

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LA PROTEINA DE CHOQUE CALÓRICO (Hsp70) EN SEIS GENOTIPOS CAPRINOS DURANTE CUATRO EPOCAS DEL AÑO

C. A. Meza-Herrera^{1,2}, L. Martínez-Soriano¹, R. Bañuelos-Valenzuela³,
C. F. Aréchiga-Flores³, R. M. Rincón-Delgado³

¹ Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. A. P. 8, Bermejillo, Durango. México. 35230.e-mail: cmeza2000@hotmail.com

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

³ Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas.

RESUMEN. Dentro de los mecanismos de respuestas compensatorias al estrés ambiental mostrados por los mamíferos se encuentra la expresión de proteínas de choque calórico (Hsp70), cuya función principal es proteger a la célula ante un insulto ambiental. El objetivo del presente estudio fue establecer un indicador de adaptación al estrés ambiental en seis genotipos caprinos mediante la cuantificación de la expresión de la proteína de choque calórico (Hsp70) durante las cuatro épocas del año en el norte de Durango (25° LN). El estudio consideró cabras manejadas bajo condiciones intensivas (n=30) de las razas Granadina (G), Nubia (N), Saanen (S), Toggenburg (T), Alpina (A) y Encastadas (E), con una edad y peso promedio de 25 ± 3 meses y 33 ± 3 kg. Paralelo al muestreo de plasma sanguíneo durante los meses de Marzo, Junio, Septiembre y Diciembre, se registró el peso vivo (PV) y la condición corporal (CC), así como el largo de la cubierta externa, incluyendo el pelo en grupa (PG), en cuello (PC) y en panza (PP). La determinación de los niveles de la Hsp70 consideró la evaluación de la proteína total en linfocitos caprinos mediante el método de Bradford, su posterior caracterización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, la inmunodetección de las Hsp70 con anticuerpos específicos y su posterior cuantificación mediante densitometría óptica. Las variables de respuesta fueron analizadas mediante ANOVA. El genotipo afectó (P<0.001) la expresión del PV y la CC; mientras que las razas A y E lograron los mayores (P<0.001) PV, las E, N y G lograron la mejor (P<0.001) CC. El genotipo afectó (P<0.001) las variables de PG, PC y PP al mostrar los genotipos E, T y G los mayores promedios para dichas variables. En el mismo sentido, mientras que los mayores valores para PG, PC y PP fueron observados en Marzo y Diciembre, el mayor PV fue registrado en Diciembre, el menor en Marzo, y la mas baja (P<0.001) CC en Septiembre. En cuanto a los niveles de la Hsp70, se observó una expresión diferenciada (P<0.001) a través del año. La mayor expresión se observó en Diciembre y Junio; mientras que en el primero se observó la mayor oscilación térmica, en el segundo se observaron las máximas temperaturas ambientales. Con respecto al efecto del genotipo, mientras que los mayores niveles de expresión de la Hsp70 se observaron en las razas G, S y T, los grupos E y A generaron la mas baja expresión de las Hsp70. Dichas tendencias biológicas delimitan una mayor capacidad de adaptación por parte de las cabras A y E, particularmente el grupo E, quien mostró la mayor longitud de pelaje, los mayores pesos vivos, la mejor condición corporal, así como los mas bajos niveles de expresión de las Hsp70.

Palabras clave: Cabras, genotipos, estrés térmico, proteínas de choque calórico, adaptación.

SUMMARY. Among the compensatory response mechanisms to environmental stress depicted by mammals, there is the expression of the heat shock proteins (Hsp70), whose main function is to protect the organism at cellular level once it is exposed to an environmental insult. Aim of this study was to establish an indicator of adaptation to environmental stress by quantifying the Hsp70 expression in six goats genotypes in northern Durango (25° LN) throughout the four seasons of the year. Goats (n=30) kept under stall-fed conditions included the genotypes Granadina (G), Nubian (N), Saanen (S), Toggenburg (T), Alpine (A) and Crosses (E). Age and weight averages were 25±3 months and 33±3 kg, respectively. Besides plasma sampling during March, June, September and December, live weight (PV, kg), body condition score (CC, 1=very thin, 5=very fat) as well as estimations of the external hair cover in neck (PC), rump (PG) and belly (PP) were also considered. Quantification of Hsp70 from goat lymphocytes considered total protein determination by the Bradford method, protein characterization through polyacrilamide gel electrophoresis, Hsp70 immunodetection by specific antibodies, and their quantification by optic densitometry. Response variables were analyzed by least square means. Genotype affected (P<0.001) both PV and CC; while the A and E genotypes depicted the heaviest (P<0.001) PV, the E, N and G breeds displayed the best (P<0.001) CC. Genotype also affected (P<0.001) PG, PC and PP with the best averages depicted by the E, T and G genotypes. While the best values for PG, PC and PP were observed in March and December, the highest PV was recorded in December and the lowest in March. The lowest (P<0.001) CC was observed in September. With respect to the Hsp70 levels, the highest expression (P<0.001) was observed in June and December, months of the year in which there were recorded the highest environmental temperature as well as the greatest temperature oscillation, respectively. The effect of genot lowest Hsp70 expression.

