibilidad

SD = desviación estándar

SNP = polimorfismos de un solo nucleótido

TR = temperatura rectal (°C)

DEDICATORIA

Con dedicatoria a mi familia: mi madre Amada Ortega Blancas mi padre Alejandro Ruix Velasco mi hermana Diocelin Ruix Ortega y mi hermano Edwin Ruix Ortega. Quiero aprovechar estas palabras para darles las gracias por todo el amor y todo lo que soy ahora. Ustedes son los responsables de haberme hecho la mujer profesionalista de bien que soy hoy y me siento afortunada de tener una familia tan maravillosa.

¡Los amo con toda el alma!

Maricela

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, que junto con el Posgrado en Producción Animal, me brindaron la oportunidad de continuar con mi formación profesional y concluir una importante etapa de mi vida profesional.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante los cuatro años de preparación doctoral.

A los Doctores Rodolfo Ramírez Valverde, Rafael Núñez Domínguez, Baldomero Alarcón Zúñiga, Carlos Miguel Becerril Pérez y Adalberto Rosendo Ponce, por su dirección, enseñanzas, consejos y apoyo brindado durante el tiempo de estancia en el Posgrado en Producción Animal.

En especial, quiero agradecer al Ph.D. José Guadalupe García Muñiz por el tiempo, dedicación, interés y apoyo incondicional durante la integración del documento de tesis, mis respetos y eterno agradecimiento porque sin su ayuda este documento no sería una realidad.

Mi reconocimiento a la M. C. Itzel Villegas, por su incondicional supervisión en el laboratorio de genética molecular. Finalmente, agradezco al Dr. Víctor Martínez de la Universidad de Chile, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi estancia de investigación doctoral en INBIOGEN, la cual contribuyó enormemente a mejorar mi formación profesional.

A todos nuevamente: ¡GRACIAS!

Maricela

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre:

Maricela Ruiz Ortega

Fecha de nacimiento:

03 de enero de 1986

Lugar de nacimiento:

Iztapalapa, Distrito Federal.



Desarrollo Académico

Licenciatura en Producción Animal

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas

Participaciones en congresos:

Conferencias: 10

Cartel: 8

RESUMEN GENERAL

POLIMORFISMOS DE HSP Y BoLA EN GANADO BOVINO JERSEY Y CRIOLLO LECHERO TROPICAL

Una de las respuestas celulares al estrés por calor consiste en la activación de un conjunto de proteínas conocidas como “Heat Shock Proteins” (HSP). En condiciones de hipertermia, la concentración de HSP se incrementa con la finalidad de contrarrestar el efecto al estrés calórico y evitar la muerte celular. Los genes de las HSP se localizan en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; por sus siglas en inglés de Major Histocompatibility Complex). Estos genes son importantes debido a su asociación con la resistencia a enfermedades, lo que se ha documentado principalmente en bovinos. En este documento se presenta un marco teórico del descubrimiento, nomenclatura, división y función de las HSP en mamíferos; así como otra revisión centrada en la descripción de la arquitectura y estructura genética del MHC, con información de resultados sobre su asociación con la resistencia a enfermedades y ectoparásitos, en diferentes ambientes y razas bovinas. En la presente tesis se realizaron análisis y evaluación de 14 polimorfismos, utilizando marcadores tipo SNP para los genes HSP y BoLA (Bovine Leukocyte Antigen) en bovinos Jersey y Criollo Lechero Tropical. En el primer estudio se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos del gen BoLA en ambas razas. La prueba estadística de Ji-cuadrada indicó que no existe asociación ($p > 0.05$) entre las razas y las frecuencias alélicas estimadas. En el segundo artículo se determinó la asociación de polimorfismos de HSP con indicadores fisiológicos de estrés por calor (EC). Solamente tres SNP mostraron asociación con las variables fisiológicas estudiadas (temperatura rectal y frecuencia respiratoria), por lo que se podrían considerar como marcadores candidatos para otros estudios. Se concluye que algunos de los genotipos estudiados para BoLA y HSP son posibles candidatos para futuros estudios de selección de bovinos tolerantes al EC.

Palabras clave: Polimorfismos, HSP, BoLA, bovinos

Tesis de Doctor en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Maricela Ruiz Ortega

Director: Ph. D. Rodolfo Ramírez Valverde

GENERAL ABSTRACT

POLYMORPHISMS OF HSP AND BoLA IN JERSEY AND TROPICAL MILKING CRIOLLO CATTLE

One of the cell responses to heat stress consists on the activation of a set of proteins known as "Heat Shock Proteins" (HSP). In hyper-thermic conditions, the HSP concentration increases in order to counteract the effect of heat stress and avoid cell death. The HSP genes are located in the region of the major histocompatibility complex (MHC). Genes from the MHC are important because of their association with disease resistance, a fact that has been documented mainly in cattle. This thesis presents a theoretical framework of the discovery, classification, division and function of the HSP genes in mammals, as well as a literature review focused on the description of the architecture and genetic structure of the MHC, showing information regarding their association with resistance to diseases and ecto-parasites on different environments and breeds of cattle. Analysis and evaluation of 14 polymorphisms were performed using SNP markers for HSP and BoLA (Bovine Leukocyte Antigen) genes in Jersey and Tropical Milking Criollo cattle. In the first study, the allelic and genotypic frequencies of polymorphisms for BoLA gene in both breeds were estimated. The statistical chi-square test indicated that there was no association ($p > 0.05$) between breed and allele frequencies estimated. In the second article, the association of HSP polymorphisms with physiological indicators (rectal temperature and respiratory rate) of heat stress (EC) was determined. Only three SNP showed association with physiological variables studied, which could be considered as candidate markers for future studies. It is concluded that some of the genotypes studied for BoLA and HSP are possible candidates of future selection studies for cattle tolerant to EC.

Key words: Polymorphism, HSP, BoLA, cattle.

Thesis for Doctor in Science of Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Maricela Ruiz Ortega

Director: Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde

INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las respuestas celulares al estrés por calor (EC) consiste en la activación de un conjunto de proteínas conocidas como “Heat Shock Proteins” (HSP) (Marcos-Carcavilla *et al.*, 2010). En mamíferos, bajo condiciones normales, se presentan niveles específicos de concentración de HSP (Dehbi *et al.*, 2010). En condiciones de hipertermia la concentración de HSP se incrementa con la finalidad de contrarrestar el efecto al EC y evitar la muerte celular (Dangi *et al.*, 2012).

Las HSP fueron reportadas por primera vez en investigaciones con *Drosophila melangoster* bajo condiciones de EC (Coronato *et al.*, 1999). Los niveles de concentración de HSP son excelentes indicadores del potencial de adaptación que un organismo presenta ante factores de EC (Hansen, 2004; Dangi *et al.*, 2012).

Existen diferentes mecanismos de acción celular de las HSP, uno de ellos es su intervención en el doblamiento y desdoblamiento de otras proteínas (Dangi *et al.*, 2012). La función de las HSP varía acorde al peso molecular de las mismas. Por ejemplo, las HSP “pequeñas” (10 a 27 KDa) estabilizan microfilamentos celulares, las HSP60 (60 KDa) previenen la desnaturalización de otras proteínas, las HSP90 regulan receptores en hormonas, finalmente las HSP de mayor tamaño (100 a 110 KDa) favorecen el plegamiento de diferentes proteínas celulares (Charoensook *et al.*, 2012).

Entre otras características específicas, los genes de las HSP se localizan en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Robert, 2003). Este autor ha reportado que existe una asociación entre las HSP y el MHC en el funcionamiento de receptores en la superficie celular.

Los genes del MHC son importantes debido a la asociación que existe con la resistencia a enfermedades, esto se ha reportado principalmente en ganado doméstico (Firouzamandi *et al.*, 2010). Dependiendo de la especie, el MHC se localiza en diferentes regiones del cromosoma. En bovinos y caprinos se localiza

en el cromosoma 23, mientras que en ovinos se ubica en el cromosoma 20 (Amills *et al.*, 1998).

En bovinos el MHC se conoce como sistema BoLA (complejo antígeno de leucocitos bovinos), presenta un elevado grado polimórfico y existen diversos estudios que muestran la relación de BoLA con la resistencia a enfermedades, como mastitis y resistencia a ectoparásitos como garrapata en bovinos. Los genes del MHC se dividen en tres clases de loci: clase I, clase II, subdividido a su vez en clase IIa y clase IIb, y clase III (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2005; Baltian *et al.*, 2012).

Se han realizado estudios sobre el MHC clase I en la región del exón 2-3, en diferentes razas de bovino mestizo, Jersey y Holstein; los resultados indican un alto número de adiciones, supresiones y sustituciones en aminoácidos, las cuales son resultado del alto grado de polimorfismo presente en el gen BoLA-clase I (Bushan *et al.*, 2007).

En México, la mayor parte de las investigaciones sobre BoLA se enfocan en los alelos de clase II, específicamente en el loci DRB3, y en razas Holstein, y pocos casos en bovinos Criollos (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2008). En investigaciones recientes se ha demostrado que la selección asistida por marcadores moleculares SNP representan un número ilimitado de diferencias de nucleótidos entre individuos, lo cual tiene relación potencial con fenotipos, que a su vez pueden convertirse en marcadores genéticos para asociar los genes BoLA y HSP con la termotolerancia (Garg *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, algunos objetivos de la tesis fueron identificar polimorfismos utilizando marcadores tipo SNP de genes HSP y BoLA, en bovinos Criollo Lechero Tropical y Jersey. Este documento consta de cuatro Capítulos. En el primero se encuentra una breve revisión sobre el estrés por calor en bovinos, y el descubrimiento, nomenclatura, división y función de las HSP en los mamíferos. En el segundo Capítulo se incluye una revisión de literatura centrada en la descripción de la arquitectura y estructura genética del MHC, con información de resultados en diferentes investigaciones publicadas, sobre la

posible asociación del MHC con la resistencia a enfermedades y ectoparásitos en diferentes razas bovinas del mundo.

El tercer Capítulo contiene un trabajo de investigación presentado como nota científica. El objetivo de esta nota fue estimar las frecuencias alélicas, genotípicas de siete SNP del gen BoLA en ganado Criollo Lechero Tropical y Jersey.

Finalmente, en el cuarto Capítulo se presenta un artículo científico sobre la asociación de diferentes indicadores fisiológicos de estrés por calor, con la presencia de siete SNP del gen HSP en bovinos de la raza Jersey y Criollo Lechero Tropical.

1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Estrés por calor en bovinos

El estrés por calor (EC) se define como la carga de calor que se acumula en el organismo, aumentando la temperatura corporal y activando los mecanismos que ayudan a disipar este calor hacia el exterior del animal (Hansen y Aréchiga, 1999; Jordan, 2003). Temperaturas ambientales elevadas, fuera de la zona de confort, producen EC en bovinos, los cuales activan una serie de mecanismos fisiológicos para disminuir la carga de calor (Armstrong, 1994; West, 2003). Algunas de estos mecanismos para contrarrestar el EC son la reducción del consumo de alimento y aumento del consumo de agua (Fuquay, 1981). La activación de estos mecanismos aumenta la concentración de cortisol, en sangre, provocando un desequilibrio homeostático en el organismo (Fuquay, 1981; Armstrong, 1994; West, 2003).

1.1.1 Zona termoneutral y temperaturas críticas del ganado bovino

La “zona de confort” o “zona termoneutral” se define como el intervalo de temperatura ambiental dentro del cual la tasa metabólica es mínima y ésta varía según la especie y la raza (Fuquay, 1981). En bovinos Holstein se localiza entre 5 y 25 °C (West, 2003). Dentro de esta zona, el animal mantiene su temperatura corporal estable sin realizar un esfuerzo adicional, es decir, sin la intervención de mecanismos fisiológicos compensatorios (Fuquay, 1981). El ganado bovino lechero, con temperaturas ambientales superiores de 25 °C, presenta un incremento gradual en la temperatura corporal a la vez que aumenta la frecuencia respiratoria y sudoración (Fuquay, 1981; Armstrong, 1994; West, 2003). La activación de la sudoración y otros mecanismos de pérdida de calor por evaporación, en gran medida dependen del porcentaje de humedad relativa presente en el ambiente, ya que entre mayor sea ésta, serán mayores las pérdidas por evaporación de calor (Armstrong, 1994). Los principales factores ambientales que influyen en la temperatura corporal son la temperatura

ambiental, la humedad relativa, el movimiento del aire y la radiación solar (Armstrong, 1994).

A partir de los factores ambientales se calcula el índice de temperatura-humedad (ITH), el cual resulta de una ecuación desarrollada por Hanh (1999). Este índice es un número utilizado para indicar la falta de confort causada por los efectos combinados de la temperatura y la humedad del aire. En la actualidad este índice se utiliza para supervisar las condiciones de estrés por calor a las que está expuesto el ganado bovino, y su asociación con la producción lechera y eficiencia reproductiva. En general, los expertos han determinado que con un índice IHT inferior a 72, el ganado lechero no experimenta estrés; si el IHT se encuentra entre 72 y 78, el estrés es moderado; y valores IHT entre 78 y 88 se caracterizan por un estrés grave (Armstrong, 1994; West, 2003).

Los mecanismos fisiológicos para contrarrestar el estrés por calor, son diferentes en ganado *B. taurus* y *B. indicus* (Charoensook *et al.*, 2012). Dichos mecanismos incluyen el aumento de la temperatura corporal, el incremento de la frecuencia respiratoria, el mayor consumo de agua, la disminución del consumo de alimento y el aumento en la susceptibilidad a enfermedades (Hansen y Aréchiga, 1999).

1.1.2 Sistemas de termorregulación en el ganado bovino

El bovino es considerado un animal homeotermo, es decir, pese a las fluctuaciones en la temperatura ambiental, es capaz de mantener la temperatura interna corporal relativamente constante (West, 2003). La temperatura corporal interna de la vaca Holstein se encuentra en torno a 38.3 y 38.7 °C, con una variación entre 0.6 y 1.2 °C (West, 2003). Los sistemas de termorregulación del bovino son controlados principalmente por radiación, conducción, convección y evaporación (Fuquay, 1981). La mayor parte del calor que producen los animales se pierde positivamente por radiación, conducción o convección al ser generalmente la temperatura corporal mayor que la ambiental lo que responde al principio físico del gradiente térmico (del área más caliente al área menos caliente), por lo que en caso de que ambas temperaturas sean idénticas estas vías de disipación calórica se anulan y de ser mayor la temperatura ambiental

que la corporal, entonces el calor se transfiere del medio al animal elevando su temperatura corporal (Fuquay, 1981; West, 2003).

1.1.3 Mecanismos de intercambio del calor entre la vaca y el ambiente

Los mecanismos más sensibles de pérdida de calor, como conducción y convección, ocurren a una velocidad que depende de la magnitud del gradiente entre la temperatura de la superficie del animal y la temperatura del objeto o medio en el ambiente en el cual el animal intercambia su energía (Fuquay, 1981; West, 2003). El mecanismo de radiación consiste en eliminar calor mediante rayos infrarrojos (forma de energía calórica) y funciona cuando existe una diferencia de temperaturas entre el animal y el ambiente circundante (Fuquay, 1981). La conducción elimina el calor a través de la transferencia de energía entre dos objetos próximos. Esta función es importante, ya que desde el interior del organismo se desplaza el calor hasta la superficie, es decir, del interior a la piel y de la piel hacia el medioambiente, siempre y cuando este último tenga una temperatura inferior a la temperatura interna corporal (Fuquay, 1981; West, 2003). Por último, la evaporación ocurre sobre la piel del animal, produciéndose en forma de espiración, sudoración, difusión de agua subcutánea y salivación (Fuquay, 1981).

1.2 Proteínas de choque térmico

Los mamíferos responden al estrés por calor con un evolucionado y adaptado sistema de protección celular; que se caracteriza por una activación en la transcripción y acumulación de un grupo particular de proteínas, conocidas como proteínas de choque térmico (HSP) (Charoensook *et al.*, 2012). Las isoformas de las HSP son categorizadas dentro de familias, según sea su peso molecular en: HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, y HSP110/90 (Kregel, 2002; Tkáčová y Angelovičová, 2012).

La función de cada una de las isoformas es diferente; HSP27 estabiliza microfilamentos a nivel celular; HSP60 participa en el plegamiento de proteínas, en donde, la información lineal contenida en la secuencia de aminoácidos obtendrá la conformación tridimensional típica en cada proteína funcional, además previene la desnaturalización de las proteínas bajo temperaturas elevadas; HSP90 participa en la regulación de receptores para hormonas esteroides y traslocación de proteínas; finalmente, HSP110/90 sólo ha sido asociada con el plegamiento de proteínas (Kregel, 2002; Tkáčová y Angelovičová, 2012). Las HSP no son constitutivas en la célula, éstas son inducibles a través del estrés, cumpliendo funciones que abarcan desde la eliminación de proteínas desnaturalizadas hasta el aumento de la producción de otras proteínas requeridas por la célula (Nover y Scharf, 1997; Coronato *et al.*, 1999).

La acumulación intracelular de proteínas desnaturalizadas o defectuosas, por efecto del estrés, desencadena una respuesta en producción de HSP; esta inducción es ocasionada por el factor de transcripción conocido como HSF1, el cual existe en forma de monómero inactivo en un complejo con HSP40/HSP70 y HSP90. Después de sufrir estrés, como puede ser una elevada temperatura, HSF1 se libera del complejo chaperona y trimeriza. HSF1 es entonces transportada al interior del núcleo celular donde es hiperfosforilada y se une a ADN que contenga elementos de choque térmico. Los genes diana de HSF1 incluyen proteínas de choque térmico como HSP72 (Kregel, 2002; Tkáčová y Angelovičová, 2012).

1.2.1 Familia HSP

La gran familia de las proteínas de choque térmico se compone de varias sub-familias, cuyos miembros se agrupan con base en sus pesos moleculares (Kregel, 2002), los cuales pueden variar entre 10 000 y 150 000 Da (Dalton) (Coronato *et al.*, 1999). Para abreviar el término proteínas de golpe de calor, se utilizan tres letras en mayúsculas (HSP) que corresponden al gen (Katherine, 2014).

1.2.2 Familia HSP de bajo peso molecular

Las proteínas de este grupo presentan un peso molecular (PM) entre 15 y 30 KDa. Las más famosas son la HSP22, conocida como alfa B-crystallin de ratón, y la HSP27-28 humana, que corresponde a la HSP25 de ratón con la que tienen secuencias de aminoácidos similares a pesar de corresponder a distintas especies.

La HSP22 o alfa B-crystallin está presente en fibras musculares estriadas con alta capacidad oxidativa, como el corazón y músculo esquelético, donde se le ha localizado en las bandas Z. Sin embargo, su localización parece depender de las condiciones fisiológicas. La proteína HSP25 se expresa en cantidades variables en todos los tejidos de ratón analizados. La expresión de los genes que codifican para esta proteína está relacionada con la respuesta a hormonas esteroides, siendo regulada por estrógeno. Su fosforilación puede inducir tolerancia al EC (Coronato *et al.*, 1999).

La HSP27 fue originalmente llamada 24K o 28K y actualmente también se encuentra con la denominación de srp-27 (stress response protein 27). Se expresa en órganos sensibles al estrógeno como útero, oviducto, vagina y piel (Coronato *et al.*, 1996), habiéndose observado cambios significativos en su localización y cuantificación, durante las diferentes fases del ciclo menstrual. Su presencia en el cordón umbilical y en menor nivel en la placenta, indican su expresión en la circulación materno-fetal humana.

Se han descrito numerosas funciones para la HSP27, en termotolerancia, en proliferación celular, resistencia a drogas, polimerización de actina y como chaperona (Xu *et al.*, 1996). Existe, además, otra proteína de menor peso aún, la HSP20, que no es inducida por calor ni estrés químico, pero que tiene un dominio C-terminal similar a las otras (Coronato *et al.*, 1999).

1.2.3 La familia HSP40

La producción en la célula de HSP47 es inducida por calor o alteraciones patológicas (por ejemplo, fibrosis hepática), y está asociada con el aumento en

la síntesis de colágeno. Se la detecta en el retículo endoplásmico y se une transitoriamente al colágeno, pudiendo además desnaturalizarlo (Coronato *et al.*, 1999). Líneas celulares tumorales derivadas de metástasis de carcinomas y que son metastásicas en animales sintetizan altos niveles de HSP47, lo que sugeriría la posibilidad de usar esta proteína como marcador de la actividad metastásica de células de tumores humanos (Morimo *et al.*, 1997).

1.2.4 La familia de HSP60

Las mitocondrias proveen un medio ambiente cerrado donde funciona esta familia, cooperando en el plegado de proteínas, en la translocación de las mismas a través de membranas y en la aceleración del ensamblado (Coronato *et al.*, 1999).

1.2.5 La familia de HSP70

La familia de las HSP70-72 es la más conservada en la evolución, siendo constitutiva y participando en los procesos de maduración de otras proteínas celulares y su transporte, eliminación de proteínas desnaturalizadas, y actividad de ATPasa (Xu *et al.*, 1996). Estudios publicados muestran que tras un shock térmico, se acumula HSP70 en el interior del nucléolo, estructura que se comunica con los ribosomas. Además, confiere protección al centrosoma y filamentos intermedios (Liang y MacRae, 1997; Kregel, 2002).

La HSP75 no es constitutiva de la célula. Todos los miembros de esta familia son abundantes en células eucariotas, donde actúan como chaperonas. En el citoplasma se unen a los polipéptidos en formación, antes que se liberen del ribosoma, con base en su habilidad para unirse a los segmentos hidrofóbicos de los péptidos de manera dependiente de ATP (Ulrich, 1996).

1.2.6 La familia HSP90

La familia de las HSP90 se relaciona funcionalmente con los receptores de las hormonas esteroideas, regulando su actividad biológica. En ausencia de la hormona correspondiente, el receptor se asocia con varias proteínas celulares, entre ellas las HSP90, que lo mantienen inactivo (Coronato *et al.*, 1999).

