

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**



**“SUSCEPTIBILIDAD AL MAL DE ALTURA EN BOVINOS
CRIOLLOS Y BROWN SWISS DETERMINADA MEDIANTE
CONSTANTES HEMATOLÓGICAS Y MARCADORES
GENÉTICOS”**

Presentada por:

GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL**




Lima – Perú

2023

Document Information

Analyzed document	TESIS DOCUMENTO SUSTENTACION GONZALO GONZALES.pdf (D162158474)
Submitted	3/26/2023 3:21:00 AM
Submitted by	Gustavo A. Gutierrez Reynoso
Submitter email	gustavogr@lamolina.edu.pe
Similarity	1%
Analysis address	gustavogr.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Britany Renata Orejuela Hurtado.pdf Document Britany Renata Orejuela Hurtado.pdf (D140786578)	 1
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS Gonzales Aparicio Gonzalo W. 11-7-22.docx Document TESIS Gonzales Aparicio Gonzalo W. 11-7-22.docx (D142098027) Submitted by: gustavogr@lamolina.edu.pe Receiver: gustavogr.unalm@analysis.arkund.com	 2
W	URL: https://www.nature.com/articles/s41437-018-0173-z Fetched: 10/20/2019 3:40:03 PM	 1
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6805228/ Fetched: 12/17/2019 11:46:11 PM	 2
W	URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172021000500009&script=sci_arttext&tlng=en Fetched: 7/14/2022 11:07:10 PM	 3

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL "SUSCEPTIBILIDAD AL MAL DE ALTURA EN BOVINOS CRIOLLOS Y BROWN SWISS DETERMINADA MEDIANTE CONSTANTES HEMATOLÓGICAS Y MARCADORES GENÉTICOS" Presentada por: GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL Lima – Perú 2022

DEDICATORIA A Dios A mi hijo Víctor Leonardo A mis padres A mis hermanos A mi familia A todas las personas a las que pude conocer en este tiempo, que me ofrecieron su apoyo y brindaron su amistad y cariño.

AGRADECIMIENTOS Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el financiamiento de mis estudios de Doctorado en Ciencia Animal. A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el financiamiento de la investigación. Al programa de investigación y proyección social en Mejoramiento Animal – UNALM, por brindarme las facilidades para el desarrollo de mis actividades académicas y financiar la tesis Al instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM) – UNALM, por permitirme usar sus instalaciones y quipos para la ejecución de la tesis. Al Vicerrectorado de Investigación de la UNALM por el uso del Servidor HPC Bioinformática - UNALM. A

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL

**“SUSCEPTIBILIDAD AL MAL DE ALTURA EN BOVINOS
CRIOLLOS Y BROWN SWISS DETERMINADA MEDIANTE
CONSTANTES HEMATOLÓGICAS Y MARCADORES
GENÉTICOS”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

Doctoris Philosophiae

Presentada por:

GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. José Alberto Barrón López
PRESIDENTE

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
ASESOR

Ph. D. Federico Ponce de León Bravo
CO-ASESOR

Ph.D. Denise Chauca Francia
MIEMBRO

Ph.D. Juan Chávez Cossio
MIEMBRO

Dra. Marcia Marisol Paredes Peralta
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A Dios

A mi hijo Víctor Leonardo

A mis padres

A mis hermanos

A mi familia

A todas las personas a las que pude conocer en este tiempo, que me ofrecieron su apoyo y brindaron su amistad y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el financiamiento de mis estudios de Doctorado en Ciencia Animal.

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el financiamiento de la investigación.

Al programa de investigación y proyección social en Mejoramiento Animal – UNALM, por brindarme las facilidades para el desarrollo de mis actividades académicas y financiar la tesis

Al instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM) – UNALM, por permitirme usar sus instalaciones y quipos para la ejecución de la tesis.

Al Vicerrectorado de Investigación de la UNALM por el uso del Servidor HPC Bioinformática -UNALM.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco por el facilitarme el empleo de sus instalaciones para la obtención y procesamiento de las muestras biológicas para esta tesis.

A mis asesores Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso y Ph.D. F. Abel Ponce de León Bravo, por su apoyo y constante guía durante esta etapa de mi vida profesional.

A mis profesores de Doctorado en Ciencia Animal, por brindarme sus conocimientos.

A mis compañeros de estudio e investigación de la UNALM, por su ayuda constante y su amistad.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	EL GANADO BOVINO Y SU CRIANZA EN LA SIERRA DE PERÚ.....	3
2.2.	RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL BOVINO CRIADO EN CONDICIONES DE HIPOXIA AMBIENTAL.....	6
2.2.1.	Ambientes de gran altitud y mal de altura	6
2.2.2.	Estrategias de adaptación y aclimatación a ambientes de gran altitud	9
2.2.3.	Características hematológicas por efecto de la altitud	11
2.3.	GENES ASOCIADOS A LA RESPUESTA FISIOLÓGICA EN CONDICIONES DE HIPOXIA.....	13
2.4.	EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ANTE ESTIMULO HIPÓXICO....	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.	LUGAR DE COLECCIÓN DE MUESTRAS	17
3.2.	LUGAR DE ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	17
3.3.	ANIMALES EVALUADOS.....	18
3.4.	COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y MEDICIÓN DE CONSTANTES HEMATOLÓGICAS.....	19
3.4.1.	Colecta de sangre	19

3.4.2. Evaluación de constantes hematológicas	20
3.5. EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS GENÓMICO	21
3.5.1. Extracción de ADN	21
3.5.2. Identificación de regiones exónicas en genes inducibles por hipoxia.....	22
3.5.3. Identificación de PNSs en las muestras de ADN colectadas	22
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3.6.1. Constantes hematológicas	24
3.6.2. Polimorfismos de nucleótido simple y desequilibrio de ligamiento.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. CONSTANTES HEMATOLÓGICAS EN LOS GRUPOS DE BOVINOS	26
4.1. CORRELACIÓN ENTRE CONSTANTES HEMATOLÓGICAS	30
4.2. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES EXÓNICAS EN DIEZ GENES INDUCIBLES POR HIPOXIA	34
4.3. IDENTIFICACIÓN DE PNSs EN ADN DE BOVINOS CRIOLLOS Y BROWN SWISS	39
V. CONCLUSIONES	45
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Poblaciones de bovinos criollos y Brown Swiss distribuidas en regiones ganaderas del Perú.	4
Tabla 2: Diferenciación de grupos bovinos por el grado de concentración de Hb.....	18
Tabla 3: Cebadores diseñados para amplificar las muestras de ADN bovino.....	23
Tabla 4: Valores hematológicos hallados en los grupos de bovinos evaluados.....	29
Tabla 5: Valores hematológicos de Brown Swiss con mal de altura y deciles superiores de Brown Swiss y criollos criados en zonas altas.....	30
Tabla 6: Correlaciones entre las constantes hematológicas halladas en los grupos bovinos.....	33
Tabla 7: Comparación entre las correlaciones de hemoglobina y hematocrito en los diferentes grupos de bovinos.....	34
Tabla 8: PNSs que generan mutaciones no sinónimas en diez genes inducibles por hipoxia en 41 genomas bovinos.....	35
Tabla 9: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs en genomas de bovinos.....	38
Tabla 10: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs no sinónimos observados en bovinos criados en los Andes.....	41
Tabla 11: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs por nivel de hemoglobina en grupos evaluados.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto de la hipoxia en la circulación sistémica y pulmonar	7
Figura 2: Ubicación geográfica de los bovinos elegidos para el análisis hematológico	19
Figura 3: Bloques de ligamiento identificados en el estudio empleando 17 PNSs de genes inducibles por hipoxia	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ubicación geográfica de zonas de colecta de muestras de sangre de bovinos.	61
Anexo 2: Altitud, temperatura y precipitación pluvial en las zonas de colecta de muestras de sangre de bovinos.	63
Anexo 3: Gráfico de correlaciones entre constantes hematológicas de muestras evaluadas	64
Anexo 4: Genotipos observados en el gen <i>EPASI</i> exón 7 (chr 11: C28809802>G) con el electroferograma	65
Anexo 5: Códigos de referencia de los genomas bovinos empleados para el estudio bioinformático	66
Anexo 6: Códigos de referencia de genes, ARNm y proteínas empleadas para el análisis bioinformático	67
Anexo 7: Polimorfismos de nucleótido simple identificados en regiones exónicas de 10 genes inducibles por hipoxia usando 41 genomas bovinos de cinco razas diferentes..	68

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amplicón	Fragmento de ADN amplificado por PCR
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSMA	Brown Swiss con mal de altura
BSZA	Brown Swiss de zonas altas
BSZB	Brown Swiss de zonas bajas
BSZAVE	Brown Swiss de zonas altas con valores hematológicos extremos
BWA	Alineador Burrows-Wheeler
CRIZA	Bovino criollo de zona alta
CRIZAVE	Criollos de zonas altas con valores hematológicos extremos
<i>EDN1</i>	Gen Endotelina 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico endotelial
<i>EPAS1</i>	Gen de proteína del dominio endotelial PAS 1; conocido como HIF-2 α
EPO	Eritropoyetina
ERO	Especie reactiva de oxígeno
GSEA	Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (Gene Set Enrichment Analysis)
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (Genome-wide association study)
Haplotipo	Combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos
Hb	Hemoglobina
HIF-1 α	Factor inducible por Hipoxia 1 α
Ht	Hematocrito
CHCM	Hemoglobina corpuscular media
LD	Desequilibrio de ligamiento
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
<i>NOS2</i>	Gen Óxido nítrico sintasa tipo 2
ON	Óxido nítrico
PASMC	Célula muscular arterial pulmonar
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PNS	Polimorfismo de nucleótido simple (Single nucleotide polymorphism SNP)
RCF	Fuerza centrífuga relativa (fuerza g)
RGB	Recuento de glóbulos blancos
RGR	Recuento de glóbulos rojos
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa a tiempo real
RVPH	Respuesta vascular pulmonar hipóxica
SNS	Sistema nervioso simpático
SRA	Archivo de lectura de secuencia (Sequence Read Archive)
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena simple (single strand conformation polymorphism)

T:E	Solución tampón formada por TRIS y EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
URV	Umbral de reclutamiento ventilatorio
VCM	Volumen corpuscular medio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WES	Secuenciación del exoma completo (Whole exome sequencing)

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo principal, analizar la susceptibilidad al mal de altura en bovinos criollos y Brown Swiss criados en condiciones de hipoxia por altitud en la sierra de Perú, mediante sus constantes hematológicas y marcadores genéticos, para ello se estudiaron y compararon las constantes hematológicas de bovinos criollos (CRIZA) y bovinos Brown Swiss (BSZA), criados en los Andes de Perú entre 3,213 y 4,309 msnm, con bovinos con mal de altura (BSMA) y con Brown Swiss criados a baja altitud, entre 243 y 1,306 msnm (BSZB). Encontrándose una correlación de 0.92 entre hemoglobina (Hb) y hematocrito (Ht). Además, se observó que los valores de Ht, recuento de glóbulos rojos (RGR) y recuento de glóbulos blancos (RGB), entre el decil superior de los grupos de BSZA y CRIZA, fueron inferiores a los observados en bovinos BSMA ($p < 0.01$). Luego, en base a los resultados de Hb, se identificaron 60 bovinos que fueron agrupados en Brown Swiss con Hb alta (BSHbA) ($n=13$), Brown Swiss con Hb baja (BSHbB) ($n=11$), criollos con Hb alta (CRHbA) ($n=13$), criollos con Hb baja (CRHbB) ($n=12$), además de los bovinos BSMA ($n=11$). Con base en el análisis de secuencias de 41 genomas bovinos de cinco razas, disponibles en Sequence Read Archive (SRA) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), identificamos SNP y desarrollamos cebadores de PCR para las secuencias exónicas de los genes *EPAS*, *NOS*, *VEGFA* y *EPO*. Después de extraer el ADN de los animales muestreados, las regiones exónicas de estos genes fueron amplificadas y secuenciadas por la metodología de Sanger. Se identificaron diez polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en estas regiones exónicas. Sin embargo, no se encontraron asociaciones específicas entre los PNSs y grupos de animales considerados. Únicamente un PNS ubicado en la posición intrónica Cr.19: 19403681T>C del gen *NOS2* tuvo frecuencia diferente entre los bovinos criollos y los Brown Swiss ($P < 0.05$), además dicho PNS se encontró ligado a otros dos ubicados en el exón 12 del mismo gen.

Palabras clave: Hemograma, hipoxia por altitud, mal de altura, SNP.

ABSTRACT

The main objective of the research was to analyze the susceptibility to altitude sickness in Creole and Brown Swiss cattle raised in hypoxic conditions due to altitude in the highlands of Peru, through their hematological constants and genetic markers, for which the hematological constants of Creole cattle (CRIZA) and Brown Swiss cattle (BSZA) raised in the Andes of Peru between 3,213 and 4,309 masl were studied and compared to cattle with brisket disease (BSMA) and to Brown Swiss raised at low altitude, between 243 and 1,306 masl (BSZB). A correlation of 0.92 between hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) was observed. In addition, it was observed that the values of Ht, red blood cell count (RGR) and white blood cell count (RGB), among the upper decile of the BSZA and CRIZA groups, were lower than those observed in BSMA cattle ($p < 0.01$). Then, based on the Hb results, 60 cattle were identified and grouped into Brown Swiss with high Hb (BSHbA) ($n=13$), Brown Swiss with low Hb (BSHbB) ($n=11$), creoles with high Hb (CRHbA) ($n=13$), creoles with low Hb (CRHbB) ($n=12$), in addition to BSMA cattle ($n=11$). Based on the sequence analysis of 41 bovine genomes from five breeds, available from the Sequence Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), we identified SNPs and developed PCR primers for the exonic sequences of the *EPAS*, *NOS*, *VEGFA* and *EPO* genes. After extracting the DNA from the sampled animals, the exonic regions of these genes were amplified and sequenced by the Sanger methodology. Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in these exonic regions. However, no specific associations were found between the SNPs and the groups of animals studied. Only one SNP located in the intronic position Cr.19: 19403681T>C of the *NOS2* gene showed a different frequency between Creole cattle and Brown Swiss ($P < 0.05$), in addition, said SNP was found linked to two other located in exon 12 of the same gene.

Keywords: Complete blood count, high altitude hypoxia, brisket disease, SNP.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la mayor población de ganado bovino se encuentra en la sierra, región geográfica que comprende zonas muy variadas con altitudes sobre el nivel del mar, que van desde los 500 a 6,768 msnm, conformando quebradas, valles, mesetas altiplánicas y montañas (Pulgar-Vidal 1987). Una de las características de este ambiente es la reducción de la presión parcial de oxígeno a medida que se incrementa la altitud. Parte significativa de esta población corresponde al grupo conformado por bovinos criollos y Brown Swiss, representando el 64 por ciento de la población nacional (CENAGRO 2012). La presencia preponderante de la población criolla y mestiza es resultado del proceso de adaptación al que fueron sometidos por cerca 500 años de presencia en este ambiente (Quispe 2016). Estos son animales muy rústicos, pero de baja capacidad productiva. Debido a ello se ha venido introduciendo animales especializados en producción lechera.

La raza Brown Swiss presenta mejores características productivas para mejorar los niveles de producción lechera, representa el 17 por ciento de la población nacional actual y tiene mayor presencia la sierra sur de Perú (CENAGRO 2012). Sin embargo, estos bovinos no están exentos de sufrir mal de altura; ello se debe a que en general el bovino como especie presenta una alta respuesta vasoconstrictora pulmonar, expresando valores presión arterial pulmonar (PAP) de entre 28 y 35 mm Hg, cuando se hallan a altitudes moderadas (<1600 msnm) y expresando valores más altos en condiciones de altitud superior a 2,300 msnm (Will *et al.* 1975; Zimprich *et al.* 2020), ello suele conducir a la manifestación del llamado “mal de altura” (Holt y Callan 2007).

Respecto de la crianza de bovinos en tierras altas, se ha reportado que estos desarrollan hipertensión arterial pulmonar al estar expuestos a altitudes por encima de 2,500 msnm, y cuando el valor de la PAP excede los 50 mm Hg presentan el síndrome denominado mal de altura (Holt y Callan 2007). Este síndrome se caracteriza por una marcada hipertensión arterial pulmonar e insuficiencia cardiaca derecha que los puede llevar a la muerte. Además del incremento de la PAP se ha observado el incremento de ciertas constantes hematológicas como la hemoglobina (Hb) y el recuento de glóbulos rojos (RGR) en bovinos criados en ambientes

de gran altitud sobre el nivel del mar (Claxton y Ortiz 1996; Ocampo *et al.* 2011; Wuletaw *et al.* 2011)

La policitemia o incremento de glóbulos rojos, es considerada un mecanismo compensatorio para mejorar el aporte de oxígeno a los tejidos (Ocampo 2004). Esta es una característica resaltante en el proceso de aclimatación de humanos que radican en ambientes de gran altitud (Heinicke *et al.* 2003; Jefferson *et al.* 2002; Monge y León-Velarde 1991). La alta concentración de glóbulos rojos y el elevado valor de hematocrito (Ht) han sido asociados con el incremento de la presión arterial, con los subsecuentes problemas cardiovasculares (Vogel *et al.* 2003). Por otro lado, valores de hemoglobina (Hb), por encima de 21 g/dL, indicarían el padecimiento de mal de altura crónico en humanos que radican en grandes altitudes (Arregui *et al.* 1990).

En los bovinos, bajo condiciones de hipoxia crónica, se manifiesta la respuesta vascular pulmonar hipóxica, resultado de la expresión de diferentes genes ante este tipo de estímulo (Newman *et al.* 2011). Dichos factores provocan la modificación del tejido vascular pulmonar, mediante la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA), óxido nítrico sintetasa tipo 2 (NOS2) (Palmer *et al.* 1998), factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) (Semenza *et al.* 2005; Dolt *et al.* 2007; Newman *et al.* 2015).

También se han observado variaciones en el grado de lesiones del epitelio vascular pulmonar y la formación de edema pulmonar, en este proceso tiene participación el factor de crecimiento de queratinocitos tipo 7 (FGF-7) (Gorkhali *et al.* 2016) y otros. Por otro lado, se reportó que varios genes inducibles por hipoxia, eran sobre-expresados o sub-expresados diferencialmente entre grupos de bovinos aclimatados y no aclimatados a ambientes de gran altitud (Verma *et al.* 2018).

Considerando los puntos antes mencionados, el objetivo general del estudio fue analizar la susceptibilidad al mal de altura en bovinos criollos y Brown Swiss criados en condiciones de hipoxia por altitud en la sierra de Perú, mediante sus constantes hematológicas y marcadores genéticos. Siendo los objetivos específicos: a) evaluar sus características hematológicas y b) Poder identificar polimorfismos de nucleótidos simples en sus genes *EPAS*, *NOS*, *VEGFA* y *EPO*, relacionados con respuestas hematológicas extremas expresadas en condiciones de hipoxia por altitud.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL GANADO BOVINO Y SU CRIANZA EN LA SIERRA DE PERÚ

La actividad productiva de ganado bovino en el Perú tiene gran importancia, esta representa un valor bruto de la producción agropecuaria, que está en torno al 9.8 por ciento, siendo la producción de leche el 5 por ciento y la producción de carne el 4.8 por ciento (León 2018). Al respecto se ha observado un incremento sostenido en la producción de leche, pasando de 1.05 a 1.90 millones de TM de leche/año, en el periodo 2002-2015 (MINAGRI 2017). También se tiene información de que en el periodo 2007-2017, el número de bovinos lecheros se incrementó de 757,189 a 889,114 vacas, así como también hubo un incremento de la productividad promedio por vacas, misma que varió de 1.93 a 2.26 L en dicho periodo (León 2018).

Sobre la producción la producción de carne, aunque se ha evidenciado un incremento de la producción nacional, que paso de 163,235 a 188,680 TM en el periodo 2007-2017, esta se debió sobre todo al incremento de la saca anual, más que al incremento en el rendimiento cárnico/animal, el cual varió entre 143.4 a 141.8 kg de carcasa/animal (León 2018), esta carne proviene centros productores que poseen grandes poblaciones de ganado bovino en Perú.