Key words: Goats, genotypes, heat stress, heat shock proteins, adaptation.

INTRODUCCION

La capacidad que tienen las cabras para adaptarse a las zonas áridas y semiáridas, está determinada por su habilidad para desarrollar mecanismos apropiados para hacer frente a las diferentes fuerzas medio ambientales (Devendra, 1987), mostrando como una de sus principales características la gran adaptación que muestran a un amplio espectro de condiciones climáticas (Gall, 1991). La adaptación animal representa una serie de procesos evolutivos genéticos, fisiológicos, inmunológicos, bioquímicos y de conducta en respuesta al estrés. En términos ecológicos, una situación de estrés se hace presente cuando los factores físicos, químicos o bióticos sitúan a un organismo más allá de sus límites fisiológicos.

En contraste a los cambios únicos que ocurren en el animal, al permitirle la aclimatación a un medio ambiente particular a su nicho, las células de todos los organismos parecen emplear mecanismos comunes de defensa cuando ocurren cambios abruptos en su medio ambiente local. Esta respuesta, referida como choque calórico o respuesta al estrés, vincula el cambio de las condiciones ambientales con la expresión de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque calórico (heat shock proteins; Hsp) o proteínas del estrés. Las proteínas Hsp, incluidas las chaperonas moleculares, se expresan de manera constitutiva y ubicua en las células eucariotas y procariotas (Lindquist y Craig, 1998). En condiciones adversas, la función de éstas proteínas es proteger a la célula del daño producido por el estrés, mediante la unión de proteínas parcialmente desnaturalizadas, disociando agregados de proteínas, regulando el correcto doblaje y traslocación intracelular en la síntesis de nuevas proteínas (Goodman y Blank, 1998). Las proteínas del estrés son inducidas por varios agentes (Lin *et al.*, 1998), entre los que destacan la hipoglucemia, anoxia, calor, etanol, peróxido de hidrógeno, iones de metales pesados, arsenicales, infección con ciertos virus (Guerreiro y Raynes, 1990), radiación ultravioleta, radiación electromagnética de baja frecuencia y campos intensos de radiación gamma (Saran y Bors, 1997). Colectivamente las proteínas del estrés proveen protección a la célula durante y(o) después de recobrase de la agresión del estrés medioambiental (Welch *et al.*, 1991).

El conocimiento de cómo las cabras responden al estrés calórico a nivel celular es incipiente. La identificación de estimadores de adaptación a las condiciones ambientales características de las zonas áridas y semiáridas es de gran importancia para México, ya que estas zonas ocupan más de la mitad de su territorio. Los programas de selección de ganado con base en los mecanismos de resistencia a factores como

el estrés calórico deben ser desarrollados para mejorar los índices productivos en carne y leche.

El objetivo del presente estudio fue identificar y cuantificar la expresión de las proteínas Hsp70 en linfocitos caprinos de seis grupos genéticos en cuatro épocas del año. Para poder lograr este objetivo se utilizaron técnicas de laboratorio como el aislamiento de linfocitos, la determinación de proteína total con el método colorimétrico de Bradford, la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE 10%) y la inmunodetección para identificar las proteínas utilizando el anticuerpo específico y su posterior cuantificación mediante densitometría óptica.

MATERIALES Y METODOS

Localización. El experimento se desarrolló en la Unidad de Experimentación Caprina Sur, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas - Universidad Autónoma Chapingo (URUZA-UACH), localizada en el Municipio de Tlahualilo, Durango, así como en el Centro Nacional de Fomento Caprino (CNFC) de Tlahualilo, Durango. El área se sitúa en la parte noroeste del país conocida como la Comarca Lagunera, localizada entre los 23°06' Latitud Norte y 103°26'46' Longitud Oeste, a una altitud de 1092 msnm. La región se caracteriza por poseer clima cálido-seco BW, con precipitación media anual de 217 mm concentrada principalmente en el verano. La oscilación térmica es muy marcada; se observa una temperatura media anual de 22.3°C; con máximas superiores a los 45°C en Junio y mínimas inferiores a los 0°C durante los meses de invierno.

Animales y condiciones de alojamiento. Para el desarrollo del presente estudio, y con objeto de evaluar los seis genotipos, se compararon las temperaturas ambientales registradas en el CNFC y en la URUZA-UACH. Al observarse la misma tendencia en la oscilación de las temperaturas ambientales, se sugiere que en la respuesta biológica observada entre los grupos genéticos no existió una interacción genotipo * medioambiente. Se utilizaron 30 cabras, (n=30); 25 cabras del CNFC de las razas, Granadina, Nubia, Saanen, Toggemburg, Alpina y 5 cabras Encastadas, alojadas en la URUZA-UACH, con una edad y peso promedio de 25 ± 3 meses y 33 ± 3 kg, respectivamente. Todas las cabras fueron sexualmente maduras, y sin antecedentes previos de gestación. Las condiciones de alojamiento en el CNFC incluyeron corrales cerrados con sombra disponible todo el día, estas cabras recibieron una dieta constituida por ensilado de maíz, alfalfa henificada, concentrado, sales minerales, esta mezcla se ofreció dos veces al día y agua *ad libitum*. Las cabras Encastadas recibieron una dieta a base de heno de alfalfa, con suplementación de maíz roado, grasa de sobrepeso, sales minerales siendo alimentadas dos veces al día heno por la mañana y

suplemento por la tarde, bajo condiciones naturales de luz. Durante todo el período experimental las cabras tuvieron libre acceso a sombra y agua.

