Polimorfismo del gen TLR4 asociado a caracteres de producción de leche en vacas Holstein manejadas bajo estrés por calor

Romel L. Hurtado-Martínez[1], Arhemy Pineda-Montes[1], Paulina Luna-Ramirez[1], Javier R. Reyna-Granados[1], José C. Leyva-Corona[1], Ricardo Zamorano-Algandar[2], Manuel I. Nieblas-López[2] y Pablo Luna-Nevárez[1*]

[1]*Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora.*
[2]*Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora.*

Artículo recibido el 29 de noviembre y aceptado el 10 de diciembre de 2024

Polymorphism from the gene TLR4 associated with milk production traits in Holstein cows managed under heat stress.

Abstract

Dairy cattle farms in Sonora are characterized by continuous annual production, which is seriously affected by adverse environmental temperature and humidity conditions that prevail most of the year, as they exceed the cow's thermal comfort threshold, leading to heat stress. Despite the challenge these conditions represent for milk production systems, it is possible to observe cows with the ability to maintain efficient production parameters, which is attributed to a genetic basis. Therefore, the objective of this study was to evaluate a polymorphism of the TLR4 gene as a genetic marker for traits associated with milk production in Holstein cows managed under heat stress. The study included 264 lactating cows from two farms located in the Yaqui Valley. Total milk production during lactation was recorded and adjusted to 305 days. Climatological data were obtained to calculate the THI, which indicated the presence of heat stress from April to October. Blood samples were obtained from each cow and processed for DNA extraction, which was used for genotyping of a single nucleotide polymorphism (SNP) of the toll-like receptor 4 (TLR4) gene by TaqMan assay and qPCR test. A mixed effects statistical model validated the predictive effect ($P < 0.05$) of the SNP rs8193046 on four traits associated with milk production and confirmed the additive behavior of the TLR4 gene. The favorable genotype was the TT genotype, where each T allele showed a contribution ($P < 0.01$) in the improvement of the four parameters evaluated. In conclusion, the SNP rs8193046 of the TLR4 gene is proposed as a genetic marker associated with milk production in Holstein cows managed under heat stress.

Key words: DNA, heat stress, lactating, SNP, THI.

Resumen

Los establos de ganado bovino para leche en el estado de Sonora se caracterizan por una producción anual contínua, la cual se ve seriamente afectada por las condiciones adversas de temperatura y humedad ambiental que prevalecen gran parte de año, ya que superan el umbral de confort térmico de la vaca conduciendo al estrés por calor. No obstante el reto que representan estas condiciones para los sistemas de producción de leche, es posible observar vacas con habilidad para mantener parámetros productivos eficientes, lo cual se atribuye a la existencia de genes que regulan producción de leche y termotolerancia. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar un polimorfismo del gen TLR4 como marcador genético para caracteres asociados a la producción de leche en vacas Holstein manejadas bajo estrés por calor. El estudio incluyó 264 vacas lactantes de dos establos ubicados en el Valle del Yaqui. Se registró la producción de leche total durante la lactancia y se ajustó a 305 días, calculando los valores promedio diarios de ambas mediciones. Se obtuvieron datos climatológicos para calcular el indicador de temperatura-humedad (ITH), el cual indicó la presencia de

*Autor de correspondencia
Email pluna@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

estrés por calor de abril a octubre. Muestras de sangre fueron obtenidas de cada vaca y procesadas para la extracción de ADN, el cual fue utilizado para el genotipado de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), del gen del receptor tipo toll-4 (TLR4) a través del ensayo TaqMan y la prueba de qPCR. Un modelo estadístico de efectos mixtos validó el efecto predictor ($P < 0.05$), del SNP rs8193046 sobre 4 rasgos asociados a la producción de leche y confirmó el comportamiento aditivo del gen TLR4. El genotipo favorable resultó ser el genotipo TT, donde cada alelo T mostró una contribución ($P < 0.01$), en la mejora de los 4 parámetros evaluados. En conclusión, se propone al SNP rs8193046 del gen TLR4 como marcador genético candidato asociado a la producción de leche en vacas Holstein manejadas bajo condiciones ambientales de estrés por calor.

Palabras claves: ADN, estrés por calor, ITH, lactantes, SNP.