Las poblaciones de bovinos predominantes en el Perú están conformadas por criollos y animales de la raza Brown Swiss (CENAGRO 2012). Respecto a los bovinos criollos, estos son animales rústicos descendientes de bovinos del sur de España, los cuales pudieron adaptarse a las condiciones ambientales alto andinas por encima de los 3,800 msnm (Quispe 2016). En cuanto al origen de este tipo de bovino, al parecer, fue el resultado del apareamiento de razas españolas de las zonas geográficas de Andalucía, Huelva y Cádiz, de donde vienen animales denominados genéricamente como: Retinta, Berrenda en colorado, Rubio gallego y la Palmera de Canarias, además el bovino de lidia (Primo 1992; Beteta 2007). Estas razas introducidas formadas por el proceso de cruzamiento y selección natural en diferentes ambientes geográficos, dieron origen a las poblaciones criollas.

Según el último censo agropecuario nacional, la población de bovinos criollos en Perú está conformada por 3'276,799 animales (Tabla 1), representando el 64 por ciento de la población

bovina nacional; estos animales están distribuidos de forma mayoritaria en las regiones de Cajamarca, Puno, Ayacucho, Apurímac Cusco y Ancash, que en conjunto suman 1'944,303 cabezas, representando el 59.3 por ciento de dicha población (CENAGRO 2012). Las características geográficas de las regiones antes mencionadas, comprenden un rango de altitud en sus capitales que varía entre los 2,719 y 3,810 msnm (Garayar 2003).

Tabla 1: Poblaciones de bovinos criollos y Brown Swiss distribuidas en regiones ganaderas del Perú

Región	Bovinos Total		Criollos		Brown Swiss	
	N°	Porcentaje	N°	Porcentaje	N°	Porcentaje
Puno	617,163	12.0	391,704.0	11.95	210,244.0	23.24
Cusco	407,267	7.90	251,549	7.68	126,986	14.04
Cajamarca	724,478	14.05	497,119	15.17	93,571	10.34
Ayacucho	414,066	8.03	330,386	10.08	52,450	5.80
Apurímac	298,214	5.78	262,120	8.00	18,218	2.01
Ancash	275,292	5.34	211,425	6.45	26,075	2.88
San Martín	228,826	4.44	69,718	2.13	61,329	6.78
Amazonas	157,166	3.05	51,567	1.57	60,792	6.72
Junín	194,230	3.77	110,470	3.37	55,886	6.18
Otras regiones	2'826,914	54.83	1,100,741	33.59	199,058	22.00
Total	5'156,044	100.00	3,276,799	100.00	904,609	100.00

Fuente: Adaptado de INEI-CENAGRO (2012)

En las condiciones de la sierra, en especial de zonas altoandinas, las razas bovinas especializadas sean en producción de leche o carne, no prosperan fácilmente por causa de diversos factores, destacándose entre otras, la condición de baja presión parcial de oxígeno o hipoxia ambiental propia de las zonas de gran altitud sobre el nivel del mar. Además de ello, en general el estado de salud de estos animales tiende a deteriorarse con la estacionalidad y la precariedad de los recursos alimenticios, factores que reducen su capacidad productiva (Leiber *et al.* 2005). Entre ellos se observa una mayor secreción de cortisol de bovinos criados en zonas geográficas altas (Kreuzer *et al.* 1998) y una menor actividad metabólica ruminal (Qiao *et al.* 2013); sin embargo, en las condiciones altoandinas, el bovino criollo prospera destacándose por su rusticidad.

Un aspecto negativo de las poblaciones de ganado bovino criollo es su baja capacidad productiva. Estos animales producen 397.2 ± 143.8 kg de leche/campaña de lactación de 210.8 ± 33.0 días; lo que implica un promedio de 1.89 ± 0.46 kg de leche/día. En lo referido a sus parámetros reproductivos se tiene información de que los bovinos criollos tienen su primer servicio a los 27.5 meses y su primer parto está en torno a los 37.5 meses de edad, con un intervalo entre partos de 14 a 16 meses. Además, el peso al nacimiento de sus terneros es de 25.8 ± 3.3 kg, el peso logrado al año está en torno a 112.6 ± 19.3 kg, ello implica una ganancia de peso en 360 días que se sitúa en 87.0 ± 20.4 kg de peso vivo (Quispe *et al.* 2014).

La condición de baja productividad del bovino criollo, fomentó un proceso de incorporación de razas especializadas como el Holstein que en el año 1994 era de 214,576 animales (CENAGRO 1994) y en 2012 su número aumentó a 527,533 animales (CENAGRO 2012), representando un incremento del 145.8 por ciento, entre ambos censos nacionales. A pesar del gran incremento logrado a lo largo de estos años, el tamaño de esta población no llega a representar más del 10.2 por ciento del total nacional y su distribución en la sierra de Perú es bastante limitada.

Otra raza que ha venido siendo introducida, sea por cruzamientos absorbentes sobre la base del criollo o por medio de incorporación de animales de pedigrí en costa, sierra y selva, es el bovino de la raza Brown Swiss, el cual es considerado un animal más adaptable a la altura que el Holstein (Ayón y Cueva 1998), aunque de menor capacidad productiva para leche que este. En 1994, su población estaba conformada por 235,239 animales (CENAGRO 1994); en 2012 esta cifra subió hasta los 904,069 animales, incrementándose en un 284.3 por ciento en el periodo comprendido entre ambos censos. Respecto a su distribución en el ámbito geográfico nacional, esta no es homogénea, teniéndose un mayor porcentaje de la misma ubicada en zonas geográficas de sierra, como se aprecia en la Tabla 1. De ellas las regiones de Puno, Cusco y Cajamarca tienen una cantidad de animales que representan el 47.7 por ciento de este grupo racial. Estas regiones se caracterizan por tener praderas altoandinas que son aprovechadas para la actividad ganadera.

Cabe mencionar que, en condiciones altoandinas de Puno, el bovino Brown Swiss, tiene rendimientos productivos de leche que están en un rango de entre 2,912.0 y 3,551.8 kg/campaña, con promedios diarios de 8.3 y 11.2 kg (Quispe *et al.* 2016). Dichos resultados, sin embargo, son algo menores a los reportados por otras cuencas de la sierra ubicadas a menor altitud donde se tuvo un rendimiento de 3,762 kg/campaña o de 12.35 kg/día (Bueno 2018).

La edad al primer parto en bovinos Brown Swiss criados en la sierra es de 35.8 meses (Catari 2018), mayor a la reportada para bovinos lecheros Holstein criados en la costa peruana, misma que se encuentra en torno a los 27.2 meses como promedio (Ortiz *et al.* 2009). Evidenciando el efecto que tiene el ambiente sobre esta característica, pero no así en otras características, como los pesos al nacimiento de los terneros de dicha raza que nacieron en regiones altoandinas, los cuales tuvieron pesos que se encontraron entre 42.2 y 51.0 kg (Quispe *et al.* 2016), los mismos no variaron respecto de pesos los obtenidos en zonas más bajas de la sierra como en Cajamarca, donde las crías nacieron con un promedio de 41.9 kg (Bueno 2018).

2.2. RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL BOVINO CRIADO EN CONDICIONES DE HIPOXIA AMBIENTAL

El ambiente de la sierra peruana se caracteriza por poseer grandes variaciones de altitud sobre el nivel del mar; a medida que se incrementa esa altitud se va reduciendo la presión parcial de oxígeno. Además, ocurren mayores variaciones de temperatura durante el día y se acentúan las condiciones generales de frío y de mayor incidencia de radiación ultravioleta (UV).

2.2.1. Ambientes de gran altitud y mal de altura

La exposición a condiciones de altitud implica la exposición a dos factores relevantes en manifestación del mal de altura, el primero es la baja presión parcial de oxígeno y el segundo contempla los amplios rangos de variación térmica ambiental. La exposición crónica a bajas presiones parciales de oxígeno y la exposición sea aguda o crónica a condiciones de frío; ejercen efectos en los animales, entre ellos se destacan, la hipertensión arterial pulmonar y la hipertrofia ventricular derecha, expresados en bovinos y no así en otras especies animales (Rhodes 2005).

En lo que respecta al frío, se ha demostrado que ovinos sometidos a dichas condiciones han sufrido un incremento en los valores de la presión arterial pulmonar (PAP) pasando de 17.9 a 22.8 mm Hg, cuando las condiciones de temperatura descendieron de 25°C a 3°C, ambos en ambientes hipóxicos. Destacando además que los valores de PAP expresados por estos animales tuvieron un valor promedio de 14.1 mm Hg en condiciones normóxicas y de temperatura de 25°C (Chauca y Bligh 1976). Por otro lado, ratas expuestas de forma crónica al frío, mostraron un incremento en la presión sanguínea así como un incremento en el tamaño del corazón de 290 mg/100 g de peso vivo en condiciones de calor a 348 mg/100 g de peso vivo en condiciones de frío (Fregly *et al.* 1989) teniéndose un aumento sostenido en la actividad de su sistema nervioso simpático (SNS) mediada por el incremento en la secreción de norepinefrina y por

epinefrina en etapas iniciales de dicha exposición (Papanek *et al.* 1991), ello sugiere una falla del sistema barorreceptor para proporcionar suficiente retroalimentación negativa al sistema nervioso central.

En la Figura 1, se muestra como la hipoxia aguda y otros factores tienen efecto sobre la hipertensión arterial pulmonar, en el mismo se ve la participación de los quimiorreceptores periféricos y el efecto del frío sobre el SNS y como este modula la respuesta del corazón.

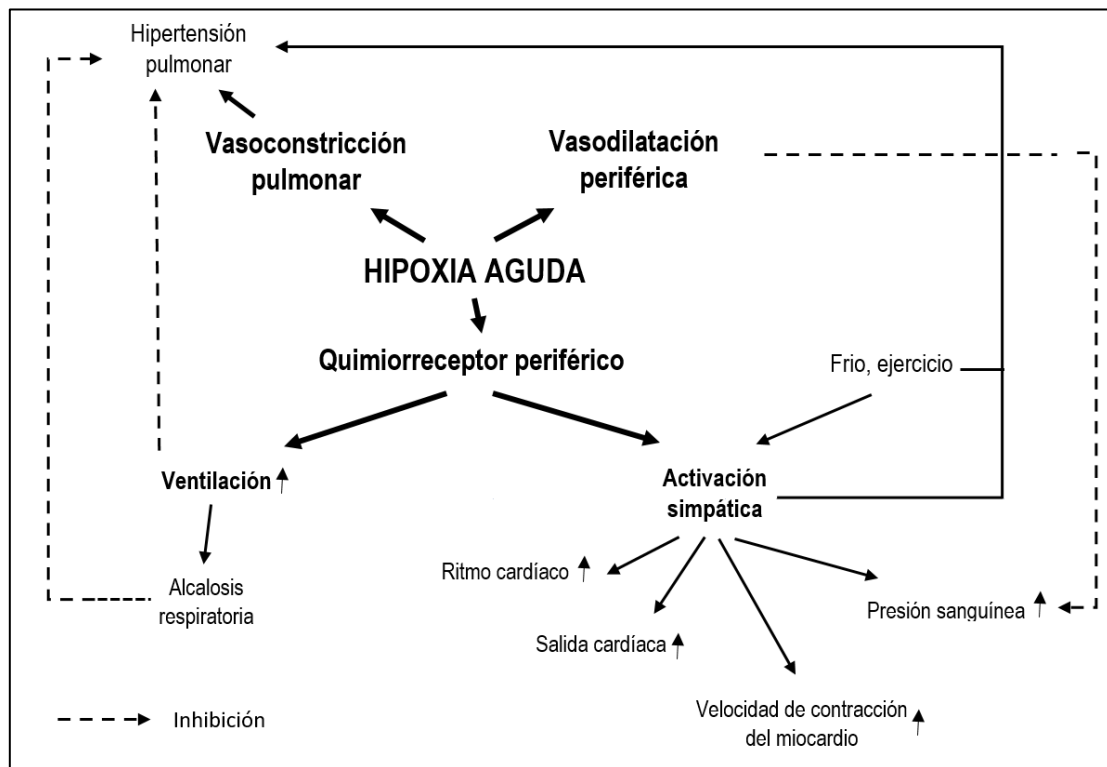


Figura 1: Efecto de la hipoxia en la circulación sistémica y pulmonar

Fuente: Adaptado de Bärtsh y Gibbs (2007)

La exposición crónica a condiciones de hipoxia ambiental ocasiona en los animales cambios en la estructura física e histológica del tejido pulmonar, vasos sanguíneos y músculo cardíaco, entre estos se pueden destacar la vasoconstricción y remodelación de vascular de las arteriolas pulmonares en bovinos (Durmowicz *et al.* 1993), policitemia en humanos y bovinos (Claxton y Ortiz 1996; León-Velarde *et al.* 2000; Wuletaw *et al.* 2011; Ocampo 2011), hipertrofia y dilatación del ventrículo derecho, congestión pulmonar, edema y fibrosis capsular hepática en aves (Wilson *et al.* 1988). La hipertrofia y posterior dilatación del ventrículo derecho, así como el edema, son manifestaciones características de los animales que padecen del síndrome del mal de altura.

La etiología del mal altura, comprende el desarrollo de una hipertensión arterial pulmonar, aunque ello no es común en todas las especies, por ejemplo, los ovinos presentan una PAP de 23 ± 4 mm Hg luego de una exposición de seis semanas a una altitud de 3,870 msnm, siendo similar al valor presentado por estos animales cuando fueron mantenidos a una altitud de 1,580 msnm (Reeves *et al.* 1963).

En las especies que presentan hipertensión arterial pulmonar, como en el caso de bovino, esta se da como resultado del estrechamiento del lumen de las arterias pulmonares, debido a la vasoconstricción, hipertrofia e hiperplasia de las células musculares lisas y el tejido endotelial de las arteriolas pulmonares (Durmowicz *et al.* 1993; Ke *et al.* 2017) y se caracteriza por un incremento de la resistencia vascular pulmonar que dificulta la expulsión de sangre por parte del ventrículo derecho. Ante esta dificultad, se produce la hipertrofia del ventrículo derecho, lo que ocasiona la elevación de la PAP en el intento de vencer la resistencia al flujo sanguíneo, ocasionando la aparición lesiones en los vasos sanguíneos (Ke *et al.* 2017) y coadyuvan a la formación de edema pulmonar.

La condición persistente de hipertrofia y resistencia al flujo sanguíneo, deriva en la dilatación del ventrículo derecho, y como consecuencia de ello se produce una insuficiencia cardiaca congestiva que resulta en la muerte del animal. En tal sentido se conoce que en bovinos oriundos de zonas altas y en su progenie, la manifestación del mal de altura tiene una incidencia del 2 por ciento, y este valor puede llegar a 40 o 50 por ciento en bovinos recién llevados a ambientes de gran altitud (Durmowicz *et al.* 1993).

La especie bovina posiblemente es una de las más sensibles a la hipertensión pulmonar, siendo empleado como animal modelo para el estudio del mal de altura (Rhodes 2005). Ello se debe a que el bovino presenta alta respuesta vascular pulmonar hipóxica (RVPH), usualmente este animal tiene una PAP de entre 27 y 29 mm Hg cuando está a nivel del mar mientras que el humano a esa misma altitud, registra una PAP de 14 mm Hg (Newman *et al.* 2015). Además, cuando el bovino está habituado a residir en una altitud mayor a 2,130 msnm, la PAP se sitúa entre 31 y 41 mm Hg, lo cual se considera normal; sin embargo, cuando este valor sube por encima de 49 mm Hg, tiene un alto riesgo de padecer del mal de altura (Holt y Callan 2007).

En estudios realizados con bovinos Angus criados en zonas altas de los Estados Unidos, se observó una incidencia de hasta el 50 por ciento de mal de altura en individuos que expresaron

valores de presión arterial pulmonar (PAP) mayores 50 mm Hg, luego de ser movilizados hacia tierras altas ubicadas por encima de 2,130 msnm. (Holt y Callan 2007, Newman *et al.* 2015).

El efecto de altitud sobre la elevación de la PAP se debe a los cambios en la concentración de O₂, este representa un estímulo fisiológico principal que puede provocar respuestas agudas y crónicas en el organismo, observándose principalmente vasoconstricción de las arteriolas pulmonares e incremento del grosor del tejido endotelial vascular pulmonar e hipertrofia del tejido muscular de dichos vasos (Durmowicz *et al.* 1993).

La vasoconstricción de las arteriolas pulmonares es el resultado de la alta sensibilidad al oxígeno por parte de las células del músculo liso arterial pulmonar (PASMC), mientras que el óxido nítrico (ON) modula la respuesta vascular pulmonar hipóxica (RVPH) (Sommer *et al.* 2016; Bärtisch *et al.* 2005). Además, las especies reactivas de oxígeno (ERO) originadas en las mitocondrias y por acción de las enzimas NADPH oxidasas, estimulan la liberación de iones Ca⁺, de manera que pueden inducir contracción de las PASMC (Sommer *et al.* 2016).

Para evaluar el grado de vasoconstricción en bovinos se compararon vasos pulmonares de bovinos Hereford con mal de altura que tenían diámetros de entre 100 a 300 µm con vasos pulmonares de yaks (*Bos grunniens*), en los primeros se observó un incremento de dos capas de músculo liso, además de una mayor deposición de elastina y la presencia de más capas de tejido adventicio en comparación con los vasos arteriales de yaks. Otra diferencia observada fue que las células endoteliales de las arteriolas pulmonares de yaks eran más largas, anchas y redondeadas (Durmowicz *et al.* 1993).

2.2.2. Estrategias de adaptación y aclimatación a ambientes de gran altitud

Las condiciones ambientales sobre 2,300 msnm de altitud tienen distintos efectos sobre los animales que radican en dicho entorno. Por ejemplo, en los bovinos denominados “amarillos” de la meseta del Tibet, se observó un incremento de la producción de calor en ayunas, causado por la exposición a ambientes de gran altitud, baja temperatura, incremento en la velocidad del viento, y exposición a la radiación solar (Han *et al.* 2003). Además, en humanos se han observado adaptaciones fisiológicas en el metabolismo de glúcidos y la oxidación de ácidos grasos, basadas en la modificación de genes como el *EPAS1* y el *PPARA* (O’Brien *et al.* 2020).

En los Andes también se manifiestan condiciones ambientales similares a las del Tibet, ello posibilita que se generen estrategias de aclimatación y adaptación por parte de los animales que viven en este entorno ambiental.

Algunas estrategias de adaptación a la altura, consisten en la reducción de la actividad metabólica tal como es observada en llamas (Riek *et al.* 2019), presencia de doble pelaje en camélidos silvestres y vellón fino en camélidos domésticos, así como la existencia de ventanas térmicas para poder controlar la pérdida de calor corporal producto de la exposición al frío de los Andes (Gerken 2010; Fowler 1994).

Los camélidos andinos, además, tienen hemoglobina (Hb) con alta afinidad al O₂ (Piccinini *et al.* 1990) y existen otras modificaciones en la estructura de la hemoglobina. De manera similar, como un alelo de alta afinidad al O₂, en genes de *HBI* y *HB2* que predomina en las poblaciones de ratones ciervos (*Peromyscus maniculatus*) existentes a gran altitud, se caracteriza por la sustitución de cinco sitios: 50(CD8)Pro, 57(E6)Gly, 60(E9)Ala, 64(E13)Gly y 71(E20) Gly, ubicados en el dominio EHelix de la cadena α de la Hb, respecto del alelo de baja afinidad, que predomina en poblaciones de la misma especie existentes en bajas altitudes, donde existe una combinación alternativa de aminoácidos His, Ala, Gly, Asp y Ser, respectivamente en las mismas posiciones antes indicadas (Storz y Moriyama 2008).