Formación de grupos y obtención de muestras. Se realizaron cuatro muestreos sanguíneos en marzo 10, junio 20, septiembre 28 y diciembre 12, obteniéndose de cada animal una muestra de 10 mL de sangre entre las 1000 y 1030 h. Las muestras sanguíneas se colectaron mediante venopunción de la yugular, con vacutainers estériles de 10 mL (Corvac Sherwood Medical), en tubos con anticoagulante. El peso vivo (PV, kg), las medidas de la cubierta externa de pelo en grupa (PG, cm), pelo en cuello (PC, cm) y pelo en panza (PP, cm), así como la estimación de la condición corporal (CC) se determinaron cada vez que se realizó el muestreo. La condición corporal fue estimada de manera subjetiva mediante palpación de los procesos transversos y verticales de las vértebras lumbares en una escala de cinco puntos (1= muy flaca, 5= muy gorda). Una vez colectadas, las muestras fueron transportadas, a temperatura ambiente, en una caja de poliuretano para protegerlas de la intemperie con un tiempo de traslado aproximado de 50 min, al laboratorio de la URUZA. Una vez que las muestras fueron parcialmente procesadas, fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Autónoma de Zacatecas, donde permanecieron en congelamiento hasta que se llevo a cabo la determinación de las Hsp70.

Aislamiento de los linfocitos. De la sangre obtenida, se aislaron los linfocitos en gradiente de Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich St. Louis MO) mediante la técnica descrita por Rose y Friedman, (1976) con pequeñas modificaciones: Se colocaron 7 mL de Histopaque 1077, en un tubo cónico de polipropileno de 15 mL (Corning Costar Co. Cambridge MA), se mantuvieron a una temperatura de 37°C y se les agregó 7 mL de sangre procurando que esta quedara por encima del primero, a manera de gradiente para lo cual fue necesario verterla lentamente sobre las paredes del tubo, posteriormente, los tubos se colocaron verticalmente evitando que el contenido se mezclara.

Las muestras se centrifugaron a 1800 g durante 90 min, al término los tubos presentaron varios estratos, en el fondo los glóbulos rojos y las células polinucleadas, seguidas del Histopaque 1077 y del plasma sanguíneo como lo describe Low y Hansen (1988). Entre el plasma y el Histopaque 1077, se formó una interfase la cual contenía los linfocitos, evitando alterar dicha interfase, manteniendo los tubos verticales evitando que se mezclaran los estratos. La interfase que contenía los linfocitos (1.5 mL) se extrajo mediante succión con una pipeta Pasteur (Corning Inc., New York); el material recuperado fue lavado con solución buffer fosfato (PBS).

Lisis celular determinación de proteínas en

extractos totales. Una vez lavado con 1 mL de solución PBS pH de 7.2 a 4° C, el precipitado de células fue resuspendido en 150 µL de una solución de lisis conformada por Tritón X-100 al 1% (Merck West Germany), NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 (Gibco BRL Grand Aisland, NY), más 1 mM de PMSF. El lisado celular fue centrifugado a 3,500 g durante 15 min, recuperándose exclusivamente el sobrenadante, el cual fue transferido a viales etiquetados para congelarse hasta su análisis posterior. La cantidad total de proteína de cada muestra se determinó utilizando la técnica de Bradford (1976) con la cual es posible determinar desde 1µg de proteínas en extractos crudos. Para preparar 200 mL del reactivo de Bradford se utilizaron las siguientes soluciones: 100 mg de Azul de Coomassie G-250 (Pierce), 50 mL de Etanol (Baker), 100 mL de Ácido fosfórico (Merk), por último se aforó a 200 mL con agua desionizada, procediendo a filtrar al observar precipitados en el reactivo Bradford.

Electroforesis. Se realizó en geles de poliacrilamida, mediante la técnica descrita por Laemmli (1970). Una vez ensamblados los cristales de vidrio, fueron lavados para evitar restos de detergente, silicona, o grasa. El volumen de poliacrilamida para preparar el gel de corrida al 10%, fue preparado de acuerdo a la recomendación del fabricante. Posteriormente, la solución de poliacrilamida fue vertida entre los cristales. El menisco de solución de poliacrilamida llegó aproximadamente a 8 cm del borde superior, manteniendo el gel en posición vertical a temperatura ambiente. Una vez formado el gel, (entre 20-30 min.) los cristales fueron inclinados por su vértice, y se lavó el gel de separación tres veces con agua destilada, verificando la eliminación de cualquier residuo de poliacrilamida. Posteriormente, se preparó la solución de poliacrilamida al 10% para el gel concentrador, agregándola directamente sobre el gel separador polimerizado. Se colocó el peine apropiado dentro de la solución cuidando de no producir burbujas; previamente el peine fue lavado con agua destilada y etanol.