Introducción

Los establos lecheros ubicados en regiones semiáridas como el sur de Sonora, México, enfrentan el desafío de producir leche de calidad en un clima cálido caracterizado por una alta temperatura ambiental y alta humedad relativa gran parte del año, periodo durante el cual la habilidad de la vaca para disipar el calor por evaporación a través de la piel se ve seriamente afectada provocando el estrés por calor (Liu *et al*., 2019). Sin embargo, se han detectado vacas con habilidad superior para producir leche en climas con calor extremo, lo cual parece estar asociado a una base genética.

La producción y acumulación de calor, junto con la capacidad de enfriamiento comprometida debido a las condiciones ambientales adversas, hacen que la carga de calor en la vaca aumente hasta el punto de que la temperatura corporal se eleva, el consumo de alimento se reduce y consecuentemente la productividad de la vaca disminuye (West, 2003). Los genes influyen en todos los mecanismos fisiológicos corporales; en el caso de la producción de leche los genes regulan la cantidad de células productoras de leche en las glándulas mamarias, la velocidad a la que estas células producen leche, y la capacidad del tejido mamario para transportar la leche a los conductos secretores (Misztal *et al*., 2015).

En Estados Unidos, las pérdidas económicas en la industria lechera por efecto del estrés calórico se estiman en 897 millones de dólares, y recientemente proyectaron pérdidas económicas de 0.4 y 1.2 % para el 2050 y 2100, respectivamente, en la cuenca lechera ubicada al noroeste de ese país. En México, no existen reportes de las pérdidas que genera el estrés por calor en el ganado lechero, sin embargo, son evidentes si se toma de referencia la estacionalidad que hay en la producción de leche en cuencas ubicadas en climas cálidos (Correa *et al*., 2022).

Se ha descrito que un componente genético influye en la producción de leche en vacas lecheras expuestas al estrés térmico, lo que sugiere la presencia de genes relacionados con la termotolerancia (Sigdel *et al*., 2019). La respuesta o sensibilidad al estrés térmico en vacas lecheras parece estar asociada con variaciones genéticas pronunciadas a nivel cromosómico, lo que indica que las regiones genómicas y los principales genes candidatos deberían ser la base de la respuesta al estrés térmico (Bohlouli *et al*., 2021). Por lo tanto, el estudio de la base genética asociada con la termotolerancia es potencialmente útil para la selección de ganado adaptable a condiciones semiáridas cálidas (Henry *et al*., 2018).

Con el progreso de la secuenciación del genoma bovino y las tecnologías de genotipificación de SNPs de alta densidad, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), se han convertido en una herramienta importante para localizar regiones cromosómicas asociadas con rasgos de importancia económica (Jiang *et al*., 2019). Los análisis de GWAS examinan miles de pequeñas variantes en todo el genoma llamadas polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que son muy útiles para identificar genes funcionales probablemente involucrados en rasgos fenotípicos tales como la producción de leche y la tolerancia al estrés por calor (Hong *et al*., 2012).

La identificación de genes específicos o marcadores SNP asociados a termotolerancia en vacas Holstein parece ser una estrategia importante para asegurar la productividad de las vacas lecheras (Leyva-Corona *et al*., 2018). Sin embargo, estos marcadores deben ser validados en poblaciones independientes de ganado para estar disponibles para su incorporación en programas de selección genética enfocados en mejorar caracteres complejos y económicamente importantes como la producción de leche y la termotolerancia (Zamorano-Algandar *et al*., 2023).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar

un polimorfismo del gen TLR4 como marcador genético candidato para producción de leche en vacas Holstein manejadas bajo condiciones climáticas de estrés por calor.

Materiales y métodos

Sitio y población experimental

El estudio se realizó en dos establos lecheros localizados en el Valle del Yaqui, en el sur del estado de Sonora. Las condiciones ambientales se caracterizan por un clima que varia de seco a semi-húmedo, con lluvias durante el verano (julio a septiembre), y temperaturas promedio anuales de 33.6°C (máxima), y 17.4°C (mínima). Se incluyeron 264 vacas lactantes de raza Holstein, de 3-6 años de edad y buena condición corporal que fueron alojadas en corrales de manejo intensivo, con acceso libre al agua y a la sombra, y en donde recibieron una ración mixta de alimento necesaria para cubrir sus necesidades nutricionales de acuerdo a lo establecido por el NRC (2001).