En algunas especies animales mecanismos de adaptación como variaciones en las características corporales y tamaños más pequeños (Yang *et al.* 2016); tal es el caso del bovino criollo, los animales de este grupo, poseen menores pesos respecto del promedio de la especie, así como un inicio de etapa reproductiva y productiva algo más tardía (Quispe *et al.* 2014). También, en el ganado Brown Swiss, se ha observado menores tasas de ganancia de peso, tasa de supervivencia y la producción leche en sus lactaciones, cuando estos son criados en condiciones altoandinas frente a condiciones de baja altitud (Quispe *et al.* 2014; Quispe 2016, Bueno 2018; Beteta 2021). En ese sentido, un reporte del efecto de la altura sobre la tasa de mortalidad en un rebaño de bovinos Brown Swiss, criados entre 3,700 y 4,500 msnm, fue de 8.7 por ciento (Valenzuela *et al.* 2017).

Otros mecanismos adaptativos corresponden al transporte de oxígeno a nivel pulmonar, en tal sentido, la respuesta ventilatoria a la hipoxia se atribuye a la actividad de quimiorreceptores periféricos carotídeos los cuales son esenciales en el proceso de aclimatación ventilatoria en cabras (Foster *et al.* 1981). Como ejemplo de ello se menciona a las variaciones en la

sensibilidad ventilatoria al CO₂ y al umbral de reclutamiento ventilatorio (URV). Estos son elementos importantes en el control de la respiración, los cuales presentaron diferencias entre habitantes de tierras altas del Himalaya frente a habitantes de tierras bajas del Cáucaso (Slessarev *et al.* 2010).

2.2.3. Características hematológicas por efecto de la altitud

Además de los cambios en las arteriolas pulmonares, la baja presión parcial de oxígeno por altitud, ejerce efecto sobre otros parámetros hematológicos. En el caso de bovinos, el efecto de la altitud causa cambios en la concentración de hemoglobina (Hb), el recuento de glóbulos rojos (RGR) y el hematocrito (Ht) (Bianca y Näf 1979).

La policitemia se caracteriza por la elevación del RGR; uno de los factores que la ocasiona, es la exposición a ambientes hipóxicos; esta elevación del RGR es considerado un mecanismo compensatorio para mejorar el aporte de oxígeno a los tejidos (Ocampo 2004). El incremento de la secreción de eritropoyetina (Claxton y Ortiz 1996) ocurre para compensar la menor disposición de O₂ en la sangre circulante (Wuletaw *et al.* 2011). Por ello se observa policitemia en el proceso de aclimatación de humanos que radican en ambientes de gran altitud (Heinicke *et al.* 2003; Jefferson *et al.* 2002; Monge y León-Velarde 1991).

La menor disposición de oxígeno en la sangre se da como resultado de la disminución del grado de saturación de oxígeno en la hemoglobina (Hb) por la disminución de la presión parcial de oxígeno en los alveolos pulmonares. Para compensar esta menor saturación, se produce una elevación en RGR, sin embargo, la elevación del Ht ha sido asociada con el incremento de la presión arterial (Barer *et al.* 1983) con los subsecuentes problemas cardiovasculares (Vogel *et al.* 2003).

Los valores de Hb en humanos residentes en zonas de gran altitud varían entre los 17 y 20 g/dL siendo algo mayores en mujeres que en varones (León-Velarde *et al.* 2000). Cuando el valor de Hb está por encima de 21 g/dL, indica el padecimiento de mal de altura crónico en humanos (Arregui *et al.* 1990). En el caso de los bovinos un estudio realizado por Campos *et al.* (2011) evidenció que los valores de Hb pueden variar de los 8 g/dL cuando se encuentran a nivel de mar, a valores de 13.8 g/dL cuando se encuentran expuestos por 30 días a altitudes de 3,320 msnm. Claxton y Ortiz (1996) reportaron valores promedios de Hb de 10.6 g/dL para bovinos Brown Swiss criados en zonas de 3,100 msnm., dicho valor fue significativamente superior al promedio de 9.0 g/dL reportado por los mismos autores en bovinos criados a 2,600 msnm. Estos

valores reportados en bovinos se encuentran dentro del rango de 9.0 a 13.7 g/dL reportado en yaks criados a 2,750 msnm (Barari *et al.* 1995), cabe precisar que estos últimos son bóvidos adaptados a vivir en condiciones de gran altitud.

Otras constantes hematológicas que suelen ser estudiadas son el recuento de glóbulos blancos (RGB) aunque los resultados muestran ligeras variaciones por efecto de la altura. En ese sentido Claxton y Ortiz (1996) reportaron valores de RGB más bajos en bovinos de montaña que en aquellos criados en los valles. También se observó que bovinos de la India criados a 3,500 msnm, mostraron valores de RGB algo menores que los referidos para bovinos en zonas de baja altitud (Kumari *et al.* 2020). En el caso de la elevación del RGB observado en bovinos de zonas geográficas altas respecto a aquellos de zonas geográficas bajas, podría ser reactiva, debido a procesos infecciosos propios de los animales (Wuletaw *et al.* 2011).

Existen otras constantes hematológicas que se muestran variación por efecto de la exposición crónica a ambientes de bajas presión parcial de oxígeno, como el Ht, volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración media de Hb corpuscular (CMHC) (Kumari *et al.* 2020; Wuletaw *et al.* 2011; Kumar y Pachauri 2000; Claxton y Ortiz 1996).

Los resultados de varios estudios hematológicos realizados en especies animales domésticas como ovinos y bovinos criados en ambientes de gran altitud permitieron evidenciar que caracteres como el Ht, recuento de glóbulos rojos (RGR) y Hb resultaron más altos que los observados en animales criados en ambientes de baja altitud (Sharma *et al.* 2015; Cuba 2014; Tibbo *et al.* 2004; Claxton y Ortiz 1996). Sin embargo, en bovinos Angus, la asociación entre el valor de Ht y el incremento de la altitud, no fue muy clara (Gulick *et al.* 2016). Además, en especies silvestres adaptadas a la altura, no se han observado incrementos en los valores de las características mencionadas, con sus símiles que habitan en ambientes de baja altitud (Monge y León-Velarde 1991).

En el caso de alpacas, se observaron valores hematológicos relativamente bajos cuando eran expuestos a ambientes de gran altitud, no obstante, se observó valores de RGR y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) relativamente altos y con rangos de variación amplios (Foster *et al.* 2009; Escalante 2017; Tallacagua y Mamani 2017). Esto es diferente a lo observado en Yaks, encontrándose en ellos, RGR más bajos y valores de CHCM altos (Barari *et al.* 1995). Por otro lado, en el caso del bovino de raza Simien criado en las tierras altas de

Etiopia, se han observado que sus valores hematológicos son más bajos que los reportados en bovinos de otras razas criados en ese tipo de ambientes (Wuletaw *et al.* 2011).

2.3. GENES ASOCIADOS A LA RESPUESTA FISIOLÓGICA EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Las variaciones en la respuesta fisiológica en los animales expuestos a condiciones de ambiente hipóxicos de gran altitud, son el resultado del genotipo del individuo, así como de la expresión génica diferencial de los diferentes animales.

Desde el punto de vista genético cuantitativo, los valores fenotipos de PAP expresados en bovinos Angus tienen una heredabilidad de 0.34 ± 0.03 , cuando estos están ubicados por encima de los 1,600 msnm (Pauling *et al.* 2018). Dicho resultado es similar a la heredabilidad de la hipertensión pulmonar de bovinos, cuyo valor fue de 0.34 ± 0.05 (Shirley *et al.* 2008).

La respuesta vascular hipóxica diferencial existente entre individuos de grupos raciales o en especies diferentes, está determinada por factores que incluyen, procesos de vasoconstricción vascular pulmonar, cambios en la estructura histológica del tejido endotelial vascular pulmonar, el engrosamiento del tejido muscular de arteriolas pulmonares y de variaciones en las características hematológicas (Barer *et al.* 1983; Durmowicz, *et al.* 1993; Wuletaw *et al.* 2011). En dichos procesos participan neurotransmisores y hormonas, entre ellos, el óxido nítrico endotelial (eNOS), la eritropoyetina (EPO), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α ; HIF-2 α), entre muchos productos bioquímicos. Estas hormonas, enzimas y otros factores bioquímicos, son el resultado de la expresión diferencial de los genes entre individuos y dentro de los órganos de los individuos; (Newman *et al.* 2011; Newman *et al.* 2015; Heaton *et al.* 2016; Verma *et al.* 2018).

Para el estudio de genes y otras regiones del ADN, se suelen emplear diversas técnicas moleculares que permiten la identificación de variantes denominadas polimorfismos y con ello poder analizar si estos polimorfismos están presentes en diferentes frecuencias dentro de las poblaciones animales que se estudien. Un ejemplo de ello es el empleo de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP), se usan para identificar regiones cromosómicas de interés en estudios de asociación con hipertensión arterial pulmonar en aves (Moncaleano 2011).

En los últimos años, el empleo de polimorfismos de nucleótido simple (PNSs), ha dado resultados en la identificación de variantes polimórficas. El uso de PNSs, generalmente implica el empleo de paneles o micro matrices de bajas y de altas densidades (Hendrickson, 2013; Newman *et al.* 2011), secuenciación de fragmentos de ADN (Moncaleano 2011) o secuenciación de genomas completos (Liu *et al.* 2019, Heaton *et al.* 2016; Das *et al.* 2015). Si además se posee una información fenotípica, se puede implementar un estudio de asociación de marcadores moleculares a lo largo del genoma (GWAS), con características fenotípicas evaluadas en una población o diferentes poblaciones animales. Para esto cada animal debe ser genotificado con la micro matriz de PNSs tal como lo realizaron Newman *et al.* (2011) o también realizando una secuenciación del exoma (WES, Whole Exome Sequencing) (Newman *et al.* 2015).

En general, es posible identificar variantes de PNSs en diferentes regiones exónicas e intrónicas de genes que están relacionados con diferentes características productivas, sanitarias y de adaptación, como el referido a la adaptación y aclimatación a ambientes de gran altitud en diferentes especies animales (Liu *et al.* 2019; Graham y McCracken 2019; Heaton *et al.* 2016, Durán *et al.* 2017; Newman *et al.* 2015; Shao *et al.* 2014; Newman *et al.* 2011).

En las investigaciones relacionadas con la adaptación a condiciones de altitud, se efectuaron estudios para identificar genes que tuvieran mayor impacto en la expresión de hipertensión arterial por efecto de la baja presión parcial de oxígeno en bovinos. Así, Newman *et al.* (2011) encontraron que en bovinos con valores de PAP mayor a 50 mm Hg, existía una gran cantidad de genes sobre expresados, entre ellos el *HLA-DQA2*, *DNER*, *SLC28A3*, *RYR* y *FCAR*; también existen genes sub expresados como el *FBNI*, *KIR3DL1*, *BOLA* y *CRIP3*, entre muchos otros como el factor de crecimiento de queratinocitos 7 (*FGF-7*) en ovinos (Gorkhali *et al.* 2016). Todos estos genes participan en diversos procesos de respuesta inmunitaria, transporte de iones a través de membrana plasmática, actividad contráctil, desarrollo celular entre otras funciones relacionados con la respuesta ante la exposición a ambientes de gran altitud (Gorkhali *et al.* 2016; Newman *et al.* 2011)

Dentro de los muchos genes que participan en la RVPH, se hace particular referencia al gen *EPASI*, el cual codifica el factor inducible por hipoxia tipo 2 α (HIF-2 α). El gen *EPASI* en la raza Angus presenta dos mutaciones no sinónimas próximas unas de la otra, en el c.1816G-A y en el c.1828G-A ambos ubicadas en el exón 12; estas variantes en el ADN producen cambios en la secuencia aminoácidos en p.A606T y p.G610S del dominio de degradación oxígeno

dependiente de la proteína HIF-2 α (Newman *et al.* 2015). Además, las variantes de *EPAS1* antes descritas, forman un haplotipo que estuvo presente en el 75 por ciento de los bovinos que mostraron PAP mayores a 50 mm Hg (Newman *et al.* 2015).

El gen *HIF-1 α* , codifica la subunidad alfa del factor de transcripción inducible de hipoxia tipo 1 (HIF-1), ha sido relacionada a la respuesta vasoconstrictora. La proteína HIF-1 es un regulador de la respuesta homeostática celular y sistémica ante condiciones de hipoxia, activando la transcripción de diversos genes, incluyendo aquellos implicados en el metabolismo energético, la angiogénesis y la apoptosis celular. También regula la expresión de otros genes cuyos productos proteicos incrementan el suministro de oxígeno o facilitan la adaptación metabólica cuando los animales están expuestos a condiciones de hipoxia (Dolt *et al.* 2007; Wang *et al.* 2014).

El gen *NOS2* codifica la enzima óxido nítrico sintetasa tipo II (NOS2) en bovinos (NCBI 2017). El NOS2 se incrementa, cuando los individuos manifiestan hipertensión arterial pulmonar por efecto de la exposición a condiciones de hipoxia crónica. Su regulación esta mediada por la participación del HIF-1, esta posibilita la síntesis de ON, el cual a su vez actúa como segundo mensajero intracelular en varios procesos celulares entre los que se incluye el remodelado vascular resultante de la proliferación y migración de células musculares lisas, así como el incremento de la matriz celular por hiperplasia e hipertrofia (Palmer *et al.* 1998).

Existen otros genes que codifican proteínas reguladoras considerados responsables del modelamiento vascular pulmonar, entre ellos se encuentran los genes *VEGF-A*, *NOS3*, *eNOS*, *EDNI*. El gen *VEGF-A* del bovino codifica el factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A), el cual pertenece a la familia de los factores de crecimiento, induce la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares y es esencial para la angiogénesis (NCBI 2017). La actividad del VEGF-A esta mediada por el gen *NOS3* mediante la producción de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) que a su vez provocará la producción de oxido nítrico ON (Zhao *et al.* 2015), se sabe que la enzima eNOS está sobre regulada por la actividad del VEGF-A promoviendo la producción de ON endotelial (Kroll y Waltenberger 1998).

El gen *EDNI* codifica una pre-proteína que se procesa proteolíticamente para generar endotelina el cual es un potente vasoconstrictor y sus receptores afines son blancos terapéuticos en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (Tenopoulou y Doulias 2020).

2.4. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ANTE ESTÍMULO HIPÓXICO

Para el estudio de la susceptibilidad a las condiciones de hipoxia ambiental, se realizaron estudios de expresión génica diferencial en el tejido de órganos como el cerebro, pulmón y bazo. En estos estudios se evaluó la concentración de ARNm del gen *HIF1α* presente en dichos órganos (Wang *et al.* 2006).

Del estudio de expresión génica se observó que, en condiciones de hipoxia crónica, el incremento de ARNm para el gen *NOS2* y de su enzima resultante fue 1.9 y 1.4 veces respectivamente comparado a grupos normóxicos. Además, la sobre expresión de NOS fue inducida en el endotelio de los vasos pulmonares, musculo liso de los vasos pulmonares grandes y pequeños y en el musculo liso bronquial, por efecto de la exposición a condiciones hipóxicas (Palmer *et al.* 1998).

En el caso particular del Yak, la falta de expresión de la variante del gen *HIF-1α* en células musculares lisas de la arteria pulmonar pueden tener un papel en la reducción de la respuesta vascular por hipoxia ambiental, al respecto se observó que la deficiencia parcial de HIF-1α, era suficiente para deteriorar la hipoxia inducida por la despolarización y la hipertrofia de PASMC en ratones (Shimoda *et al.* 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE COLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre y bulbos pilosos para el estudio fueron colectadas de bovinos criados en zonas alto andinas de Ancash, Apurímac, Cusco, Pasco y Puno (Figura 2), situadas en un rango de altitud comprendido entre 3,123 y 4,309 msnm y en zonas bajas de las regiones de Lima y Cusco situadas entre 243 y 1,306 msnm, las zonas específicas de colecta figuran el anexo 1. Los bovinos criollos fueron criados en sistemas extensivos, mientras que los bovinos Brown fueron criados en sistemas semi extensivos e intensivo en el caso de los animales que fueron colectados en la ciudad de Lima, dada su orientación a la producción de leche.

Las condiciones climatológicas en la sierra, considerando la información de las estaciones meteorológicas del SENAMHI del 2018 al 2019, situadas en las proximidades de las distintas zonas de colecta, tuvieron una temperatura promedio de 9.85°C, con una mínima 0.05°C y la máxima de 19.67°C, además se tuvo una precipitación pluvial media de 1.01 mm/hora. En el caso de las zonas bajas (La Molina, Lima y La Convención, Cusco), tuvieron una temperatura promedio de 19.99°C con temperatura mínima de 15.03°C y una máxima de 28.10°C (SENAMHI 2019). La información meteorológica más detallada puede verse en el anexo 2 de este documento.

3.2. LUGAR DE ANÁLISIS DE MUESTRAS

Parte de los análisis hematológicos de las muestras de sangre fueron realizados en el laboratorio de fisiología animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco (UNSAAC) y otra parte de las muestras fueron analizadas en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IIBBM) de la Universidad Nacional Agraria - La Molina (UNALM) en la ciudad de Lima.

La extracción de ADN a partir de las muestras de sangre, se realizó en el laboratorio de genética molecular del IIBBM - UNALM en la ciudad de Lima.

3.3. ANIMALES EVALUADOS

Para el estudio se eligieron bovinos criollos y Brown Swiss machos y hembras de condición aparentemente sana y diferentes edades, criados entre los 3,213 msnm y 4,309 msnm. Se formaron dos grupos, uno denominado como bovinos criollos de zonas altas (CRIZA) formado por 184 individuos y el segundo denominado como bovinos Brown Swiss de zonas altas (BSZA) formado por 126 individuos. Además, se pudo formar un tercer grupo conformado por 11 bovinos de raza Brown Swiss que manifestaron mal de altura (BSMA) y también se formó un cuarto grupo constituido por 31 individuos criados entre 243 y 1,306 msnm, denominados como Brown Swiss de zonas bajas (BSZB). La información de los animales incluidos en esta investigación figura en el anexo 1 y la distribución general de las zonas donde fueron colectados los bovinos de ambas razas se muestran en la Figura 2.

Del grupo total de animales criados en ambientes de mayor altitud se eligieron un total de 60; que fueron distribuidos en cuatro grupos diferenciados por los resultados de la concentración de Hb (Tabla 1), además de un quinto grupo de bovinos Brown Swiss con mal de altura (BSMA).

Tabla 2: Diferenciación de grupos bovinos por el grado de concentración de Hb

Grupo	Hb (mg/dL) Promedio \pm DS	Número de animales
Brown Swiss con Hb alta (BSHbA)	15.59 \pm 0.94	13
Brown Swiss con Hb baja (BSHbB)	9.32 \pm 1.43	11
Criollos con Hb alta (CRHbA)	16.24 \pm 0.44	13
Criollos con Hb baja (CRHbB)	9.83 \pm 1.43	12
Brown Swiss con mal de altura (BSMA)	15.77 \pm 2.82	11

DS = Desviación estándar

Las muestras de ADN de estos animales fueron empleadas para realizar la identificación de PNSs en las regiones exónicas de los genes elegidos.