Son relativamente abundantes a temperatura ambiente y su nivel basal se aumenta con el estrés, uniéndose a los microtúbulos (Xu *et al.*, 1996). Dos miembros de esa familia, HSP90 α y β , constituyen entre 1 y 2 % de las proteínas totales del citoplasma (Coronato *et al.*, 1999).

1.2.7 La familia HSP100/110

Las proteínas HSP100 se caracterizan por conservar dos cajas, cada una, con 200 aminoácidos residuales como ATP. La talla de estas proteínas varía entre los 78 y 100 kDa, teniendo actividad de chaperonas y en algunos casos reemplazan a las HSP70/HSP40 en los sistemas. Las HSP110 tienen funciones de chaperonas y citoprotectoras (Nover y Scharf, 1997).

1.2.8 Mecanismo de acción de las HSP

Las HSP tienen como función principal proteger a la célula del daño ocasionado por el calor y participan en la normalización de funciones durante la recuperación por el estrés (Charoensook *et al.*, 2012). En la célula las HSP tienen distintas funciones, ya sea como reguladoras, chaperonas, o proteínas de protección celular, según el orgánulo en donde se localicen (Cuadro1).

Cuadro 1. Localización celular y función de la familia de HSP en mamíferos.

Familia HSP	Localización celular	Propósito/Función
HSP27	Núcleo, Citosol	Estabilización de micro filamentos
HSP60	Mitocondria	Proteína, prevención y agregación de desnaturalización de proteínas
HSP72	Citosol y núcleo	Doblaje de proteínas y citoprotección
HSP73	Citosol y núcleo	Chaperonas moleculares
HSP75	Mitocondria	Chaperonas moleculares
HSP78	Retículo endoplásmico	Cito protección y chaperonas moleculares
HSP90	Citosol, Retículo endoplásmico y núcleo	Regulador de receptores de hormonas esteroides y translocación de proteínas
HSP110/104	Citosol	Doblaje de proteínas

(Adaptado de: Kregel, 2002)

Burdon (1986) propuso un mecanismo para la activación en el ADN, de genes para la transcripción de HSP (Figura 1). Este mecanismo consiste en la presencia de la región HSE (elemento de choque térmico) en el genoma, junto a la caja TATA. En las células que no presentan estrés calórico (a), investigaciones previas indicaron que el HSE se encuentra libre de proteínas HSTF (factor de transcripción de choque térmico), las cuales se encuentran independientes del factor pero inactivadas. Después de un choque térmico (b), se provoca una alteración específica del factor HSTF, lo cual le permite unirse a las secuencia HSE del ADN, iniciando la transcripción del gen HSP por ARN polimerasa II. Una vez sintetizada la HSP comenzará su función de chaperona o reparación de las proteínas dañadas en la célula.

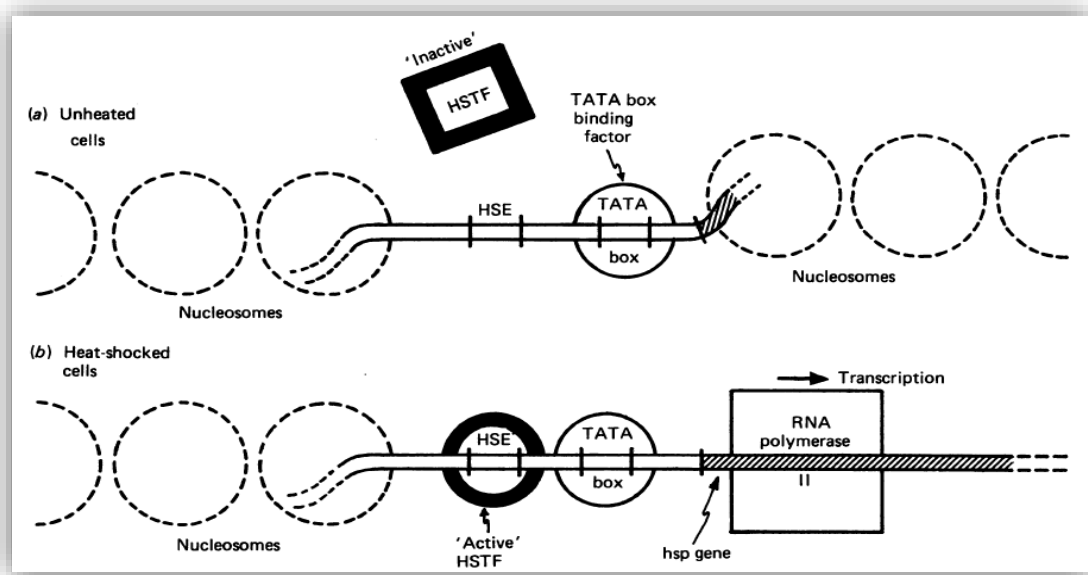


Figura 1. Mecanismo de activación del gen HSP (Burdon, 1986)

Algunos factores que provocan la síntesis de HSP en la célula son la presencia de tratamientos con aminoácidos análogos, calor, etanol, arsénico y radicales libres presentes en el medio celular. Una vez que las proteínas en la membrana celular son dañadas por algún factor, se inicia la formación del complejo proteína-ubiquitina, utilizando una molécula de ATP, y una vez unido inicia la proteólisis.

El HSTF se activa uniéndose a la zona HSE del ADN, iniciando la transcripción de las HSP (Figura 1). Para inactivarse el HSTF se une nuevamente a una ubiquitina.

1.3 HSP y el estrés por calor

En diversas investigaciones se ha mostrado que la función de determinadas proteínas depende de la preexistencia de otras proteínas, denominadas chaperonas. Las chaperonas son un grupo de proteínas que se encuentran en las células, cuyas funciones son: favorecer el plegamiento de proteínas sintetizadas de *novο*, ayudar en el plegamiento correcto de proteínas después de un proceso de desnaturalización y colaborar en volver a plegar correctamente proteínas que han sido translocadas hacia algún compartimento celular (Carrasco *et al.*, 2010). Las células en cultivos, responden de manera similar a cambios en el medio ambiente, iniciando una respuesta a la síntesis de proteínas de choque térmico, o también llamadas proteínas antiestrés; la denominación HSP surge al ser detectadas inicialmente en *Drosophila melangoster*, bajo cambios de temperatura mayores a los 5 °C de sus temperatura termoneutral (Nover y Scharf, 1997; Coronato *et al.*, 1999). También se ha observado que la respuesta celular al tratamiento con calor suave, sub-letal, de alrededor de 56°C, aumenta la capacidad de las células para resistir un posterior estrés letal (Coronato *et al.*, 1999).

Las células transfectadas con el gen para HSP70/HSP90, son resistentes a los diversos factores que provocan EC en las células normales. Las HSP aumentan hasta un 20% en animales que se encuentran bajo climas cálidos, con la finalidad de ayudar a sobrevivir a la célula al estrés calórico (Donati *et al.*, 1990). La cantidad de proteína HSP expresada en los linfocitos está en función del estrés calórico recibido, dependiendo del nivel de adaptación del organismo al estresor (Kregel, 2002; Bañuelos-Valenzuela *et al.*, 2005).

Charoensook *et al.* (2012) indicaron que los polimorfismos encontrados en HSP90AB1 (en toros: *Lamphum Blanco* x ganado de montaña y Holstein Friesian

x Nativos Thai), no se relacionaron directamente con la respuesta fisiológica del ganado al estrés calórico, sin embargo, sus resultados proponen que dicho gen es un excelente candidato para evaluar en otros estudios la tolerancia al estrés por calor y como pueden utilizarse los marcadores genéticos en la selección de animales para próximos apareamientos, obteniendo animales genéticamente adaptados a climas cálidos. Otros estudios muestran que la HSP70 puede indicar un grado de evolución o adaptación de los animales (Guerreiro y Raynes, 1990).
Quité un espacio, borrar esto, lo puse sólo para avisarte

1.4 Literatura citada

- Acosta-Rodríguez R., R. Alonso-Morales, S. Balladares, H. Flores-Aguilar, Z. García-Vázquez, and C. Gorodezky. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Veterinary Parasitology* 127: 313-321.
- Amills, M., V. Ramiya, J. Norimine, and H. A. Lewin. 1998. The major histocompatibility complex of ruminants. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 17: 108-120.
- Armstrong, D. V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. Symposium: Nutrition and heat stress. *Journal of Dairy Science* 77: 2044-2050.
- Baltian, L. R., M. V. Ripoli, S. Sanfilippo, S. N. Takeshima, Y. Aida, and G. Giovambattista. 2012. Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Molecular Biology Reports* 39: 7215-7220.
- Bañuelos-Valenzuela, R., S. Sánchez-Rodríguez, y H. Sergio. 2005. Las proteínas de estrés calórico HSP70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. Disponible en:

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305/030523.pdf>.

Consultada el 13 de mayo del 2013.

Bhushan, B., B. N. Patra, P. J. Das, T. Dutt, P. Kumar, A. Sharma, U. Umang, S. Dandapat, and S. P. A. Ahlawat. 2007. Polymorphism of exon 2-3 of bovine major histocompatibility complex class I BoLA-A gene. *Brazilian Journal of Genetics* 30: 560-566.

Burdon, H. 1986. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochemical Journal* 240: 313-324.

Carrasco, L. B. Sañudo, I. C. Martínez, and M. De Hoyo. 2010. Heat shock proteins and exercise. *International Journal of Medicine and Science of Physical Activity and Sport* 37: 1-21.

Charoensook, R., K. Gatphayak, A. R. Sharifi, C. Cahisongkram, B. Brenig, and C. Knorr. 2012. Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Tropical Animal Production* 44: 921-928.

Coronato S., W. Di Girolamo, M. Salas, O. Spinelli., y G. Laguens. 1999. Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina* 59: 477-486.

Dangi, S. S., M. Gupta, D. Maurya, V. P. Yadav, R. P. Panda, G. Singh, N. H. Mohan, S. K. Bhure, B. C. Das, S. Bag, R. Mahapatra, G. Taru Sharma, and M. Sarkar. 2012. Expression profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra hircus*). Disponible en: http://www.phenix-veterinaire.com/download/file1104_article14.pdf. Consultada el 11 de octubre del 2013.

Dehbi, M., E. Baturcam, A. Eldali, M. Ahmed, A. Kwaasi, M. A. Chishti, and A. Bouchama. 2010. HSP-72, a candidate prognostic indicator of heatstroke. *Cell Stress and Chaperones* 15: 593-603.

- Donati, Y., D. O. Slosman, and B. S. Polla. 1990. Oxidative injury and the heat shock response. *Biochemistry Pharmacology* 32: 104-113.
- Fernández, I. G., J. G. Ríos-Ramírez, A. Gayosso-Vázquez, R. Ulloa-Arvizu, and R. A. Alonso-Morales. 2008. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of creole cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology*. 31: 880-886.
- Firouzmandi M., J. Shoja, A. Bazegari, and E. Roshani. 2010. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. *African Journal of Biotechnology* 9: 2224-2228.
- Fuquay, J. W., A. B. Zook, J. W. Daniel, W. H. Brown, and W. E. Poe. 1981. Modifications in free stall housing for dairy cows during summer. *Journal of Dairy Science*. 62: 566 -577.
- Guerriero, V., and D. A. Raynes. 1990. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *Journal of Animal Science* 68: 2779-2783.
- Hansen, P. J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science* 82: 349-360.
- Hansen, P. J., and Aréchiga C. F. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *Journal of Animal Science* 77: 36- 50.
- Jordan, E. R. 2003. Effects of heat stress on reproduction. *Journal of Dairy Science* 86: E104-E114.
- Katherine, A. 2014. Guidelines for formatting gene and protein names. Disponible en: <http://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>. Consultada el 30 de junio del 2016.

- Kregel, K. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92: 2177-2186.
- Marcos-Carcavilla, A., M. Mutikainen, C. González, J. H. Calvo, J. Kantanen, A. Sanz, N. S. Marzanov, M. D. Pérez-Guzmán, y M. Serrano. 2010. A SNP in the HSP90AA1 gene 5' flanking region is associated with the adaptation to differential thermal conditions in the ovine species. *Cell Stress and Chaperones* 15: 67-81.
- Nover, L., and K. D. Scharf. 1997. Heat stress protein and transcription factors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 80-103.
- Robert J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 449-464.
- Tkáčová, J., and M. Angelovičová. 2012. Heat shock proteins (HSPs): a review. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 1: 45-50.
- West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86: 2131-2144.

2 GENETIC ARCHITECTURE AND STRUCTURE OF ANTIGEN OF LEUKOCYTE BOVINE (BoLA) AND THEIR ASSOCIATION WITH DISEASES – A REVIEW

M. Ruiz-Ortega¹, R. Ramírez-Valverde^{1*}, G. García-Muñiz¹, B. Alarcón-Zúñiga¹, C. Becerril-Pérez², A. Rosendo-Ponce³ and R. Núñez-Domínguez¹

Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo.
Estado de México, México

ABSTRACT: Disease resistance are highly desirable traits in cattle breeds or populations, so that Antigen of Leukocyte Bovine (BoLA) genes have been the most widely studied in livestock populations because they may influence several important traits, including resistance to infectious diseases and autoimmunity. The BoLA genes appear to be organized in a similar way that the genes of the major histocompatibility complex region in humans, but there are notable differences. In cattle, the BoLA genes are located in chromosome 23; they are highly polymorphic and form an important component of the immune system. A high degree of polymorphism has been reported in various studies carried out on different breeds, such as Holstein, Jersey, Japanese Black, Argentine Criollo, Mexican Criollo and Iranian Hosltein cattle. The BoLA polymorphism has also been associated with resistance or susceptibility to several diseases like mastitis, persistent lymphocytosis by bovine leukemia virus, cystic ovarian disease, retained placenta and milk fever. More than 100 different alleles from BoLA-DRB gene have been identified. These variations in both class I and II are likely to play an important role in cattle immune responses. The aim of this review is to summarize information of the genetic architecture, structure features and disease associations of BoLA genes.

Key words: Disease resistance, Major histocompatibility complex, Polymorphism.

2.1 Introduction

The major histocompatibility complex (MHC) is a fundamental part of the immune system in nearly all vertebrates (Edwards and Hedrick, 1998). It is one of the most important genetic systems for infectious disease resistance in vertebrates (Hill, 1998; Hedrick and Kim, 2000). Thus, defining the structure, function and diversity of this system is important to understand immune responses in vertebrate species.

The MHC is a chromosomal region consisting of a series of closely linked loci or so called gene families. MHC molecules are divided into class I (expressed by all nucleated cells) and class II (expressed by antigen cells and lymphocytes). The number of MHC loci varies among species, for example, one locus each for MHC class I and II in salmon, six loci for class I and three for class II in humans (Milinski, 2006). The proteins of the MHC are cell-surface glycoproteins that bind small peptide fragments derived from host- and pathogen-expressed proteins via proteolysis. Therefore, MHC molecule polymorphism results in diverse immune responses (Takeshima et al., 2014). The MHC, known as the bovine leukocyte antigen (BoLA) in cattle, plays an essential role in the regulation of the immune response. Moreover, the genes within the complex have been implicated in resistance or susceptibility to diseases and parasites in ruminants (Mosafer and Nassiry, 2005; Takeshima and Aida, 2006; Behl et al., 2009). Thus, the BoLA genes have received attention because of their association with host immunity (Mosafer and Nassiry, 2005).

In dairy cattle, production traits and traits related to animal health have been associated with allelic polymorphisms in the BoLA gene (Maillard et al., 1996; Dietz et al., 1997; Sharif et al., 1998). To illustrate specific relationships, Nascimento et al. (2006) showed associations between the BoLA genes and differences in the production and percentage of fat and protein in milk, growth rate, reproductive performance, immune response and disease resistance.

Van Eijk et al. (1992) reported 30 different BoLA alleles based on genotyping 168 animals of 10 cattle breeds including Angus, Ayrshire, Brown Swiss, Gelbvieh, Guernsey, Jersey, Holstein-Friesian, Polled Hereford, Simmental and South Devon. These genetic variations are likely to play an important role in cattle immune responses. The objective of this review is to summarize current knowledge of the genetic architecture, structure features and disease association of BoLA genes.

2.2 History of Major Histocompatibility Complex (MHC)

According to Penn (2002), the origin of the MHC concept was in 1916, when Little and Tyzzer performed tumor transplants between different strains of mice and found that tumors could be transplanted among some strains of mice, but rejected among others. In 1927, Bover found that tissue transplants were not rejected if the donor and recipients were identical twins. In 1933, Haldane suggested that an immune response leading to rejection of transplanted tumors was directed against normal cellular antigens belonging to a different strain rather than against some antigens unique to tumors.

Discovery of the MHC was recognized and first known for its role in histocompatibility by Gorer (1937). This author discovered four blood group antigens (he called “antigen I, II, III and IV”) and found that the growth or rejection of a tumor was associated with the expression of the particular antigen. Snell also defined minor histocompatibility (mH) antigens in 1948, using congenic mice, and showing that in contrast to H antigens, mH accounted for a slower and more chronic graft rejection (Barth et al., 1956). These are polymorphic and endogenously synthesized products that can be recognized by allo-reactive T cells in context of MHC molecules (Ramlachan, 2004).

In addition to the role of the MHC in allo-recognition, it was later proposed that in vertebrates, the driving force for high polymorphism of MHC loci is the diversity of MHC-regulated immune responses to pathogens (Bodmer, 1972). In 1975, Zinkernagel and Doherty found that T-cell responses were restricted not only to

the antigen, but also to MHC molecules. They suggested that MHC heterozygotes would have greater T-cell responses than homozygotes, and this could potentially explain both the evolutionary advantage for gene duplication and diversity of MHC genes (Penn, 2002). The MHC is evolutionary important as it has been identified in all jawed vertebrates, including teleosts (Hansen et al., 1999; Matsuo et al., 2002), avians (Sato et al., 2001; Shiina et al., 2004) and numerous mammals (Wagner et al., 1999; Miska et al., 2002; Yuhki et al., 2003).

The MHC is a relatively large cluster of genes, spanning nearly 4, 2, 5, and 2 Mb of the human, cattle, and mouse and porcine genome, respectively (Rothschild et al., 2000). It is located on the short arm of chromosome 6 in humans, chromosome 23 in cattle, chromosome 17 in mice, and chromosome 7 in pigs. The human MHC is commonly referred to as the human leukocyte antigen (HLA) complex, the mouse MHC as the H-2 complex, the pig MHC as the swine leukocyte antigen (SLA) complex, and the cattle MHC as the bovine leukocyte antigen (BoLA) complex (Abdel-Hameed et al., 2006).

2.3 Antigen of leukocyte bovine (BoLA)

The term BoLA was defined at the First International Bovine Leukocyte Antigen Workshop that took place in Edinburgh in 1979 and it refers to *Bos taurus* and *Bos indicus*. The MHC encompasses a large chromosomal region that maps to chromosome 23 in both cattle and goats (Sadeghi et al., 2008). The bovine MHC is designated as BoLA, whereas in other ruminants the MHC is named according to the nomenclature proposed by Klein et al. (1990).

In the past few years, research have concentrated on a complex cluster of genes that are known to be involved in the immune response. According to Takeshima and Aida (2006), these BoLA genes produce two types of protein products. The class I proteins are present on the surface of most cells and they act in the rejection of foreign cells such as transplants, tumors or virus-infected cells. The class II proteins are in cells of the immune system and they are related with

antibody formation (Mosafer and Nassiry, 2005; Behl et al., 2012; Paracha et al., 2015).

2.4 Genetic Architecture and Structure of BoLA

The BoLA genes are relatively preserved and are divided into three main regions, namely classes I, II and III, with different function roles (Takeshima and Aida, 2006; Behl et al., 2012). Classes I and II MHC membrane glycoproteins bind foreign antigens and present them to T lymphocytes. Class I molecules exist on most nucleated cell types, whereas class II molecules are restricted primarily to B-cells and macrophages. Class II MHC molecules are composed of two chains (α and β) encoded by separated genes, A and B (Mosafer and Nassiry, 2005; Behl et al., 2012; Paracha et al., 2015). MHC classes I and II molecules are transmembrane glycoproteins (Giphart et al., 1990).

BoLA genes occur in two regions of chromosome 23 and are separated by a recombination frequency of approximately 17 % (Andersson et al., 1988; Van Eijk et al., 1992). The largest genes cluster is located in chromosome 23 band 22, and contains all of the bovine class I BoLA genes (BoLA-A, BoLA-B, MOG), class III sequences, and class II genes encoding the proteins of DQ and DR genes (Abdel-Hameed et al., 2006).

Class II molecules are very similar to class I, except that the alpha and beta chains are both encoded in the MHC. The lower part of an MHC molecule is anchored in the cell membrane, whereas the upper portion contains a small groove, which is the antigen-binding site (Penn, 2002). Next sub-chapters describe the architecture, structure and some functions of molecules classes I, II and III.

2.4.1 Class I

Class I molecules consist of an alpha chain with a molecular mass of about 45 KDa (heavy chain) associated non-covalently with β 2- microglobulin chain which is around 12 KDa (Behl et al., 2012). Class I genes of MHC are found in all nucleated cells, encoding proteins of 337 to 351 amino acids. Physical mapping

of bovine chromosome 23 (BTA23) has shown that the class I region encompasses approximately 1,550 kilobases (kb) of DNA, and there are two tightly linked expressed loci (BoLA-A and BoLA-B) (Bensaid et al., 1991). Molecular analysis of MHC class I region suggested that this region may contain up to 15 genes (Amills et al., 1998; Bhushan et al., 2007).