El gel se mantuvo en posición vertical a temperatura ambiente, observándose la polimerización del gel concentrador en aproximadamente 10 min. A las muestras de proteínas de cada tratamiento se les agregó buffer de lisis y se calentaron a 95°C por 5 min en baño María. Una vez polimerizado, se retiró el peine del gel y los pozos se lavaron inmediatamente con agua destilada o buffer de corrida para eliminar la poliacrilamida no polimerizada. Las muestras fueron vertidas en los pozos correspondientes, para lo cual se utilizó una jeringa Hamilton o una micropipeta, evitando producir burbujas. La corrida electroforética se realizó a 100 V por aproximadamente 2 h. Cuando el frente de corrida alcanzó la parte inferior del gel, la fuente de poder fue desconectada, los cristales fueron removidos y

cuidadosamente separados, marcándose el gel para su identificación.

Tinción con azul de Coomassie. Para visualizar las bandas de proteína en el gel de poliacrilamida, el gel se tiñó depositándolo en un recipiente conteniendo azul brillante de Coomassie R-250 al 0.25% en ácido acético, permaneciendo ahí durante 20 minutos. El gel fue lavado para eliminar el colorante no fijado al gel. Por último, se agregaron tres volúmenes de solución decolorante (25% de metanol, y 7% de ácido acético). Cuando fue necesario, se cambió hasta que sólo se observaron las bandas de las proteínas teñidas, la sensibilidad fue de 1.0 μ L por carril (Kamwanja, 1994).

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección. Para detectar a las hsp70, las proteínas en los geles de poliacrilamida (no teñidos) fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond-C # RPN303C), utilizando la técnica propuesta por (Towbin *et al.*, 1979). A las membranas de nitrocelulosa se les agregó la solución bloqueadora (solución al 3% de leche descremada Sbelty de Nestlé en PBS) y se dejó bloqueando por espacio de 12 h (Olmsted, 1981). Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa fueron identificadas utilizando el anticuerpo específico contra la proteína hsp70 y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. La membrana se lavó tres veces con una solución preparada con leche descremada al 3% en peso disuelto en 100 mL de PBS a 4°C durante 12 h. Posteriormente, se incubó por 1h en solución bloqueadora la cual contenía el anticuerpo contra Hsp70, para después lavar la membrana de nitrocelulosa en forma alternada 5 veces con solución PBS, y 5 veces con PBS-Tween-20. Esta misma membrana se incubó 1 h con el segundo anticuerpo peroxidado, con agitación suave.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar de nuevo en la forma descrita en el párrafo anterior. Finalmente, para llevar a cabo el proceso de inmunodetección, las membranas fueron tratadas con un reactivo quimioluminiscente (ECL, por sus siglas en inglés; Amersham Little, England), este reactivo reacciona con la peroxidasa del anticuerpo unido a la membrana emitiendo luz, la cual al ser absorbida por una placa radiográfica (Dupont de Neumors, USA), generando una mancha por velado en ella. El proceso de velado consideró 5 min, permitiendo la identificación de la proteína por el anticuerpo específico.

Autoradiografía y densitometría. El revelado se realizó con revelador Kodak GBX 616-0832 y fijador Kodak GBX 616-2911 (Olmsted, 1981). Posteriormente, las placas radiográficas fueron analizadas para cuantificar la densidad de las manchas mediante densitometría óptica (Model GS 300; Hoeffler Scientific Instruments, San Francisco, CA).

Análisis Estadísticos. El análisis de la información

consideró el Procedimiento de Modelos Lineales Generales (PROC GLM), del Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 1991). Las variables dependientes peso vivo (PV, kg), condición corporal (CC, 1=muy flaca, 5=muy gorda), largo de cubierta externa en grupa, cuello y vientre (PG, PC, y PP, cm), niveles de expresión de la Hsp70 (Unidades Densitométricas) fueron evaluadas según la metodología de mínimos cuadrados en un diseño completamente al azar, considerando un diseño factorial de tratamientos de seis genotipos por cuatro épocas, con cinco repeticiones (Snedecor y Cochran, 1967). Debido a que la CC se define como variable cualitativa, previo al desarrollo de dicho modelo se realizó una análisis no paramétrico de la citada variable.

Las variables de respuesta fueron evaluadas mediante un análisis de parcelas divididas para muestras repetidas en animales al través de tiempo. El efecto principal del grupo genético fue incluido en la parcela mayor, y la época del año en la parcela chica. El análisis de la interacción consideró a la cabra(genotipo*época) como término para calcular el error (Gill y Hafs, 1971). Cuando se observaron valores significativos de F, la separación de medias consideró para probar sus diferencias el procedimiento PDIFF, mediante el PROC LSMEANS. Todos los análisis fueron realizados mediante el uso del paquete estadístico SAS (SAS, 1991).