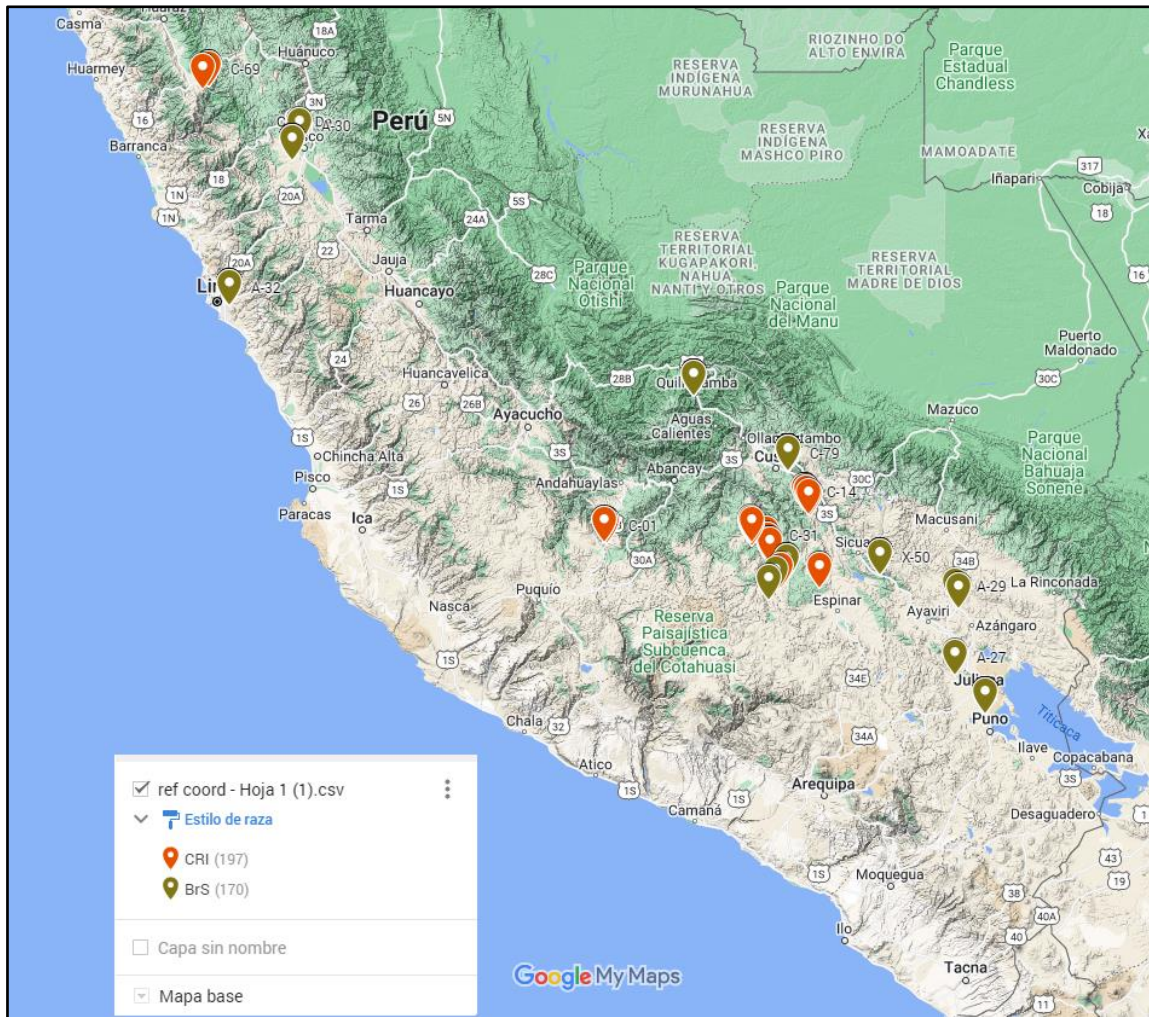


Figura 2: Ubicación geográfica de los bovinos elegidos para el análisis hematológico

CRI: criollo (Naranja), BrS: Brown Swiss (Marrón)

3.4. COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y MEDICIÓN DE CONSTANTES HEMATOLÓGICAS

3.4.1. Colecta de sangre

La toma de muestras de sangre fue realizada de la vena caudal y se colectó de cada uno de los animales. Para ello se utilizaron tubos al vacío de 6 mL con 10.8 mg de anticoagulante K₂EDTA. Las muestras fueron codificadas y conservadas a 5°C hasta su evaluación.

Las muestras de sangre de los bovinos criollos, fueron colectadas entre los meses de diciembre y mayo de los años 2018 y 2019, debido a que en estas épocas se presentan mejores condiciones nutricionales de pastizales naturales, con ello se buscó contar con animales en mejores

condiciones corporales al momento de la evaluación hematológica. Las muestras de bovinos Brown Swiss se colectaron en diferentes meses de los años 2018 y 2019, ello debido al tipo de manejo semi estabulado, que se efectúa con estos animales, el cual implica, empleo adicional de forrajes para su alimentación, lo que evita la reducción de su condición corporal en la época de estiaje.

Los protocolos de recolección de muestras de sangre, se hicieron cumpliendo la reglamentación del Comité de Ética de la UNALM, y de la Ley Nacional No. 30407, "Ley de Protección y Bienestar Animal ", vigente en Perú desde el 7 de enero de 2016.

3.4.2. Evaluación de constantes hematológicas

a. Recuento de glóbulos rojos

Se diluyó un volumen de 20 μL de sangre en 3,980 μL de solución salina fisiológica, esta suspensión fue homogenizada y de esta, se extrajeron 15 μL y se colocaron sobre la cámara de Neubauer y se efectuó el conteo de células observadas en cinco recuadros de la cámara central, usando un microscopio de contraste de fases. El promedio de recuento de ambas cámaras fue multiplicado por un factor de dilución de 10,000. Los valores fueron expresados en millones por μL .

b. Recuento de glóbulos blancos

Se diluyó un volumen de 20 μL de sangre en 380 μL de solución Turk, (2 mL de ácido acético glacial, 1 mL de violeta de genciana al 1 por ciento y 97 mL de agua destilada), la suspensión fue homogenizada y de esta, se extrajeron 15 μL y se colocaron sobre la cámara de Neubauer, luego se hizo el recuento de las células observadas en las cuatro cámaras externas, usando un microscopio de contraste de fases. El promedio de recuento de ambas cámaras fue multiplicado por un factor de dilución de 100. Los valores fueron expresados en miles por microlitro.

c. Hematocrito

Se depositó sangre homogenizada en un tubo capilar y se centrifugó a 9,500 RCF por 5 minutos, la determinación del porcentaje de Ht se hizo por medio de observación directa con la ayuda de una regla de medición; el valor se expresó en porcentaje.

d. Hemoglobina

Por observación directa del resultado, colocando 10 μL de sangre homogenizada sobre una tira reactiva previamente insertada en un equipo de medición electrónica marca *Mission HB*®. Esta medición se realizó dentro de las primeras ocho horas posteriores a la extracción de sangre. Los valores se expresaron en g/dL de sangre.

e. Volumen corpuscular medio

Se dividió el porcentaje de Ht entre el RGR (expresado en millones/ μL) y multiplicado por 10. El valor se expresó en femtolitros (fL)

f. Hemoglobina corpuscular media

Este valor se obtuvo multiplicando el valor de Hb por 10 y dividiendo el resultado entre el número RGR expresado en millones/ μL . El valor es expresado en picogramos (pg).

g. Concentración de hemoglobina corpuscular media

Este valor se calculó tomando la concentración de Hb dividida entre el valor de Ht de cada muestra. El valor se expresó en porcentaje.

3.5. EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS GENÓMICO

3.5.1. Extracción de ADN

Las muestras de sangre colectadas, se centrifugaron a 2,800 RCF por cinco minutos a fin de obtener la fracción leuco plaquetaria de la sangre, la que fue lavada repetidas veces con solución T:E 20:5. El pellet leuco plaquetario resultante fue conservado a -20°C , hasta el momento de su procesamiento para la extracción de ADN, en este procedimiento se usó el kit de extracción de ADN Quick-DNA™ (Zymo Research, Ca).

Las muestras extraídas de ADN se evaluaron con un espectrofotómetro para medir la concentración del ADN extraído y por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento a fin evaluar el grado de fragmentación del ADN. Para la amplificación de las regiones genómicas de interés del estudio se utilizó una concentración mínima de ADN de 60 ng/ μL .

3.5.2. Identificación de regiones exónicas en genes inducibles por hipoxia.

Con el objetivo de ubicar mutaciones no sinónimas en las secuencias de ADN de los genes *EPAS1*, *HIF1a*, *EDN1*, *ARNT*, *HIF3a*, *VEGFA*, *EPO*, *NOS2*, *EGLN* y *SLC2A1*, se empleó la información genómica de 41 bovinos de razas: Brown Swiss (n = 6), Holstein (n = 11), Jersey (n = 8), Aberdeen Angus (n = 9) y Simmental (n = 7), existentes en la base de datos Sequence Read Archive (SRA) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), los códigos de los animales son detallados en el anexo 3. La información de los genomas fue descargada en el servidor para computación de altas prestaciones en bioinformática “HPC-Bioinformática” de UNALM.

La identificación de PNSs se efectuó mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas y el genoma de referencia ARS-UCD1.2 disponible en el NCBI (GCF_002263795.1). Para ello se utilizaron herramientas bioinformáticas como Alineador Burrows-Wheeler (BWA), Picard tools, SamTools y BcfTools, para la indexación con el genoma de referencia se emplearon las herramientas BWA y SamTools (Li y Durbin 2010; Li *et al.* 2009); para la creación de la secuencia "diccionario", el ordenamiento, la marcación de duplicados, la indexación y la unión de archivos se empleó la herramienta Picard tools (Picard Toolkit 2019). Para el alineamiento de lecturas fue empleada la herramienta BWA y para la identificación y llamado de variantes se empleó la herramienta BcfTools (BCF Tools 2019). Obteniéndose un archivo de extensión vcf con peso de 19.8 gigabytes, del cual, se extrajeron los PNSs ubicados en las coordenadas correspondientes a los genes antes referidos, generándose archivos FASTA con las variantes encontradas; dichos archivos fueron alineados con sus correspondientes archivos de ARNm y de proteínas codificadas existentes en la base de datos de NCBI (ver códigos de referencias en el anexo 6); usando para ello las herramientas Mega Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Splign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>), con esta herramienta se predijo la secuencia de aminoácidos de las proteínas resultantes y con ello se pudo identificar aquellos PNSs que ocasionaron mutaciones no sinónimas que generan variaciones en la codificación de los aminoácidos de las proteínas resultantes.

3.5.3. Identificación de PNSs en las muestras de ADN colectadas

Para esta etapa se estudiaron cuatro regiones exónicas de los genes *EPAS1*, *EPO*, *VEGFA* y *NOS2*, que fueron elegidas a partir de los resultados bioinformáticos obtenidos con el

alineamiento de secuencias descrito en la sección 3.5.2. Para este estudio se emplearon 60 muestras de ADN de bovinos criollos y Brown Swiss que fueron elegidas, tomando como criterio para la elección, la concentración de Hb (Tabla 2).

Las muestras de ADN de los 60 individuos fueron distribuidas en cuatro grupos diferenciados por su concentración de Hb alta (15.25 ± 0.81 g/dL) y Hb baja (9.59 ± 1.40 g/dL) dividiéndose en: Brown Swiss con Hb alta (BSHbA) (n = 13), Brown Swiss con Hb baja (BSHbB) (n = 11) criollos con Hb alta (CRHbA) (n = 13) y criollos con Hb baja (CRHbB) (n = 12) además de un quinto grupo formado por 11 bovinos Brown Swiss con mal de altura (BSMA) que tuvieron una concentración de Hb de 15.77 ± 2.82 g/dL.

Las regiones exónicas seleccionadas de los genes descritos anteriormente, fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de polimerasa usando los cebadores diseñados (Tabla 3) para este trabajo utilizando la herramienta Primer – BLAST del NCBI. Para ello se seleccionaron las regiones exónicas y sus regiones intrónicas adyacentes de los genes elegidos. Mismos que fueron extraídos de la base de datos de genes de NCBI del genoma de referencia del bovino ARS-UCD1.2. La especificidad de los cebadores diseñados fue evaluada con la herramienta UCSC In-Silico PCR (Kent *et al.* 2002). Los cebadores fueron sintetizados por la empresa Macrogen (Seúl, Corea).

Tabla 3: Cebadores diseñados para amplificar las muestras de ADN bovino

Loci	Gen	Cebador	Longitud del Amplicón	Localización Cromosómica
L1	<i>EPAS1</i> Exón 7	F: GGGGTGAGAGTTAGGGAACC R: CTCAAGGCCAGATTCCACAG	423pb	BTA11
L2	<i>VEGFA</i> Exón 7	F: CGAGCCCGGAAGATTAGAG R: TCCTCCACCAACGTCTCTTC	668pb	BTA23
L3	<i>EPO</i> Exón 5	F: AGAAGGGCCCATCCATTCTA R: CAGTCCATCCTGTCCCTGTT	622pb	BTA25
L4	<i>NOS2</i> Exón 12	F: AGAGACATGTGGCCCTCTT R: GGATTTGTCACAAGGCTGCT	548pb	BTA19

La calidad de los amplicones obtenidos, fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 por ciento. Se visualizo la calidad de las bandas y el tamaño del amplicón. Luego las

muestras fueron remitidas para su secuenciación en el extranjero (Bio Basic Inc. Canadá) mediante metodología Sanger.

Los resultados de la secuenciación fueron obtenidos en archivos de extensión bsf1 que contenían la información de la secuenciación, estos fueron abiertos y analizados usando el programa BioEdit v7.2.5 (Hall 1999) y el programa Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011), obteniéndose los electroferogramas de las muestras lo que permitió determinar el genotipo (homocigoto o heterocigoto), para cada animal y PNS en cada exón estudiado. (imagen referencial en el anexo 4). Luego las secuencias fueron comparadas mediante el alineamiento, para el caso de cada gen dentro de los grupos de animales descritos anteriormente, así se determinó la frecuencia de variantes PNSs. Los resultados fueron empleados para determinar las frecuencias alélicas de los PNSs entre los grupos formados en base a la concentración de Hb.

También se calcularon los correspondientes desequilibrios de ligamientos (LD) entre los PNSs identificados en los diferentes genes y se identificaron los haplotipos que estos formaron, usando el programa Haploview v.4.2 (Barret *et al.* 2005).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1. Constantes hematológicas

Los datos hematológicos expresados en valores porcentuales fueron transformados con la función de raíz cuadrada del arcoseno, luego se efectuó un análisis de correlación de Pearson entre las características de estudio de forma general y para cada grupo. La significancia de las diferencias observadas de las correlaciones entre pares de grupos se determinó mediante la transformación de los coeficientes de correlación a coeficientes Z de Fisher (Sánchez-Bruno y Borges 2005) y el empleó el coeficiente Q de Cohen (Ventura-León y Caycho 2017) con un nivel de significancia del 0.05.

Para el análisis de varianza de las constantes hematológicas existente entre grupos evaluados se usó un modelo de arreglo factorial 4 x 2 x 3, cuya representación lineal es:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + C_k + (T * S)_{ij} + (T * C)_{ik} + (S * C)_{jk} + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable respuesta

μ = media general

T_i = efecto del i-esimo grupo de animales (BSMA, BSZA, CRIZA, BSZB);

S_j = efecto del j-esimo sexo (macho, hembra)

C_k = efecto de la k-esima condición corporal (valores: 2, 3, 4)

$(T * S)_{ij}$ = interacción entre el i-esimo grupo de animales y el j-esimo sexo

$(T * C)_{ik}$ = interacción entre el i-esimo grupo de animales y la k-esima condición corporal

$(S * C)_{jk}$ = interacción entre el j-esimo sexo y la k-esima condición corporal

e_{ijk} = residual.

Para la comparación de medias se usó prueba de mínima diferencia significativa (LSD). En todos los análisis se empleó el programa R versión 3.6.0.

3.6.2. Polimorfismos de nucleótido simple y desequilibrio de ligamiento

En lo que se refiere al análisis de los PNSs identificados en cada exón dentro de los diferentes grupos estudiados, se calcularon las frecuencias del alelo menor (MAF en inglés), el equilibrio de Hardy-Weinberg, y el distanciamiento genético usando el test G (Sokal y Rohlf 1995), existentes entre los dos grupos considerados en el estudio, empleando el programa GENEPOP v4.7 (Rousset 2008).

Por último, se efectuó un estudio de LD entre los PNSs y la identificación de posibles haplotipos usando el algoritmo denominado columna solida de LD del programa Haploview v.4.2 (Barret *et al.* 2005).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONSTANTES HEMATOLÓGICAS EN LOS GRUPOS DE BOVINOS

En general se observaron diferencias en las constantes hematológicas de los grupos evaluados (Tabla 4). Los valores promedios en bovinos BSZB fueron similares o estuvieron dentro de los rangos reportados como referenciales en bovinos criados en ambientes de baja altitud (Cardoso *et al.* 2001; Lumsden *et al.* 1980; Kessel 2015), pero fueron algo superiores para Ht y VCM, comparados con muestras de bovinos Jersey criados a 160 msnm (Ocampo 2004). Por tanto, los BSZB serían considerados como normocíticos, normocrómicos y no padecen de policitemia.

Los valores hallados en BSMA, fueron mayores a los demás grupos de bovinos, en características como RGR, RGB, Ht y Hb ($p < 0.01$). Además, los valores de Ht, RGR y Hb obtenidos en este grupo, se ubicaron por encima del rango normal para bovinos (Kessel 2015). Sin embargo, los valores de VCM y CHCM para BSMA fueron similares a los observados en BSZB, por lo que se considera que estas dos constantes hematológicas están dentro de los rangos normales para bovinos (Roland *et al.* 2014; Kessel 2015).

Cabe mencionar que los valores de constantes hematológicas en el grupo BSMA fueron más altos que los reportados por Cuba (2014), para animales con la misma condición de salud en valores de Ht, Hb y RGR los cuales fueron 25 por ciento, 14.8 por ciento y 39 por ciento respectivamente más altos en los BSMA del presente estudio. Mientras que los valores de VCM, HCM y CHCM fueron menores a los reportados por este mismo investigador. Por tanto, el grupo BSMA tendría una condición de policitemia y una ligera hipocromía; pese a haberse observado un incremento marcado en la concentración de Hb, el elevado número de glóbulos rojos, hace que, por el VCM, a los bovinos BSMA se les clasifique como normocíticos, al estar dentro del volumen de referencia considerado por Kessel (2015).

En el caso de los bovinos CRIZA, mostraron valores de Ht, Hb y VCM más altos que los BSZA, además ambos grupos presentaron Ht más altos que los bovinos BSZB ($p < 0.01$). Los bovinos CRIZA y BSZA no difirieron en el RGR, RGB y CHCM. Cabe mencionar que los valores de RGR, Hb, VCM y CHCM de los grupos CRIZA y BSZA están dentro de los rangos

considerados como normales (Kessel 2015). También los valores Ht y Hb de bovinos BSZA y de CRIZA evaluados, fueron más altos que los reportados en bovinos criados en altitudes de 3,100 a 3,320 msnm (Claxton y Ortiz 1996; Ocampo 2004) y presentaron menores valores de RGR y CHCM (Ocampo 2004).

Los valores de Hb y Ht de los bovinos CRIZA y BSZA son más parecidos a los promedios observados en bovinos criados a 4,000 msnm (Cuba 2014). No obstante, las constantes hematológicas de los grupos de bovinos CRIZA y BSZA, hace que a estos se les puedan clasificar como normocrómicos, normocíticos y sin policitemia.

La evidencia de estos resultados, muestra que los bovinos BSZA y CRIZA presentaron constantes hematológicas más altas que los BSZB por efecto de la exposición en ambientes altoandinos. Esto es algo que resultó destacable en los bovinos CRIZA ya que no se esperaba ver que las constantes hematológicas de estos, fueran muy diferentes de las expresadas por los bovinos BSZB. Además, fueron más altos que los valores reportados en bovinos Simien que son considerados como un tipo de bovino europeo adaptado a entornos de 3,500 msnm en Etiopia, los cuales tuvieron valores de Hb de 11.24 ± 1.13 g/dL, Ht 33.96 ± 3.7 por ciento, VCM de 43.92 ± 2.25 fL, y un valor PAP de 32 mm Hg (Wuletaw *et al.* 2011). Esto hace notar que la mencionada rusticidad y adaptación a ambientes altoandinos por parte de los bovinos criollos, no se daría por alguna variación en concentración o elevación de las constantes hematológicas evaluadas. Lo que llevar a considerar tener que hacer otras características como variaciones en los índices corporales o tasas metabólicas por citar algunos ejemplos.

Cabe acotar que algunos animales de los grupos CRIZA y BSZA tuvieron valores de Ht y Hb bastante altos y ubicados dentro de los rangos presentados por bovinos Brown Swiss con mal de altura (BSMA). Debido a esto se efectuó la formación de dos subgrupos con animales incluidos en el decil superior, considerando al Ht como patrón de referencia. Los dos subgrupos Brown Swiss con valores extremos (BSZAVE) y criollos con valores extremos (CRIZAVE) se compararon con el grupo de bovinos BSMA (Tabla 5), observándose que estos nuevos dos subgrupos, mostraron promedios de Ht, RGR y RGB similares entre ellos, pero inferiores a los obtenidos por bovinos BSMA ($p < 0.01$).