Producción de leche

La producción de leche se determinó dos veces al día, después de cada ordeña, utilizando un sistema electrónico (Metatron 21, Westfalia Surge, México, S.A. de C.V., Aguascalientes MX). Se registró la cantidad de leche total (kg), durante la lactancia completa (LecheT); este valor se multiplicó por un factor de ajuste basado en los días en leche y en la edad de la vaca para estimar la variable de leche ajustada a 305 días (LecheA). Se calcularon los valores promedio de ambas variables para determinar el promedio de leche total (PromT), y el promedio de leche ajustada a 305 días (PromA). Por lo tanto, los 4 caracteres evaluados fueron: LecheT, LecheA, PromT y PromA.

Variables climáticas y fisiológicas

Se obtuvieron datos de temperatura ambiental (TA °C) y humedad relativa (HR %) de una base climatológica cercana, los cuales fueron usados para calcular el índice de temperatura-humedad (ITH), de acuerdo a la siguiente fórmula: ITH= 0.81 TA + HR (TA − 14.4) + 46.4 (Mader *et al.*, 2006). Las unidades de ITH se usaron para determinar el grado de estrés por calor al que estuvieron expuestas las vacas a través de año.

Se midieron los rasgos fisiológicos de temperatura rectal (TR), y frecuencia respiratoria (FR), semanalmente (06:00 y 16:00 h), como indicadores de termotolerancia. Se utilizó un termómetro digital (TES-1310R), con una sonda rectal de contacto (Tipo K-com grande), para registrar la TR, mientras que la FR se evaluó mediante el conteo visual de los movimientos intercostales del flanco durante 60 s (respiraciones/min). Mediciones de ambas variables fueron registradas en la sala de espera antes de la ordeña.

Muestreo de sangre y extracción de ADN

Una muestra de sangre de cada vaca fue recolectada a través de punción en la vena yugular en tubos Vacutainer (Venoject®, Terumo, Lakewood, CA, EE. UU.) que contenían ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA-Na2), como anticoagulante. Las muestras se colocaron en una bolsa térmica y se transportaron inmediatamente al laboratorio de Biotecnología Reproductiva del ITSON, donde se centrifugaron durante 15 minutos a 1500 g. Posteriormente se extrajeron 200 µL de capa leucoplaquetaria de cada muestra y se almacenaron a -20 °C antes de la extracción de ADN. El ADN se extrajo utilizando un kit disponible comercialmente (DNeasy Blood & Tissue Kits; Cat. no. 69504, QIAGEN, Hilden, Alemania), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se midieron en un espectrofotómetro automático Nano Drop (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis.

Selección del gen y SNP candidato

Un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación reportó 3 polimorfismos (SNPs), asociados a producción de leche y termotolerancia en vacas de raza Holstein (Zamorano-Algandar *et al*., 2023), a través de un estudio análisis asociativo del genoma completo (GWAS). Uno de estos polimorfismos fue el SNP rs8193046 que se encuentra dentro del gen TLR4 (receptor tipo toll-4) y el cual mostró un efecto favorable al asociarse con un incremento en la producción de leche, así como a una disminución en dos caracteres indicativos de termotolerancia tales como la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria de las vacas evaluadas. Por lo anterior, se seleccionó el SNP rs8193046 del gen TLR4 para su validación en 2 poblaciones independientes de vacas de raza Holstein manejadas bajo condiciones ambientales de estrés por calor.

Genotipificación

El SNP rs8193046 del gen TLR4 fue genotipificado usando el método de discriminación alélica TaqMan y qPCR (StepOneTM, Applied Biosystems, Foster City CA, EE. UU.). Este método permite la

genotipificación de las dos variantes posibles en el SNP en una secuencia de plantilla diana utilizando dos pares de cebadores/sonda en cada reacción. La reacción de PCR de genotipificación se realizó añadiendo la plantilla de ADN genómico (2 µL), más la mezcla maestra de genotipificación (5 µL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), la mezcla de ensayo personalizada de genotipificación (0.5 µL; sondas y cebadores) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y agua libre de ADNasa (2.5 µL).

Se incluyeron dos controles negativos en cada placa. Para los controles negativos, se añadió agua libre de ADNasa (2.5 µL) a cada placa de reacción en lugar de ADN genómico para la muestra. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: primero se realizó una desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, y alineamiento y extensión a 60°C durante 60 s. La PCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El análisis de datos del PCR y la genotipificación se realizaron con el software StepOne (versión 2.3, Life Technologies Corporation, USA).