Los valores reportados se definen como medias de mínimos cuadrados \pm el error estándar de la media. Debido a que no existió efecto de interacción ($P>0.05$) entre el genotipo y la época, los resultados y la discusión de los mismos se abordan considerando el comportamiento de las variables dependientes de acuerdo a los efectos principales.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del grupo genético sobre peso vivo, condición corporal y largo de la cubierta externa.

En el Cuadro 1 se presenta la información del efecto del genotipo sobre el PV, CC, y el largo de la cubierta externa. El modelo estadístico utilizado para evaluar el efecto de la raza sobre dichas variables fue significativo ($P<0.001$); el grupo genético afectó la expresión fenotípica de las variables PV y CC. La superioridad en el PV favoreció a los grupos genéticos Alpinas (A) y Encastadas (E), seguidas de la Nubia (N), Saanen (S) y Granadina (G), mientras que la raza Toggenburg (T) mostró el PV más bajo ($P<0.001$). Una buena condición corporal en el ganado refleja altas cantidades de energía almacenada en el tejido corporal, en cuanto a la condición corporal, se observó un efecto ($P<0.001$) del grupo genético sobre la expresión de dicha variable. Los grupos que mostraron la máxima CC fueron las E, seguidas de N y G, no existiendo diferencias entre éstas ($P>0.005$), pero sí para las razas A, S y T, las cuales mostraron las

CC más bajas ($P < 0.001$). La superioridad mostrada por el grupo E para CC sugiere un posible efecto de heterosis hacia tamaño corporal, en comparación con los genotipos puros.

Los genotipos S, T y A, animales grandes, con mayor estructura ósea y alzada que el resto de los grupos evaluados mostraron una menor CC. Al respecto, Kleiber (1961) mencionó que los requerimientos energéticos de un animal están en función de su $PV^{0.75}$, por lo que, en animales grandes y pesados, los requerimientos nutricionales tienden a ser más altos ya que destinan menos nutrientes consumidos a la ganancia de peso. En cambio, genotipos como la G y E (Criolla x Saanen o Alpina), debido a que su estructura anatómica es más pequeña, sus requerimientos para mantenimiento tenderán a ser menores y destinarán más de lo consumido hacia el desarrollo muscular.

La función de protección al animal está dada primero por el pelo y no por el cuero totalmente. Sin embargo, en bovinos y caprinos la protección de la piel esta dada por el pelo, debido a que presenta una estructura fuerte y cerrada. Cuando el pelo crece, la piel no tiene que hacer toda la función de protección y como la cubierta externa realiza esta función, la piel se hace delgada (Borgues, 2000). Respecto al comportamiento de la cubierta externa de pelo, para la variable pelo en grupa (PG), el grupo de las E y G mostraron los valores más altos ($P < 0.001$) en comparación con los otros grupos. Para el caso del pelo en cuello (PC), la expresión fenotípica de dicha variable favoreció a las E, T y G quienes presentaron los mas alto promedios y difirieron ($P < 0.001$) con respecto

a los demás grupos. En cuanto a la variable pelo en vientre o panza (PP), los grupos raciales E, G, T, A y S no difirieron entre sí, pero si con respecto a la N, que mostró el más bajo promedio ($P < 0.001$).

Efecto de la época del año sobre el peso vivo, condición corporal, y largo de la cubierta externa. En el Cuadro 2 se observa que el PV difirió ($P < 0.001$) a través de los distintos meses. El peso corporal más bajo correspondió a Marzo y Junio, lo cual pudo deberse a que el alimento ofrecido durante dicho período no cubrió sus requerimientos de energía. La CC de más bajo valor correspondió al mes de Septiembre, difiriendo de los otros meses, probablemente como respuesta a variaciones en las condiciones climáticas y de alimentación que pudieron prevalecer durante dicho período. Además, pudo deberse a que los animales estuvieron sujetos a estrés ambiental, situación que generó una respuesta compensatoria que culminó con el uso de sus reservas corporales para mantener su peso vivo.

Estudios realizados en relación a la dieta seleccionada por el ganado con cabras fistuladas del esófago (Ramírez, 1994; Carlos, 1994) se determinó en los análisis del valor nutricional de la dieta seleccionada que la energía en ninguna época del año cubrió los requerimientos energéticos del caprino de acuerdo a los valores proporcionados por el NRC de 1985. Poppi y McLennan, (1994) mencionaron que en rumiantes bajo contextos de trópico y subtropical, se observan sensibles variaciones estacionales no solo en el suministro de los alimentos, sino también en la calidad de los pastos.