En el caso de la concentración de Hb, no se observó diferencia entre los tres grupos evaluados y para el caso de los valores del VCM, HCM y CHCM, los BSZAVE y CRIZAVE tuvieron promedios similares entre ellos y más altos al promedio de los BSMA ($p < 0.01$).

Esta condición ubicaría a los subgrupos CRIZAVE y BSZAVE, como policitémicos, con ligera hipocromía, pero su VCM hace ver que sus glóbulos tienen volúmenes mayores a los observados en BSMA. En general se puede inferir que los valores hematológicos extremos de este grupo de animales, podrían deberse a un efecto de eritropoyesis acelerada. Como se sabe la eritropoyesis acelerada se da por estimulación de la médula ósea por parte de la eritropoyetina (EPO), la misma se da como respuesta ante el estímulo hipóxico (Aguilo 2001). En ese sentido es posible que existan variaciones de expresión en el gen *EPO* entre los animales que presentan amplias diferencias en los valores de Ht, RGR y Hb, a pesar de que se encuentren expuestos a las mismas condiciones ambientales alto andinas y presenten similares características nutricionales y sanitarias.

Tabla 4: Valores hematológicos hallados en los grupos de bovinos evaluados

Característica	Rango de Referencia (Kessel 2015)	Brown Swiss con mal de altura (BSMA)		Criollos ubicados en tierras altas (CRIZA)		Brown Swiss criados en tierras altas (BSZA)		Brown Swiss criados en tierras bajas (BSZB)	
		N	Promedio ± ES (Rango)	N	Promedio ± ES (Rango)	N	Promedio ± ES (Rango)	N	Promedio ± ES (Rango)
Altitud (msnm)		11	3,991.5 ± 55.1 (3,815.0 – 4,309.0)	184	3,568.0 ± 13.9 (3,213.0 – 4,211.0)	128	3,674.3 ± 31.5 (3,213.0 – 4,309.0)	31	860.2 ± 95.8 (243.0 – 1,306.0)
Hematocrito Ht (porcentaje)	24.0 - 46.0	11	59.5 ± 3.0 (a) (40.0 - 74.4)	183	45.9 ± 0.5 (b) (23.5 - 60.4)	128	42.5 ± 0.6 (c) (27.7 - 61.9)	31	35.0 ± 1.2 (d) (25.1 - 50.0)
Recuento de glóbulos rojos RGR (10 ⁶ /μL)	5.0 – 10.0	11	14.5 ± 0.9 (a) (10.2 - 20.5)	184	8.3 ± 0.1 (b) (3.8 - 13.5)	128	8.3 ± 0.1 (b) (5.1 - 12.6)	31	7,2 ± 0.2 (c) (4.7 - 9.8)
Recuento de glóbulos blancos RGB (10 ⁶ /μL)	4.0 – 12.0	11	10.1 ± 1.2 (a) (4.8 - 17.9)	184	6.8 ± 0.2 (b) (2.3 - 15.7)	128	6.9 ± 0.2 (b) (3.4 – 12.9)	31	7.6 ± 0.5 (b) (3.7 -15.4)
Hemoglobina Hb (g/dL)	8.0 – 15.0	11	15.8 ± 0.9 (a) (10.9 - 19.1)	112	12.9 ± 0.2 (b) (6.7 - 17.0)	125	12.1 ± 0.2 (c) (7.4 - 17.8)	31	9.7 ± 0.4 (d) (6.5 - 14.1)
Volumen corpuscular medio VCM (fL)	40.0 – 60.0	11	41.3 ± 1.0 (c) (36.3 - 45.6)	183	57.5 ± 0.9 (a) (29.1 - 97.6)	128	51.6 ± 0.6 (b) (30.0 - 82.6)	31	49.1 ± 1.2 (bc) (36.0 - 63.9)
Hemoglobina corpuscular media HCM (pg)	11.0 – 17.0	11	10.9 ± 0.3 (c) (9.3 - 12.3)	112	15.0 ± 0.2 (a) (8.3 - 24.6)	125	14.8 ± 0.2 (ab) (8.7 - 23.1)	31	13.6 ± 0.4 (b) (9.7 - 18.0)
Concentración Hb corpuscular media CHCM (porcentaje)	30.0 – 36.0	11	26.5 ± 0.5 (b) (24.1 - 30.0)	112	28.5 ± 0.2 (a) (21.6 - 33.6)	125	28.6 ± 0.2 (a) (23.6 - 36.1)	31	27.7 ± 0.6 (ab) (22.4 - 37.0)

Fuente: Kessel (2015)

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas al 0.01; ES: error estándar

Tabla 5: Valores hematológicos de Brown Swiss con mal de altura y deciles superiores de Brown Swiss y criollos criados en zonas altas

Característica	BSMA		CRIZAVE		BSZAVE	
	N	Promedio ± ES (Rango)	N	Promedio ± ES (Rango)	N	Promedio ± ES (Rango)
Altitud (msnm)	11	3,991.5 ± 55.1 (3,815.0 – 4,309.0)	19	3,585.1 ± 55.8 (3,213.0 – 4,061.0)	14	3,542.3 ± 67.0 (3,213.0 – 4,309.0)
Hematocrito Ht (porcentaje)	11	59.49 ± 3.02 (a) (40.00 - 74.41)	19	55.32 ± 0.62 (b) (51.67 – 60.40)	14	53.85 ± 0.87 (b) (50.21 - 61.85)
Recuento de glóbulos rojos RGR (10⁶/μL)	11	14.50 ± 0.86 (a) (10.16 - 20.52)	19	9.62 ± 0.35 (b) (6.91 - 12.63)	14	10.00 ± 0.37 (b) (6.71 - 11.96)
Recuento de glóbulos blancos RGB (10⁶/μL)	11	10.06 ± 1.15 (a) (4.83 - 17.90)	19	6.52 ± 0.62 (b) (2.88 - 11.03)	14	6.87 ± 0.58 (b) (3.80 – 10.80)
Hemoglobina Hb (g/dL)	11	15.77 ± 0.85 (a) (10.90 - 19.10)	13	15.70 ± 0.24 (a) (14.30 - 17.00)	14	15.31 ± 0.33 (a) (13.30 - 17.80)
Volumen corpuscular medio VCM (fL)	11	41.27 ± 1.01 (b) (36.26 - 45.58)	19	59.13 ± 2.60 (a) (41.17 – 81.49)	14	54.97 ± 2.57 (a) (42.90 - 82.55)
Hemoglobina corpuscular media HCM (pg)	11	10.93 ± 0.29 (b) (9.31 - 12.30)	13	17.20 ± 0.84 (a) (13.26 - 24.62)	14	15.63 ± 0.75 (a) (11.12 - 23.11)
Concentración Hb corpuscular media CHCM (porcentaje)	11	26.51 ± 0.52 (b) (24.11 - 30.04)	13	28.53 ± 0.51 (a) (24.32 – 30.41)	14	28.43 ± 0.41 (a) (25.92 - 31.27)

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas al 0.01; ES: error estándar. Brown Swiss con mal de altura (BSMA), Criollos de zonas altas con valores hematológicos extremos (CRIZAVE), Brown Swiss de zonas altas con valores hematológicos extremos (BSZAVE)

4.1. CORRELACIÓN ENTRE CONSTANTES HEMATOLÓGICAS

En general la correlación existente entre Ht y Hb, tuvo un valor de 0.92 ($p < 0.01$), pero en los grupos BSZB y CRIZA las correlaciones fueron 9 por ciento y 3 por ciento más bajas

que el valor general (Tabla 6). Las diferencias observadas en las correlaciones obtenidas entre Hb y Ht para los grupos evaluados fueron significativas ($p < 0.05$), salvo aquella observada entre bovinos BSZA y CRIZA (Tabla 7), lo que implica que el comportamiento de la correlación entre Hb y Ht es igual en ambos grupos de animales. Además, las correlaciones entre Hb y VCM fueron más bajas que las obtenidas por Turkson y Ganyo (2015) para bovinos.

Dada la correlación existente entre Hb y Ht, puede calcular la concentración de Hb usando el valor de Ht multiplicándolo por tres (Bain y Bates 2011), esto se hace debido a la relativa facilidad para determinar Ht respecto de la determinación directa de Hb (Quintó *et al.* 2006). Ello se puede usar como estrategia para la cuantificación del contenido de Hb en función del valor de Ht en bovinos.

La correlación general entre el RGR y el Ht, fue 0.71. Se observó una amplia variación en el valor de la correlación entre RGR y Ht dentro de cada grupo, variando de 0.45 a 0.89 para CRIZA y BSMA respectivamente.

Además, la correlación general entre la Hb y el RGR fue 0.63 con rangos de variación amplios entre los grupos tal es el caso de BSMA donde la correlación fue 0.86 y 0.43 en CRIZA, siendo este último el menor el valor obtenido para CRIZA (Tabla 6).

En los bovinos CRIZA el VCM, tuvo un valor fue de 57.5 ± 0.09 fL (Tabla 4), es decir un 11.43 por ciento más alto que el de los BSZA, esto es relevante dado que también se ha observado una correlación general inversa entre el VCM y el RGR de -0.46; este valor es similar a la correlación de VCM y RGR en humanos (Sharp *et al.* 1996). Pero para el caso del grupo BSZA la correlación fue de -0.41 y de -0.55 en bovinos CRIZA (Tabla 6).

Considerando que el RGR y Ht están asociados a un incremento en la presión sanguínea, por ser los glóbulos rojos, un componente de la viscosidad de la sangre (Nader *et al.* 2019) y que la viscosidad tiene efecto en el incremento de la presión vascular. La existencia de la relación inversa entre el Ht y VCM a niveles altos, puede tener efecto en reducir de forma parcial la presión vascular sin comprometer el flujo sanguíneo (Sharp *et al.* 1996), esto porque el incremento de la capacidad de deformabilidad de los glóbulos rojos tiene una correlación de 0.21 con del VCM en mujeres (von Tempelhoff *et al.* 2016), dicha deformabilidad de los glóbulos rojos facilita el pasaje de este tipo celular a través de capilares (Shevkoplyas *et al.* 2006; Ebrahimi y Bagchi *et al.* 2022). Esta condición

podiera tener implicancia en la respuesta hipóxica del bovino criollo respecto del bovino Brown Swiss criados en ambientes altoandinos, por lo que cabría hacer investigaciones sobre la relación entre el grado de deformidad de los glóbulos rojos en bovinos criollos.

Por último, considerando los resultados de las diferentes correlaciones, sobre todo aquellas observadas entre Hb y Ht como entre Hb y RGR así como el hecho del que el valor de Hb en los grupos generales BSMA, CRIZA, BSZA y CRIZB fueran diferentes en comparación lo observado con el RGR (Tabla 4), se eligió la Hb como criterio para poder elegir animales extremos que fueran empleados para el estudio de evaluación de ADN subsecuente.

Tabla 6: Correlaciones entre las constantes hematológicas halladas en los grupos bovinos

Grupo	Carácter	Ht	RGR	RGB	Hb	VCM	HCM	CHCM
General	Ht	1	0.71(**)	0.12(*)	0.92(**)	0.28(**)	0.17(**)	-0.17(**)
	RGR		1	0.21(**)	0.63(**)	-0.46(**)	-0.47(**)	-0.16(**)
	RGB			1	0.08	-0.12(*)	-0.14(*)	-0.09
	Hb				1	0.29(**)	0.36(**)	0.22(**)
	VCM					1	0.88(**)	0.01
	HCM						1	0.47(**)
	CHCM							1
BSMA	Ht	1	0.89(**)	0.17	0.94(**)	0.04	0.06	0.00
	RGR		1	0.22	0.86(**)	-0.42	-0.31	0.08
	RGB			1	0.36	-0.21	0.23	0.60
	Hb				1	-0.03	0.22	0.34
	VCM					1	0.73(*)	-0.24
	HCM						1	0.49
	CHCM							1
BSZA	Ht	1	0.65(**)	0.02	0.91(**)	0.41(**)	0.28(**)	-0.13
	RGR		1	0.09	0.56(**)	-0.41(**)	-0.43(**)	-0.17
	RGB			1	0.00	-0.06	-0.07	-0.04
	Hb				1	0.41(**)	0.49(**)	0.30(**)
	VCM					1	0.87(**)	0.04
	HCM						1	0.53(**)
	CHCM							1
CRIZA	Ht	1	0.45(**)	0.15	0.89(**)	0.48(**)	0.36(**)	-0.22(*)
	RGR		1	0.07	0.43(**)	-0.55(**)	-0.55(**)	-0.05
	RGB			1	0.13	0.07	0.05	-0.04
	Hb				1	0.41(**)	0.49(**)	0.24(*)
	VCM					1	0.90(**)	-0.13
	HCM						1	0.30(**)
	CHCM							1
BSZB	Ht	1	0.69(**)	0.00	0.83(**)	0.40(*)	0.14	-0.24
	RGR		1	0.23	0.59(**)	-0.38(*)	-0.43(*)	-0.16
	RGB			1	-0.07	-0.27	-0.36(*)	-0.16
	Hb				1	0.33	0.46(**)	0.33
	VCM					1	0.76(**)	-0.07
	HCM						1	0.59(**)
	CHCM							1

** = ($p \leq 0.01$); * = ($p \leq 0.05$). Hematocrito (Ht), recuento de glóbulos rojos (RGR), recuento de glóbulos blancos (RGB), Hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio, (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM), Brown Swiss con mal de altura (BSMA), Brown Swiss de zonas altas (BSZA), Criollos de zonas altas (CRIZA), Brown Swiss de zonas bajas (BSZB)

Tabla 7: Comparación entre las correlaciones de hemoglobina y hematocrito en los diferentes grupos de bovinos

Comparación	Q-Cohen	N	ES	Límite inferior	Límite superior	Significancia
BSMA vs BSZA	0.211	137	0.09	0.38	0.04	*
BSMA vs CRIZA	0.316	195	0.07	0.46	0.17	*
BSMA vs BSZB	0.550	42	0.16	0.86	0.24	*
BSZA vs CRIZA	0.106	310	0.06	0.22	-0.01	NS
BSZA vs BSZB	0.339	157	0.08	0.50	0.18	*
CRIZA vs BSZB	0.234	215	0.07	0.37	0.10	*

* = ($p \leq 0.05$), NS = no significativo; ES = error estándar. Brown Swiss con mal de altura (BSMA), Brown Swiss de zonas altas (BSZA), Criollos de zonas altas (CRIZA), Brown Swiss de zonas bajas (BSZB)

4.2. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES EXÓNICAS EN DIEZ GENES INDUCIBLES POR HIPOXIA

Como resultado de este estudio se identificaron 79 PNSs en las regiones exónicas de los 10 genes evaluados, los mismos figuran en el anexo 6; de ellos 17 PNSs son no sinónimos, ocasionando una variación en la secuencia de aminoácidos (Tabla 8)

Al comparar las frecuencias alélicas entre los grupos de bovinos cárnicos y lecheros se observaron diferencias en tres PNSs del gen *EPAS1* ubicados en c.1081G>C del exón 7 ($p < 0.05$) y c.2089G>A ($p < 0.05$), c.2101G>A ($p < 0.01$) ambos en el exón 12, el tercer PNS ubicado en la posición c.1358C>T del exón 9 no tuvo una frecuencia diferente entre bovinos cárnicos y lecheros ($p > 0.05$) el resto de PNSs no tuvo una frecuencia alélica diferente entre los grupos formados por razas cárnicas y lecheras (Tabla 9).

Luego de efectuar el análisis general de desequilibrio de ligamiento con las 41 muestras, se observó que los dos PNSs del gen *EPAS1* ubicados en el exón 12, presentaron una puntuación de logaritmo de probabilidades (LOD) de 5.33 y el coeficiente de determinación (r^2) de 0.70. Cabe señalar que cuando se compararon los grupos de bovinos cárnicos y lecheros de forma independiente, en estos últimos, no se observó dicho

ligamiento, mientras que en el grupo de bovinos cárnicos el ligamiento tuvo una puntuación LOD de 3.95 y r^2 de 0.82.

Tabla 8: PNSs que generan mutaciones no sinónimas en diez genes inducibles por hipoxia en 41 genomas bovinos

Gen	Posición genómica (ARS-UCD1.2)	Exón	ARNm	PNS		Codón	Aminoácido		
				Ref.	Alt.	Ref.	Ref.	Alt.	Posición
<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28809802	7	c.1081	G	C	GAA	E(Glu)	Q(Gln)	p.270
<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28817869	9	c.1358	C	T	CCG	P(Pro)	L(Leu)	p.362
<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28821484	12	c.2089	G	A	GCC	A(Ala)	T(thr)	p.606
<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28821496	12	c.2101	G	A	GGT	G(Gli)	S(Ser)	p.610
<i>EPO</i>	Cr.25: 35873867	5	c.457	C	T	GCA	A(Ala)	T(thr)	p.153
<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73857457	2	c.482	G	C	CGT	R(Arg)	P(Pro)	p.183
<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73875740	12	c.2064	A	G	ATG	M(Met)	V(Val)	p.629
<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296719	7	c.2262	C	T	ACG	T(Thr)	M(Met)	ND
<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296773	7	c.2316	G	A	CGA	R(Arg)	Q(Gln)	ND
<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403710	12	c.1543	A	G	TTC	F(Fen)	L(Leu)	p.515
<i>NOS2</i>	Cr.19: 19402899	13	c.1594	C	T	GCC	A(Ala)	T(Thr)	p.532
<i>NOS2</i>	Cr.19: 19400180	16	c.1961	G	A	GCC	A(Ala)	V(Val)	p.654
<i>NOS2</i>	Cr.19: 19399220	17	c.2131	G	A	CTC	L(Leu)	F(Fen)	p.711
<i>ARNT</i>	Cr.3: 19935387	8	c.853	G	T	GTG	V(Val)	L(Leu)	p.285
<i>EDN1</i>	Cr.23: 44159580	4	c.782	C	T	GGA	G(Gly)	R(Arg)	p.164
<i>EDN1</i>	Cr.23: 44161432	2	c.422	G	T	CCC	P(Pro)	T(Thr)	p.44
<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53579258	10	c.1189	C	G	CTG	L(Leu)	V(Val)	p.392

En color rojo ubicación de PNS dentro de codón, Ref.= Referencia, Alt. = Alterno, ND = No definido

Por otro lado con el análisis general de las 41 muestras, se observó que dos PNSs del gen *NOS2* ubicados en las posiciones c.1961G>A (exon16) y c.1594C>T (exon13) tuvieron una puntuación LOD de 7.41 y r^2 de 0.61, pero cuando se analizaron únicamente a bovinos cárnicos se observó el ligamiento entre los PNSs c.1594C>T (exón 13) y Cr.19: 19403681T>C (intrón 12) los cuales tuvieron una puntuación LOD de 2.14 y un r^2 de 0.52; mientras que en bovinos lecheros, se observó el ligamiento entre los PNSs c1594C>T (exón 13) y c.1961G>A (exon16) con una puntuación LOD de 5.9 y un r^2 de 0.75 y estos a su vez estuvieron ligados con un tercer PNS ubicado en la posición Cr.19: 19403681T>C (intrón 12), con puntuaciones LOD de 8.57 y 6.68 con un r^2 de 0.92 y 0.83 respectivamente.

Considerando las 41 muestras, se observaron otros PNSs que al parecer están ligados, estos fueron el c.2316G>A ubicado en el exón 7 del gen *VEGFA* con el c.782C>T (exón 4) del gen *EDN1* y entre los PNSs c.1081G>C del gen *EPAS1* con c.2316G>A del gen

VEGFA. (LOD: 2.06) (Figura 3). Sin embargo, en el caso específico de bovinos lecheros se observó una puntuación LOD de 2.04 entre c.2316G>A del gen *VEGFA* y el c.233C>T del gen *SLC2A1*.