Análisis estadísticos

Las estadísticas descriptivas para los 4 caracteres evaluados en el presente estudio se calcularon utilizando PROC MEANS. Los supuestos de normalidad de la distribución de datos e igualdad de varianzas se probaron utilizando PROC UNIVARIATE y PROC GLM (prueba de Levene), respectivamente. Las frecuencias de alelos y genotipos para el SNP bajo estudio se calcularon con PROC ALLELE. Se utilizó un análisis de Ji-cuadrada (X^2), para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP rs8193046.

Un estudio asociativo entre genotipo y fenotipo fue procesado para evaluar el SNP rs8193046 como marcador molecular para los 4 caracteres de producción de leche bajo estudio, en dos poblaciones independientes de vacas Holstein expuestas a condiciones de estrés por calor. Se usó un modelo estadístico de efectos mixtos a través de PROC MIXED para evaluar el potencial del SNP rs8093046Ps como predictor de caracteres asociados a la producción de leche. El modelo estadístico incluyó además de la variable de respuesta, el genotipo del SNP, el establo y el número de lactancia como efectos fijos, los días en leche como covariable, y el padre como efecto aleatorio.

Se generaron comparaciones por pares de los valores promedio por genotipo utilizando la opción PDIFF cuando los análisis asociativos detectaron el término genotipo como una fuente significativa de variación ($P < 0.05$). Se utilizó la opción LSMEANS con ajuste de Bonferroni para procesar las pruebas de separación de medias, así como el procedimiento MIXED para calcular los efectos estimados de la sustitución de alelos promedio. Finalmente se calcularon los efectos genéticos de aditividad y dominancia para determinar el tipo de acción génica. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software SAS (versión 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Resultados

Los valores promedio para los caracteres de producción de leche en vacas Holstein manejadas bajo condiciones cálidas del sur de Sonora se muestran en la tabla 1, siendo indicativos de un apropiado manejo en los establos lecheros en los cuales se realizó el estudio. En la tabla 2 se observan los resultados del análisis asociativo desarrollado bajo el procedimiento MIXED, los cuales confirman que el polimorfismo analizado (rs8193046) mostró un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre 4 caracteres de producción de leche en vacas Holstein que estuvieron expuestas a condiciones climáticas de estrés por calor, ya que el ITH que prevaleció durante el período experimental superó las 75 unidades en promedio. El genotipo favorable resultó ser el TT, ya que mostró los valores más altos para los caracteres analizados. El alelo T confirmó su contribución favorable para los 4 rasgos de producción de leche, así como un efecto genético aditivo del SNP rs8193046 (Tabla 3), lo que sugiere que la suma de sus efectos individuales es igual a los efectos de sus alelos combinados.

Tabla 1. Valores promedio ± EE para 4 caracteres relacionados con la producción de leche en vacas de la raza Holstein criadas en el sur de Sonora.

Carácter	N	Media ± EE
LecheA	264	5271.1 ± 264.5
PromA	264	17.8 ± 0.7
LecheT	264	5256.7 ± 366.5
PromT	264	18.8 ± 0.9

Carácter = Rasgo productivo asociado a la producción de leche (LecheA = Producción de leche ajustada a 305 días, kg; PromA = Promedio de producción de leche ajustada a 305 días, kg; LecheT = Producción de leche total durante la lactancia, kg; PromT = Promedio de producción de leche total durante la lactancia, kg); N= Número de vacas; Media ± EE = Valor promedio ± error estándar.

Tabla 2. Valores promedio ± EE para caracteres de producción de leche de acuerdo a los genotipos del SNP rs8193046 del gen TLR4 en vacas Holstein.