Also, class I genes are found in “clusters” that tend to vary in location and number from species to species (Hurt et al., 2004; Shiina et al., 2004). There are a large number of MHC genes and their alleles are present in most of the vertebrates (Paracha et al., 2015). Class I genes play a role in the recognition and binding of intracellular antigens, whereas Class II genes are analogous to extracellular antigens (Singh et al., 2012). Zinkernagel and Doherty (1979) reported that viruses were recognized by cytotoxic T lymphocytes, where class I molecules served as restriction elements for CD8+ cytotoxic T lymphocytes. Class I molecules are expressed on all nucleated cells (Giphart et al., 1990).

Class I molecules present small peptides to cytotoxic T lymphocytes (CTL), effectively advertizing the contents of the body's cells to the immune system. These peptides are usually self-peptides; however, if a cell becomes infected with a virus or other type of intracellular parasite, then the infected cell presents foreign peptides from the invading parasite. The CTL probe the surface of cells, searching for evidence of an infection. Each CTL has a unique, highly specific T-cell receptor on its surface that binds to MHC–antigen complexes. CTL also have CD8 adhesion molecules on their surface that stabilize the interaction between T cells and the presenting cell by binding to class I MHC molecules. If recognized as foreign, the CTL becomes activated, and once activated, the T cell proliferates and all of the clones search out and eliminate other infected cells presented in the foreign peptide (Penn, 2002). Class I antigens are found on the surface of nearly all cell types and are in general involved in the cytotoxic T-cell response. These antigens are highly polymorphic and their amino acid sequences are highly variable (Bhushan et al., 2007).

In general, MHC class I molecules bind peptides derived from the processing of endogenously synthesized cellular proteins and present them at the cell surface for recognition by cytotoxic T cells (Van Bleek and Nathenson, 1992). The process of MHC class I antigen presentation to cells of the immune system involves the binding of opposing cell surface molecules to the class I molecule (Shaw et al., 1995).

2.4.2 Class II

Both chains of class II molecules (molecular mass 33 KDa and 28 KDa) are encoded by genes within MHC (Behl et al., 2012). The class II genes encode proteins that present processed peptides derived from extracellular antigens to help T cells bearing the CD4+ differentiation marker. The class II molecules are formed by non-covalent association of α and β chains encoded by distinct genes within the MHC. For the MHC class II molecules, the α_1 and β_2 domains form the antigen binding site (Amills et al., 1998).

Class II genes are found on antigen-presenting cells such as B-cells, macrophages, thymic epithelial cells, venular endothelial cells, human activated T-cells and dendritic cells. They respond to intracellular pathogens (Abdel-Hameed et al., 2006) and show a more restricted tissue distribution, at least in some species (Giphart et al., 1990).

The function of MHC class II molecules is to bind peptides from extracellular bacteria and larger parasites. These peptides are generated in the intracellular vesicles of macrophages, immature dendritic cells, B cells, and other antigen-presenting cells (Milinski, 2006). The main function of class II molecules is to present processed pathogen derived peptides to T-helper lymphocytes DC4+ (Sachinandan et al., 2011). Animals deficient in CD4, CD8, or MHC classes I and II molecules have provided significant insight into the functions of these proteins during T cell development and in the generation of peripheral immune responses (Riberdy et al., 1998).

MHC class II molecules present these peptides to other specific T cells, which activate B cells and thus stimulate the production of specific antibodies, i.e., induce a vaccination effect (Milinski, 2006). MHC II molecules are of central importance for adaptive immunity. The MHC class II are highly polymorphic and they are located either closely linked (as in human) or in two distinct chromosomal locations (as in cattle) (Othman and Ahmed, 2010). The class II MHC genes of cattle appear to be further divided into two distinct regions (Nassiry et al., 2004). Class IIa contains functionally expressed DR and DQ genes (Takeshima and Aida, 2006). The remaining class II BoLA, named class IIb are located in a cluster near to the centromere in chromosome 23, band 12 and 13 (Rothschild et al., 2000). Class IIb sub-region is separated from the rest of MHC by a recombination frequency of approximately 17% and contains DNA, DOB, DYA, DYB, DMA, DMB, LMP2, LMP7, and TAP2 genes. These genes do not appear to be highly polymorphic (Abdel-Hameed et al., 2006).

Class II MHC products are highly polymorphic cell-surface molecules that are involved in the initiation of the immune response to foreign antigens. Molecules of Class II are heterodimer glycoproteins consisting of two polypeptide chains (α and β) (Nassiry et al., 2004).

Three BoLA DRB genes (DRB1, 2 and 3) are reported in bovines but only DRB3 is functional (Singh et al., 2012). DRB1 is a pseudogene, DRB2 is expressed at lower level and DRB3 gene is highly expressed and polymorphic (Wei et al., 2010). Under the DR region of the MHC complex, highly polymorphic β chain encoded by DRB genes is found (Zhao et al., 2011). DRA gene encodes α chain whereas β chain is coded by DRB gene (Naskar et al., 2012). DRB3 is a member of MHC class II genes and it is polymorphic, playing significant role in disease resistance and in immune responsiveness variability (Radwan et al., 2010). DRB3 exon 2 is highly polymorphic with more than 100 identified alleles (Kumar et al., 2011) and encode the antigen recognition site of the DR (Paracha et al., 2015).

2.4.3 Class III

The class III region is more diverse than the other classes, containing immune genes such as tumor necrosis factor, complement proteins and other secreted proteins (Baxter et al., 2010). Class III region of the MHC contains a heterogeneous collection of more than 30 genes including several complement components (C2, C4A, C4B, Bf), b-21 hydroxylase, tumor necrosis factors TNF- α and TNF- β , and heat shock protein genes (Milner and Campbell, 2001). The region is constituted by a heterogeneous set of genes related to immunological and other functions, such as the complement factors BF and C4, steroid 21-hydroxylase (CYP21), heat shock protein 70 (HSP70) and tumor necrosis factor α and β (TNFA and TNFB) (Lewin, 1996).

2.5 Polymorphism of BoLA

Selection of dairy cows for enhanced disease resistance without compromising production traits is a concept that is very enticing to dairy producers and researchers (Mosafer and Nassiry, 2005). Molecular techniques have been developed, resulting in identification of genetic markers for the characterization of genes responsible for production traits and host immunity (Lewin, 1989).

Polymorphism is a characteristic important to their function and is believed to be maintained primarily by selection pressure imposed by pathogens. BoLA genes are central to immunity and are among the most polymorphic known genes (Ellis and Hammond, 2014). The MHC classes I and II molecules exhibit an extraordinarily degree of genetic polymorphism in several vertebrate species (Giphart et al., 1990; Sachinandan et al., 2011).

The use of molecular techniques may help overcome some of the limitations of current breeding methods. Molecular techniques are able to detect variations or polymorphisms in specific DNA regions among different members of a population (Nascimento et al., 2006). These polymorphisms can be used to construct genetic maps and to determine differences between markers in the expression of particular phenotypes in a population. These differences, in turn, might indicate a

direct effect of these markers on the genetic determination of a trait (Albert et al., 1994).

The extensive structural polymorphism of class II molecules is responsible for the differences among individuals in immune response to infectious agents. This high degree of polymorphism observed at the DRB3.2 *locus* may help in identification of superior haplotypes for disease resistance (Behl et al., 2012).

Mota et al. (2002) detected 17 different BoLA-DRB3 alleles in Brazilian dairy Gyr cattle, some of which had previously been reported in Brahman cattle (Maillard et al., 1999), whereas Machado et al. (2005) also detected seven different BoLA-DRB3 alleles in Gyr cattle. Nascimento et al. (2006) identified a further 15 BoLA-DRB3 alleles in Brazilian *Bos indicus* Gyr dairy cattle. The distribution of the allele frequencies varied among herds, possibly due to variation in the founder populations, different selection intensities and the diversity in the genotyped animals in each herd.

The results presented by Fernández et al. (2008), in Mexico, showed that criollo cattle from states of Chihuahua and Tamaulipas had a high degree of BoLADRB3.2 polymorphism. For the population from Chihuahua, the cumulative frequency of six alleles out of 18 (*24, *19, *15, and *23) accounted for 75% of the allele frequency. For the population from Tamaulipas, eight alleles out of 34 (*23, *24, *39, *17, *18, *15, and *22) accounted for 66.6% of the whole allele frequency. These results are consistent with findings in other criollo populations Criollo (Kelly et al., 2003; Ripoli et al., 2004; Martínez et al., 2005), European taurine breeds (Sharif et al., 1998), Asian taurine breeds (Takeshima et al., 2003), and the Zebu Gyr breed (Behl et al., 2007).

Several studies suggest that the polymorphism present in DRB3 gene is significantly associated with the immune response (Ballingall et al., 2004; Baxter et al., 2010; Gowane et al., 2013). A degree of BoLA-DRB3 polymorphism has been reported in Holstein, Jersey, Japanese Shorthorn, Argentine Criollo, Iranian Holstein and Philippine native cattle (Gilliespie et al., 1999; Nassiry et al., 2004; Takeshima et al., 2014). Moreover, the six most frequently detected alleles

(BoLA-DRB3.2×8, ×9, ×21, ×27, ×7, and ×24) accounted for 70% of the alleles in a population of Japanese Shorthorn cows (Takeshima et al., 2003).

Van Eijk et al. (1992) reported 30 different alleles based on genotyping 168 animals of 10 cattle breeds including Angus, Ayrshire, Brown Swiss, Gelbvieh, Guernsey, Jersey, Holstein-Friesian, Polled Hereford, Simmental and South Devon. In another study from the United States involving BoLA-DRB3.2, there were genotyped 1100 Holstein cows from 93 commercial dairy farms, and 29 alleles were found (Dietz et al., 1997). Gelhaus et al. (1995) identified 14 novel BoLADRB3.2 alleles. Thirty-five different alleles were observed in Japanese Holstein herds (Yoshida et al., 2004). Sharif et al. (1998) showed that BoLA-DRB3.2 *8, *11, *16, *22, *23 and *24 accounted for 83.5% of the alleles in Holstein cows from Canada.

Results so far indicate that allelic frequencies of BoLA-DRB3 may depend on the breed and population, because of the founder population and selection pressure. The extensive polymorphism exhibited by these genes may have important implication for binding and make BoLADRB3 typing potentially useful. In addition, an association between certain BoLA alleles and the disease resistance or beneficial production traits has been demonstrated (Mosafer and Nassiry, 2005).

2.6 Influence of BoLA genes in disease and resistance of cattle

Different studies confirm the existence of correlations between susceptibility to disease and a specific MHC haplotype reported in animals and humans (Sharif et al., 2000; Alizadeh et al., 2003). Although each parasite contains different proteins, which are degraded into different peptides, studies in various vertebrate taxa have shown that only one or a few different MHC alleles provide resistance to an specific parasite (Grimholt et al., 2003; Harf and Sommer, 2005; Untalan et al., 2007).

Associations between BoLA alleles and diseases were identified in cattle (classes I and II genes) (Abdel-Hameed et al., 2006). To date, different authors have reported several associations between a particular allele of the BoLA genes and

resistance/susceptibility to some infectious disease in cattle (Sharif et al., 1998; Lewin et al., 1999; Ballingal et al., 2004). Table 2 shows other findings for specific diseases in several cattle breeds.

In cattle, BoLA-DRB genes are involved with the regulation of immune response (Van Eijk et al., 1992; Dietz et al., 1997; Sharif et al., 1998). They also have been associated with resistance to tick (Untalan et al., 2007), nematode egg worm counts (Stear et al., 1990), lymphocytosis caused by bovine leukemia virus (Lewin, 1994), subsequent chronic spinal paresis (Park et al., 1993) and ketosis (Mejdell et al., 1994). Table 2 presents other findings for the gene BoLA and the presence of ticks in cattle.

Specifically, the alleles DRB3.2×23 and DRB3.2×16 have been associated with increased and decreased risk of mastitis in Canadian Holsteins, respectively (Sharif et al., 1998; Ledwidge et al., 2001; Zambrano et al., 2011). One group of four BoLA-DRB3.2 alleles representing 46% of the allele frequency was associated with increased immunoglobulin M and complement, and decreased mononuclear cell numbers (Mosafer and Nassiry, 2005).

In the study of Mosafer and Nassiry (2005) BoLA-DRB3.2*16 and *22 were associated with a lower risk of cystic ovarian disease in Holstein cattle ($P \leq 0.05$). Iranian Golpayegani cows had not BoLA-DRB3.2×23 allele, and frequency of the BoLA-DRB3.2×11 allele was 7% (Mosafer and Nassiry, 2005); these two alleles were associated with cows that were resistant to mastitis and to bovine leukemia virus infection (Dietz et al., 1997). Associations have been made between infection diseases of cattle and BoLA genes. Sharif et al. (1998) reported that BoLA-DRB3.2 *16 was associated with somatic cell score and BoLA-DRB3.2 *23 with severe coliform mastitis in Canadian Holstein cattle.

Kelm et al. (1997) reported the presence of allele DRB3.2*16 associated with higher estimated breeding value for SCS. Allele DRB3.2*8 was associated with increased estimated breeding value for clinical mastitis. The same study show that DRB3.2 alleles *11, *23 and the recessive allele for bovine leukocyte adhesion deficiency were associated with decreased clinical mastitis.

The allele BoLA-DR/DQ, have been associated for resistance to dermatophilosis in Brahman cattle (Maillard et al., 1996) and immune response to foot and mouth diseases (Glass et al., 1991; Lewin et al., 1999; Wei et al., 2012). The DRB3 exon 2 polymorphism has also been observed to be associated with milk proteins traits (Starkenbourg et al., 1997).

2.7 Conclusions

The study of the MHC is important because of the critical role that it plays in the immune system of animals. The role of the BoLA-DRB3 gene in the development of an immune response system and its highly polymorphic nature makes it one of the most important candidate genes in disease resistance studies. The highly polymorphic nature of the MHC has functional consequences, suggesting that it is critical to the role of the MHC molecules in the immune response. Genetic mechanisms generate the variation that is observed among MHC alleles. The molecular analysis and fine mapping of disease associations will probably play a central role in animal genetics and veterinary medicine for many years to come. Understanding the nature of genetic variation to immune response in populations is an important aspect for designing disease prevention strategies for livestock.

CONFLICT OF INTEREST

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

2.8 References

- Abdel-Hameed, K. G., G. Sender, and M. Mayntz. 2006. Major histocompatibility complex polymorphism and mastitis resistance- a review. *Animal Science Papers and Reports* 24: 11-25.
- Acosta-Rodríguez R., R. Alonso-Morales, S. Balladares, H. Flores-Aguilar, Z. García-Vázquez, and C. Gorodezky. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is

probably associated with susceptibility. *Veterinary Parasitology* 127: 313-321.

Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. B. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell* 4th Ed. Garland Publishing, Inc., New York. NY, USA. Pp: 355-362.

Alizadeh, Z., N. Karrow, and B. A. Mallard. 2003. Biological effect of varying peptide binding affinity to BoLA-DRB3*2703 allele. *Genetics Selection Evolution* 35: S51-S65.

Amills, M., V. Ramiya, J. Norimine, and H. A. Lewin. 1998. The major histocompatibility complex of ruminants. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 17: 108-120.

Andersson, L., A. Lundén, S. Sigurdardottir, C. J. Davies, and L. RASK. 1988. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics* 27: 273-280.

Ballingall, K. T., A. Luyai, G. J. Rowlands, J. Sales, A. J. Musoke, S. P. Morzaria, and D. J. McKeever. 2004. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*2703 and DRB3*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. *Infection and Immunity* 72(5): 2738-2741.

Baltian, L. R., M. V. Ripoli, S. Sanfilippo, S. N. Takeshima, Y. Aida, and G. Giovambattista. 2012. Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Molecular Biology Reports* 39: 7215-7220.

Barth, R., S. Counce, P. Smith, and G. D. Snell. 1956. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *The Annals of Surgery* 144: 198-204.

- Baxter, R., S. C. Craigmile, C. Hailey, A. J. Douglas, J. L. Williams, and E. J. Glass. 2010. BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine Journal* 28: 28-37.
- Behl, J. D., N. K. Verma, N. Tyagi, P. Mishra, R. Behl, and B. K. Joshi. 2012. The major histocompatibility complex in bovines: a review. *ISRN Veterinary Science*. doi.org/10.5402/2012/872710.
- Behl, J. D., N. K. Verma, R. Behl, and M. Sodhi. 2009. Genetic variation of the major histocompatibility complex DRB3.2 locus in the native *Bos indicus* cattle breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 11: 1487-1494.
- Behl, J. D., N. K. Verma, R. Behl, M. Mukesh, and S. P. S. Ahlawat. 2007. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). *Journal of Dairy Science* 90: 2997-3001.
- Bensaid A., A. Kaushal, C. L. Baldwin, H. Clevers, J. R. Young, S. J. Kemp, N. D. MacHugh, P. G. Toye, and A. J. Teale. 1991. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immunogenetics* 33(4): 247-254.
- Bhushan, B., B. N. Patra, P. J. Das, T. Dutt, P. Kumar, A. Sharma, U. Umang, S. Dandapat, and S. P. A. Ahlawat. 2007. Polymorphism of exon 2-3 of bovine major histocompatibility complex class I BoLA-A gene. *Brazilian Journal of Genetics* 30: 560-566.
- Bodmer, W. F. 1972. Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature* 237: 139-145.

- Dietz, A. B., N. D. Cohen, L. Timms, and M. E. Kehrli. 1997. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80: 406-412.
- Ebtihal, A. I., N. A. T. Allam, E. E. Z. Katb, G. A. El-Rafey, M. M. Alaa El-Deen, and M. G. Fadlallah. 2012. Sequence-Based typing-study on the relationship between subclinical mastitis and BoLA-DRB3.2* allelic polymorphism in Egyptian cows. *Global Veterinaria* 09: 08-22.
- Edwards, S. V., and P. W. Hedrick. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 305-311.
- Ellis, S. A., and J. A. Hammond. 2014. The functional significance of cattle major histocompatibility complex. *Annual Review of Animal Biosciences* 2: 285-306.
- Fernández, I. G., J. G. Ríos-Ramírez, A. Gayosso-Vázquez, R. Ulloa-Arvizu, and R. A. Alonso-Morales. 2008. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of criollo cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology* 31: 880-886.
- Firouzmandi M., J. Shoja, A. Bazegari, and E. Roshani. 2010. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Iranian Holstein and Sarabi (Iranian native) cattle. *African Journal of Biotechnology* 9: 2224-2228.
- Gelhaus, A., L. Schnittger, D. Mehlitz, R. D. Horstmann, and C. G. Meyer. 1995. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics* 26: 147-153.
- Gilliespie, B. E., B. M. Jayarao, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver SP. 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 82: 2049-2053.

- Giphart, M. J., M. A. M. Groenen, and J. J. Van Der Poel. 1990. Homologies between the major histocompatibility complex of man and cattle: Consequences for disease resistance and susceptibility. *Veterinary Quarterly* 12: 202-211.
- Glass, E., R. Oliver, T. Collent, T. Doelt, R. Dimarchi, and R. Spooner. 1991. MHC class second restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* 74: 594-599.
- Gorer, P. A. 1937. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *Journal of Pathology and Bacteriology* 44: 691-697.
- Gowane, G. R., R. K. Vandre, M. Nangre, and A. K. Sharma. 2013. Major histocompatibility complex (MHC) of bovines: an insight into infectious disease resistance. *International Journal of Livestock Research* 1: 46-57.
- Grimholt, U., S. Larsen, R. Nordmo, P. Midtlyng, and S. Kjoeglum. 2003. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics* 55: 210-219.
- Hansen, J. D., P. Strassburger, G. H. Thorgaard, W. P. Young, and L. Du Pasquier. 1999. Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Immunology* 163: 774-786.
- Harf, R., and S. Sommer. 2005. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Molecular Ecology* 14: 85-91.
- Hedrick, P. W., and T. J. Kim. 2000. Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of MHC variation. In: *Evolutionary Genetics: From Molecules to Morphology*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA. Pp: 204-234.

- Hill, A. V. S. 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. Annual Review of Immunology, vol. 16, University of Oxford, Windmill Road, Oxford, United Kingdom. Pp: 593-617.
- Hurt, P., L. Walter, R. Sudbrak, S. Klags, I. Müller, T. Shiina, H. Inoko, H. Lenrach, E. Günter, R. Reinhardt, and H. Himmelbauer. 2004. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. Genome Research 14: 631-639.
- Kelly, L., P. Nicolini, M. D'Angelo, A. Nimo, G. Rincón, J. Piagio, and A. Postiglioni. 2003. Polimorfismo de gen DRB3.2 en bovinos criollos del Uruguay. Archivos de Zootecnia 52: 77-80.
- Kelm, S. C., J. C. Dettilleux, A. E. Freeman, M. E. Kehrli, A. B. Dietz, L. K. Fox, J. E. Butler, I. Kasckovics, and D. H. Kelley. 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. Journal of Dairy Science 80: 1767-1775.
- Klein J., R. E. Bontrop, R. L. Dawkins, H. A. Erlich, U. B. Gyllensten, E. R. Heise, P. P. Jones, P. Parham, E. K. Wakeland, and D. I. Watkins. 1990. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. Immunogenetics 31(4): 217-219.
- Kumar, S., M. L. Sangwan, S. Ahlawat, and A. Barwar. 2011. Polymorphism in DRB3 exon 2 by PCR-RFLP and its association with mastitis in Murrah buffaloes. Indian Journal of Biotechnology 10: 232-234.
- Ledwidge, S. A., B. A. Mallard, J. P. Gibson, G. B. Jansen, and Z. H. Jiang. 2001. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. Animal Genetics 32: 219-221.
- Lewin, H. A. 1989. Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. Journal of Dairy Science 72: 1334-1348.