Usando los 41 genomas de bovinos, sin incluir coordenadas de los PNSs en sus respectivos cromosomas. El cuadro rojo brillante representa valor de LOD mayor o igual a 2 y el coeficiente de determinación r^2 igual a 1

Figura 3: Bloques de ligamiento identificados en el estudio empleando 17 PNSs de genes inducibles por hipoxia

En lo que se refiere a los haplotipos del gen *EPAS1*, en el grupo de bovinos cárnicos se observó un bloque de cinco haplotipos formados por el PNS del exón 9 y los dos reportados en el exón 12, estos fueron CGG (71.9 por ciento), CAA (18.8 por ciento), TGG (6.3 por ciento) y CGA (3.1 por ciento). En el caso de los bovinos lecheros se obtuvo un grupo de cinco haplotipos formados por los PNSs de los exones 7, 9 y uno del exón 12 (c.2089G>A), de ellos, los haplotipos GCG (79.2 por ciento), CCG (12.8 por ciento), GTG, (4.8 por ciento) tuvieron una mayor frecuencia.

En el gen *NOS2* de bovinos lecheros se observó un bloque conformado por siete haplotipos con los PNSs c.2131G>A, c.1961G>A, c.1594C>T, Cr.19: 19403571G>A y Cr.19: 19403681T>C, los haplotipos más frecuentes fueron GGCGT (53.9 por ciento), GATGC (28.0 por ciento), AGCGT (6.0 por ciento) y GATAC (5.9 por ciento). Para el caso de los bovinos cárnicos se observó un bloque de siete haplotipos formados por los PNSs c.1594C>T, Cr.19: 19403571G>A, Cr.19: 19403681T>C y c.1543A>G, los más frecuentes fueron: CGTA (44.3 por ciento), TGCA (21.2 por ciento), CGTG (11.8 por ciento).

Tabla 9: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs en genomas de bovinos

N°	GEN	Posición (ARS-UCD1.2)	Exón	Alelos	BOVINOS LECHEROS								BOVINOS CÁRNICOS						G test Pval
					Holstein (n:11)		Jersey (n:8)		Brown Swiss (n:6)		B. Lecheros (n:25)		Angus (n:9)		Simmental (n:7)		B. Cárnicos (n:16)		
					HW Pval	MA F	HW Pval	MA F	HW Pval	MA F	HW Pval	MAF	HW Pval	MA F	HW Pval	MA F	HW Pval	MAF	
1	<i>EPASI</i>	Cr.11: 28809802	7	G>C	0.48	0.32	-	0.06	-	0.00	1.00	0.160	-	0.00	-	0.00	-	0.000	0.021
2	<i>EPASI</i>	Cr.11: 28817869	9	C>T	1.00	0.09	-	0.06	-	0.00	1.00	0.060	-	0.00	1.00	0.14	1.00	0.063	1.000
3	<i>EPASI</i>	Cr.11: 28821484	12	G>A	-	0.05	-	0.00	-	0.00	-	0.020	0.46	0.33	-	0.00	1.00	0.188	0.038
4	<i>EPASI</i>	Cr.11: 28821496	12	G>A	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	0.000	1.00	0.39	-	0.00	1.00	0.219	0.001
5	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873867	5	C>T	1.00	0.14	0.21	0.19	-	0.08	0.38	0.140	-	0.06	-	0.07	1.00	0.063	0.316
6	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73857457	2	G>C	-	0.05	-	0.00	-	0.00	-	0.020	-	0.00	-	0.00	-	0.000	1.000
7	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73875740	12	A>G	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	0.000	-	0.00	-	0.07	-	0.031	0.388
8	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296719	12	C>T	-	0.05	-	0.00	-	0.08	1.00	0.004	1.00	0.28	-	0.00	0.30	0.156	0.105
9	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296773	7	G>A	0.55	0.41	-	0.00	-	0.08	1.00	0.200	-	0.06	-	0.07	1.00	0.063	0.111
10	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403710	12	A>G	0.51	0.27	1.00	0.25	-	0.08	0.30	0.220	-	0.00	0.44	0.29	0.20	0.125	0.390
11	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19402899	13	C>T	0.26	0.45	1.00	0.13	1.00	0.41	1.00	0.380	0.49	0.39	1.00	0.43	1.00	0.406	0.817
12	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19400180	16	G>A	0.09	0.50	1.00	0.13	1.00	0.42	0.41	0.360	0.49	0.39	1.00	0.36	0.59	0.375	1.000
13	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19399220	17	G>A	-	0.00	0.20	0.19	-	0.00	0.06	0.060	-	0.00	-	0.00	-	0.000	0.276
14	<i>ARNT</i>	Cr.3: 19935387	8	G>T	-	0.00	1.00	0.13	1.00	0.25	1.00	0.100	-	0.00	-	0.00	-	0.000	0.085
15	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44159580	4	C>T	1.00	0.14	-	0.00	-	0.00	1.00	0.060	-	0.00	-	0.00	-	0.000	0.278
16	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44161432	2	G>T	1.00	0.14	-	0.00	-	0.00	1.00	0.060	1.00	0.11	-	0.00	1.00	0.063	1.000
17	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53579258	10	C>G	1.00	0.41	1.00	0.19	0.39	0.42	1.00	0.380	1.00	0.11	1.00	0.36	0.27	0.344	0.815
18	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403571	Intrón 12	G>A	1.00	0.14	-	0.06	-	0.00	1.00	0.080	1.00	0.33	-	0.00	0.44	0.188	0.180
19	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403681	Intrón 12	T>C	0.09	0.50	1.00	0.13	1.00	0.42	0.41	0.360	1.00	0.28	1.00	0.43	0.59	0.344	1.000
20	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873425	5	C>T	1.00	0.18	-	0.00	1.00	0.08	1.00	0.120	-	0.06	-	0.00	-	0.031	0.239
21	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296897	7	G>T	0.14	0.14	0.39	0.25	-	0.08	0.08	0.160	1.00	0.11	1.00	0.14	1.00	0.125	0.759
22	<i>SLC2A1</i>	Cr.3: 103320850	2	C>T	1.00	0.32	-	0.06	-	0.00	0.49	0.160	0.34	0.22	-	0.00	0.19	0.125	0.759
CONJUNTO					0.91		0.97		0.99		0.98		0.99		1.00		0.98		0.038

4.3. IDENTIFICACIÓN DE PNSs EN ADN DE BOVINOS CRIOLLOS Y BROWN SWISS

Como resultado de la labor de secuenciación de las 60 muestras de bovinos locales criados en los Andes, se identificaron 10 PNSs en los amplicones obtenidos de los genes *EPASI*, *NOS2*, *EPO* y *VEGFA*. Los mismos guardan correspondencia con las posiciones identificadas en los 41 genomas presentados en las tablas 10 y 11.

Las frecuencias alélicas de estos PNSs cuando se compararon entre bovinos criollos y Brown Swiss, fueron diferentes únicamente para dos PNSs del gen *NOS* ubicados en las posiciones Cr.19: 19403681T>C (intrón 12) y c.1536C>T (exón 12) del gen *NOS2*, este último PNS no genera una variación en la secuencia de aminoácidos p.E512E del producto. También se pudo observar que la frecuencia del PNS c.1081G>C del gen *EPASI*, fue de 0.10 en los bovinos criollos y en los bovinos criollos con HB baja (CRHbB) llegó a 0.17 (Tabla 11). Además, cuando se agruparon las muestras en los dos grupos generales diferenciados por la concentración de Hb no se pudieron apreciar diferencias en las frecuencias alélicas que pudieran estar asociadas con dichos grupos ($p > 0.05$) (Tabla 10). Tampoco se apreciaron diferencias en las frecuencias de alelos entre los bovinos con mal de altura y los otros cuatro grupos de bovinos criollos y Brown Swiss. (Tabla 11).

En lo referido al análisis de desequilibrio de ligamiento de los PNSs, en el grupo de bovinos Brown Swiss, se observó la existencia de ligamiento entre los dos PNSs del gen *NOS2* ubicados en las posiciones c.1543A>G y c.1536C>T, ambas dentro del exón 12, estas tuvieron una puntuación LOD de 3.1 y un r^2 0.54 y en el grupo de bovinos Brown Swiss con Hb baja (BSHbB) este tuvo una puntuación LOD de 2.2 y tuvo un r^2 de 1.0. Además, en este grupo racial se identificó un bloque formado por cuatro haplotipos constituidos por los PNSs Cr.19: 19403681T>C, c.1543A>G y c.1536C>T del gen *NOS2* estos fueron TAC, CAC, TGT y TAT existentes en el 61 por ciento, 28 por ciento, 6 por ciento y 5 por ciento del grupo; mientras que en los bovinos criollos se observó un bloque conformado por los dos últimos PNSs del gen *NOS2*, antes referidos, encontrándose tres haplotipos AC, AT, GT en el 78 por ciento, 16 por ciento y 6 por ciento de los animales de este grupo.

Otro análisis para identificar haplotipos, considerando esta vez a los 10 PNSs de los cuatro genes estudiados, permitió identificar un haplotipo común a los cinco grupos de estudio, este fue CGGGTACGCC constituido por los PNSs: 1: *VEGFA* c.2262C>T, 2: *VEGFA* c.2316G>A, 3: *VEGFA* Cr.23: 17296897G>T, 4: *NOS2* Cr.19: 19403571G>A, 5: *NOS2* Cr.19: 19403681T>C, 6: *NOS2* c.1543A>G, 7: *NOS2* c.1536C>T, 8: *EPAS1* c.1081G>C, 9: *EPO* Cr.25: 35873425C>T y 10: *EPO* c.457C>T. Sin embargo, la frecuencia del mismo varió entre grupos, observándose que en bovinos BSMA y BSHbA, esta fue de 0.51 y 0.55 mientras que en bovinos BSHbB, CRHbA y CRHbB, su frecuencia fue de 0.35, 0.35 y 0.33 respectivamente. También se identificaron dos haplotipos propios de bovinos criollos, el primero CGGGTATGCC con frecuencias de 0.15 en CRHbA y 0.13 en CRHbB y el segundo CGGGTACGTC con frecuencias de 0.13 en CRHbA y 0.08 en CRHbB. No se identificó un haplotipo que fuera único para el grupo de bovinos BSMA que tuviera una frecuencia alta como para ser considerado que este asociado con dicho grupo de animales.

Tabla 10: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs no sinónimos observados en bovinos criados en los Andes

N°	GEN	Posición (ARS-UCD1.2)	Exón	Alelos	Concentración media de Hb				Tipo de bovinos					
					Alto (n:34) (15.25 ±0.81 g/dL)		Bajo (n:31) (9.59 ±1.40 g/dL)		G test Pval	Criollo (n:25)		Brown Swiss (n:31)		G test Pval
					HW Pval	MAF	HW Pval	MAF		HW Pval	MAF	HW Pval	MAF	
1	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28809802	7	G>C	1.00	0.041	0.13	0.087	0.427	0.20	0.100	1.00	0.029	0.124
2	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403571	Intrón 12	G>A	1.00	0.136	1.00	0.136	1.000	1.00	0.140	1.00	0.133	1.000
3	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403681	Intrón 12	T>C	0.56	0.182	0.54	0.227	0.630	1.00	0.100	0.62	0.283	0.017
4	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403710	12	A>G	1.00	0.061	1.00	0.068	1.000	1.00	0.060	1.00	0.067	1.000
5	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403717	12	C>T	0.55	0.152	0.54	0.182	0.794	0.55	0.220	1.00	0.117	0.197
6	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873425	5	C>T	1.00	0.203	1.00	0.150	0.619	1.00	0.208	0.56	0.167	0.632
7	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873867	5	C>T	1.00	0.081	--	0.025	0.278	1.00	0.083	1.00	0.046	0.452
8	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296719	7	C>T	1.00	0.106	1.00	0.068	0.528	1.00	0.063	1.00	0.113	0.509
9	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296773	7	G>A	1.00	0.121	1.00	0.136	1.000	1.00	0.146	1.00	0.113	0.577
10	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296897	7	G>T	0.22	0.091	0.65	0.136	0.541	1.00	0.063	0.09	0.145	0.228
CONJUNTO					0.99		0.96		0.993	0.99		0.93		0.409

Hemoglobina (Hb), equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), frecuencia de alelo menor (MAF), valor de probabilidad (Pval)

Tabla 11: Frecuencia del alelo menor (MAF) y equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de PNSs por nivel de hemoglobina en grupos evaluados

N°	Gen	Posición (ARS-UCD1.2)	Exón	Alelos	Grupos de bovinos										G test Pval
					BSMA (n: 11)		BSHbA (n: 13)		BSHbB (n: 11)		CRHbA (n: 13)		CRHbB (n: 12)		
					HW Pval	MAF	HW Pval	MAF	HW Pval	MAF	HW Pval	MAF	HW Pval	MAF	
1	<i>EPASI</i>	Cr.11: 28809802	7	G>C	--	0.046	--	0.039	--	0.000	--	0.039	0.25	0.167	0.255
2	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403571	Intrón 12	G>A	1.00	0.278	--	0.046	1.00	0.100	1.00	0.115	1.00	0.167	0.334
3	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403681	Intrón 12	T>C	0.46	0.333	1.00	0.182	0.22	0.350	1.00	0.077	1.00	0.125	0.103
4	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403710	12	A>G	--	0.000	1.00	0.091	1.00	0.100	1.00	0.077	--	0.042	0.737
5	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403717	12	C>T	--	0.056	1.00	0.182	1.00	0.100	0.37	0.192	1.00	0.250	0.447
6	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873425	5	C>T	1.00	0.091	1.00	0.231	1.00	0.167	1.00	0.269	1.00	0.136	0.525
7	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873867	5	C>T	--	0.000	1.00	0.077	--	0.056	1.00	0.154	--	0.000	0.117
8	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296719	7	C>T	1.00	0.150	1.00	0.091	1.00	0.100	1.00	0.083	--	0.042	0.835
9	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296773	7	G>A	1.00	0.100	1.00	0.091	1.00	0.150	1.00	0.167	1.00	0.125	0.946
10	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296897	7	G>T	--	0.050	--	0.182	--	0.200	--	0.042	--	0.083	0.365
CONJUNTO					0.999		1.000		0.993		1.000		0.999		0.255

BSMA: Brown Swiss con mal de altura, BSHbA: Brown Swiss con hemoglobina alta, BSHbB: Brown Swiss con hemoglobina baja, CRHbA: Criollo con hemoglobina alta, CRHbB: Criollo con hemoglobina baja

La elección de exones para amplificar en los grupos locales de bovinos criollos y Brown Swiss criados en los Andes se basó en la identificación de PNSs no sinónimos existentes en los 41 genomas bovinos de la base datos SRA del NCBI. Para el caso del gen *EPAS1* los resultados fueron concordantes con los de Newman *et al.* (2015) y Heaton *et al.* (2016), en lo que se refiere a PNSs del exón 12, además se evidenció la ausencia de PNSs en las posiciones c.2089G>A y c.2101G>A en muestras de bovinos de tipo lechero, por ello no se incluyó dicho exón en el análisis de las muestras de criollos y Brown Swiss locales. Sin embargo, esto no implica que no existan dichas variantes en bovinos criollos, quedando pendiente el hacer dicha evaluación.

La variante del gen *EPAS1* ubicada en la posición c.1081G>C del exón 7 que genera un cambio en p.E270Q, está presente en los genomas bovinos Holstein y Jersey y aunque no fue identificada en bovinos Brown Swiss (Tabla 9), se decidió analizarla. Ello permitió identificar dicho PNS en bovinos Brown Swiss y criollos, aunque el mismo se encontró en baja frecuencia en ambos grupos; no se pudo evidenciar una diferencia entre dichos grupos, tampoco se pudo observar una diferencia significativa ($p > 0.05$) cuando se compararon los grupos formados en base a la concentración de Hb. Hay que tomar en consideración que en este estudio se analizaron pocas muestras de ADN por grupo.

Un PNS que tuvo frecuencia alélica diferente entre bovinos criollos y Brown Swiss fue el Cr.19: 19403681T>C del gen *NOS2* ($P < 0.05$), dicho PNS se ubica en una región intrónica, pero de acuerdo a los resultados de este estudio, el mismo está ligado con PNSs identificados en regiones exónicas del mismo gen. Como se sabe el gen *NOS2* está más vinculado con la respuesta inflamatoria (Accinelli y Lopez 2018) y su transcripción está regulada por el incremento de las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interleucina beta ($IL-\beta$) en células endoteliales vasculares (Zulueta *et al.* 2002). Además, el óxido nítrico (NO) tiene efecto sobre el desarrollo de tejido muscular y endotelial vascular, participando en la regulación del tono vascular entre otras funciones (Zhao *et al.* 2015). Debido a la importancia de estas funciones y considerando los procesos inflamatorios relacionados con el síndrome de mal de altura, se esperaba encontrar alguna asociación entre los PNSs del gen *NOS2* con el grupo de bovinos BSMA que los diferenciara de los cuatro grupos de bovinos criollos y Brown Swiss agrupados considerando su concentración de Hb. Al no detectar la asociación esperada, este resultado nos guía a tener que analizar las posibles diferencias en la expresión génica de

genes inducibles por hipoxia, entre los grupos considerados; esta es una alternativa de trabajo en relación a estudios de adaptación a condiciones de altura (Verma *et al.* 2018). Ello permitirá entender que mecanismos potenciadores o inhibidores del gen *NOS2* controlan su expresión, así como la de muchos otros genes que participan en este proceso.

Por otro lado, la evaluación de haplotipos considerando a los 10 PNSs no permitió identificar un haplotipo propio de los bovinos BSMA que pudiera tener una alta frecuencia en dicho grupo y aunque se pudieron identificar dos haplotipos propios para bovinos criollos, la suma de ambas frecuencias observadas en CRHbA y CRHbB, estuvo en un rango entre 21 y 28 por ciento, por lo que no son haplotipos referenciales para dicha población.

Considerando los aspectos antes referidos, sería conveniente poder desarrollar un estudio de GWAS como aquellos realizados por Wei *et al.* (2016) o Liu *et al.* (2019) en ovinos y equinos respectivamente, que incluya mayor número de bovinos a analizar y que a su vez tenga que considerarse primordial la colecta de información fenotípica referida a diferentes características fisiológicas que se presentan en el síndrome de mal de altura o que sean propias de animales poco susceptibles a padecer problemas relacionados con entornos de altitud, de la misma forma en que se hacen estos estudios para características de interés productivo o de adaptación ambiental (De León *et al.* 2019; Martínez *et al.* 2014). Esto permitiría poder identificar PNSs en genes de efecto mayor o que puedan estar implicados en los procesos metabólicos intermedios del síndrome de mal de altura y en la adaptación de poblaciones bovinas locales a dicho entorno ambiental.

V. CONCLUSIONES

1. Se observaron diferencias en los valores de recuento de glóbulos rojos (RGR), hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM) entre bovinos Brown Swiss de zonas altas (BSZA) y criollos de zonas altas (CRIZA). Siendo la diferencia del VCM fue 11.43 por ciento más alta en CRIZA que en bovinos BSZA, además la correlación inversa entre el RGR y VCM fue más alta en los bovinos criollos.
2. Los valores de RGR, hematocrito (Ht) y recuento de glóbulos blancos (RGB) en bovinos Brown Swiss con mal de altura (BSMA) fueron más altos que el resto de los grupos estudiados, incluidos de los bovinos Brown Swiss de zonas altas con valores hematológicos extremos (BSZAVE) y criollos criados en el mismo ambiente y con valores hematológicos extremos (CRIZAVE), además, el VCM de BSMA fue mucho menor que en los dos grupos extremos, por lo que podrían considerarse como indicadores de la susceptibilidad ante condiciones de hipoxia por altitud.
3. No se identificaron PNSs en las cuatro regiones exónicas estudiadas de los genes *EPAS1*, *EPO*, *NOS2* y *VEGFA* que estuvieran asociados con la variación extrema de Hb, ni con el mal de altura, en los bovinos locales que fueron evaluados.
4. Considerando los 10 PNSs de genes *EPAS1*, *EPO*, *NOS2* y *VEGFA* estudiados en bovinos locales, se pudieron identificar dos haplotipos propios de bovinos criollos, presentes en bajas frecuencias, sin embargo, no se pudo identificar un haplotipo propio de bovinos Brown Swiss con mal de altura.