Cuadro 1. Medias Mínimo Cuadráticas, \pm error estándar, peso vivo (PV, Kg), condición corporal (CC) y largo de la cubierta externa (PG=pelo grupa, PC=pelo cuello, PP=pelo panza) en seis grupos genéticos caprinos del Norte de Durango (n=120, 25° LN)

RAZA	PV (Kg)	CC1	PG (cm)	PC (cm)	PP (cm)
Probabilidad	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Granadina	29.90 ^c	2.88 ^{a, b}	4.12 ^a	2.67 ^{a, b}	3.82 ^{a, b}
Nubia	35.92 ^{a, b}	3.06 ^a	3.65 ^{a, b}	2.40 ^b	3.20 ^b
Saanen	32.10 ^{b, c}	2.61 ^c	3.15 ^b	2.47 ^{a, b}	3.50 ^b
Toggenburg	29.67 ^c	2.55 ^c	3.75 ^{a, b}	2.80 ^{a, b}	3.70 ^{a, b}
Alpina	38.10 ^a	2.68 ^{b, c}	3.40 ^{a, b}	2.25 ^b	3.67 ^{a, b}
Encastada	37.61 ^a	3.11 ^a	4.23 ^a	3.05 ^a	4.31 ^a
Error estandard	1.03	0.05	0.21	0.15	0.15

CC: 1= Muy Flaca, 5= Muy Gordaa,b,c. Valores con diferente literal dentro de columnas, difieren ($P < 0.001$)

Cuadro 2. Medias Mínimo Cuadráticas \pm error estándar, peso vivo (PV, Kg), condición corporal (CC) y largo de la cubierta externa (PG=pelo grupa, PC=pelo cuello, PP=pelo panza) en cabras, durante cuatro épocas del año en el Norte de Durango (n=120, 25° LN)

RAZA	PV (Kg)	CC ¹	PG (cm)	PC (cm)	PP (cm)
Probabilidad	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Marzo	30.75 ^c	2.78 ^b	4.10 ^a	3.16 ^a	4.76 ^a
Junio	32.92 ^{b,c}	3.04 ^a	3.01 ^b	2.03 ^b	3.08 ^c
Septiembre	34.37 ^{a,b}	2.53 ^c	3.35 ^b	2.28 ^b	3.19 ^c
Diciembre	37.49 ^a	2.91 ^{a,b}	4.40 ^a	2.95 ^a	3.76 ^b
Error Estándar	0.84	0.04	0.17	0.12	0.12

CC; 1= Muy Flaca, 5= Muy Gorda

^{a, b}. Valores con diferente literal dentro de columnas, difieren (P<0.001)

En el Cuadro 2 también se presenta la información del efecto de la época del año sobre el largo de la cubierta externa. El modelo estadístico utilizado para evaluar el efecto de la época sobre dichas variables fue significativo (P<0.001). Durante el invierno en las zonas templadas no crece el pelo de la cabra, que manifiestamente se desarrolla por los efectos hormonales acumulativos después del equinoccio de primavera. El índice de crecimiento vuelve a disminuir en el otoño. Tanto las fibras primarias como las secundarias siguen este ciclo de crecimiento. La muda de la cubierta externa apenas es perceptible en el invierno, mientras que la renovación de la capa inferior se pone de manifiesto en verano.

En el presente estudio, los más altos valores para PC y PP correspondieron al mes de Marzo, seguidos de Diciembre y Septiembre, por último Junio con el valor más bajo. En cuanto al PG, el valor difirió (P<0.05) entre las épocas. Al igual que lo anteriormente mencionado, las tendencias numéricas observadas en el presente estudio indican que el mayor diámetro y crecimiento del pelo se produce en la primavera e invierno.

Efecto del grupo genético sobre los niveles de expresión de la proteína de choque calórico 70 (Hsp70). En el Cuadro 3 se concentra la información del efecto del grupo genético sobre la concentración de las proteínas de choque calórico (Hsp70). El modelo estadístico utilizado en el análisis de dichas variables fue significativo (P<0.001), observándose un efecto del grupo genético sobre la expresión de la variable de respuesta. Según Feder y Hoffmann (1999), la habilidad de un animal para adaptarse a los cambios del medio ambiente depende de la evolución. En el presente estudio, la síntesis de las Hsp70 en los linfocitos caprinos expresada como unidades densitométricas, mostró los mas altos niveles (P<0.001) en los grupos G, S, T, y N,

no existiendo diferencias entre ellos, pero sí con respecto al los genotipos A y E, quienes mostraron los mas bajos niveles de expresión de las Hsp70.

Estudios recientes sitúan a las Hsp70 como indicadores del grado de evolución en ciertos organismos como *Mytilus californianus*, *Drosophila melanogaster*, *Tripanozoma cruzi*, así como en algunos mamíferos como en la especie murina (Fabatier *et al.*, 1997). Tanto la proliferación celular, como la síntesis de proteínas y la viabilidad de la célula están comprometidas al estar expuestas a temperaturas elevadas, o choque calórico. Bajo dicho escenario, las células dependen de ciertos procesos bioquímicos que les confieren termoresistencia, y que son responsables de generar una respuesta compensatoria de termotolerancia, para atenuar los efectos del estrés térmico o choque calórico (Craig *et al.*, 1994).