Carácter	N	Valores promedio por genotipo ± EE			Prob
		TT	TG	GG	
LecheA	264	5945.9 ± 219.7[a]	5299.5 ± 289.3[b]	4976.2 ± 402.4[c]	0.0195
PromA	264	19.4 ± 0.70[a]	17.3 ± 0.90[b]	16.3 ± 1.30[b]	0.0156
LecheT	264	5627.4 ± 321.6[a]	5129.2 ± 410.1[b]	4053.9 ± 598.4[c]	0.0373
PromT	264	20.1 ± 0.60[a]	18.2 ± 0.80[b]	17.1 ± 1.20[b]	0.0239

Carácter = Rasgo productivo asociado a la producción de leche (LecheA = Producción de leche ajustada a 305 días, kg; PromA = Promedio de producción de leche ajustada a 305 días, kg; LecheT = Producción de leche total durante la lactancia, kg; PromT = Promedio de producción de leche total durante la lactancia, kg); N = Número de vacas; [a,b,c]Indican diferencia estadística significativa entre los valores promedio por genotipo de acuerdo al modelo estadístico empleado; Prob = Significancia estadística.

Tabla 3. Valores estimados de los efectos de substitución alélica y de los efectos fijos de aditividad y dominancia del alelo favorable del SNP rs8193046 del gen TLR4 en vacas Holstein.

Carácter	N	Efectos de substitución alélica				Efectos fijos estimados	
		Alelo Favor[a]	Prob[b]	Estimado ± EE[c]	Prob[d]	Efecto Aditivo[e]	Efecto Dominant[f]
LecheA	264	T	<0.01	478.3 ± 35.4	<0.01	484.8	161.5
PromA	264	T	<0.01	1.4 ± 0.9	<0.01	1.6	0.6
LecheT	264	T	<0.01	726.1 ± 56.1	<0.01	786.8	288.6
PromT	264	T	<0.01	1.2 ± 0.08	<0.01	1.5	0.4

[a]Alelo del SNP con el efecto favorable sobre el carácter fenotípico.
[b]Valor de probabilidad obtenido del análisis de substitución alélica que incluyó el término genotipo como covariable.
[c]Efecto estimado expresado en unidades del carácter fenotípico ± el error estándar.
[d]Valor de probabilidad obtenido del análisis de efectos fijos de aditividad y dominancia.
[e]Diferencia entre los 2 genotipos homocigotos dividida entre 2.
[f]Desviación del genotipo heterocigoto con respecto al promedio de los 2 homocigotos.

Discusión

La respuesta fisiológica del ganado lechero bajo estrés calórico representa un eslabón de un complejo sistema regulado por genes, donde los primeros genes que fueron propuestos como mediadores de los efectos fisiológicos del estrés calórico en las vacas fueron el de la prolactina (PRL), y el de su receptor (PRL-R; Collier *et al*., 2008; DoAmaral *et al*., 2010). De acuerdo con Mariasegaram *et al*. (2007), el gen PRL-R ha sido localizado en el cromosoma 20 del bovino, en una región cercana al gen Slick, el cual está asociado con la tolerancia al calor.

La prolactina participa dentro del eje funcional de la hormona del crecimiento (GH), y del factor de crecimiento insulínico (IGF1), los cuales son positivamente regulados a través de familias de genes señaladores de traducción y activación de transcripción (STAT; DoAmaral *et al*., 2010), y de activadores de la biodisponibilidad del IGF-1 como las proteínas plasmáticas asociadas a la preñez (PAPPA; Luna-Nevárez *et al*., 2012). Hernandez-Cordero *et al*. (2018), reportaron diversos genes pertenecientes al eje de la PRL/GH/IGF1 como marcadores genéticos asociados a la producción de leche ajustada a 305 días en vacas de raza Holstein expuestas a condiciones de estrés por calor. De forma similar, Proaño-Morales *et al*. (2021), encontraron dos SNPs pertenecientes a los ejes funcionales de prolactina y GH-IGF1 como predictores de tolerancia al calor.

Recientemente, las tecnologías genómicas y los programas de selección asistida por marcadores se han utilizado como estrategias exitosas para estudiar genes candidatos y marcadores genéticos asociados con la respuesta al estrés por calor en vacas Holstein (Macciota *et al*., 2017). Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), utilizan matrices densas de marcadores SNP que cubren todo el genoma animal, lo que explica una parte significativa de la variación genética de rasgos importantes (Silva *et al*., 2014), y permite el descubrimiento de una gran cantidad de SNPs vinculados a un gen o genes que afectan a un rasgo determinado (Meuwissen *et al*., 2016). Los estudios de selección asistida por marcadores (SAM), obtenidos a partir de GWAS permiten la validación de SNPs utilizando poblaciones independientes para identificar individuos con alelos favorables en un solo marcador o región genómica (Contreras-Méndez *et al*., 2024).