VI. RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios de correlación entre las constantes hematológicas, grado de deformidad de glóbulos rojos, índice cardíaco y corporales además de presión arterial pulmonar en bovinos criollos y Brown Swiss criados en condiciones altoandinas, a fin de relacionarlas con la medición de presión arterial pulmonar (PAP) que en la actualidad es la técnica más usada, como prueba general, para determinar la susceptibilidad a la hipoxia por altitud en bovinos.
2. Efectuar estudios de asociación empleando micro matrices de PNSs de alta densidad, o secuenciaciones de genoma completo, a fin de poder cubrir el genoma de los bovinos y tener una mayor posibilidad de identificar regiones genómicas asociadas con el mal de altura e identificar genes candidatos estén asociados con esta condición.
3. Evaluar la expresión diferencial de los genes aquí estudiados o del exoma completo en grupos de bovinos criollos, Brown Swiss y Brown Swiss con mal de altura, con la finalidad de identificar regiones reguladoras y mecanismos de regulación metabólica intermedia, que pudieran contribuir a la susceptibilidad al mal de altura en bovinos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayón, M; Cueva S. 1998. Adaptación del ganado bovino a la altura. Pub. Téc. N° 38. Facultad de medicina veterinaria. Universidad nacional mayor de san Marcos. UNMSM. Lima. p.15.

Accinelli, RA; López, LM. 2018. Enfermedades por exposición a la altura. Archivos de Bronconeumología. 54(3): 115–116. DOI: 10.1016/j.arbres.2017.06.002

Aquino, YN; Veli, EA; Rivas, E; Rivas Palma, V; Estrada, R. 2008. Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú, utilizando marcadores microsatélites. Arch. Zootec. 57(219): 337-340.

Arregui, A; León-Velarde, F; Monge, C. 1990. Mal de montaña crónico entre mineros de Cerro de Pasco: Evidencias epidemiológicas y fisiológicas. Rev Med Hered 1990. 1(1).

Bain, BJ; Bates, I. 2011. Basic haematological techniques. En: Dacie and Lewis Ed. Practical Haematology. 11th Edition. Elsevier Churchill Livingstone. Edinburgh. p 23–56.

Barari, SK; Biswas, D; Pal, RN. 1995. Normal Hemogram of Yak (*Bos grunniens*). Journal of Applied Animal Research. 7(1): 99-103. DOI: 10.1080/09712119.1995.9706056

Barer, GR; Bee, D; Wach, RA. 1983. Contribution of polycythaemia to pulmonary hypertension in simulated high altitude in rats. J. Physiol. 336: 27-38. DOI: 10.1113/jphysiol.1983.sp014563

Barret, JC; Fry, B; Maller, J; Daly, MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 21(2): 263-265. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth457

Bärtsch, P; Mairbäurl, H; Maggiorini, M; Swenson, E. 2005. Physiological aspects of high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol.* 98(3): 1101-1110. DOI: 10.1152/jappphysiol.01167.2004.

Bärtsch, P; Gibbs, JSR. 2007. Effect of Altitude on the Heart and the Lungs. *Circulation.* 116(19): 2191–2202. doi:10.1161/circulationaha.106.650796

Beteta, D. 2021. Productividad lechera de vacas Brown Swiss en un establo de la costa. Tesis ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima. Perú. 61p.

Beteta, M. 2007. Las razas autóctonas españolas y su participación en los bovinos criollos iberoamericanos. APPA - ALPA – Cusco. Perú.

BCF Tools. 2019. Broad Institute. GitHub Repository. <http://samtools.github.io/bcftools/>; Broad Institute.

Bianca, W; Näf, F. 1979. Responses of Cattle to the Combined Exposure to Diurnal Temperature Rhythm (--5 to 25 ° C) and to Simulated High-Altitude (4,000 m). *Int. J. Biometeor.* 23(4): 299-310.

Broucek, J; Ryba, S; Dianova, M, Uhrincat, M; Soch, M; Sistkova, M; Mala, M; Novak, P. 2020. Effect of evaporative cooling and altitude on dairy cows milk efficiency in lowlands. *International Journal of Biometeorology.*64(3):433-444. DOI: 10.1007/s00484-019-01828-5

Bueno, W. 2018. Índices productivos y reproductivos en vacunos Brown Swiss, Jersey y Holstein en altura - Cooperativa Atahualpa Jerusalén, Cajamarca 1999 – 2013. Tesis Magister Scientiae. Lima. Universidad Nacional Agraria la Molina. 169 p.

Catari, Y. 2018 Eficiencia biológica lechera de vacas Brown Swiss a la primera lactación del CIP Chuquibambilla, años 2010 - 2016. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Puno. Universidad Nacional del Altiplano. 91 p.

Chauca, D; Bligh, J. 1976. And additive effect of cold exposure and hypoxia on pulmonary artery pressure in sheep. *Research in Veterinary Science.* 21: 123-124.

Censo Nacional Agropecuario “CENAGRO”. 1994. Instituto nacional de estadísticas e informática. INEI. [Internet]. [11 mayo 2019]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/bcoCuadros/IIIcenagro.htm>

Censo Nacional Agropecuario. “CENAGRO”. 2012. Instituto Nacional de Estadísticas e Informática. INEI. [Internet]. [11 mayo 2019]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/?id=CensosNacionales>

Claxton, JR; Ortiz, P. 1996. Haematological parameters in Brown Swiss and Holstein cattle at high altitude. *Tropical Animal Health and Production*. 28: 112-116. DOI: 10.1007/BF02250734

Cuba, A. 2014. Estudio comparativo del mal de montaña. *Anales de la Facultad de Medicina*, 39(3): 1104-1127. DOI: 10.15381/anales.v39i3.10833

Das, A; Panitz, F; Gregersen, VR; Bendixen, C; Holm, L. 2015. Deep sequencing of Danish Holstein dairy cattle for variant detection and insight into potential loss-of-function variants in protein coding genes. *BMC Genomics* 16:1043. DOI: 10.1186/s12864-015-2249-y

De León, C; Manrique, C; Martinez, R; Rocha, JF. 2019. Genomic association study for adaptability traits in four Colombian cattle breeds. *Genetics and Molecular Research* 18 (3): gmr18373. DOI: 10.4238/gmr18373

Durmowicz, AG; Hofmeister, S; Kadyraliev, TK; Aldashev, AA; Stenmark, KR. 1993. Functional and structural adaptation of the Yak pulmonary circulation to residence at high altitude. *Journal of Applied Physiology*. 74(5): 2276-2285. DOI: 10.1152/jappl.1993.74.5.2276

Dolt, KS; Mishra, MK; Karar, J; Baig, MA; Ahmed, Z; Qadar Pasha, MA. 2007. cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 α in high altitude yak (*Bos grunniens*). *Gene*. 386: 73–80.

Durán, M; Román, SI; Ruiz, FJ; González, E; Vásquez, CG; Bagnato, A; Strillacci, MG. 2017. Genome-wide association study for milk somatic cell score in Holstein cattle using copy number variation as markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 134(1): 49-59. DOI:10.1111/jbg.12238

Ebrahimi, S; Bagchi, PA. 2022. Computational study of red blood cell deformability effect on hemodynamic alteration in capillary vessel networks. *Sci Rep.* 12. 4304. DOI:10.1038/s41598-022-08357-z

Escalante, L. 2017. Valores hematológicos, bioquímicos sanguíneos y urinarios en crías de alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) menores de dos meses. Tesis para optar título de Médico veterinario-Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano. Puno. Perú. 111p.

Foster, A; Bidewell, C; Barnett, J; Sayer, R. 2009. Haematology and biochemistry in alpacas and llamas. *In Practice* 31: 276-281.

Foster, HV; Bisgard, GE; Klein JE. 1981. Effect of peripheral chemoreceptor denervation on acclimatization of goats during hypoxia. *Journal of applied physiology.* 50(2): 392–398. DOI:10.1152/jappl.1981.50.2.392

Fowler, ME. 1994. Hyperthermia in llamas and alpacas. *The veterinary clinics of North America. Food Animal Practice* 10, 309–317. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30564-8.

Garayar, C. 2003. Atlas departamental del Perú: Ayacucho. Edit. PEISA S.A.C. Lima. Perú. ISBN 9972-40-265-7

Gerken, M. 2010. Relationships between integumental characteristics and thermoregulation in South American camelids. *Animal.* 4(9): 1451–1459. doi:10.1017/S1751731109991443

Gorkhali, NA; Dong, K; Yang, M; Song, S; Kader, A; Shrestha, BS; He, X; Zhao, Q; Pu, Y; Li, X; Kijas, J; Guan, W; Han, J; Jiang, L; Ma, Y. 2016. Genomic analysis identified a potential novel molecular mechanism for high-altitude adaptation in sheep at the Himalayas. *Scientific Reports.* |6:29963| P. 1-10. DOI: 10.1038/Srep29963

Graham, AM; McCracken, KG. 2019 Convergent evolution on the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway genes *EGLN1* and *EPAS1* in high-altitude ducks. *Heredity* 122: 819–832. DOI: 10.1038/s41437-018-0173-z

Gulick, AK; Garry, FB; Holt, TN; Retallick-Trennepohl, K; Enns, RM; Thomas, MG; Neary, JM. 2016. Angus calves born and raised at high altitude adapt to hypobaric

hypoxia by increasing alveolar ventilation rate but not hematocrit. *Journal of Animal Science*. 94(10): 4167-4171. DOI: 10.2527/jas.2016-0718

Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Han, XT; Xie, AY; Bi, XC; Liu, SJ; Hu, LH. (2003) Effects of altitude, ambient temperature and solar radiation on fasting heat production in yellow cattle (*Bos taurus*). *British Journal of Nutrition* 89. 399–407. DOI: 10.1079/BJN2003783

Heaton, MP; Smith, TPL; Carnahan, JK; Basnayake, V; Qiu, J; Simpson, B; Kalbfleisch, TS. 2016. Using diverse U.S. beef cattle genomes to identify missense mutations in *EPAS1*, a gene associated with pulmonary hypertension. *F1000Research* 5:2003. 1-23. DOI: 10.12688/f1000research.9254.2

Heinicke, K; Prommer, N; Cajigal, J; Viola, T; Behn, C; Schmidt, W. 2003. Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur J Appl Physiol.* 88: 535–543. DOI 10.1007/s00421-002-0732-z

Holt, TN; Callan, RJ. 2007. Pulmonary Arterial Pressure Testing for High Mountain Disease in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 23(3): 575–596. DOI: 10.1016/j.cvfa.2007.08.001

Jefferson, JA; Escudero, E; Hurtado, ME; Pando, J; Tapia, R; Swenson, ER; Prchal, J; Schreiner, GF; Schoene, RB; Hurtado, A; Johnson, RJ. 2002. Excessive erythrocytosis, chronic mountain sickness, and serum cobalt levels. *Lancet.* 359: 407-408. DOI: 10.1016/s0140-6736(02)07594-3.

Kent, WJ; Sugnet, CW; Furey, TS; Roskin, KM; Pringle, TH; Zahler, AM; Haussler, D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.*12(6): 996-1006. DOI: 10.1101/gr.229102.

Ke, J; Wang, L; Xiao, D. 2017. Cardiovascular Adaptation to High-Altitude Hypoxia. *Hypoxia and Human Diseases.* Chapter 6. 117-124. DOI: 10.5772/65354

- Kessel, A. 2015. Bovine Haematology and Biochemistry. En: Peter Cockcroft ed. Bovine Medicine. 3rd Edition. Wiley-Blackwell. p 146 – 160.
- Kreuzer, M; Langhans, W; Sutter, F; Christen, RE; Leuenberger, H; Kunz, PL. 1998. Metabolic response of early-lactating cows exposed to transport and high altitude grazing conditions. *Animal Science*. 67 (2): 237 – 248. DOI: 10.1017/S1357729800009991.
- Kroll, J; Waltenberger, J. 1998. VEGF-a induces expression of *eNOS* and *iNOS* in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochemical and biophysical research communications*. 252 (3): 743-746.
- Kumar, B; Pachauri, SP. 2000. Haematological profile of crossbred dairy cattle to monitor herd health status at medium elevation in Central Himalayas. *Research in Veterinary Science*. 69. 141-145. DOI:10.1053/rvsc.2000.0400
- Kumari, P; Bharti, V; Kumar, D; Mukesh, M; Sharma, I. 2020. Haematological and biochemical profiling of Ladakhi cow: A native cattle of high altitude Leh-Ladakh, India. *Indian Journal of Animal Sciences*. 90(4): 599–602.
- Leiber, F; Kreuzer, M; Leuenbenger, H; Wettstein, HR. 2005. Contribution of diet type and pasture conditions to the influence of high altitude grazing on intake, performance and composition and renneting properties of the milk of cows. *Animal Reserarch*. 55(1). 37–53. DOI: 10.1051/animres:2005041
- León, C. 2018. Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria y Avícola 2017. Edit. MINAGRI. Lima. Perú. 153 p.
- León-Velarde, F; Gamboa, A; Chuqiza, J; Esteba, W; Rivera-Chira, M; Monge, C. 2000. Hematological parameters in high altitude residents living at 4355, 4660, and 5500 meters above sea level. *High Altitude Medicine & Biology*. 1(2): 97-104. DOI: 10.1089/1527029005007423
- Li, H; Durbin, R. 2010. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 26 (5): 589-595. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698

Li, H; Handsaker, B; Wysoker, A; Fennell, T; Ruan, J; Homer, N; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25(16): 2078–2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352

Liu, X; Zhang, Y; Li, Y; Pan, J; Wang, D; Chen, W; Zheng, Z; He, H; Zhao, Q; Pu, Y; Guan, W; Han, J; Orlando, L; Ma, Y; Jiang, L. 2019. *EPAS1* gain-of-function mutation contributes to high-altitude adaptation in Tibetan horses. *Molecular Biology and Evolution*. 36(11): 2591–2603. DOI: 10.1093/molbev/msz158

Martínez, R; Gómez, Y; Rocha, JFM. 2014. Genome-wide association study on growth traits in Colombian creole breeds and crossbreeds with Zebu cattle. *Genetics and Molecular Research* 13(3): 6420-6432. DOI: 10.4238/2014.August.25.5

Moncaleano, JS. 2011. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple de los genes endotelina 1, óxido nítrico sintasa endotelial y factor inducible por hipoxia 1 α , con síndrome de hipertensión pulmonar en pollos de engorde. Tesis de magister en producción animal. Genética y mejoramiento animal. Universidad Nacional de Colombia. 85 p.

Ministerio de Agricultura y Riego “MINAGRI”. 2017. Estudio de la Ganadería Lechera en el Perú. Análisis de su Estructura, Dinámica y Propuestas de Desarrollo. Edit. MINAGRI. 1ra Edición. Lima. Perú. 80 p.

Monge, C; León-Velarde, F. 1991. Physiological adaptation to high altitude: Oxygen transport in mammals and birds. *Physiological reviews* 71(4): 1135-1172. DOI: 10.1152/physrev.1991.71.4.1135

Nader, E; Skinner, S; Romana, M; Fort, R; Lemonne, N; Guillot, N; Gauthier, A; Antoine-Jonville, S; Renoux, C; Hardy-Dessources, M; Stauffer, E; Joly, P; Bertrand, Y; Connes, P. 2019. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sickle Cell Disease and Effects of Exercise. *Front. Physiol.* 10. 1329. doi: 10.3389/fphys.2019.01329

Newman, JH; Holt, TN; Cogan, JD; Womack, B; Phillips III, JA; Li, C; Kendall, Z; Stenmark, KR; Thomas, MG; Brown, RD; Riddle, SR; West, JD; Hamid, R. 2015. Increased prevalence of *EPAS1* variant in cattle with high-altitude pulmonary hypertension. *Nature communications*. |6:6863|.1-5. DOI:10.1038/ncomms7863

Newman, JH; Holt, TN; Hedges, LK; Womack, B; Memon, SS; Willers, ED; Wheeler, L; Phillips-III, JA; Hamid, R. 2011. High-altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease): Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Pulmonary Circulation*. 1(4): 462-469. DOI:10.4103/2045-8932.93545

O'Brien, KA; Simonson, TS; Murray, AJ. 2020. Metabolic adaptation to high altitude. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. 11: 33-41. DOI: 10.1016/j.coemr.2019.12.002

Ocampo, NR. 2004. Determinación de valores hematológicos en bovinos Jersey tratados con Ketoprofeno y sometidos a condiciones de hipoxia crónica. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 61p.

Ocampo, N; Vasquez, M; Ayón, M; Lira, B. 2011. Valores hematológicos de bovinos jersey sometidos a condiciones de hipoxia crónica de la altura. *Revista electrónica de Veterinaria*. 12(7): 1-10.

Ortiz, D; Camacho, J; Echevarría, L. 2009. Parámetros reproductivos del ganado vacuno en la cuenca lechera de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 20 (2): 196-202.

Piccinini, M; Kleinschmidt, T; Jurgens, KD; Braunitzer, G. 1990. Primary structure and oxygen-binding properties of the hemoglobin from guanaco (*Lama guanacoe*, Tylopoda). *Biol. Chem Hoppe Seyler* 371, 641–648. DOI: 10.1515/bchm3.1990.371.2.641

Palmer, LA; Semenza, GL; Stoler, MH; Johns, RA. 1998. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 274: 1212-1219.

Papanek, PE; Wood, CE; Fregly, MJ. 1991. Role of the sympathetic nervous system in cold-induced hypertension in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*. 71(1): 300-306. doi: 10.1152/jappl.1991.71.1.300. PMID: 1917754.

Pauling, RC; Speidel, SE; Thomas, MG; Holt, TN. Enns, RM. 2018. Evaluation of moderate to high elevation effects on pulmonary arterial pressure measures in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 96(9): 3599-3605. DOI: 10.1093/jas/sky262

Picard Toolkit. 2019. Broad Institute, GitHub Repository. <http://broadinstitute.github.io/picard/>; Broad Institute.

Primo, AT. 1992. El ganado bovino ibérico en las américas: 500 años después. Archivos de Zootecnia. 41. (extra): 421-432.

Pulgar-Vidal, J. 1987. Geografía del Perú. Las ocho regiones naturales. Edit. PEISA S.A.C. Lima. Perú. p. 304.

Qiao, GH; Yu, CQ; Li, JH; Yang, X; Zhu, XQ; Zhou, XH. 2013. Effect of high altitude on nutrient digestibility, rumen fermentation and basal metabolism rate in Chinese Holstein cows on the Tibetan plateau. *Animal Production Science*, 53. 240–246. DOI: 10.1071/AN12109

Quispe, JE; Apaza, E; Chambilla, P; Sapaná, R. 2014. Índices reproductivos y productivos en un hato de bovinos criollo del altiplano peruano. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 16(2): 49-56.

Quispe, JE. 2016. El bovino criollo del altiplano peruano: Origen, producción y perspectivas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 18.(3): 257 – 270.

Quispe, JE; Belizario, C; Apaza, C; Maquera, Z; Quisocala, V. 2016. Desempeño productivo de vacunos Brown Swiss en el altiplano peruano. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 18(4): 411 - 422.

Reeves, JT; Grover, EB; Grover RF. 1963. Pulmonary circulation and oxygen transport in lambs at high altitude. *J Appl Physiol* 18(3): 560–566, DOI: 10.1152/jappl.1963.18.3.560

Riek, A; Stölzl, A; Bernedo, RM; Ruf, T; Arnold, W; Hambly, C; Speakman, JR; Gerken, M. 2019. Energy expenditure and body temperature variations in llamas living in the High Andes of Peru. *Scientific Reports*. 9. 4037.

Rhodes J. 2005. Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J Appl Physiol* (Bethesda, Md.: 1985). 98(3):1092-100. DOI: 10.1152/japplphysiol.01017.2004.