En cada ecosistema, los animales tienden a vivir en equilibrio dinámico con su ambiente, el mantenimiento de éste equilibrio involucra interacciones de numerosos factores ambientales, fisiológicos y de comportamiento. Para los animales homeotermos, el estrés calórico ocurre bajo condiciones en las cuales los animales tienen dificultad para disipar el calor corporal, produciéndose incrementos en la temperatura corporal, frecuencia cardiaca y una disminución en el consumo de alimento (Lefcourt y Adams, 1996).

Según Bañuelos (1999), las razas que muestran una mayor capacidad de adaptación son aquellas que muestran una mayor capacidad de síntesis de Hsp cuando células de estas son expuestas a un choque calórico, generándose un incremento en la expresión de Hsp inducidas.

del presente estudio. Dicho escenario involucraría una falta de percepción por parte de los genotipos Encastados y Alpinos, de estados de alarma dependientes del medioambiente, lo cual conllevó a una limitada expresión de Hsp70. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren una mayor capacidad de adaptación por parte de los grupos genéticos Alpina y Encastado, particularmente el grupo Encastado, quien mostró la mayor longitud de pelaje, los mayores pesos vivos, la mejor condición corporal, así como los más bajos niveles de expresión de las Hsp70.

Efecto de la época del año sobre la expresión de la proteína de choque calórico 70 (Hsp70). En el Cuadro 4 se presenta la información del efecto de la época del año sobre la expresión de la Hsp70. El modelo estadístico utilizado en el análisis de Hsp70 fue significativo ($P < 0.0001$). La adquisición de la termotolerancia en los organismos sometidos a los tratamientos de choque térmico se correlaciona con una mayor síntesis de proteínas de alto peso molecular o de estrés calórico (Hendrick y Hartl, 1993). Las proteínas de choque calórico participan como mecanismo de

resistencia al estrés, y si este mecanismo es común, entonces los individuos pueden tener niveles de resistencia altos a un rango de estresores y la selección para una mayor resistencia a un estresor, puede incrementar la resistencia a otros (Hoffmann y Parsons, 1991).

En el presente estudio en el mes de Diciembre se observó la mayor expresión ($P < 0.01$) de la Hsp70 en comparación con las otras épocas. Dicho patrón de comportamiento sugiere un efecto ocasionado por la oscilación térmica elevada que se presentó en el invierno (22.6°C). Aún cuando en Junio también se observó una elevada expresión en los niveles de las Hsp70, coincidente con las más altas temperaturas medias por día, dicho escenario pudo ser promovido por un efecto directo de las altas temperaturas promedio por día, ya que la oscilación térmica para dicho mes solo fue de 14.9°C .

Lo anterior puede deberse más a un efecto directo de la temperatura máxima por día, que a las diferencias entre las temperaturas máxima y mínima para dicho mes;

Cuadro 4. Inmunodetección de las proteínas de choque calórico (Hsp70) en linfocitos mediante quimioluminiscencia (ECL), bandas representativas por época del año y medias mínimo cuadráticas \pm error estándar (Unidades Densitométricas) para la expresión de las Hsp70 durante cuatro épocas del año en ganado caprino del Norte de Durango (25°LN)

Epoca	Muestras representativas por época					Niveles Hsp70
	1	2	3	4	5	
Marzo						32397.26 b
Junio						51302.06 a
Septiembre						19780.16 c
Diciembre						53890.00 a
Error estándar						2916.99
Probabilidad						$P < 0.001$

a, b, c. Valores con diferente literal en la columna difieren ($P < 0.0001$)

ECL. Reactivo quimioluminiscente (Amersham Little, England)

dichas elevadas temperaturas pudieron generar estrés calórico y en consecuencia los animales incrementaron la expresión de los genes que codifican dichas proteínas. En observaciones realizadas tanto en animales homeotermos como en diferentes tipos de células, al incrementarse la temperatura ambiental se genera un incremento en la expresión de proteínas de choque calórico, como un mecanismo que activan los individuos para lograr termoprotección (Kamwanja *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

El grupo genético afectó ($P < 0.001$) las variables peso vivo (PV) y condición corporal (CC), observándose valores promedios de 33.88 ± 1.03 kg para PV y 2.81 ± 0.05 para CC. Mientras que el mayor PV se observó en el grupo Alpino (A), las mayores CC ($P < 0.001$) fueron mostradas por las cabras Encastadas (E), seguidas de la Nubia (N) y la Granadina (G); los grupos de origen Suizo, mostraron la mas baja ($P < 0.001$) CC. Los valores promedio para el largo del pelo en grupa (PG), en cuello (PC) y en panza (PP) fueron, respectivamente, 3.72 ± 0.21 , 2.61 ± 0.15 y 3.70 ± 0.15 cm, y difirieron ($P < 0.001$) entre genotipos, observandose los mayores valores en las cabras E. La época afectó ($P < 0.001$) las variables PG, PC y PP, observandose los mayores promedios durante Marzo y Diciembre, coincidente con las mas bajas temperaturas ambientales.