- Lewin, H. A. 1994. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. *Animal Biotechnology* 5: 183-195.
- Lewin, H. A. 1996. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In *The major histocompatibility complex region of domestic animal species*, Chapter 4. CRC Series in Comparative Immunology. CRC Press, Boca Raton, Florida, FL, USA. Pp: 65-98.
- Lewin, H. A., G. C. Russel, and E. J. Glass. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Annual Review of Immunology* 167: 145-58.
- Machado, M. A., C. S. Nascimento, M. L. Martinez, M. V. G. B. Da Silva, A. L. Campos, R. L. Teodoro, R. S. Verneque, and S. E. F. Guimarães. 2005. Associação do loco BoLA-drb3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gyr. *Journal Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57: 380-389.
- Maillard, J. C., C. Renard, P. Chardon, I. Chantal, and A. Bensaid. 1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics* 30: 200-203.
- Maillard, J. C., D. Martinez, and A. Bensaid. 1996. An amino acid sequence coded by the exon 2 of the BoLA DRB3 gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of resistance to dermatophilosis in Brahman zebu cattle of Martinique (FWI). *Annals of the New York Academy of Sciences* 791: 185-197.
- Martínez, R., R. Toro, F. Montoya, M. Burbano, J. Tobón, J. Gallego, and F. Ariza. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia* 54: 349-356.

- Matsuo, M. Y., S. Asakawa, N. Shimizu, H. Kimura, and M. Nonaka. 2002. Nucleotide sequence of the MHC class I genomic region of a teleost, the medaka (*Oryzias latipes*). *Immunogenetics* 53: 930-940.
- Mejdell, C. M., Ø. Lie, H. Solbu, E. F. Aarnet, and R. L. Spooner. 1994. Associations of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian Cattle. *Animal Genetics* 25: 99-104.
- Milinski, M. 2006. The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 159-186.
- Milner, C. M., and R. D. Campbell. 2001. Genetic organization of the human MHC class III region. *Frontiers of Bioscience* 6: 914-926.
- Miska, K. B. G. A. Harrison, L. Hellman, and R. D. Miller. 2002. The major histocompatibility complex in monotremes: an analysis of the evolution of MHC class I genes across all three mammalian subclasses. *Immunogenetics* 54: 381-393.
- Mosafer, J. and, M. R. Nassiry. 2005. Identification of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Iranian Golpayegani cattle by DNA test. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18: 1691-1695.
- Mota, A. F., J. E. Gabriel, M. L. Martinez, and L. L. Coutinho. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gyr cattle (*Bos indicus*). *European Journal of Immunogenetics* 29: 223-227.
- Nascimento, C. S., M. A. Machado, M. L. Martinez, M. G. Vinícius, B. Da Silva, M. F. M. Guimarães, A. L. Campos, A. L. S. Azevedo, R. L. Teodoro, R. D. Verneque, S. E. F. Guimarães, and D. A. A. Oliveira. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with

fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). Brazilian Journal of Genetics 29: 641-647.

Naskar, S., S. M. Deb, S. K. Niranjana, S. Kumar, D. Sharma, D. Sakaram, and A. Sharma. 2012. Molecular characterization of MHC-DRB cDNA in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Brazilian Journal of Genetics 35(1): 95-98.

Nassiry, M. R., F. Eftekhari shahroodi, J. Mosafer, A. Norouzy, and A. Javadmanesh. 2004. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. Proceedings of the 11th Asian-Australasian Animal Production Animal Science Congress (AAAP), Malaysia 3: 266-268.

Othman, E. O., and S. Ahmed. 2010. Genetic polymorphism of BoLA-DRB3 exon 2 in Egyptian Buffalo. Genes, Genomes and Genomics 4: 70-73.

Paracha, H., T. Hussain, M. Z. Tahir, A. Yasmeen, M. T. Pervez, A. A. Sheikh, A. Haider, R. Ali, and W. A. Khan. 2015. Multifunctional DRB3, a MHC class II gene, as a useful biomarker in small ruminants: A review. Journal of Infection and Molecular Biology 3: 19-23.

Park, C. A., H. Hines, D. R. Monke, and W. T. Threlfall. 1993. Association between the bovine major histocompatibility complex and chronic posterior spinal paresis – a form of ankylosing spondylitis – in Holstein bulls. Animal Genetics 24: 53-58.

Penn, J. D. 2002. Major Histocompatibility Genes (MHC). In: Encyclopedia of Life Sciences [<http://www.els.net>], Nature Publishing Group, London.

Radwan, J., A. Biedrzycka, and W. Babik. 2010. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? Biological Conservation 143(3): 537-544.

- Ratislav, M., and B. Mangesh. 2011. BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 192: 517-519.
- Ramlachan, N. 2004. Organization of the class I region of the bovine major histocompatibility complex (BOLA) and the characterization of a class I frameshift deletion (BOLA-Adel) prevalent in feral bovids. Ph.D. Thesis, Texas A&M University, Texas, TX, USA.
- Riberdy, J. M., E. Mostaghel, and C. Doyle. 1998. Disruption of CD4-major histocompatibility complex class II interaction blocks the development of CD4+ T cells *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4493-4498.
- Ripoli, M. V., V. J. P. Lirón, J. C. De Luca, F. Rojas, and G. Giovambattista. 2004. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreño Criollo dairy cattle. *Biochemical Genetics* 42: 231-240.
- Rothschild, M. F., L. Skow, and S. J. Lamont. 2000. The major histocompatibility complex and its role in disease resistance and immune responsiveness. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*. 2nd Ed. (Eds. R.F.E. Axford, S.C. Bishop, F. W. Nicholas and J.B Owen), CAB International, Wallingord, England. Pp: 243-252.
- Sachinandan, D., R. K. Singh, and B. Brahman. 2011. Allelic diversity of major histocompatibility complex class II DRB gene in Indian cattle and buffalo. *Molecular Biology International* doi.org/10.4061/2011/120176.
- Sadeghi, B. M. R. Nassiry, M. Heydarpour, F. E. Shahroudi, J. Mosafer, and A. S. Motlagh. 2008. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Sistani cattle of Iran (*Bos indicus*). *Biotechnology* 7(2): 333-337.

- Sato, A., W. E. Mayer, H. Tichy, P. R. Grant, B. R. Grant, and J. Klein. 2001. Evolution of MHC class II B genes in Darwin's finches and their closest relatives: birth of a new gene. *Immunogenetics* 53: 792-801.
- Sharif, S., B. A. Mallard, and J. M. Sargeant. 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76: 231-238.
- Sharif, S., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, J. M. Sargeant, H. M. Scott, J. C. M. Dekkers, and K. E. Leslie. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of diseases and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics* 29: 185-193.
- Shaw, M. K., L. G. Tilney, A. J. Musoke, and A. J. Teale. 1995. MHC class I molecules are an essential cell surface component involved in *Theileria parva* sporozoite binding to bovine lymphocytes. *Journal of Cell Science* 108: 1587-1596.
- Shiina, T., S. Shimizu, K. Hosomichi, S. Kohara, S. Watanabe, K. Hanzawa, S. Beck, J. K. Kulski, and H. Inoko. 2004. Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions. *Journal of Immunology* 172: 6751-6763.
- Singh, P. K., S. V. Singh, M. K. Singh, V. K. Saxena, A. V. Singh, and J. S. Sohal. 2012. Genetic analysis of MHC Class II DRB gene in an endangered Jamunapari breed of goats. *Indian Journal of Biotechnology* 11(2): 220-223.
- Starkenburg, R. J., L. B. Hansen, M. E. Kehrli, and H. Chester-Jones. 1997. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. *Journal Dairy Science* 80: 3411-3419.

- Stear, M. J., D. J. S. Hetzel, S. C. Brown, J. J. Gershwin, M. J. Mackinnon, and F. W. Nicholas. 1990. The relationships among ecto and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Veterinary Parasitology* 34: 303-321.
- Takeshima, S. N., and Y. Aida. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Journal of Animal Science* 77: 138-150.
- Takeshima, S. N., T. Miyasaka, M. Polat, M. Kikuya, Y. Matsumoto, C. N. Mingala, M. A. Villanueva, A. J. Salces, M. Onuma, and Y. Aida. 2014. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene Journal* 2: 176-190.
- Takeshima, S., N. Saitou, M. Morita, H. Inoko, and Y. Aida. 2003. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* 316: 111-118.
- Untalan, P. M., J. H. Pruett, and C. D. Steelman. 2007. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Veterinary Parasitology* 145: 190-195.
- Van Bleek, G. M., and S. G. Nathenson. 1992. Presentation of antigenic peptides by MHC class I molecules. *Trends in Cell Biology* 2: 202-207.
- Van Eijk, M. J. T., J. A. Stewart-Haynes, and H. A. Lewin. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 23: 483-496.
- Wagner, J. L., R. C. Burnett, and R. Storb. 1999. Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives. *Journal of Heredity* 90: 35-38.

- Wei, K., Z. Zhang, X. Wang, W. Zhang, X. Xu, F. Shen, and B. Yue. 2010. Lineage pattern, trans-species polymorphism, and selection pressure among the major lineages of feline MHC-DRB peptide binding region. *Immunogenetics* 62(5): 307- 317.
- Wei, L., L. Qinglong, J. Luo, W. Chengmin, W. Xiaobing, and H. Hongxuan. 2012. BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. *Molecular Biology Reports* 39: 9203-9209.
- Yoshida, T., H. Mukoyama, H. Furuta, S. Ohboshi, M. Kosugiyama, and H. Tomogane. 2004. Allelic frequency of PCR-RFLP type of BoLA-DRB3 in the Japanese Holstein herds and the relation to mastitis. *Proceedings of the 29th International Conference on Animal Genetics*, Tokyo, Japan.
- Yoshida, T., H. Mukoyama, H. Furuta, Y. Kondo, S. Takeshima, Y. Aida, M. Kosugiyama, and H. Tomogane. 2009. Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Journal of Animal Science* 80: 498-509.
- Yuhki, N., T. Beck, R. M. Stephens, Y. Nishigaki, K. Newmann, and S. J. O'Brien. 2003. Comparative genome organization of human, murine, and feline MHC class II region. *Genome Research* 13: 1169-1179.
- Zambrano, C. J., J. Echeverri, and A. H. López. 2011. Genetic association of BOLA DB3.2 gen with mastitis in Holstein and Bon x Holstein cows. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 1: 177-180.
- Zhao, Y., H. Xu, L. Shi, and J. Zhang. 2011. Polymorphisms in exon 2 of MHC class II DRB3 gene of 10 domestic goats in southwest China. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24(6): 752-756.
- Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty. 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation

antigens determining T cell-restriction specificity, function and responsiveness. *Advances in Immunology* 27: 51-177.

2.9 Tables

Table 2. DRB allele frequency associated with diseases in different cattle breeds

Breed	Disease	Locus and Allele	Gene effect	Frequency (%)	Reference
Holstein X Slovak (Slovakia)	Paratuberculosis	DRB3*1, *6 and *11	Positive	15.7, 15.7 and 10.8	Ratislav and Mangesh, 2011
Holstein (Egypt)	Mastitis (Subclinical, <i>Staphylococcus aureus</i>)	DRB3.2*11 and *24	Positive	73.8 and 23.8	Ebtihal et al., 2012
Holstein (Egypt)	Mastitis (Subclinical, <i>Escherichia coli</i>)	DRB3.2*11, *6 and *24	Positive	11.7, 26.7 and 61.7	Ebtihal et al., 2012
Holstein (Egypt)	Mastitis (Subclinical, <i>Streptococcus agalactiae</i>)	DRB3.2*11 and *24	Positive	71.1 and 24.4	Ebtihal et al., 2012
Sarabi	Mastitis (Clinic)	DRB3.2*11	Positive	10.4	Firouzamandi et al., 2010
Holstein (Argentina)	Mastitis (SCC < 250 000)	DRB3.2*16, *23 and *24	Positive	10.2, 14.8 and 11.7	Baltian et al., 2012
Holstein (US)	Mastitis (SCC > 300 000 - 500 000)	DRB3.2*22, *24, *8, *16 and *23	Positive	14.3, 14.3, 14.1, 10.1 and 9.1	Dietz et al., 1997
Holstein (Japan)	Mastitis (Subclinical, <i>Streptococci</i>)	DRB3*0101, *1501 and *1201	Positive	14.6, 18.3 and 12.2	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Subclinical, <i>Staphylococci</i>)	DRB3*0101, *1501 and *1201	Positive	22.6, 17.7 and 12.9	Yoshida et al., 2009

SCC (somatic cell count)

Table 2. DRB allele frequency associated with diseases in different cattle breeds
(Continuation)

Breed	Disease	Locus and Allele	Gene effect	Frequency (%)	Reference
Holstein (Japan)	Mastitis (Subclinical, <i>Escherichia coli</i>)	DRB3*0101, *1501 and *1101	Positive	22.2, 25 and 11.1	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Subclinical, <i>Staphylococcus aureus</i>)	DRB3*0101, *1501 and *1101	Positive	16.7, 13.3 and 10.1	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Clinic, <i>Streptococci</i>)	DRB3*0101, *1501, *1201 and *1101	Positive	14, 18, 12 and 10.1	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Clinic, <i>Staphylococci</i>)	DRB3*0101, *1501, *1201 and *1101	Positive	21.3, 19.1, 11.7 and 9.6	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Clinic, <i>Escherichia coli</i>)	DRB3*0101, *0105 and *1101	Positive	21.2, 23.1 and 11.1	Yoshida et al., 2009
Holstein (Japan)	Mastitis (Clinic, <i>Staphylococcus aureus</i>)	DRB3*0101, *1201 and *1101	Positive	17.3, 13.5 and 9.6	Yoshida et al., 2009

SCC (somatic cell count)

Table 3. DRB allele frequency associated with resistance to tick bovine breeds

Breed	Tick	Locus and Allele	Frequency (%)	Reference
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	DRBP1* 118 and *128	33.3 and 33.3	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	DRBP1*116 and *134	14.8 and 11.1	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Red Poll X Simmental	<i>Amblyomma americanum</i>	DRB3*4401, *1301 and *0201	23, 20 and 10	Untalan et al., 2007
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	DRB3*184 and *210	66.8 and 16.8	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	DRB3*164, *174, *184, *198 and *210,	9.2, 14.8, 27.8, 9.3 and 9.2	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Red Poll X Simmental	<i>Amblyomma americanum</i>	DRB3*174, *185, *193 and *194	27, 21, 15, and 25	Untalan et al., 2007
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	BM1815*148, *150, *166 and *170	25, 16.7, 16.7, 16.7 and 16.7	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	BM1815*148, *150, *162, *166 and *168	22.2, 24, 11, 14.8 and 9.2	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Red Poll X Simmental	<i>Amblyomma americanum</i>	MB025*118, *124, *128 and *133	38, 13, 21 and 20	Untalan et al., 2007
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	RM185*100 and *106	25 and 25	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Simmental X Holstein X Zebu	<i>Boophilus microplus</i>	RM185*94, *98, *100, *102, *104 and *106	14.8, 16.7, 12.9, 16.7, 18.5 and 14.8	Acosta-Rodríguez et al., 2005
Red Poll X Simmental	<i>Amblyomma americanum</i>	BM1815*147, *149, *151 and *166	44, 12, 11 and 24	Untalan et al., 2007
Red Poll X Simmental	<i>Amblyomma americanum</i>	RM185*98 and *100	38 and 44	Untalan et al., 2007

3 POLYMORPHISM OF THE BoLA GENE IN THE JERSEY AND THE TROPICAL MILKING CRIOLLO BOVINE BREEDS IN MEXICO

M. Ruiz-Ortega¹, R. Ramírez-Valverde¹; C. Becerril-Pérez², G. García-Muñoz¹; A.

Rosendo-Ponce³; R. Núñez-Domínguez¹, and B. Alarcón-Zúñiga^{1**}

Abstract

The aim of this study was to estimate the allelic and genotypic frequencies and polymorphic information content of the bovine leukocyte antigen (BoLA) gene. Blood samples were collected from 51 Tropical Milking Criollo (TM) and 92 Jersey (J) individuals. Seven BoLA Class I specific SNP primers were used publically available in the bovine genome database. The DNA samples were extracted and alleles identified by the real-time polymerase chain reaction technique. The G allele at SNP BoLA7 was the most polymorphic and had the highest genotypic frequency in both breeds. The chi-square test statistic indicates that none statistically significant association between breed and allele was estimated. There is a need for other studies with different polymorphisms that are associated with disease resistance of TM in hot tropical regions.

Key Words: Bovine leukocyte antigen, genetic, polymorphism.

Esa última oración no la entiendo bien, ni veo la razón del cambio, revisa lo que te pidió el Lector Externo

3.1 Introduction

The genomes of all vertebrates examined to date include a major histocompatibility complex (MHC), which is a region of tightly linked genes that are largely responsible for the presentation of self and non-self antigens to the immune system, containing the most polymorphic protein-encoding loci within the mammalian genome [1, 2, 3]. The extreme high level of polymorphism observed for MHC loci may be a result of the evolutionary consequences of intensive interactions between infectious pathogens and the host defensive system [4, 5].

The MHC is organized within distinct functional clusters as class I, II and III, which shows a considerable level of conservation among mammal species [4, 6, 7]. This region encodes a range of MHC class I and class II cell surface glycoproteins with central roles in T cell mediated immune surveillance [8, 9]. The MHC class I and II molecules present pathogen-derived peptide fragments for recognition by antigen specific T cells, resulting in their clonal expansion and differentiation into effector and memory cells [6]. Many studies have shown associations between specific MHC classes I and II alleles and disease resistance, susceptibility and progression in humans, mice, chickens and cattle [10, 11, 12, 13]. It has been reported also several associations between a particular allele of the BoLA genes and resistance/susceptibility to some infectious diseases in cattle [10, 14, 15, 16].

The Indian zebu *Bos indicus* have evolved under tropical climatic conditions over thousands of years and have acquired many unique adaptability features that have helped them to survive under these conditions [17]. The criollo breeds in Latin America possess a set of genes that confer them an adaptive characteristic to hot tropical regions [18]. In tropical cattle, several SNPs (single nucleotide polymorphisms) related to the MHC and associated with susceptibility/resistance to diseases have been reported [19, 18, 20].

The results of Fernández et al. [18] show that Chihuahua and Tamaulipas Criollo cattle have a high degree of BoLADRB3.2 polymorphism, in concordance with findings in other populations, such as the American Criollo cattle [40,35,33],

European taurine breeds [14], Asian taurine breeds [37], and the Zebu Gyr breed [39, 2]. In this study [39], allele DRB3.2*24 showed the highest frequency (0.38) in Chihuahua Criollo cattle, and it has also been reported to be present at frequencies higher than 0.1 in all taurine populations [40, 14].

Many studies suggest that the polymorphism present in DRB3 gene is significantly associated with the immune response [16, 38, 13]. A degree of BoLA-DRB3 polymorphism has been reported in studies of Holstein, Jersey, Japanese Shorthorn, Argentine Criollo, Iranian Holstein and Philippine native cattle [40, 31, 36]. However, there are significant differences in allelic frequencies of BoLADRB3 alleles between Holstein, Jersey, Japanese Shorthorn, Argentine Criollo and Iranian Holstein [34].

In bovine genomic breeding, selection decisions are made on genotyping and genomic breeding values predicted from single nucleotide polymorphic (SNP) markers associated with genes and traits. In dairy cattle, genomic selection has the potential to double the rate of genetic gain to that of conventional breeding due to a substantial reduction in generation intervals and increased reliable breeding values [21, 22]. However, there have been no reports of genetic variations in bovine BoLA genes in the Jersey (J) and the Tropical Milking Criollo (TM) breeds of Mexico, which is responsible for tropical diseases and parasites resistance. Therefore, the main task of this study was to estimate the allelic and genotypic frequencies and polymorphic information content in the bovine leukocyte antigen (BoLA) gene of Jersey and Tropical Milking Criollo breeds of Mexico.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Genetic Material

Samples were collected from 51 TM and 92 J individuals, registered in the Tropical Milking Criollo and Jersey Cattle Mexican Associations. The TM is originated from cattle brought to the Caribbean and Continental America by Spaniards since the XV century, passed by Central America, and brought to

Mexico and mixed with local criollos during the past century. The Jersey cattle is a gene pool mixed brought to Mexico from USA, Canada, Denmark, New Zealand and Australia. Samples were obtained from blood, semen and follicle tissue from male and females, and DNA extraction done using the guanidinium thiocyanate method [23] with modifications.

3.2.2 Selection of SNP primers

SNPs primers used to genotype individuals were designed using OligoAnalyzer 3.1® (Integrated DNA Technologies, 2012, Iowa, USA), corresponding to the BoLA-Class I gene, reported in the Bovine Genome database (bovinegenome.org). The changing nucleotides were marked with a different fluorophore at the SNP position to distinguish each one during the allele identification by real time PCR. The reverse sequences and their complements, the coefficients of hairpin formation, autodimerization and creation of heterodimers, the percentage of each nucleotide and the fusion point for each sequence, necessary to design the thermo-cycling protocol, were determined with the same software. Seven SNP primers were selected for genotyping the BoLA-Class I gene (Table 4) and were synthesized by Kbioscience (Massachusetts, USA). Molecular validation was done by amplifying the previously designed primers to corroborate the *in silico* performance. With the SNP primers that amplified well, the resolution curve was verified to guarantee the correct measure of the sample.

3.2.3 Genotyping of DNA

The PCR amplification was done with 4.11 µL of reaction solution (KASPar V4.0 Master Mix, KBioscience, USA) and 20 ng of genomic DNA; for the negative template control, 4 µL of molecular grade water was used. The polymorphism was identified with the UV–Vis of the rtPCR thermo cycler (CFX 96, Bio-Rad, California, USA). Different fluorescence of SNP primers was used to detect the changing nucleotides. The thermocycling protocol was: one cycle at 94 °C for 15 min, 10 cycles at 94 °C for 20 s and 61 °C for 1 min, with a decrease of 0.6 °C per cycle in the second step and 35 cycles at 94 °C for 20 s, followed by a cycle at 55

°C for 20 s for 1 min, and finally a cycle of 37 °C for 1 min, including the fluorescence report for each cycle in the last step.