Un estudio reciente realizado por Zamorano-Algandar *et al*. (2023), reportó la aplicación de tecnologías de GWAS y SAM de manera secuencial para identificar y validar SNPs como marcadores

moleculares potenciales para ser utilizados en programas de selección genética y mejoramiento de hatos lecheros. Después de realizar el GWAS se identificaron 18 SNPs como predictores de la producción de leche en vacas Holstein estresadas por calor. Se encontró que 4 de estos SNPs cumplían con los criterios de selección para marcadores genéticos, pero sólo 3 de ellos mostraron una frecuencia del alelo menor superior al 10% y se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, condiciones requeridas para los estudios de validación.

En el estudio antes mencionado, Zamorano-Algandar *et al*. (2023), demostraron una asociación entre 3 SNPs encontrados en vacas expuestas a estrés calórico y su producción de leche, estos SNPs se encontraban en los genes TLR4, GRM8 y SMAD3, los cuales parecen estar implicados en múltiples mecanismos fisiológicos que regulan la producción de leche en vacas expuestas a estrés por calor, por lo que argumentan que la validación de estos genes en poblaciones independientes de vacas Holstein es una importante estrategia para comprender el mecanismo de adaptación del ganado.

El carácter productivo más importante para cualquier explotación lechera es la capacidad del animal para producir grandes cantidades de leche; este rasgo fenotípico está ligado a la expresión de múltiples genes, siendo uno de ellos el gen TLR4, el cual desempeña un papel fundamental en la inmunidad innata y la inmunidad mediada por células (Duan *et al*., 2022). Lo anterior le confiere a este gen una importante función en los mecanismos de defensa contra enfermedades, ya que promueve la maduración y activación de los linfocitos T ante diversas condiciones fisiológicas, proporcionando defensa contra múltiples patógenos como los causantes de la mastitis (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*), la cual representa un problema sanitario que afecta seriamente la productividad de los establos lecheros (Chen *et al*., 2022).

Lui *et al*. (2017), observaron una disminución del gen TLR4 causada por el estrés térmico, la cual se asoció con una marcada reducción en la actividad lipolítica y el contenido lipídico de la leche. El tejido adiposo, al ser un órgano endócrino altamente sensible a los cambios climáticos, es probable que reduzca la movilización de adipocitos en vacas lecheras estresadas por calor, siendo esta respuesta al parecer mediada por una baja expresión del gen TLR4. La norepinefrina también se ha asociado a una reducción del efecto lipolítico en ganado lechero lactante bajo estrés por calor, por lo que no se descarta su interacción con el gen TLR4 (Baumgard *et al*., 2013).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos sugieren que el SNP rs8193046 en el gen TLR4 es un predictor de la producción de leche en vacas Holstein manejadas durante el verano en el sur de Sonora, ya que es capaz de inducir una respuesta inmune contra el estrés por calor, así como modificaciones en el metabolismo lipídico para minimizar la carga de calor interna. Por lo tanto, el gen TLR4 parece coordinar funciones endócrinas y metabólicas adaptativas en vacas lecheras sometidas a estrés por calor, lo que les permite mantener la producción de leche en niveles relativamente normales.

Sharma *et al*. (2015), postularon que el SNP rs29017188 dentro del gen TLR4 se asoció a diversos caracteres relacionados con la sanidad y reportaron que dicho SNP podría contribuir en la respuesta inmune bovina contra *Mycobacterium avium* ssp. y *Paratuberculosis* (MAP). Interesantemente, Wang *et al*. (2018), reportaron este mismo polimorfismo como predictor significativo de caracteres de producción de leche en vacas Holstein. Referente al efecto del gen TLR4 asociado a la actividad lipolítica, Gupta *et al*. (2021), observaron una estrecha relación entre las respuestas endócrinas al estrés térmico y la activación del sistema inmunológico, y en la cual parece estar involucrada la vía de señalización del gen TLR4.

Resultados del presente estudio confirman que el polimorfismo rs8193046 dentro del gen TLR4 resultó ser un potencial predictor del desempeño productivo durante la lactancia en ganado bovino de raza Holstein manejado bajo condiciones ambientales de estrés por calor. El alelo favorable de dicho polimorfismo incrementó la producción de leche ajustada a 305 días de lactancia (478.3 ± 35.4), el promedio de leche diario ajustado a 305 días de lactancia (1.4 ± 0.9), la producción de leche total (726.1 ± 56.1) y el promedio diario de leche total (1.2 ± 0.08).