Con respecto a la proteína de choque calórico (Hsp70), esta fue identificada en los linfocitos de los seis grupos genéticos en estudio, mostrando una expresión diferencial ($P < 0.001$) a través del año. Los mayores niveles de expresión ocurrieron en Junio y Diciembre meses en los cuales se observó la máxima temperatura ambiental (33.6°C), y la mayor oscilación térmica (23.6°C), en forma respectiva. La expresión de la Hsp70 difirió ($P < 0.001$) entre genotipos; mientras que las razas G, S y T mostraron la mayor biosíntesis de Hsp70, los genotipos A y E generaron la mas baja expresión.

Si la expresión de dichos niveles de Hsp70 se considera como constitutiva, no inducida, los resultados, en su conjunto, delinean una mayor capacidad de adaptación por parte de los genotipos E y A, a las condiciones medioambientales que prevalecieron durante el desarrollo del presente estudio. Dicho escenario involucraría una falta de percepción por parte de los grupos E y A de estados de alarma dependientes del medioambiente, lo cual conllevó una limitada expresión de Hsp70. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren una mayor capacidad de adaptación por parte de los grupos genéticos A y E, particularmente el grupo E, quien mostró la mayor longitud de pelaje, los

mayores pesos vivos, la mejor condición corporal, así como los más bajos niveles de expresión de las Hsp70.

LITERATURA CITADA

- Arbiza, A.S. 1986. Producción caprina. 1ª Edición. AGT EDITOR, S.A. México, D.F.
- Bañuelos, V.R. 1999. Efecto de la temperatura en la expresión in vitro de la proteína Hsp70 en linfocitos de bovinos con diferencias raciales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 149 p.
- Borgues, C.J. 2000. Estructura de la piel. AUQTIC. Uruguay.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Carlos, R.J. 1994. Determinación de la composición botánica, valor nutritivo y digestibilidad de la dieta seleccionado por el ganado caprino en el agostadero de Marín N.L. Tesis de Maestría. F.A.-UANL. Monterrey, N.L. México.
- Craig, E.A., Weissman, J.S. and Horwich, A.L. 1994. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell.* 78: 365-372.
- Devendra, C. 1987. Goats. In: H.D. Johnson (Editor), *World Animal Science*, Vol. B5. Elsevier, Amsterdam, pp. 157-167.
- Fabatier, F., Bormman, L., Hightower, E.L., Gunther, E., Polla, S.B. 1997. Variation in hspgene expression and Hsp polymorphis do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance?. *Cell Stress & Chaperones.* 3: 141-155.
- Gall CF. 1991. Breed differences in adaptation of goats. In: Genetic resources of pig, sheep and goat. Majjala K, editors. *World Animal Science B8.* Elsevier, Amsterdam, 413-429.
- Goodman, R. and Blank, M. 1998. Magnetic field stress induces expression of Hsp 70. *Cell Stress & Chaperones.* 3:79-88.
- Guerreiro V, Raynes DA. 1990. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J. Anim. Sci.* 68:2779-2783.
- Hendrick, J.P., Hartl, F.U. 1993. Molecular chaperonig functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349-384.
- Hoffman, A.A., Parsons, P.A. 1991. Evolutionary genetics

- and environmental stress. Oxford University Press, New York. pp. 47-58.
- Kamwanja, L.A. Chase, C.C, Jr, Guerreiro, V. Jr., Olson, A.T., Hammond, J., Hansen, J.P. 1994. Responses of bovine to heat shock as modified by breed and antioxidant status. *J. Anim. Sci.* 72: 438-444.
- Kleiber, M. 1961. *The fire of life: An introduction to Animal Energetics.* Willey, New York.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 335: 455-457.
- Lefcourt, M.A., Adams, R.W. 1996. Radiotelemetry measurement of body temperatures of feedlot steers during summer. *J. Anim. Sci.* 74: 2633-2640.
- Lindquist, S., and Craig, E. A. 1998. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 22:631-637.
- Olmsted, J.B. 1981. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogenic protein samples. *J. Biol. Chem.* 256: 11955-11957.
- Poppi, D.P., McLennan, S.R. 1994. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. *J. Anim. Sci.* 73:278-290.
- Ramírez, L.R. 1994. Composición y calidad nutritiva del forraje seleccionado por cabras en pastoreo en los agostaderos del noreste de México. *Memorias de IX Reunión Nacional de Caprinocultura.* pp. 52-60.
- Saran, M and Bors, W. 1997. Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated: evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity. *Radiation Research.* 147:70-77.
- SAS, 1991. *SAS system for lineal models.* Third edition. SAS Institute Inc., Cary, NC pp. 329.
- Snedecor, G.W., and W.G. Cochran. 1967. *Statistical Methods.* (6th Ed.). The Iowa State University Press, Ames.
- Welch, W.J., Kang, S.H., Beckman, P.R., Mizzen, A.L. 1991. Response of mammalian cells to metabolic stress; Changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Current Topics Microbiol. Imm.* 167: 31-50.