3.2.4 Data analysis

Allelic diversity, effective number and frequencies for the seven SNP loci per breed were estimated by direct counting of amplification considering a non-amplicon control. Between-breeds, allelic and genotypic frequencies for each SNP primer were compared using Chi-square test. The expected frequencies of heterozygote (He) were those expected from the Hardy-Weinberg equilibrium. Significance was set at $p \leq 0.05$.

3.3 Results and Discussion

Data of allelic and genotypic frequencies of BoLA gene in the TM, J and pooled samples are reported in Table 5. Seven BoLA polymorphic loci, BoLA1 to BoLA7, were detected on 143 individuals. In both breeds, the heterozygous genotypes of the SNPs were in low frequency or not detected, and all the SNP BoLA genotypes were not in Hardy Weinberg equilibrium (Table 5). No differences were estimated between breeds for the SNP BoLA genotypic frequencies, and exception was BoLA1CC. In the TM, the genotypes AA of BoLA2, TT of BoLA4 and CC of BoLA6 were not identified in the sampled animals. The allele G of BoLA7 was predominantly found in TM and J (35.2 and 25%). The genotypic frequencies for BoLA2 and BoLA4 polymorphisms were statistically different between TM and J, according to Chi-square test, although the expected heterocigosity frequency was low ($He=0.1341$; interval 0.031 – 0.405) for SNP genotypes (Table 5). Based on genotypic frequencies, genetic distance between breeds for BoLA SNP genotypes was 0.0047, assuming a high genetic similarity of both breeds J and TM.

A few comparative studies have been performed to assess the MHC class I diversity in small naturalized and conventional cattle populations in tropical America. For example, a principal component analysis and subtropical tree showed that the Bolivian population had the highest genetic divergence compared

to Holsteins bred in temperate or cold regions, and that population is closely related to the Bolivian Criollo cattle. These results suggest that genetic divergence in Holstein can be explained by the selection and introgression of genes from local germplasm. This is the first review of Holstein cows BoLA-DRB3 adapted to tropical environments, and contributes to an ongoing effort to catalog bovine allele frequencies of MHC within breed and location [41].

Early studies were performed during BoLA workshops between 1979 and 1996 [24, 25, 26]. These were hampered by lack of high resolution technologies and small populations; thus, they cataloged only broad breed similarities and differences while hinting at the presence of underlying complexity that could not at that time be resolved [20].

The Chillingham cattle breed is an example of a very small population that is geographically isolated and has experienced inbreeding for hundreds of years. Several studies suggest that this breed may be genetically uniform; for example, they have been shown to have a single mtDNA haplotype [27]. Studies to assess their MHC diversity support this assertion [20], suggesting that the animals of Chillingham breed are homozygous at all MHC loci, class I and class II, same results as identified in both J and TM in our database. In this experimental assay, both the J and TM showed diversity to the different polymorphisms in all seven BoLA SNPs.

Only three SNP are homozygous at a loci in both TM and J. In contrast, whole-genome resequencing data from feral Japanese native cattle, Kuchinoshima-Ushi, when compared with the Hereford sequence, reveals considerable genetic variation [28]. Although the overall diversity within the breed is unknown, this does highlight that genetic variation is stored within different cattle breeds. With improved analytical techniques, the genetic variation associated with beneficial traits, including that found in MHC class I and related genes, can be exploited [20]. The introduction of the concept of breed in the 19th century led to human-oriented selection imposing strong bottlenecks, which created population demes based on phenotypes. Breed formation was followed by breed expansion via the

use of artificial insemination, which reduced genetic variability within breeds particularly in the sex chromosomes and mitochondrial DNA [29]. This is due to the fact that only one haplotype is passed on to the following generation, and subjected to stronger selective forces when compared to autosomal chromosomes. However, several cycles of natural selections also trends to be fixed into small criollo populations, as occurs in the BoLA-Class I gene SNPs. In contrast, balancing selection refers to the selective process through which multiple alleles are selected, thus preserving the genetic diversity in a population by generations, as happen in the CSN2, CSN3 and LG genes in the Jersey breed [30].

The results of this study show that the TM and J breeds have a high degree of BoLA-Class I polymorphism and homocygosity. It is known that the MHC genes are highly polymorphic in the populations studied so far [31]. Although we have found a high number of alleles in Mexican populations in a large number of genes, there are no reports of polymorphisms in gene BoLA class I in criollo breeds of Latin America. The criollo breed from Chihuahua had the lowest effective allele number (5.5), even lower than that of Holstein (7.4) and Jersey (8.2) populations, which are known to be undergoing intense selection and inbreeding.

In recent studies, the Mexican Criollo cattle present a wide variation in many low frequency alleles. In fact, considering the relationship between the number of effective alleles and the total number of alleles, Argentine and Uruguayan criollos showed a high ratio (0.80 and 0.72, respectively), while in the Chihuahua criollo breed was very low (0.30 and 0.32, respectively). This may be the result of natural selection in a particular allele pool ball, leading to the emergence of resistance to local infectious diseases [18, 13, 32].

Concluding remarks

The chi-square test statistic indicates that there is not a statistically significant association between breed and BoLA7 alleles. The results suggest that only SNP BoLA1 and BoLA7 could be attractive candidate genes for disease resistance and stress tolerance, including phenotypic data for both traits. It is necessary others

SNP's to be used as genetic markers to select appropriate genotypes for tropical hot climates in Mexico.

Financial support

This project was supported by Universidad Autónoma Chapingo, Mexico (DGIP-145503005). The authors also thank CONACYT (National Council for Science and Technology, Mexico) for financial support to the first author during her doctoral studies.

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

3.4 References

- [1] Ballingall KT, Herrmann-Hoesing L, Robinson J, Marsh SGE, Stear MJ. A single nomenclature and associated database for alleles at the major histocompatibility complex class II DRB1 locus of sheep. *Tissue Antigens*. 2011; 77: 546-553. doi:10.1111/j.1399-0039.2011.01637.
- [2] Behl JD, Verma NK, Tyagi N, Mishra P, Behl R, Joshi BK. The major histocompatibility complex in bovines: a review. *International Scholarly Research Network*. 2012. doi:10.5402/2012/872710.
- [3] Konnai S, Nagaoka Y, Takeshima S, Onuma M, Aida Y. Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep. *Immunogenetics*. 2003; 30: 275-282. doi:10.1046/j.1365-2370.2003.00399.
- [4] Amills M, Ramiya V, Norimine J, Lewin HA. The major histocompatibility complex of ruminants. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 1998; 17: 108-120. doi: 10.20506/rst.17.1.1092.

- [5] Beck S, Geraghty D, Inoko H, Rowen L. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401: 921- 923. doi:10.1038/44853.
- [6] Creswell P, Howard J. Antigen recognition. *Immunology*. 1999; 11: 61-63. doi: 10.1016/0167-5699(87)90843-7. doi:10.1016/S0952-7915(99)80011-9.
- [7] Milinski M. The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2006; 37: 159-186. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110242.
- [8] Bhushan B, Patra BN, Das PJ, Dutt T, Kumar P, Sharma A, Umang U, Dandapat S, Ahlawat SPA. Polymorphism of exon 2-3 of bovine major histocompatibility complex class I BoLa-A gene. *Genetics and Molecular Biology*. 2007; 30: 560-566. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000400009>.
- [9] Ballingall TK, Tassi R. Sequence-based genotyping of the sheep MHC class II *DRB1* locus. *Immunogenetics*. 2010; 62: 31-39. doi: 10.1007/s00251-009-0410-y.
- [10] Giphart MJ, Groenen MAM, Van Der Poel JJ. Homologies between the major histocompatibility complex of man and cattle: Consequences for disease resistance and susceptibility. *Veterinary Quarterly*. 1990; 12: 202-211. doi:10.1080/01652176.1990.9694267.
- [11] Zekarias B, Ter Huurne AAHM, Landman WJM, Rebel JMJ, Pol JMA, Gruys E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Veterinary Research*. 2002; 33: 109-125. doi: 10.1051/vetres:2002001.
- [12] Nikolich-Zugich J, Fremont DH, Miley MJ, Messaoudi I. The role of MHC polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes and Infection*. 2004; 6: 501-512. doi: 10.1016/j.micinf.2004.01.006.

- [13] Gowane GR, Vandre RK, Nangre M, Sharma AK. Major histocompatibility complex (MHC) f bovines: an insight into infectious disease resistance. *Livestock Research International*. 2013; 1: 46-57.
- [14] Sharif S, B. A. Maillard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JCM and Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility DRB3 (BoLA DRB3 alleles) with the occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian Dairy cattle. *Animal Genetics*. 1998; 29: 185-193. doi: 10.1046/j.1365-2052.1998.00318.x
- [15] Lewin HA, Russel GC, Glass EJ. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Reviews*. 1999; 167: 145-58. doi: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01388.x.
- [16] Ballingall KT, Luyia A, Rowlands GL, Sales J, Musoke AJ, Morzaria SP and Mckeever DJ. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*2703 and DRB*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with sporozoite p67 antigen. *Infection and Immunity*. 2004; 72(5): 2738-2741. doi: 10.1128/IAI.72.5.2738-2741.2004
- [17] Behl JD, Verma NK, Behl R, Sodhi M. Genetic variation of the major histocompatibility complex DRB3.2 locus in the native *Bos indicus* cattle breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009; 11: 1487-1494. doi: <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2009.90043>.
- [18] Fernández IG, Ríos-Ramírez JG, Gayosso-Vázquez A, Ulloa-Arvizu R, Alonso-Morales RA. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Criollo Cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology*. 2008; 31: 880-886. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008005000020>.
- [19] Abdel-Hameed KG, Sender G, Mayntz M. Major histocompatibility complex polymorphism and *mastitis* resistance- a review. *Animal Science Paper and Reports*. 2006; 24: 11-25.

- [20] Ellis AS, Hammond JA. The functional significance of cattle major histocompatibility complex class I genetic diversity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2014; 2: 285-306. doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114234.
- [21] Maillard JC, Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Sidibé I, Stachurski F, Belemsaga D, Razafindraïbé H, Elsen JM. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilis. *Genetics Selection Evolution*. 2003; 35: S193-S200. doi: 10.1186/1297-9686-35-S1-S193.
- [22] Moser G, Khatkar MS, Hayes BJ, Raadsma HW. Accuracy of direct genomic values in Holstein bulls and cows using subsets of SNP markers. *Genetics Selection Evolution*. 2010; 42: 37-52. doi: 10.1186/1297-9686-42-37.
- [23] Hossain AM, Rizk B, Behzadian A, Thorneycroft JH. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Molecular Human Reproduction*. 1997; 3(11): 953-956. doi: 10.1093/molehr/3.11.953.
- [24] Bernoco D, Lewin HA, Andersson L, Arriens MA, Byrns B. Joint Report of the Fourth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop, East Lansing, Michigan, USA, 25 August 1990. *Animal Genetics*. 1991; 22: 477-96. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1991.tb00719.x
- [25] Davies CJ, Joosten I, Bernoco D, Arriens MA, Bester J. Polymorphism of bovine MHC class I genes. Joint report of the Fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA). *Immunogenetics*. 1994; 21: 239-58. doi: 10.1111/j.1744-313X.1994.tb00198.x
- [26] Davies CJ, Andersson L, Mikko S, Ellis SA, Hensen EJ. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*. 1997; 28: 159-68. doi: 10.1111/j.1365-2052.1997.00106.x

- [27] Hudson G, Wilson I, Payne BI, Elson J, Samuels DC. Unique mitochondrial DNA in highly inbred feral cattle. *Mitochondrion*. 2012; 12:438-40. doi: 10.1016/j.mito.2012.05.003.
- [28] Kawahara-Miki R, Tsuda K, Shiwa Y, Arai-Kichise Y, Matsumoto T. Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. *BMC Genomics*. 2011; 12: 103-113. doi: 10.1186/1471-2164-12-103.
- [29] Schaffner SF. The X chromosome in population genetics. *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5(1): 43-51. doi:10.1038/nrg1247.
- [30] Zepeda-Batista JL, Alarcón-Zúñiga B, Ruiz-Flores A, Núñez-Domínguez R, Ramírez-Valverde R. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015; 18(1): 1-4. doi:10.1016/j.ejbt.2014.10.002.
- [31] Dietz AB, Cohen ND, Timms T, Kehrli ME. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80: 406-412. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75951-4.
- [32] Alarcón-Zúñiga B, Ramírez-Flores F, Ruiz-Flores A, Ramírez-Valverde R, Saavedra-Jiménez LA, Zepeda-Batista JL. Comparison of the accuracy of genomic values of animals predicted through analysis with two alternative models. *Agrociencia*. 2015; 49(6): 613-622.
- [33] Martínez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J, Ariza F. Caracterización del locus BoLa-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia*. 2005. 54: 349-356.

- [34] Mosafer J, Nassiry MR. Identification of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Iranian Golpayegani cattle by DNA test. Asian-Aust. Journal of Animal Science. 2005. 18: 1691-1695. 106. doi: [10.5713/ajas.2005.1691](https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1691)
- [35] Ripoli MV, Lirón VJP, De Luca JC, Rojas F, Giovambattista G. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreño Criollo dairy cattle. Biochemical Genetics. 2004. 42: 231-240. 135. doi: [0006-2928/04/0800-0231/0](https://doi.org/10.1006-2928/04/0800-0231/0)
- [36] Takeshima SNT, Miyasaka T, Polat M, Kikuya M, Matsumoto Y, Mingala CN, Villanueva MA, Salces AJ, Onuma M, Aida Y. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. Meta Gene. 2014. 2: 176-190. doi:10.1016/j.mgene.2013.12.005
- [37] Takeshima S, Saitou N, Morita M, Inoko H, Aida Y. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. Gene. 2003. 316: 111-118. doi:10.1016/S0378-1119(03)00744-3
- [38] Baxter R, Craigmile SC, Hailey C, Douglas AJ, Williams JL, Glass EJ. Peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. Vaccine. 2009. 28: 28-37. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.131
- [39] Da Mota, AF, Gabriel JE, Martinez ML, Coutinho LL. Distribution of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) alleles in Brazilian dairy Gyr cattle (*Bos indicus*). European Journal of Immunogenetics. 2002. 29: 223-227. 40. doi: [10.1046/j.1365-2370.2002.00294.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2370.2002.00294.x)
- [40] Giovambattista, G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Criollo cattle. Animal Genetics. 1996. 27: 55-56. doi: [10.1111/j.1365-2052.1996.tb01178.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1996.tb01178.x)

- [41] Takeshima, SN, Giovambattista G, Okimoto N, Matsumoto Y, Rogberg-Muñoz A, Acosta TJ, Onuma M, Aida Y. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*. 2015. 86(6):419-30. doi: 10.1111/tan.12692

3.5 Tables

Table 4. SNP sequence (5′/3′ near sequence 50bp) for comparative sequencing of BoLA-Class I gene in Tropical Milking Criollo and Jersey cattle.

Name	SNP ^a	Sequence (5′/3′ near sequence 50bp)	Position
BoLA1	rs109024026	GCCTGAAGTCTGGGCCCCTTCCCTTTCTTCCACAGAACCTCCTCAGCCCT (C/G) CATCCCCATCATGGGCATCATTTGTTGGCCTGGTTCTCCTCATGGTCACTG	378
BoLA2	rs209241856	CTGAAGCCTGAAGTCTGGGCTCCTTCCCTTTCTTCCACAGAACCTCCTCA (A/G) CTGAAGCCTGAAGTCTGGGCTCCTTCCCTTTCTTCCACAGAACCTCCTCA	302
BoLA3	rs211450392	CAGGCCTTACATGACTGACTGAACTGGTTCCTGATTCTTTTCTCTCACAG (G/T) GTGAGACAGCTGCCTTGTGGGGACTGAGTGATGCTCTGTCCCACTTTGCG	348
BoLA4	rs211306040	GTCAGTGGAGCTGTGGTGACTGGAGCTGTGATTTGGAGGAATTAAGCACT (C/T) AGGTAGGGAAAGGAGGGAGGGATCTGTTTTTTTTTTTTTTTGTCTCACT	409
BoLA5	rs385967024	CTTCCTCAGACCCTCCAAAGACACATGTGGCCCATCACCCATCTCTGAC (C/T) GTGAGGTCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGAGGAGATC	221
BoLA6	rs385839109	CTTCTTCTCCAGATCACAGCTCCAGCCACCACAGCTACTACGAGGACAA (C/T) CAGGCCAACAATGATGCCCATGGTGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTTCTG	315
BoLA7	rs385543498	CCTCATGCTGCACACGGCACGTGTATCTCTGCTCCTCTCCAGAAGGCACC (A/G) CCAGGGCTGCCCACTTCTGGAAGGTTCCATCCCCTGAAGGCCTGGTCTCC	272

^aNumbers refer to dbSNP GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/snp/)

Table 5. Allelic and genotypic frequencies of the BoLA-Class I gene in Tropical Milking Criollo (TMC) and Jersey (JE) cattle.

SNP	Genotype	Genotypic frequency (n)			Allele	Allelic frequency (%)			
		TMC*	JE*	Pooled*		TMC*	JE*	Pooled*	P
UACHBoLA1	CC	0.24(12)	0.043(4)	0.11(16)	C	23.5(12)	4.3(4)	11.1(16)	0.0291
	CG	0(0)	0(0)	0(0)	G	3.9(2)	4.3(4)	4.1(6)	
	GG	0.04(2)	0.043(4)	0.041(6)					
	Other	0.73(37)	0.913(84)	0.846(121)					
UACHBoLA2	AA	0(0)	0.011(1)	0.008(1)	A	TT0(0)	1.08(1)	0.6(1)	0.3505
	AG	0(0)	0(0)	0(0)	G	25.4(13)	31(29)	29.3(42)	
	GG	0.25(13)	0.315(29)	0.293(42)					
	Other	0.75(38)	0.674(62)	0.69(100)					
UACHBoLA3	GG	0.02(1)	0(0)	0.008(1)	G	1.9(1)	0(0)	0.6(1)	0.1376
	GT	0(0)	0(0)	0(0)	T	19.6(10)	23.9(22)	22.3(32)	
	TT	0.2(10)	0.239(22)	0.223(32)					
	Other	0.78(40)	0.761(70)	0.769(110)					
UACHBoLA4	CC	0.1(5)	0.033(3)	0.055(8)	C	9.8(5)	3.2(3)	5.5(8)	0.0337
	CT	0(0)	0(0)	0(0)	T	0(0)	2.1(2)	1.3(2)	
	TT	0(0)	0.022(2)	0.013(2)					
	Other	0.9(46)	0.946(87)	0.93(133)					
UACHBoLA5	CC	0.06(3)	0.033(3)	0.041(6)	C	5.8(3)	3.2(3)	4.1(6)	0.7539
	CT	0(0)	0(0)	0(0)	T	5.8(3)	4.3(4)	4.8(7)	
	TT	0.06(3)	0.043(4)	0.048(7)					
	Other	0.88(45)	0.924(85)	0.090(130)					
UACHBoLA6	CC	0(0)	0(0)	0(0)	C	0(0)	0(0)	0(0)	0.9567
	CT	0(0)	0(0)	0(0)	T	1.9(1)	1.08(1)	1.3(2)	
	TT	0.02(1)	0.011(1)	0.01(2)					
	Other	0.98(50)	0.989(91)	0.98(141)					
UACHBoLA7	AA	0.02(1)	0.011(1)	0.013(2)	A	1.9(1)	1.08(1)	1.3(2)	0.8564
	AG	0(0)	0(0)	0(0)	G	35.2(18)	25(23)	28.6(41)	
	GG	0.35(18)	0.25(23)	0.28(41)					
	Other	0.63(32)	0.739(68)	0.69(100)					

*Within parentheses the number of individuals that presented the corresponding genotype.

4 INDICADORES DE ESTRÉS POR CALOR ASOCIADOS CON POLIMORFISMOS DEL GEN HSP EN BOVINOS JERSEY Y CRIOLLO LECHERO TROPICAL EN MÉXICO

Resumen

En algunas poblaciones bovinas se han reportado SNP para proteínas de estrés por calor (EC) (HSP), que están asociados con la tolerancia al EC. El objetivo del presente estudio fue determinar siete SNP para HSP y su asociación con indicadores fisiológicos (frecuencia respiratoria y temperatura rectal) de EC en bovinos Jersey (JE) y Criollo Lechero Tropical (CLT) de México. Se muestreó ADN de 43 animales en un hato JE de zona templada (Chapingo), 52 de un hato JE de zona tropical (Chiapas) y 53 de un hato CLT de zona tropical (Veracruz). Durante 10 días consecutivos se registró la frecuencia respiratoria (FR, respiraciones por minuto) y temperatura rectal (TR, °C). Como medida para identificar EC, se calculó el índice de temperatura ambiental y humedad relativa (ITH, unidades). Con el ADN de las muestras se identificaron los alelos mediante la técnica RT-PCR. La elección de siete SNP se realizó con base en las secuencias reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). La información se analizó ajustando modelos de regresión aleatoria con el efecto de genotipo, que variaron en el grado tanto del polinomio fijo como del aleatorio, hasta encontrar la combinación de mejor ajuste para FR y TR. Las proporciones de genotipos conocidos en los hatos JE y CLT estudiados fueron variables en los siete SNP utilizados. En general, los patrones de aumento en FR y TR en los animales a medida que aumenta el ITH fueron confirmados bajo las condiciones estudiadas, y su utilidad como explicación de mecanismos de respuesta en los bovinos ante el EC. Los genotipos estudiados en los SNP1, SNP2 y SNP4 mostraron cierta asociación de variables fisiológicas, bajo algunas de las condiciones ambientales, con la adaptación de los animales al estrés por calor, por lo que son posibles candidatos para futuros estudios.