Conclusiones

Un polimorfismo del gen TLR4 fue validado como un marcador genético asociado a rasgos de producción de leche en ganado Holstein manejado bajo las condiciones cálidas típicas del sur de Sonora. Por lo anterior, se propone el gen TLR4 como candidato para ser utilizado en programas de selección para favorecer el aumento en la

producción de leche en vacas expuestas a estrés por calor. Sin embargo, se recomienda la evaluación en estudios adicionales de otros polimorfismos del gen TLR4, así como de otros genes relacionados con la producción de leche en ganado bajo estrés por calor, para conocer más sobre las bases genéticas que regulan la productividad del ganado lechero manejado en la región sur el estado de Sonora.

Referencias

Baumgard, L.H., Rhoads, R.P. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 311–337, https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103644

Bohlouli, M., Yin, T., Hammami, H., Gengler, N., König, S. 2021. Climate sensitivity of milk production traits and milk fatty acids in genotyped Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 104, 6847–6860, https://doi.org/10.3168/jds.2020-19411

Chen, H., Liu, C., Xiang, M., Yu, J., Xia, Y., Hu, X., Wang, D., Tao, B., Zhang, Y., Cheng, L. 2022. Contribution of the mutation rs8193069 in TLR4 to mastitis resistance and performance in Holstein cows in southern China. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1): 357–366. https://doi.org/10.1002/vms3.671

Collier, R.J., Collier, J.L., Rhoads, R.P., Baumgard, L.H. 2008. Invited Review: Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. J. Dairy Sci. 91: 445-454, https://doi.org/10.3168/jds.2007-0540

Contreras-Méndez, L.A., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Luna-Nevárez, G., López-Castro, P.A., Rivera-Acuña, F., Luna-Nevárez, P. 2024. The Anti-Müllerian hormone as endocrine and molecular marker associated with reproductive performance in Holstein dairy cows exposed to heat stress. Animals (Basel), 14(2):213, https://doi.org/10.3390/ani14020213

Correa, A., Avendaño, L., López, M., Macías, U. 2022. Estrés por calor en ganado lechero con énfasis en la producción de leche y los hábitos de consumo de alimento y agua. Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 13(2), 488-509, https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i2.5832

Do Amaral, B.C., Connor, E.E., Tao, S., Hayen, J., Bubolz, J., Dahl, G.E. 2010. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. Domestic Animal Endocrinology, 38, 38–45, https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.07.005

Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., Wang, R.F. 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13, https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774

Gupta, S. Sharma, A. Joy, A. Dunshea, F.R., Chauhan, S.S. 2022. The impact of heat stress on immune status of dairy cattle and strategies to ameliorate the negative effects. Animals, 13, 107, https://doi.org/10.3390/ani13010107

Henry, B., Eckard, R., Beauchemin, K. 2018. Adaptation of ruminant livestock production systems to climate changes. Animal, 12, s445–s456. https://doi.org/10.1017/S1751731118001301

Hernández-Cordero, A.I., Sánchez-Castro, M.A., Zamorano-Algandar, R., Luna-Nevárez, P., Rincón, G., Medrano, J.F., Speidel, S.E., Enns, R.M., Thomas, M.G. 2018. Genotypes within the Prolactin and Growth Hormone Insulin-Like Growth Factor-I pathways associated with milk production in heat stressed Holstein cattle. Gen. Mol. Res., 16(4), 1-10, http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039821

Hong, E.P., Park, J.W. 2012. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. Genom. Inform. 10, 117–122, https://doi.org/10.5808/GI.2012.10.2.117

Jiang, J., Ma, L., Prakapenka, D., VanRaden, P.M., Cole, J.B., Da, Y. 2019. A large-scale genome-wide association study in U.S. Holstein cattle. Front. Genet., 14, 412. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00412

Leyva-Corona, J.C., Reyna-Granados, J.R., Zamorano-Algandar, R., Sánchez-Castro, M.A., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Medrano, J.F., Rincon, G., Luna-Nevárez, P. 2018. Polymorphisms within the prolactin and growth hormone/insulin-like growth factor-1 functional pathways associated with fertility traits in Holstein cows raised in a hot-humid climate. 50(8), 1913–1920, https://doi.org/10.1007/s11250-018-1645-0

Luna-Nevarez, P., Rincon, G., Medrano, J.F., Riley, D.G., Chace, C. Jr., Coleman, S.W., DeAtley, K.L., Islas-Trejo, A., Silver, G.A., Thomas, M.G. 2012. Identificación de un polimorfismo del gen PAPP-A2 asociado a la fertilidad en vaquillas Romosinuano criadas en subtropico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 3(2), 185-200.