Palabras Clave: Proteínas de estrés calórico, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, índice de temperatura y humedad.

4.1 Introducción

La temperatura óptima para la producción de leche depende de varios factores que incluyen la raza y su inherente tolerancia al estrés por calor (EC) (Blackshaw y Blackshaw, 1994; Avendaño-Reyes *et al.*, 2012). Por ejemplo, en general los animales *Bos indicus* se adaptan más fácilmente a altas temperaturas que los *Bos taurus* (Hahn *et al.*, 2003; Da Silva, 2006).

El impacto del EC está determinado por la combinación de temperatura y humedad del ambiente. Investigaciones recientes han mostrado que en condiciones ambientales por encima de 20 °C y 50 % de humedad relativa, se disminuye la confortabilidad de las vacas y la producción de leche (Segnalini *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2015). El índice de temperatura-humedad (ITH) es una medida que combina la temperatura y la humedad relativa en un valor único, y regularmente está asociado con el grado de EC (Hahn *et al.*, 2003; Berman, 2005). Las vacas lecheras entran en estrés térmico cuando el ITH es mayor que 72 unidades (Kadzere *et al.*, 2002; Segnalini *et al.*, 2013).

Una forma de determinar si las vacas están en EC y si son necesarias medidas para el enfriamiento del ambiente, es con base en la frecuencia respiratoria (FR) y la temperatura rectal (TR) de los animales. Cuando la FR es mayor que 80 respiraciones por minuto (rpm) y la TR es mayor que 39.1 °C se considera que los bovinos están en EC (Gaughan *et al.*, 2000; West, 2003; Arias *et al.*, 2008); cuando en bovinos la TR es mayor que 39.8 °C se considera un estado no adaptativo y una respuesta severa al EC (Mitlöhner *et al.*, 2001).

Además del incremento en la FR y TR de los animales, para contrarrestar el efecto del EC, se conoce que las células inician la producción de proteínas de estrés o *heat shock proteins* (HSP) que combaten alteraciones y defectos en la síntesis de proteínas, para proteger a las células de daños que puedan sufrir ante el incremento de temperatura y otros factores ambientales (Carrasco *et al.*, 2010; Basiricò *et al.*, 2011).

Los mismos estímulos que desencadenan la expresión de HSP actúan simultáneamente como agentes reguladores de dicha respuesta (Carrasco *et al.*, 2010). Así, se ha demostrado que la respuesta de HSP, inducida por diferentes agentes estresantes, está relacionada con la intensidad o grado de estrés experimentado (Wu *et al.*, 1986). Por otra parte, la respuesta de las HSP al EC parece tener un mecanismo de auto-regulación (Liu y Steinacker, 2001). En ausencia de EC, la HSP permanece unida al HSF (heat shock factor); sin embargo, durante el EC, la HSP se disocia del HSF y, ya libre, captura las proteínas desnaturalizadas, potenciando la formación de trímeros de HSF, que entran en el núcleo de la célula y se unen a la región 5' del gen que contiene el elemento promotor HSE (heat shock element), dando como resultado la producción de HSP. Esta producción permite una nueva asociación HSP-HSF, evitando así la unión del HSF en la región anteriormente descrita del gen precursor, controlando, por tanto, la concentración intracelular de HSP (Carrasco *et al.*, 2010).

Además de las funciones de protección intracelular indicadas, se ha planteado la hipótesis que las HSP cumplen funciones sistémicas (Carrasco *et al.*, 2010). En concreto, se ha postulado que la presencia extracelular de HSP desempeña una serie de funciones en la modulación del sistema inmunológico, pudiendo actuar a modo de señal de alerta en el sistema durante los momentos de estrés (Matzinger, 1998).

En investigaciones recientes se ha demostrado que la selección asistida por marcadores moleculares SNP representan un número ilimitado de diferencias de nucleótidos entre individuos, lo cual tiene relación potencial con fenotipos, que a su vez pueden convertirse en marcadores genéticos para asociar las HSP con la termotolerancia (Garg *et al.*, 2012). Los polimorfismos proteicos fueron los primeros marcadores utilizados en estudios genéticos del ganado. Sin embargo, el número de loci polimórficos que se pueden analizar, y el nivel de polimorfismos observados en dichos loci suelen ser bajos, lo cual limita mucho su aplicación a estudios de diversidad genética (Carrasco *et al.*, 2010). Según Sørensen (2010),

se requieren estudios para aumentar la comprensión de las HSP en la adaptación al EC y su enorme potencial al ser utilizadas como biomarcadores.

En diversos estudios se ha determinado la relación entre ciertos marcadores genéticos HSP y la respuesta de los animales al EC, medida principalmente en términos de la FR y TR para diferentes poblaciones bovinas (Sodhi *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014); sin embargo, los resultados específicos dependen de los genotipos de los animales y los ambientes en que se desarrollan.

En el caso de las razas bovinas criollas de Colombia y México se ha reportado una adaptación rápida a los climas cálidos, ampliando su tolerancia al EC (Anzola-Vásquez, 2005). Tal es el caso del bovino Criollo Lechero Tropical (CLT) en México y Centroamérica, donde el hato más importante se localiza en Veracruz, México (De Alba, 2011). El CLT se caracteriza por presentar una mayor tolerancia al EC que otras razas especializadas en la producción de leche; sin embargo, existen pocos estudios que demuestren esto mediante datos fenotípicos y genotípicos (Hernández *et al.*, 2007; Charoensook *et al.*, 2012; Vilaboa-Arroniz *et al.*, 2012). Asimismo, los bovinos Jersey (JE) han mostrado buenas características de adaptación a ambientes tropicales con posible presencia de estrés por calor (WingChing-Jones *et al.*, 2008). En México, no existen publicaciones que muestren la posible asociación de marcadores genéticos HSP de estas razas con la respuesta de los animales en términos de FR y TR, por lo que es de interés su estudio y posible aplicación futura como apoyo en la toma de decisiones para determinar los animales más apropiados para seleccionar como reproductores. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar siete SNP para HSP y su asociación con indicadores fisiológicos (FR y TR) de EC en bovinos CLT y JE de México.

4.2 Materiales y métodos

El estudio se realizó en tres ranchos lecheros distribuidos en el país. El Módulo de Producción de Leche Orgánica en Pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo se localiza en Chapingo, México (19°29'27" N y 98°52'23" O), a 2,240

m de altitud. La región se caracteriza por un clima templado subhúmedo, con lluvias en verano; la temperatura media anual es 11.1 °C y la precipitación anual promedio es 964.1 mm (García, 1981). La Unidad Experimental del Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados se localiza en el municipio de Manlio Fabio Altamirano, Ver. (19° 11.74'00" N y 96° 20.27'00" O), a una altitud de 40 m. El clima de la región es cálido con lluvias en verano; la temperatura media anual es de 25.2 °C y la precipitación es 909 mm (García, 1981). El rancho "Framboyanes" se localiza en la carretera Tuxtla-Villaflora, en el Km 55, en Chiapas (16°14'00" N y 93°16'09" O), a una altitud de 560 m; con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y la temperatura media anual es de 24.35 °C (García, 1981).

En los tres hatos los animales fueron manejados en pastoreo. En el rancho de Chapingo, los bovinos se alimentaron en praderas de alfalfa (*Medicago sativa*), rye-grass (*Lolium multiflorum*) y pasto orchard (*Dactylis glomerata*). En el hato de Veracruz, los animales pastorearon en potreros con *Cynodon plectostachyus*, *Brachiaria mutica* y *Panicum maximum*, y ninguna de las hembras fue inseminada u ordeñada. En el hato de Chiapas, los bovinos se alimentaron de pastos (*Brachiaria mutica* y *Panicum maximum*).

En Chapingo, Estado de México, se utilizaron 43 animales JE del Módulo de Producción de Leche Orgánica en Pastoreo del Departamento de Zootecnia. En Veracruz, se utilizaron 53 animales del hato de bovinos CLT del Colegio de Postgraduados. En Chiapas se utilizaron 52 animales de un hato comercial de ganado JE de registro. En los tres sitios, los animales muestreados fueron vacas y becerras en crecimiento, excepto en Veracruz, donde adicionalmente también se muestrearon algunos machos adultos y en crecimiento.

4.2.1 Muestreos en animales y ambiente

En los tres ranchos, se registró cada 30 min la temperatura ambiental (T) y la humedad relativa (HR) por un periodo de 10 días, durante los meses de abril y mayo de 2013, en las estaciones meteorológicas más cercanas a los sitios. En cada caso se generó un ITH, usando la ecuación propuesta por Hahn (1999): ITH

= $0.81 \times T + HR (T-14.40) + 46.40$. Además, a las 8:00 y 15:00 h de cada día, a cada animal muestreado se le registró la frecuencia respiratoria (FR), y para los animales de los hatos de Veracruz y Chapingo se registró además la temperatura rectal (TR), utilizando un termómetro digital (Fluke, USA). En el Cuadro 6 se muestran estadísticos descriptivos de variables ambientales en cada sitio y variables fisiológicas en los animales. Los ITH en Chiapas y Veracruz estuvieron prácticamente durante todo el periodo (70.9 a 86.9 unidades) por encima del umbral para considerar posible EC (>72 unidades) (Kadzere *et al.*, 2002; Segnalini *et al.*, 2013); mientras que en Chapingo estuvieron por debajo de ese umbral (33.7 a 65.3 unidades de ITH).

Cuadro 6. Estadísticos descriptivos para variables ambientales y fisiológicas de los animales en los hatos de Chapingo, Estado de México; Villaflores, Chiapas; y Veracruz.

Variable	N	Promedio	Mínimo	Máximo	DE*	CV**
Chapingo						
Temperatura ambiental (°C)	840	10.8	-1.7	21.1	8.3	77.4
Humedad relativa (%)	840	0.5	0.2	0.8	0.2	46.3
Índice de temperatura y humedad (unidades)	840	51.4	33.7	65.3	11.9	23.2
Temperatura rectal (°C)	827	38.4	34.6	40.2	0.8	2.0
Frecuencia respiratoria (rpm)	827	34.2	17.0	110.0	13.0	38.2
Chiapas						
Temperatura ambiental (°C)	1038	27.5	21.8	33.6	4.8	17.5
Humedad relativa (%)	1038	0.7	0.4	1.0	0.2	34.4
Índice de temperatura y humedad (unidades)	1038	76.5	70.9	82.4	4.2	5.4
Temperatura rectal (°C)	1002	38.6	34.9	40.2	0.6	1.5
Frecuencia respiratoria (rpm)	997	31.1	15.0	72.0	8.8	28.4
Veracruz						
Temperatura ambiental (°C)	1020	28.4	24.3	36.8	3.5	12.4
Humedad relativa (%)	1020	0.7	0.5	0.9	0.1	15.9
Índice de temperatura y humedad (unidades)	1020	78.9	74.5	86.9	3.6	4.6
Frecuencia respiratoria (rpm)	995	47.6	24.0	120.0	13.8	28.9

*DE = desviación estándar; **CV = coeficiente de variación (%).

4.2.2 Extracción de ADN

De cada animal se extrajeron seis mL de sangre por venopunción coccígea, se colocaron en un tubo con anticoagulante y se mantuvieron en refrigeración para su conservación y envío al laboratorio. En tubos *eppendorf* se colocaron 0.5 µL de sangre, a los cuales se les agregó una solución de lisis y proteinasa K, manteniéndose en incubación con movimiento. Posteriormente, se agregó un volumen de fenol y se centrifugó, el primer sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregaron dos volúmenes de Cloroformo-Octanol; se centrifugó nuevamente y el segundo sobrenadante fue colocado en otro tubo al cual se le agregó Isopropanol y se mezcló por inversión hasta que el ADN se precipitó. El ADN se colocó en un nuevo tubo con agua de grado molecular y ARNasa y se incubó a 30 °C.

El ADN con Isopropanol se precipitó nuevamente y se lavó con etanol al 70%; posteriormente, las hebras de ADN se colocaron en TE (Tris-EDTA) para su suspensión nuevamente. Todas las muestras de ADN se mantuvieron en refrigeración a -4 °C, su calidad y concentración fue analizada con un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

4.2.3 Selección de los SNP y determinación de alelos

Siete oligonucleótidos específicos para bovinos fueron diseñados y elaborados con el fin de detectar los alelos en genes de proteínas de estrés por calor (HSP). Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, 2013, Ciudad IA, Estados Unidos), a partir de secuencias reportadas en la base de datos para SNP del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013) (Cuadro 7), correspondientes a cada SNP. Una vez seleccionados los SNP, estos fueron sintetizados por la compañía KBioscience (Massachusetts, Ciudad Beverly, Estados Unidos), especificando un fluoróforo distinto por cada nucleótido cambiante en la posición del SNP para la identificación de cada alelo. Los alelos no identificados se presentan en los genotipos como otros.

Cuadro 7. Secuencias por SNP (5´/3´ secuencia cercana a 50bp) para comparar polimorfismos del gen para proteínas de estrés por calor (HSP) en bovinos Jersey y Criollo Lechero Tropical.

Nombre	Referencia*	Secuencia	Posición
SNP1	rs207550804	GAAAGTCTGCGTCTGCTTGGTAGGAATGGT (T/C) GTATTGCGCTTGATGAGGACAGTCATGACT	418
SNP2	rs135485189	TAGCTAAAGAGATTACCTGCACCATATGCA (T/G) CAGCCTCATCAGGGTTGATGCTCTTATTCA	369
SNP3	rs209931688	AGTGAGGATTGACACATCAAAAGTGCCACC (G/T) CCTAAATCAAAGATCAGCAC GTTTCTTTCT	201
SNP4	rs385211761	AGGAGCAAAATACCTTTTTGTATGCCATTT (G/A) GAAAAGCTTCAATGATGCTTGCTGAAGGGA	649
SNP5	rs378326917	GCTTCATATTCAAATGCTTGGGTCCAGAAG (G/T) ATCCATTGTAAGGTATGGCAAATTGATGTC	336
SNP6	rs134429278	ACACCTCCCTGAATGGCAGCTCCTATGGCC (T/G) CAGCCTCATCAGGATTGACAGCTTTACTTG	417
SNP7	rs134635840	AATAAGACGCTTGGTAGCATAGAATGTGTT (T/C) TTTGGGTTGGACAGCCTG TCGCTTGGCC	114

*Número de referencia en National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013).

La determinación de alelos se realizó mediante el RT-PCR, en un termociclador de tiempo real (CFX 96, Bio-Rad, CA, EE. UU.). El programa de termociclaje consistió en: un ciclo de 94 °C durante 15 minutos, 10 ciclos de 94 °C durante 20 segundos y 65 °C durante un minuto, con un decremento de 0.8 °C por ciclo en el segundo paso y 35 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, seguido de 57 °C por 20 segundos, incluyendo el reporte de la fluorescencia de cada ciclo en este último paso. El lector del termociclador UV-Vis identificó el polimorfismo de cada secuencia, marcando la base nitrogenada cambiante, indicando con un color diferente los alelos presentes en cada muestra.

4.3 Análisis estadísticos

Para cada hato se modelaron las trayectorias de la FR y TR de los bovinos en general y de forma individual, utilizando modelos de regresión aleatoria. Los

registros de ITH sirvieron como la variable independiente y se utilizaron para generar una medida estandarizada del ITH (x) con valores entre -1 y 1, utilizando la expresión:

$$x=2\left(\frac{ITH-ITH_{\min}}{ITH_{\max}-ITH_{\min}}\right)-1$$

Donde $ITH_{\min}$ e $ITH_{\max}$ son los valores más bajos y más altos del ITH en el día de registro de las variables fisiológicas modeladas. Con los registros estandarizados del ITH se calcularon los polinomios de Legendre de grados cero hasta seis, utilizando las expresiones:

$$P(x)^0=1$$

$$P(x)^1=x$$

$$P(x)^2=\frac{1}{2}(3x^2-1)$$

$$P(x)^3=\frac{1}{2}(5x^3-3x)$$

$$P(x)^4=\frac{1}{8}[(35x^4-3x)-(30x^2+3)]$$

$$P(x)^5=\frac{1}{8}(63x^5-70x^3+15x)$$

$$P(x)^6=\frac{1}{16}(231x^6-315x^4+105x^2-5)$$

Los modelos de regresión aleatoria se ajustaron con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2009), siguiendo los procedimientos descritos por Hanford (2005). Para cada variable modelada se construyó un modelo de regresión aleatoria, que se fue minimizando con la eliminación de los efectos no significativos, utilizando los criterios de AIC y BIC. En la parte fija del modelo se ajustó el efecto del SNP respectivo y la interacción de los coeficientes de la regresión fija con el SNP. En la parte aleatoria del modelo, además, del término de error, se evaluó el ajuste

de los polinomios de Legendre de grado cero, uno, dos y tres, cuando éste último fue significativo. Para obtener las regresiones aleatorias de cada animal, la identificación única de éste se utilizó como el 'sujeto' en el análisis de varianza. En general, para las trayectorias de la FR y TR, el modelo final de mejor ajuste en los tres hatos para los siete polimorfismos, consistió en una combinación de un polinomio fijo de quinto grado con un polinomio aleatorio de segundo grado.

En el enunciado 'model' del programa, se especificaron las opciones 'noint', 'solution', 'outp', 'outpm', y 'residual', para generar el ajuste de un modelo sin una media general, las soluciones de los efectos fijos del modelo, los valores predichos para las regresiones aleatorias de cada animal, los valores predichos de las regresiones fijas promedio para cada nivel del SNP incluido en el modelo, y los residuales en las regresiones aleatorias de animales individuales, respectivamente.

Las medias de cuadrados mínimos para el efecto del SNP modelado se compararon utilizando la prueba de Tukey. Los valores predichos y residuales obtenidos con el modelo de mejor ajuste se utilizaron para producir figuras de las trayectorias de las regresiones aleatorias de cada animal, así como las regresiones fijas de cada nivel del SNP modelado. Las figuras de resolución alta se generaron utilizando el procedimiento SGPLOT de SAS (SAS, 2009). El modelo estadístico de la ecuación 1 se ajustó a los registros estandarizados del ITH y de la frecuencia respiratoria o temperatura rectal de animales individuales.

$$Y_{ijk} = \text{SNP}_i + \sum_{m=1}^u \text{SNP}_i \beta_{mi} P(x_{ijk})_i^m + \sum_{n=0}^v \alpha_{nij} P(x_{ijk})_{ij}^n + e_{ijk} \quad [1]$$

Dónde: Y_{ijk} es la observación k de frecuencia respiratoria o temperatura rectal, del animal j , con el genotipo i del SNP modelado. El término SNP_i representa el efecto fijo del i -ésimo genotipo del SNP modelado. Los términos β_{mi} (β_{1i} = efecto lineal, β_{2i} = efecto cuadrático, β_{3i} = efecto cúbico, etc.) corresponden a los coeficientes de la regresión fija del i -ésimo genotipo del SNP modelado del animal sobre los polinomios de Legendre contruidos con los registros estandarizados

(x_{ijk}) del ITH. Los términos $P(x_{ijk})_i^m$ y $P(x_{ijk})_{ij}^n$ son los polinomios de Legendre de grado m o n , generados con la i -ésima o la ij -ésima observación del ITH estandarizado (x_{ijk}) , respectivamente. Los elementos α_{nij} corresponden a los coeficientes de la regresión aleatoria de cada animal (α_{0ij} = intercepto, α_{1ij} = efecto lineal, α_{2ij} = efecto cuadrático,...) para cada una de las variables de respuesta analizadas, sobre los polinomios de Legendre contruidos con los registros del ITH estandarizado (x_{ijk}) , para el j -ésimo animal, con el i -ésimo genotipo del SNP modelado y e_{ijk} es el error aleatorio asociado con la observación y_{ijk} .

4.4 Resultados y discusión

Las frecuencias genotípicas de cada SNP por raza estudiada se muestran en el Cuadro 8. Las proporciones de genotipos conocidos detectados fueron variables en los siete SNP utilizados (16 a 67% para JE y 20 a 59% para CLT), lo que sugiere posibilidades para identificar otros alelos y genotipos importantes en estos loci. Sodhi *et al.* (2013) utilizaron 11 polimorfismos en la secuencia del promotor para HSP en bovinos y búfalos, indicando que pueden existir otros genes que podrían ser evaluados como marcadores moleculares para tolerancia al EC. No se encontraron publicaciones que reporten el uso de los SNP considerados en este estudio en otras poblaciones bovinas. Por lo anterior, algunos autores coinciden en la necesidad de continuar con las investigaciones sobre los diferentes polimorfismos que se localizan en genes HSP y su relación con la tolerancia al EC (Charoensook *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Mullins *et al.*, 2016).

En general, en el Cuadro 8 se puede notar que en los siete SNP utilizados se detectaron prácticamente sólo genotipos homocigóticos, con la excepción de SNP7 para CLT, donde se detectaron heterocigóticos. Esto era de esperarse, dada el alto grado de pureza en los tres hatos. Además, con la excepción del SNP1, donde el genotipo AA fue el más frecuente en CLT y el genotipo GG fue el más frecuente en JE, en los otros SNP la frecuencia más alta en cada raza fue el mismo genotipo.

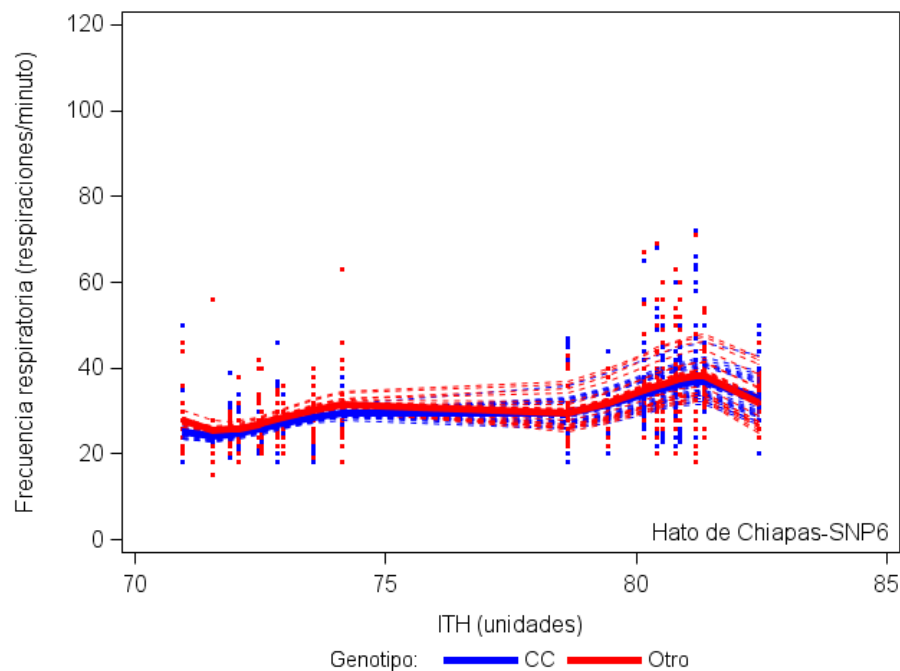
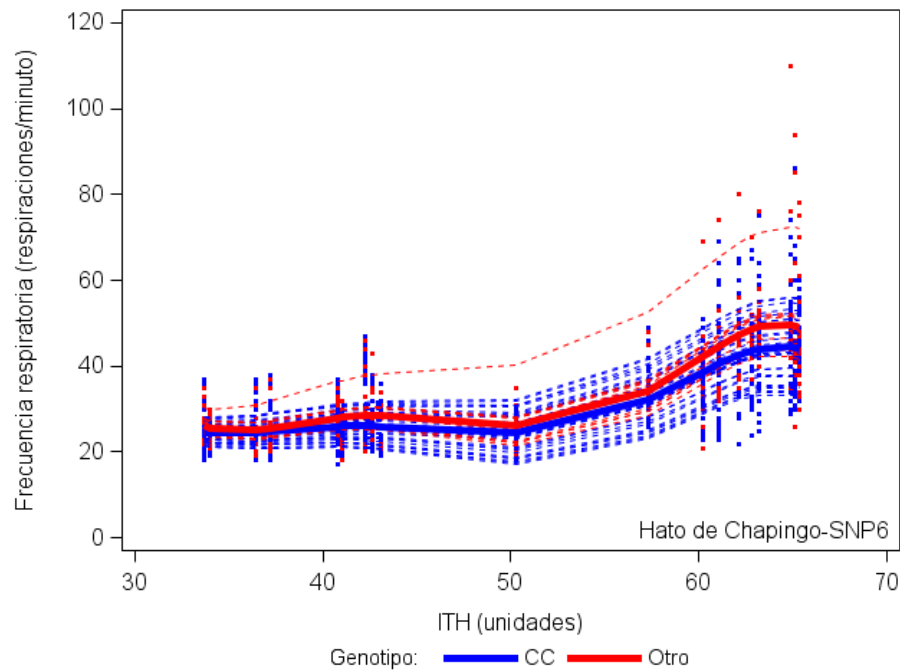
Cuadro 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en bovinos Jersey (JE) y Criollo Lechero Tropical (CLT), el número dentro del paréntesis indica el número de animales.

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		
	Genotipos	JE	CLT	Alelos	JE	CLT
HSP1	AA	0.04 (4)	0.18 (9)	A	0.04	0.19
	AG	0.00 (0)	0.02 (1)	G	0.30	0.05
	GG	0.30 (28)	0.04 (2)	Otros	0.66	0.76
	Otros	0.66 (62)	0.76 (39)			
HSP2	AA	0.01 (1)	0.02 (1)	A	0.01	0.03
	AC	0.00 (0)	0.02 (1)	C	0.59	0.46
	CC	0.59 (55)	0.45 (23)	Otros	0.40	0.51
	Otros	0.40 (38)	0.51 (26)			
HSP3	AA	0.00 (0)	0.02 (1)	A	0.01	0.02
	AC	0.01 (1)	0.00 (0)	C	0.36	0.18
	CC	0.35 (33)	0.18 (9)	Otros	0.64	0.80
	Otros	0.64 (60)	0.80 (41)			
HSP4	CC	0.02 (2)	0.02 (1)	C	0.02	0.02
	CT	0.00 (0)	0.00 (0)	T	0.49	0.37
	TT	0.49 (46)	0.37 (19)	Otros	0.49	0.61
	Otros	0.49 (46)	0.61 (31)			
HSP5	CC	0.51 (48)	0.59 (30)	C	0.51	0.59
	AC	0.00 (0)	0.00 (0)	A	0.00	0.00
	AA	0.00 (0)	0.00 (0)	Otros	0.49	0.41
	Otros	0.49 (46)	0.41 (21)			
HSP6	AA	0.03 (3)	0.00 (0)	A	0.03	0.00
	AC	0.00 (0)	0.00 (0)	C	0.64	0.51
	CC	0.64 (60)	0.51 (26)	Otros	0.33	0.49
	Otros	0.33 (31)	0.49 (25)			
HSP7	AA	0.02 (2)	0.02 (1)	A	0.02	0.08
	AG	0.00 (0)	0.12 (6)	G	0.14	0.14
	GG	0.14 (13)	0.08 (4)	Otros	0.84	0.78
	Otros	0.84 (79)	0.78 (40)			

Un aumento de la FR puede ser indicador de una respuesta termorreguladora importante ante el EC, que ayuda en la disipación de calor a través de su liberación por evaporación (Hammond *et al.*, 1996; Beatty *et al.*, 2006). Por tanto, una baja FR puede indicar una elevada tolerancia al EC. Hernández *et al.* (2007)

clasificaron el grado de estrés por calor de acuerdo con las FR presentadas por bovinos CTL, considerando 36 rpm como sin estrés, de 46 a 60 rpm como estrés suave y moderado, y de 61 a 90 rpm como estrés alto.

Para ejemplificar lo anterior en este estudio, en las Figuras 2, 3 y 4 se muestra gráficamente el incremento en la FR a medida que aumenta el ITH en los sitios de muestreo (en este ejemplo para el SNP6 en los genotipos CC y otros no identificados). En el hato de Chapingo (Figura 2) y en el de Chiapas (Figura 3), los ITH fluctuaron entre 33.7 y 65.3, y entre 70.9 y 82.4 unidades, respectivamente. Las FR de estos animales (JE) tuvieron ligeros aumentos a medida que se incrementó el ITH. En general, la FR en la mayoría de estos animales fue menor que 40 rpm, sugiriendo no presencia o moderado EC; sin embargo, también se puede observar la variabilidad individual (puntos y líneas punteadas de la gráfica) en la respuesta, particularmente a ITH altos, lo que sugiere posibilidades para el uso de esta característica en la selección de reproductores. En el hato de Veracruz (Figura 4), los ITH fluctuaron entre 74.5 y 86.9 unidades, lo que representa condiciones ambientales para generar EC en los animales. Las FR de estos animales (CLT) muestran en forma clara su aumento paulatino a medida que incrementa el ITH hasta aproximadamente 80 unidades, para posteriormente mostrar un incremento acelerado de FR en los animales. En este caso, las diferencias individuales son más evidentes que en los casos anteriores y durante un rango alto de valores de ITH, lo que confirma la posibilidad de uso de esta característica, especialmente por los altos valores de ITH y presencia de evidente EC. Estos patrones generales observados en este estudio coinciden con lo publicado por Hernández *et al.* (2007), quienes reportan la manera en la que el ambiente afectó durante dos años de estudio la FR del ganado CLT.



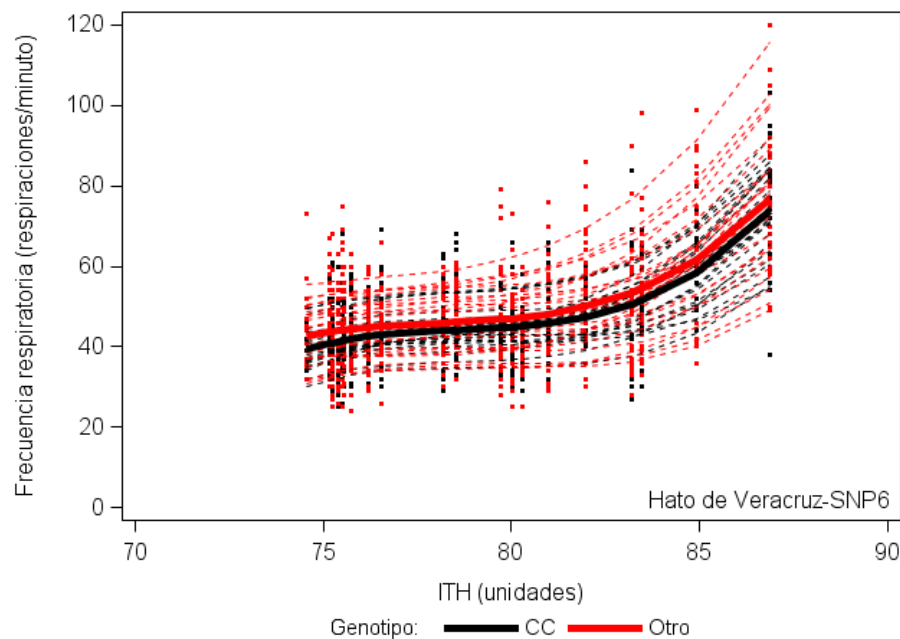


Figura 4. Frecuencia respiratoria de animales Criollo Lechero Tropical como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Veracruz (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).

Similar a lo observado con la FR, en la TR también se detecta una trayectoria ascendente a medida que incrementa el ITH y variabilidad individual de las respuestas para los animales JE de los hatos de Chapingo y Chiapas. Como ejemplo, en las Figuras 5 y 6 se muestran estos patrones de respuesta, pero a diferencia de la FR, la variabilidad relativa de la TR en los individuos fue menor, lo que sugiere que FR pudiera ser mejor indicador que la TR para determinar la respuesta al EC.

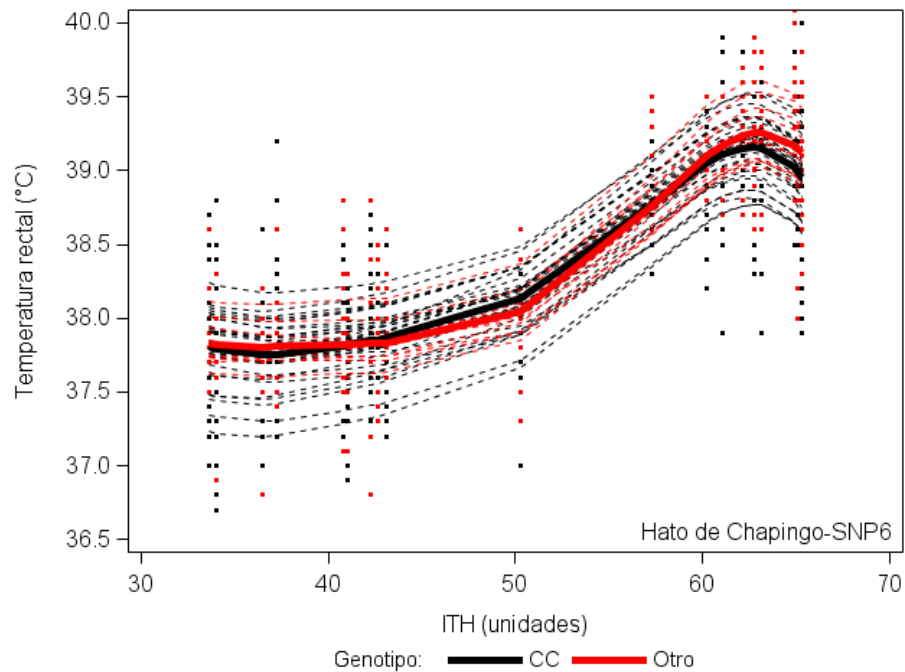


Figura 5. Temperatura rectal de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chapingo (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).

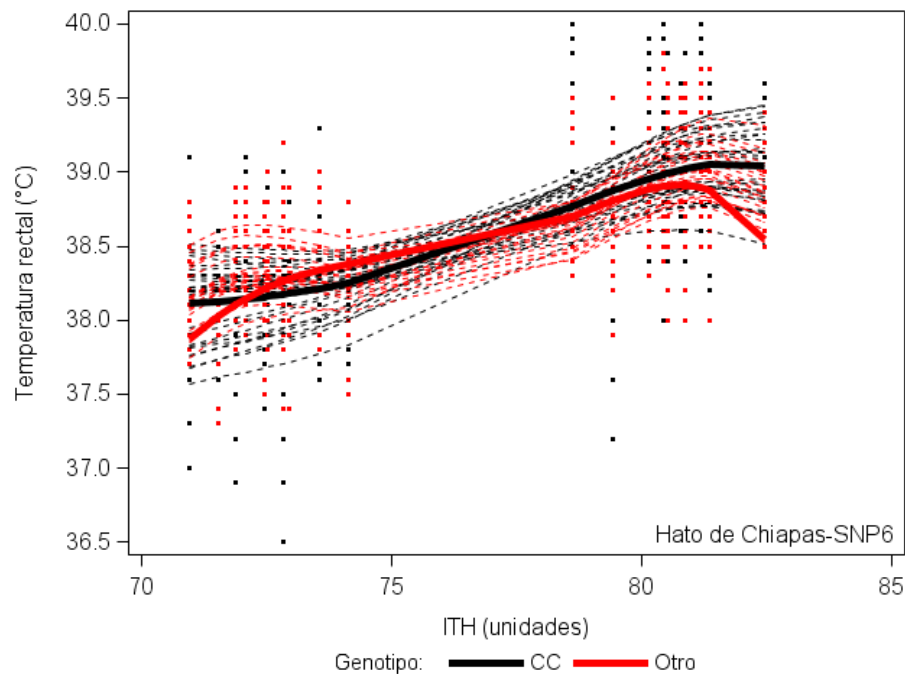


Figura 6. Temperatura rectal de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP6 en el hato de Chiapas (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).

En los Cuadros 9 y 10 se presentan los valores promedio de los genotipos para la FR y TR, así como las probabilidades de diferencias entre ellos para cada hato en estudio. En los genotipos contrastados para los SNP3, SNP6 y SNP7 no se detectaron diferencias importantes ($p > 0.05$) para los promedios de los genotipos en FR y TR. Además, sólo se detectaron diferencias ($p < 0.05$) en algunos de los coeficientes de regresión fijos (trayectorias) del SNP6 en el hato de Chiapas (Figura 3) y el SNP7 de los hatos de Chapingo y Chiapas. Lo anterior sugiere que esos tres SNP podrían ser los menos importantes para detectar diferencias en respuestas de los animales al EC.

Para el hato de Chapingo, en el SNP5 se detectaron diferencias importantes ($p < 0.05$) tanto para los promedios de los genotipos como para sus trayectorias a través de valores crecientes del ITH. En los Cuadros 9 y 10 se muestran las diferencias en los promedios; el genotipo CC tuvo menores FR y TR que otros genotipos. En las Figuras 7 y 8 se muestran las ventajas en las trayectorias a través de los ITH del genotipo CC. A pesar de la mejor respuesta al EC por menor FR y TR de los animales con genotipos CC, dado que en este sitio los ITH no representaron un desafío importante para posible EC y de que en los otros sitios de muestreo no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre CC y otros genotipos, esto sugiere que el SNP5 podría no ser importante para detectar diferencias en respuestas de los animales al EC severo.

Para los SNP2 y SNP4, a pesar de que no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en FR y TR para los hatos de Chapingo y Veracruz, en el hato JE de Chiapas se detectaron diferencias ($p < 0.05$) en FR para el genotipo conocido *versus* otros genotipos. El genotipo CC del SNP2 tuvo 5.7% menos rpm promedio que otros genotipos, mientras que el genotipo TT del SNP4 tuvo 6.2% menos rpm promedio que otros genotipos. Por lo anterior, los SNP2 y SNP4 pudieran considerarse candidatos a estudiarse para su posible asociación con el EC en los animales.

Cuadro 9. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ E.E.) y probabilidades (P) de significancia para las comparaciones (genotipo vs genotipo) entre ellas para frecuencia respiratoria (FR) por SNP en hatos de animales Jersey (Chapingo y Chiapas) y Criollo Lechero Tropical (Veracruz)*.

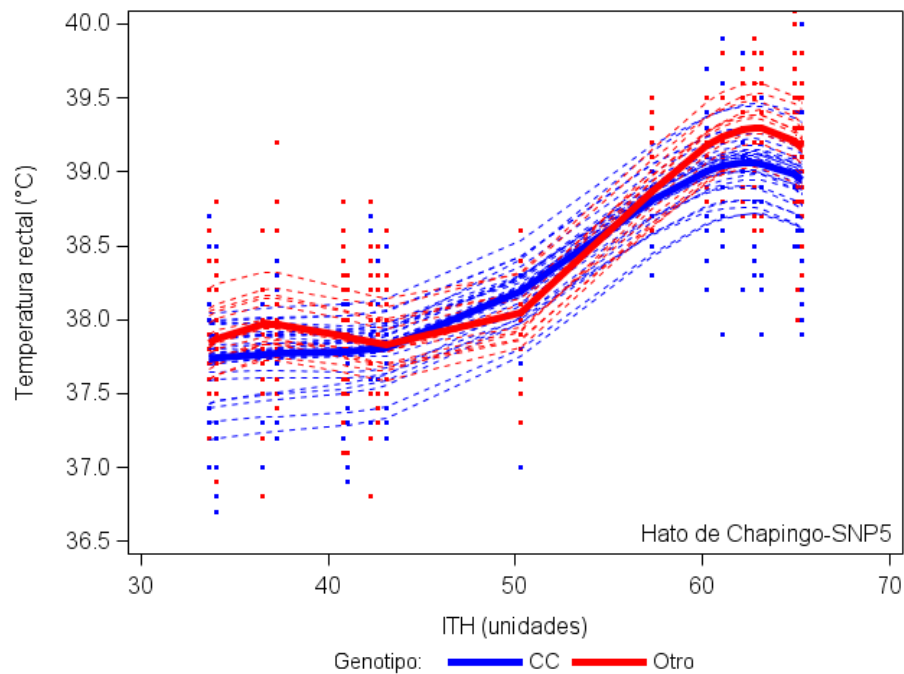
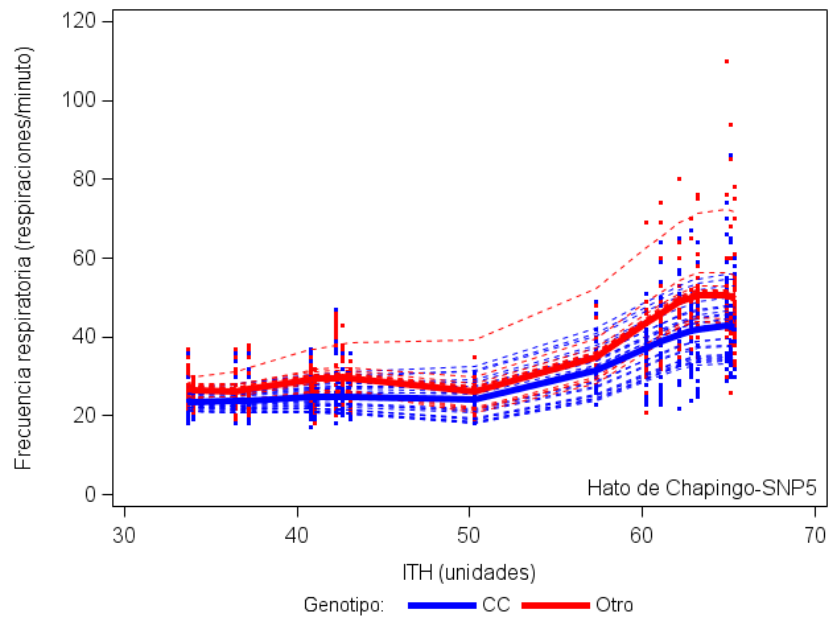
SNP	Genotipo	Chapingo	P	Chiapas	P	Veracruz	P
<i>HSP1</i>	AA	NE	NE	29.76 $\pm$ 1.38	<0.0001	47.18 $\pm$ 2.07	<0.0001
	AG	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	GG	31.50 $\pm$ 0.91	<0.0001	31.30 $\pm$ 0.74	<0.0001	NE	NE
	Otros	35.22 $\pm$ 1.06	<0.0001	31.18 $\pm$ 0.59	<0.0001	47.65 $\pm$ 1.21	<0.0001
	AA vs GG	NE	NE	-1.53 $\pm$ 1.57	0.5953	NE	NE
	AA vs Otros	NE	NE	-1.41 $\pm$ 1.51	0.6184	-0.47 $\pm$ 2.40	0.8437
	GG vs Otros	-3.71 $\pm$ 1.40	0.008	0.120 $\pm$ 0.95	0.9913	NE	NE
<i>HSP2</i>	AA	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	CC	34.04 $\pm$ 1.94	<0.0001	30.17 $\pm$ 0.46	<0.0001	47.26 $\pm$ 1.47	<0.0001
	Otros	34.79 $\pm$ 1.12	<0.0001	31.90 $\pm$ 0.66	<0.0001	47.87 $\pm$ 1.50	<0.0001
	CC vs Otros	-0.74 $\pm$ 1.53	0.6296	-1.73 $\pm$ 0.81	0.0341	-0.61 $\pm$ 2.11	0.773
<i>HSP3</i>	AA	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	CC	32.55 $\pm$ 1.41	<0.0001	31.83 $\pm$ 0.61	<0.0001	49.78 $\pm$ 2.46	<0.0001
	Otros	34.79 $\pm$ 1.08	<0.0001	30.66 $\pm$ 0.60	<0.0001	47.39 $\pm$ 1.09	<0.0001
	CC vs Otros	-2.22 $\pm$ 1.78	0.2112	1.17 $\pm$ 0.86	0.1755	2.39 $\pm$ 2.70	0.3766
<i>HSP4</i>	CC	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	CT	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	TT	34.39 $\pm$ 1.14	<0.0001	29.84 $\pm$ 0.40	<0.0001	46.46 $\pm$ 1.29	<0.0001
	Otros	34.26 $\pm$ 1.19	<0.0001	31.70 $\pm$ 0.59	<0.0001	47.93 $\pm$ 1.44	<0.0001
	TT vs Otros	-0.12 $\pm$ 1.65	0.9374	1.85 $\pm$ 0.72	0.0101	1.46 $\pm$ 1.93	0.4485
<i>HSP5</i>	CC	31.32 $\pm$ 0.93	<0.0001	30.72 $\pm$ 0.71	<0.0001	47.98 $\pm$ 1.21	<0.0001
	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AA	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	Otros	37.80 $\pm$ 1.31	<0.0001	31.40 $\pm$ 0.56	<0.0001	46.97 $\pm$ 1.77	<0.0001
	CC vs Otros	-5.48 $\pm$ 1.61	0.0007	-0.67 $\pm$ 0.91	0.4591	1.01 $\pm$ 2.15	0.6362
<i>HSP6</i>	AA	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	CC	33.60 $\pm$ 0.94	<0.0001	30.50 $\pm$ 0.39	<0.0001	46.30 $\pm$ 1.08	<0.0001
	Otros	36.69 $\pm$ 1.72	<0.0001	31.60 $\pm$ 0.80	<0.0001	48.88 $\pm$ 1.71	<0.0001
	CC vs Otros	-3.09 $\pm$ 1.96	0.1165	-1.09 $\pm$ 0.89	0.2221	-2.58 $\pm$ 2.03	0.2035
<i>HSP7</i>	AA	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	AG	NE	NE	NE	NE	47.99 $\pm$ 2.05	<0.0001
	GG	33.59 $\pm$ 2.23	<0.0001	30.15 $\pm$ 0.58	<0.0001	49.33 $\pm$ 1.55	<0.0001
	Otros	34.58 $\pm$ 0.95	<0.0001	31.29 $\pm$ 0.50	<0.0001	47.56 $\pm$ 1.23	<0.0001
	AG vs GG	NE	NE	NE	NE	-1.33 $\pm$ 2.58	0.8621
	AG vs Otros	NE	NE	NE	NE	0.42 $\pm$ 2.39	0.9826
	GG vs Otros	-0.98 $\pm$ 2.43	0.6851	-1.13 $\pm$ 0.77	0.1406	1.76 $\pm$ 1.98	0.6471

*NE = no tiene información suficiente (n menor que tres animales).