Liu, J., Li, L., Chen, X., Lu, Y., Wang, D. 2019. Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress — A review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 32(9), 1332–1339, https://doi.org/10.5713/ajas.18.0743

Liu, Z., Ezernieks, V., Wang, J., Arachchillage, N.W., Garner, J.B., Wales, W.J., Cocks, B.G., Rochfort, S. 2017. Heat stress in dairy cattle alters lipid composition of milk. Sci. Rep., 7, 961, https://doi.org/10.1038/s41598-017-01120-9

Macciotta, N.P.P., Biffani, S., Bernabucci, U., Lacetera, N., Vitali, A., Ajmone-Marsan, P. Nardone, A. 2017. Derivation and genome-wide association study of a principal component-based measure of heat tolerance in dairy cattle. J. Dairy Sci., 100, 4683–4697, https://doi.org/10.3168/jds.2016-12249

Mader, T.L., Davis, M.S., Brown-Brandl, T. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle1,2. Journal of Animal Science, 84(3), 712–719, https://doi.org/10.2527/2006.843712x

Mariasegaram, M., Chase, C.C., Chaparro, J.X., Olson, T.A., Brenneman, R.A., Niedz, R.P. 2007. The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived Cattle. Animal Genetics, 38:54-59, https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01560.x

Meuwissen, T., Hayes, B., Goddard, M. 2016. Genomic selection: A paradigm shifts in animal breeding, Animal Frontiers, 6, 6-14, https://doi.org/10.2527/af.2016-0002

Misztal, I., Hayes, B.J., VanRaden, P.M. 2015. Implications of genome-wide association studies in dairy cattle breeding theory. Journal of Dairy Science, 98(5), 3361-3377, https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4504.1760

Proaño-Morales, A.B., Luna-Nevárez, G., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Zamorano-Algandar, R., Sánchez-Castro, M.A., Leyva-Corona, J.C., Luna-Nevárez, P. 2021. Marcadores genéticos asociados a un indicador de tolerancia al estrés por calor en vacas Holstein lactantes del sur de Sonora México. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 17(2): 55-62.

Sharma, A., Lee, J.D., Dang, C.G., Sudrajad, P., Kim, H.C., Yeon, S.H., Kang, H.S., Lee, S.H. 2015. Stories and Challenges of Genome Wide Association Studies in Livestock — A Review. 28(10), 1371–1379, https://doi.org/10.5713/ajas.14.0715

Sigdel, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Aguilar, I., Peñagaricano, F.

2019. Whole genome mapping reveals novel genes and pathways involved in milk production under heat stress in US Holstein cows. Front. Genet., 4, 928, https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00928

Silva, M.V.B., dos Santos, D.J.A., Boison, S.A., Utsunomiya, A.T.H., Carmo, A.S., Sonstegard, T.S., Cole, J.B., Van Tassell, C.P. 2014. The development of genomics applied to dairy breeding, Livestock Science, 166, 66-75., https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.05.017

Wang, M., Song, H.L., Zhu, X., Xing, S., Zhang, M., Zhang, H., Wang, X., Yang, Z., Ding, X., Karrow, N.A., König, S., Mao, Y. 2018. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms influence milk production traits in Chinese Holstein cows. 85(4), 407–411, https://doi.org/10.1017/s0022029918000535

Zamorano-Algandar, R., Medrano, J.F., Thomas, M.G., Enns, R.M., Speidel, S.E., Sánchez-Castro, M.A., Luna-Nevárez, G., Leyva-Corona, J.C., Luna-Nevárez, P. 2023. Genetic Markers Associated with Milk Production and Thermotolerance in Holstein Dairy Cows Managed in a Heat-Stressed Environment. Biology, 12(5), 679–679, https://doi.org/10.3390/biology12050679