Cuadro 10. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ E.E.) y probabilidades (P) de significancia para las comparaciones (genotipo vs genotipo) entre ellas para temperatura rectal (TR) por SNP en hatos de animales Jersey en Chapingo y Chiapas*.

SNP	Genotipo	Chapingo	P	Chiapas	P
<i>HSP1</i>	AA	NE	NE	38.56 $\pm$ 0.07	<0.0001
	AG	NE	NE	NE	NE
	GG	38.46 $\pm$ 0.06	<0.0001	38.61 $\pm$ 0.02	<0.0001
	Otros	38.47 $\pm$ 0.03	<0.0001	38.57 $\pm$ 0.03	<0.0001
	AA vs GG	NE	NE	-0.05 $\pm$ 0.07	0.777
	AA vs Otros	NE	NE	-0.008 $\pm$ 0.07	0.993
	GG vs Otros	-0.011 $\pm$ 0.07	0.8744	0.042 $\pm$ 0.04	0.55
<i>HSP2</i>	AA	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE
	CC	38.43 $\pm$ 0.04	<0.0001	38.59 $\pm$ 0.03	<0.0001
	Otros	38.48 $\pm$ 0.05	<0.0001	38.58 $\pm$ 0.02	<0.0001
	CC vs Otros	-0.044 $\pm$ 0.06	0.500	0.003 $\pm$ 0.043	0.946
<i>HSP3</i>	AA	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE
	CC	38.40 $\pm$ 0.07	<0.0001	38.59 $\pm$ 0.03	<0.0001
	Otros	38.45 $\pm$ 0.03	<0.0001	38.57 $\pm$ 0.02	<0.0001
	CC vs Otros	-0.04 $\pm$ 0.08	0.5730	0.019 $\pm$ 0.04	0.656
<i>HSP4</i>	CC	NE	NE	NE	NE
	CT	NE	NE	NE	NE
	TT	38.46 $\pm$ 0.40	<0.0001	38.58 $\pm$ 0.04	<0.0001
	Otros	38.43 $\pm$ 0.05	<0.0001	38.58 $\pm$ 0.02	<0.0001
	TT vs Otros	-0.03 $\pm$ 0.06	0.6435	0.005 $\pm$ 0.05	0.908
<i>HSP5</i>	CC	38.39 $\pm$ 0.04	<0.0001	38.55 $\pm$ 0.03	<0.0001
	AC	NE	NE	NE	NE
	AA	NE	NE	NE	NE
	Otros	38.54 $\pm$ 0.05	<0.0001	38.60 $\pm$ 0.20	<0.0001
	CC vs Otros	-0.14 $\pm$ 0.06	0.0322	-0.05 $\pm$ 0.04	0.2655
<i>HSP6</i>	AA	NE	NE	NE	NE
	AC	NE	NE	NE	NE
	CC	38.43 $\pm$ 0.04	<0.0001	38.57 $\pm$ 0.02	<0.0001
	Otros	38.48 $\pm$ 0.05	<0.0001	38.61 $\pm$ 0.03	<0.0001
	CC vs Otros	-0.05 $\pm$ 0.07	0.465	-0.03 $\pm$ 0.04	0.4462
<i>HSP7</i>	AA	38.47 $\pm$ 0.05	<0.0001	NE	NE
	AG	NE	NE	NE	NE
	GG	38.52 $\pm$ 0.08	<0.0001	38.60 $\pm$ 0.05	<0.0001
	Otros	38.43 $\pm$ 0.03	<0.0001	38.58 $\pm$ 0.02	<0.0001
	AA vs GG	-0.05 $\pm$ 0.09	0.8603	NE	NE
	AA vs Otros	0.04 $\pm$ 0.06	0.7982	NE	NE
	GG vs Otros	0.09 $\pm$ 0.08	0.5437	0.02 $\pm$ 0.06	0.7157

*NE = no tiene información suficiente (n menor que tres animales).



En el SNP1 no se detectaron diferencias importantes ($p > 0.05$) entre genotipos para TR (Cuadro 10); sin embargo, se detectaron diferencias ($p < 0.05$) en sus promedios o sus trayectorias a través de valores de ITH en todos los sitios de muestreo de animales JE. En el hato de Chapingo, el genotipo GG tuvo 11.8% menos rpm promedio que otros genotipos, manteniendo prácticamente esas diferencias a través del rango de valores de ITH considerados (Cuadro 9). En los hatos de Chiapas (animales JE) y Veracruz (animales CLT), a pesar de que no se detectaron diferencias para FR en los promedios de los genotipos considerados (Cuadro 9), se estimaron diferencias en las trayectorias, principalmente en los momentos de ITH más altos (genotipo AA menores rpm que los otros genotipos; Figuras 9 y 10). Estos comportamientos observados en los genotipos sugieren a este SNP un candidato favorable para el estudio de su posible asociación con el EC en animales de diversos orígenes raciales.

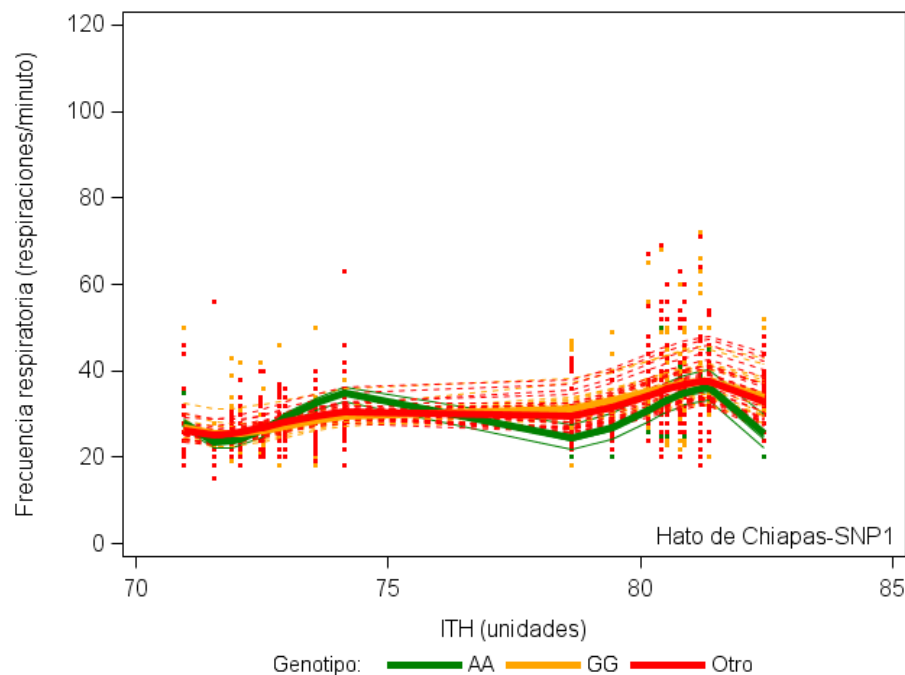


Figura 9. Frecuencia respiratoria de animales Jersey como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP1 en el hato de Chiapas (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).

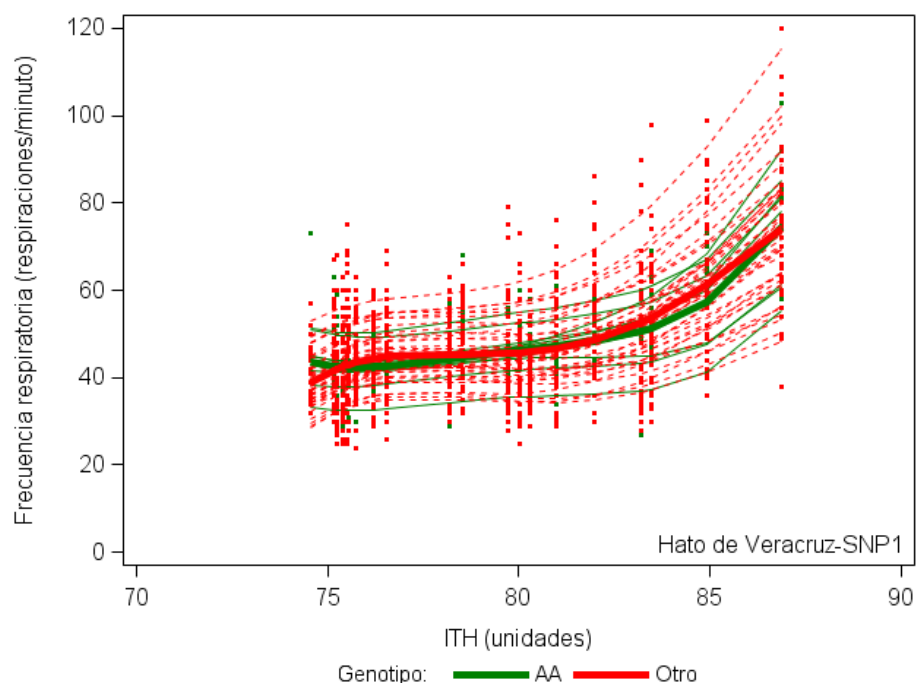


Figura 10. Frecuencia respiratoria de animales Criollo Lechero Tropical como respuesta al incremento del índice de temperatura y humedad (ITH), para el SNP1 en el hato de Veracruz (líneas continuas son promedios de genotipos y líneas punteadas son individuales).

Según Sørensen (2010), además de considerar la FR y TR, es necesario conocer si existen interacciones entre factores estresantes ambientales y manejo de los animales para entender con mayor precisión cómo afectan la expresión de HSP en respuesta al EC. Aunque es aceptado el aumento de la síntesis de HSP bajo condiciones de estrés térmico en bovinos, es necesario continuar con estudios para mejorar de manera significativa la selección de bovinos con genes implicados en la tolerancia al EC, especialmente bajo condiciones tropicales.

4.5 Conclusiones

Las proporciones de genotipos conocidos en los hatos Jersey y Criollo Lechero Tropical estudiados fueron variables (bajas en muchos casos) en los siete SNP utilizados, por lo que se requiere identificar otros polimorfismos y genotipos de posible importancia en los loci considerados. En general, los patrones de aumento en frecuencia respiratoria y temperatura rectal en los animales a medida que aumenta el índice de temperatura y humedad fueron confirmados bajo las condiciones estudiadas, y su utilidad como explicación de mecanismos de respuesta en los bovinos ante el estrés por calor. Los genotipos estudiados en los SNP1, SNP2 y SNP4 mostraron cierta asociación de variables fisiológicas, bajo algunas de las condiciones ambientales, con la adaptación de los animales al estrés por calor, por lo que son posibles candidatos para futuros estudios.

4.6 Conclusiones generales e implicaciones

Los marcadores moleculares utilizados en este estudio fueron una herramienta para localizar e identificar variaciones de interés en los genes HSP y BoLA de bovinos Criollo Lechero Tropical y Jersey bajo condiciones de estrés por calor; sin embargo, se requieren identificar algunas otras variantes de polimorfismos implicados.

Los resultados sugieren que sólo el SNP para BoLA7 fue identificado en el grupo de genes del complejo de mayor histocompatibilidad de estos bovinos, lo cual puede estar asociado con la resistencia del sistema inmune a ciertas enfermedades de bovinos en zonas cálidas. En el caso de HSP, los SNP1, SNP2 y SNP4 mostraron asociación con variables fisiológicas (temperatura rectal y frecuencia respiratoria) bajo algunas de las condiciones ambientales, con cierta variabilidad individual en cierta adaptación de los animales al estrés por calor, por lo que son posibles candidatos para futuros estudios y selección para este tipo de características.

Los patrones de aumento en frecuencia respiratoria y temperatura rectal en los animales a medida que aumenta el ITH fueron confirmados bajo las condiciones

estudiadas, y fueron de utilidad en la explicación de mecanismos de respuesta de los bovinos ante el estrés por calor.

Algunas de las limitaciones que presentan estos estudios fueron el número reducido de SNP, tanto BoLA como HSP, y el limitado número de muestras registradas. Con el propósito de tener una mayor cobertura de polimorfismos importantes para explicar y poder modelar con mayor precisión SNP implicados y su asociación con el estrés por calor.

Por último, es necesario dar continuidad con la selección y evaluación de nuevos SNP para ambos genes en un número mayor de animales que el considerado en estos estudios y bajo exposición a mayores variabilidades climáticas. Además, se requiere considerar estudios en otras razas y bajo condiciones climáticas contrastantes.

4.7 Literatura citada

Anzola-Vásquez, H. J. 2005. Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. Archivos de Zootecnia 207: 141-144.

Arias, R. A., T. L. Mader, y P. C. Escobar. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. Archivos de Medicina Veterinaria 40: 47-42.

Avendaño-Reyes, L., J. A. Hernández-Rivera, F. D. Álvarez-Valenzuela, U. Macías-Cruz, R. Díaz-Molina, A. Correa-Calderón, P. H. Robinson, and J. G. Fadel. 2012. Physiological and productive response of multiparous lactating Holstein cows exposed to short-term cooling during severe summer conditions in an arid region of Mexico. International Journal of Biometeorology 56: 993-999.

Bañuelos-Valenzuela, R., y S. H. Sánchez-Rodríguez. 2005. La proteína de estrés calórico HSP 70 funciona como un indicador de adaptación de los

bovinos a las zonas áridas. Consultado el 3 de mayo de 2016. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305/030523.pdf>

Basiricò, L., P. Morera, V. Primi, N. Lacetera, A. Nardone, and U. Bernabucci. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress and Chaperones* 16: 441-448.

Beatty, D.T., A. Barnes, E. Taylor, D. Pethick, M. McCarthy, and S. K. Maloney. 2006. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *Journal of Animal Science* 84: 972-985.

Berman, A. 2005. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science* 83: 1377-1384.

Blackshaw, J. K., and A. W. Blackshaw. 1994. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behavior: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34: 285-295.

Carrasco, L. B. Sañudo, I. C. Martínez, and M. De Hoyo. 2010. Heat shock protein and exercise. *International Journal of Medicine and Science of Physical Activity and Sport* 37: 1-21.

Charoensook, R., K. Gatphayak, A. R. Sharif, C. Chaisongkram, B. Brenig, and C. Knorr. 2012. Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Tropical Animal Health and Production* 44: 921-928.

Da Silva, R. G. 2006. Weather and climate and animal production. Disponible en: http://www.agrometeorology.org/fileadmin/insam/repository/gamp_chap_11.pdf. Consultada el 05 de marzo del 2016.

- De Alba, J. 2007. El Ganado Lechero Tropical en América Latina. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/ah223s/AH223S06.htm>. Consultado el 28 de abril de 2016.
- García, E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía de la UNAM. México. 252 p.
- Garg, D., S. Sareen, S. Dalal, R. Tiwari, and R. Singh. 2012. Heat shock protein based SNP marker for terminal heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Australian Journal of Crop Science 6(11): 1516-1521.
- Gaughan, J. B., S. M. Holt, G. L. Hahn, T. L. Mader, and R. Eigenberg. 2000. Respiration rate. Is it a good measure of heat stress in cattle? Journal of Animal Science 13: 329-332.
- Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. Journal of Animal Science 77: 10-20.
- Hahn, G. L., Mader, T. L., Eigenberg, and R. A. 2003. Perspective on development of thermal indices for animal studies and management. Europe Federation Animal Science, Technic Series 7: 31–44.
- Hammond, A. C., T. A. Olson, C. C. Chase, E. J. Bowers, R. D. Randel, C. N. Murphy, D. W. Vogt, and A. Tewolde. 1996. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. Journal of Animal Science 74: 295–303.
- Hernández, A., P. Cervantes, V. M. Salinas, R. García, A. Tejeda, F. Gallardo, y J. L. Álvarez. 2007. Respuestas al estrés por calor en la vaca Criollo Lechero Tropical bajo un sistema de doble propósito en México. Revista Salud Animal 2: 85-90.

- Kadzere, C. T., M. R. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77: 59-91.
- Liu, Y., and J. M. Steinacker. 2001. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Frontiers in Bioscience* 6: D12-D15.
- Matzinger, P. 1998. An innate sense of danger. *Seminars in Immunology* 10: 399–415.
- Mitlöhner, F. M., J. L. Morrow, J. W. Dailey, S. C. Wilson, M. L. Galyean, M. F. Miller, and J. J. McGlone. 2001. Shade and water misting effects on behavior, physiology, performance, and carcass traits of heat-stressed feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 79: 2327-2335.
- Mullins, C. R., H. N. Zerby, L. A. Fitzpatrick, and A. J. Parker. 2016. *Bos indicus* cattle possess greater basal concentrations of HSP27, alpha B-crystallin, and HSP70 in skeletal muscle *in vivo* compared to *Bos taurus* cattle. Department of Animal Sciences, The Ohio State University, Columbus, Ohio, School of Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, Townsville, QLD.
- NCBI (National Center of Biotechnology Information). GenBank: SNP database. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Consultada el 03 de enero de 2013.
- Ortiz, X. A., J. F. Smith, F. Rojano, C. Y. Choi, J. Bruer, T. Steele, N. Schuring, J. Allen, and R. J. Collier. 2015. Evaluation of conductive cooling of lactating dairy cows under controlled environmental conditions. *Journal of Dairy Science* 98: 1-13.
- SAS. 2009. S. A. S. User's Guide: Stastics 9th Ed. SAS Institute Inc., Cary, N. C. USA.

- Segnalini, M., U. Bernabucci, A. Vitali, A. Nardone, and N. Lacetera. 2013. Temperature humidity index scenarios in the Mediterranean basin. *International Journal of Biometeorology* 57: 451-458.
- Singh, A. K., R. C. Upadhyay, D. Malakar, S. Kumar, and S. V. Singh. 2014. Effect of thermal stress on HSP70 expression in dermal fibroblast of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan-Fries) cattle. *Journal of Thermal Biology* 43: 46-53.
- Sodhi, M., M. Mukesh, A. Kishore, B. P. Mishra, R. S. Kataria, and B. K. Joshi. 2013. Novel polymorphism in UTR and coding region of inducible heat shock protein 70.1 gene in tropically adapted Indian zebu cattle (*Bos indicus*) and riverine buffalo (*Bubalus bubali*). *Gene* 527(2): 606 -15.
- Sørensen, J. G. 2010. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Current Zoology* 56: 703–713.
- Vilaboa-Arroniz, J., O. J. Quirós-Madrigal, P. Díaz-Rivera, and P. Zetina-Córdoba. 2012. Status of Tropical Dairy Creole (CLT) in Mexico, Nicaragua and Costa Rica. *Archivos de Zootecnia* 61: 31-39.
- West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86: 2131-2144.
- WingChing-Jones, R., R. Pérez, y E. Salazar. 2008. Condiciones ambientales y producción de leche de un hato de ganado Jersey en el trópico húmedo: el caso del módulo lechero-SDA/UCR. *Agronomía Costarricense* 32(1): 87-94.
- Wu, B. J., R. E. Kingston, and R. I. Morimoto. 1986. Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 629–633.