Roland, L; Drillich, M; Iwersen, M. 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26(5): 592–598.

Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8(1):103–106. DOI:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Sánchez-Bruno, A; Borges, A. 2005. Transformación Z de Fisher para la determinación de intervalos de confianza del coeficiente de correlación de Pearson. *Psicothema*. 17(1): 148-153.

Semenza, Gl. 2005. Pulmonary Vascular Responses to Chronic Hypoxia Mediated by Hypoxia-inducible Factor 1. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(1): 68–70. DOI: 10.1513/pats.200404-029MS

Sharma, A; Kumar, P; Singh, M; Vasishta, NK. 2015. Haemato-biochemical and endocrine profiling of north western Himalayan Gaddi sheep during various physiological/reproductive phases. *Open Veterinary Journal*. 5(2): 103-107.

Shao, Y; Wellman, TL; Lounsbury, KM; Zhao, F. 2014. Differential regulation of *GLUT1* and *GLUT8* expression by hypoxia in mammary epithelial cells. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 307(3): R237–R247. DOI: 10.1152/ajpregu.00093.2014

Sharp, D; Curb, D; Schatz, IJ; Meiselman, HJ; Fisher, TC; Burchfiel, CM; Rodriguez, BL; Yano, K. 1996. Mean Red Cell Volume as a Correlate of Blood Pressure. *Circulation*. 93(9): 1677–1684. DOI: 10.1161/01.CIR.93.9.1677

Shevkoplyas, SS; Yoshida, T; Gifford, SC; Bitensky, MW. 2016. Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device. *Lab Chip*. 6(7): 914-920. DOI: 10.1039/b601554a.

Shimoda, LA; Manalo, DJ; Sham, JSK; Semenza, GL; Sylvester, JT. 2001. Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 281: 1202-1208. DOI: 10.1152/ajplung.2001.281.1.L202

Shirley, KL; Beckman, DW; Garrick, DJ. 2008. Inheritance pulmonary arterial pressure in angus cattle and its correlation with growth. *Journal of Animal Science*. 86: 815-819. DOI: 10.2527/jas.2007-0270

Sievers, F; Wilm, A; Dineen, DG; Gibson, TJ; Karplus, K; Li, W; Lopez, R; McWilliam, H; Remmert, M; Söding, J; Thompson, JD; Higgins, DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539 doi:10.1038/msb.2011.75

Simonson, TS; Yang, Y; Huff, CD; Yun, H; Qin, G; Witherspoon, DJ; Bai, Z; Lorenzo, FR; Xing, J; Jorde, LB; Prchall, JT; Ge, R. 2010. Genetic evidence for high altitude adaptation in Tibet. *Science* 329(5987):72–75. DOI: 10.1126/science.1189406

Slessarev, M; Prisman, E; Ito, S; Watson, RR; Jensen, D; Preiss, D; Greene, R; Norboo, T; Stobdan, T; Diskit, D; Norboo, A; Kunzang, M; Appenzeller, O; Duffin, J; Fisher, JA. 2010. Differences in the control of breathing between Himalayan and sea-level residents. *J Physiol*. 588(9):1591-1606. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.185504.

Sokal, RR; Rohlf, FJ. 1995. *Biometry*. 3rd Edition. New York: W.H. Freeman and Company. 887 p.

Storz, JF; Moriyama, H. 2008. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. *High Alt Med Biol*. 9(2):148-157. DOI: 10.1089/ham.2007.1079.

Stothard, P; Liao, X; Arantes, AS; De Pauw, M; Coros, C; Plastow, GS; Sargolzaei, M; Crowley, JJ; Basarab, JA; Schenkel, F; Moore, S; Miller, SP. 2015. A large and diverse collection of bovine genome sequences from the Canadian Cattle Genome Project. *Gigascience*. 4: 49. DOI: 10.1186/s13742-015-0090-5

Tallacagua, R; Mamani, R. 2017. Determinación de los parámetros bioquímicos sanguíneos y hematología, en Llamas (*Lama glama*) en el Altiplano central, La Paz. *Apthapi* 3(3): 693-701.

Tenopoulou, M; Doulias, PT. 2020. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-1190. doi: 10.12688/f1000research.19998.1

- Tibbo, M; Aragaw, K; Abunna, F; Woldemeskel, M; Deressa, A; Lemma, M; Rege, JEO. 2004. Factors affecting haematological profiles in three indigenous Ethiopian sheep breeds. *Comp Clin Path* 13: 119–127. DOI 10.1007/s00580-004-0525-3
- Turkson, P; Ganyo, E. 2015. Relationship between haemoglobin concentration and packed cell volume in cattle blood samples. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 82(1) Art. 863. 5 p. DOI:10.4102/ojvr.v82i1.863.
- Valenzuela, H; Baquerizo, M; Ramirez, I; Pantoja, C; Rojas, F; Huayre, R; Reina, J; Alata, Y; Palomino, S; Eulogio, J; Rojas, E. 2017. Estudio de la prevalencia del mal de altura en ganado vacuno de la raza Brown Swiss, de la sierra central de Perú. *Ciencia y Desarrollo* 20 (2):17-23.
- Ventura-León, T; Caycho, T. 2017. Q de Cohen: Comparación de Correlaciones entre Muestras Independientes en base a Urzúa et al. *Rev. méd. Chile.* 145(3):410-412. DOI: 10.4067/S0034-98872017000300020
- Verma, P; Sharma, A; Sodhi, M; Thakur, K; Bharti, VK; Kumar, P; Giri, A; Kalia, S; Swami, SK; Mukesh, M. 2018. Overexpression of genes associated with hypoxia in cattle adapted to Trans Himalayan region of Ladakh. *Cell Biology International.* 42: 1141–1148. DOI: 10.1002/cbin.10981
- Vogel, J; Kiessling, I; Heinicke, K; Stallmach, T; Ossent, P; Vogel, P; Aulmann, M; Frietsch, T; Schmid-Schönbein, H; Kuschinsky, W; Gassmann, M. 2003. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood.* 102 (6): 2278-2284.
- von Tempelhoff; GF; Schelkunov, O; Demirhan, A; Tsikouras, P; Rath, W; Velten, E; Csorba, R. 2016. Correlation between blood rheological properties and red blood cell indices (MCH, MCV, MCHC) in healthy women. *Clin Hemorheol Microcirc.* 62(1): 45-54. DOI: 10.3233/CH-151944.
- Wang, DP; Li, HG; Li, YJ; Guo, SC; Yang, J; Qi, DL; Jin, C; Zhao, XQ. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 α cDNA cloning and its mRNA and protein tissue specific expression in domestic Yak (*Bos grunniens*) from Qinghai-tibetan plateau. *Biochemical and biophysical Research Communications.* 348: 310–319. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.07.064

Wang, GD; Fan, RX; Zhai, W; Liu, F; Wang, L; Zhong, L; Wu, H; Yang, HC; Wu, SF; Zhu, CL; Li, Y; Gao, Y; Ge, RL; Wu, CI; Zhang, YP. 2014. Genetic convergence in the adaptation of dogs and humans to the high-altitude environment of the Tibetan plateau. *Genome Biology and Evolution*. 6(8): 2122–2128. DOI: 10.1093/gbe/evu162

Wei, C; Wang, H; Liu, G; Zhao, F; Kijas, JW; Ma, Y; Lu, J; Zhang, L; Cao, J; Wu, M; Wang, G; Liu, R; Liu, Z; Zhang, S; Liu, C; Du, L. 2016. Genome-wide analysis reveals adaptation to high altitudes in Tibetan sheep. *Scientific Reports* 6: 26770. DOI: 10.1038/srep26770

Will, DH; Horrell, JF; Reeves, JT; Alexander, AF. 1975. Influence of Altitude and Age on Pulmonary Arterial Pressure in Cattle. *Experimental Biology and Medicine*. 150(3): 564–567. doi:10.3181/00379727-150-39079

Wuletaw, Z; Wurzinger, M; Holt, T; Dessie, T; Sölkner, J. 2011. Assessment of physiological adaptation of indigenous and crossbred cattle to hypoxic environment in Ethiopia. *Livestock Science*. 138: 96–104. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.12.005

Yang, J; Li, WR; Lv, FH; He, SG; Tian, SL; Peng, WF; Sun, YW; Zhao, YX; Tu, XL; Zhang, M; Xie, XL; Wang, YT; Li, JQ; Liu, YG; Shen, ZQ; Wang, F; Liu, GJ; Lu, HF; Kantanen, J; Han, JL; Li, MH; Liu, MJ. 2016. Whole-genome sequencing of native sheep provides insights into rapid adaptations to extreme environments. *Molecular Biology and Evolution* 33(10): 2576–92. DOI: 10.1093/molbev/msw129

Zhao, Y; Vanhoutte, PM; Leung, SWS. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond *eNOS*. *Journal of Pharmacological Sciences* 129(2): 83-94. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.09.002

Zimprich, TR; Speidel, ES; Schafer, DW; Lashell, B; Holt, TN; Enns, RN; Cunningham, SF; Thomas, MG. 2020. Repeated measures of PAP at different elevations in beef bulls in Colorado. *Transl. Anim. Sci.* 2020.4:S113–S117. doi: 10.1093/tas/txaa116

Zulueta, JJ; Sawhney, R; Kayyali, U; Fogel, M; Donaldson, C; Huang, H; Lanzillo, JJ; Hassoun, PM. 2002. Modulation of Inducible Nitric Oxide Synthase by Hypoxia in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 26: 22–30. DOI: 10.1165/ajrcmb.26.1.4510

ANEXOS

Anexo 1: Ubicación geográfica de zonas de colecta de muestras de sangre de bovinos

Región	Provincia	Distrito	Sector	Altitud	Coordenadas	Raza	M	F	Total
Apurímac	Andahuaylas	Pampachiri		3656	S14°11'5.72"; W073°31'23.4"	CRI	1	6	7
Apurímac	Andahuaylas	Pampachiri		3405	S14°10'54.08"; W073°32'45.84"	CRI	1	5	6
Cusco	Acomayo	Acos	Chalanea	3871	S13°53'32.62"; W071°43'5.57"	CRI	8	0	8
Cusco	Acomayo	Acos	Yansarcoma	3864	S13°53'55.25"; W071°42'40.01"	CRI	2	1	3
Cusco	Acomayo	Acos	Huascar	3689	S13°56'46.10"; W071°40'36.98"	CRI	1	5	6
Cusco	Chumbivilcas	Colquemarca	Toromayo	3510	S14°15'51.64"; W072°4'15.11"	CRI	1	1	2
Cusco	Chumbivilcas	Colquemarca	Corpiri	3644	S14°18'52.74"; W072°3'14.25"	CRI	0	2	2
Cusco	Chumbivilcas	Colquemarca	Huayllani	3675	S14°21'45.28"; W072°3'1.38"	CRI	2	4	6
Apurímac	Cotabambas	Haqira	Jayan	3804	S14°12'50.22"; W072°11'53.00"	CRI	1	5	6
Apurímac	Cotabambas	Haqira	Huancaya grande	3925	S14°10'47.15"; W072°12'42.62"	CRI	1	8	9
Cusco	Chumbivilcas	Velille	Cullahuata	4061	S14°35'16.33"; W071°35'7.65"	CRI	0	3	3
Cusco	Chumbivilcas	Velille	Centro poblado	3738	S14°30'44.50"; W071°53'14.68"	CRI	1	6	7
Cusco	Chumbivilcas	Velille	Centro poblado	3738	S14°30'44.50"; W071°53'14.68"	BrS	0	1	1
Cusco	Chumbivilcas	Velille	Velille -Santo tomas	3833	S14°34'56.22"; W071°56'15.43"	CRI	0	2	2
Ancash	Bolognesi	Huasta	Huito	3536	S10°7'55.74"; W77°8'22.14"	CRI	0	7	7
Ancash	Bolognesi	Chiquian	Kankas-Shincus	4109	S10°6'25.42"; W77°11'35.42"	CRI	1	1	2
Cusco	Cusco	San Jerónimo	Camal municipal	3213	S13°32'58.94"; 71°52'02.83"	BrS	25	45	70
Cusco	Cusco	San Jerónimo	Camal municipal	3213	S13°32'58.94"; 71°52'02.83"	CRI	46	72	118
Cusco	Cusco	San Jerónimo	Granja Kayra	3241	S13°33'40.65"; W71°52'37.44"	BrS	0	9	9

Anexo 1. Continuación

Cusco	Canchis	Marangani	CICAS la Raya	4123	S14°28'11.15"; W71°2'24.34"	BrS	1	15	16
Puno	Puno	Paucarcoya	EST. ILLPA -INIA	3815	S15°41'12.77"; W70°4'38.10"	BrS	1	16	17
Cusco	La Convención	Santa Ana	F. Potrero - MDSA	1306	S12°53'22.16"; W72°43'37.66"	BrS	4	14	18
Puno	Lampa	Lampa	Particular	3871	S15°20'50.02"; W70°21'39.25"	BrS	2	1	3
Pasco	Pasco	Pasco	Particular	4100		BrS	1	1	2
Lima	Lima	La molina	UNALM	243	S12°04'52.66"; W76°56'35.22"	BrS	5	8	13
Puno	Azángaro	Asillo	Particular	3884	S14°45'51.93"; W70°19'38.54"	BrS	2	2	4
Pasco	Pasco	Simón Bolívar	C.C. S. P. Racco	4309	S10°47'07.71"; W76°22'21.64"	BrS	1	16	17
Cusco	Chumbivilcas	Santo Tomas	P. menor Pulpera	3964	S14°41'35.35"; W72°02'51.05"	BrS	0	3	3
TOTAL							108	259	367

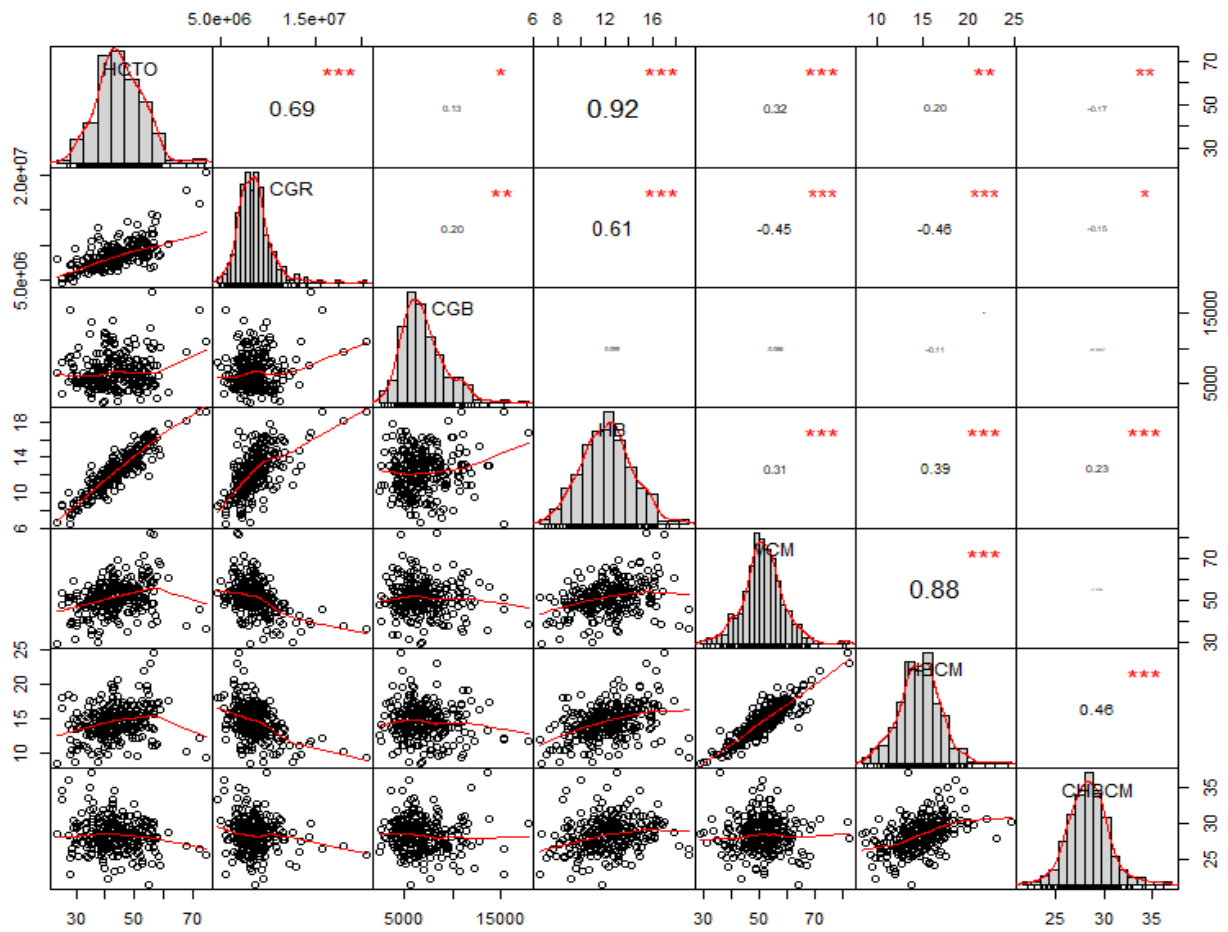
BrS, Brown Swiss; CRI: Criollo. M: macho; F: hembra. Del total de muestras colectadas (367), 14 no pudieron ser empleadas por haber sufrido de hemolisis durante su transporte al laboratorio.

Anexo 2: Altitud, temperatura y precipitación pluvial en las zonas de colecta de muestras de sangre de bovinos

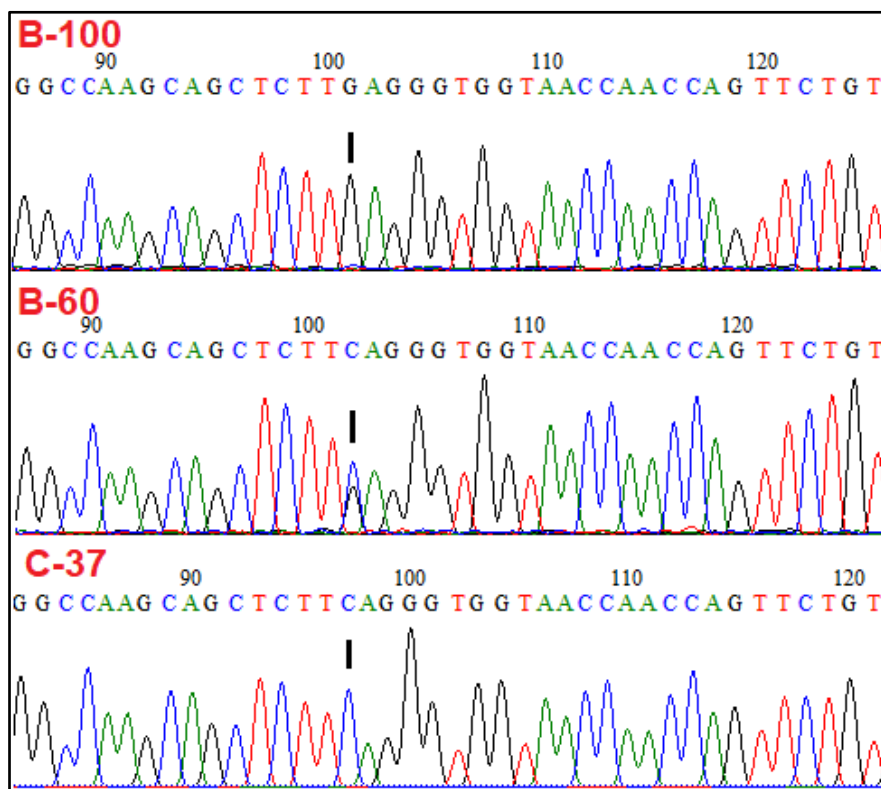
Región, sector	Em.	Altitud (msnm) (*)	Mes, Año	Temperatura °C			Precipitación (mm/hora)		
				Min	Max	P	Min	Max	P
Apurímac, Pampachiri	114044	3405 – 3656	Feb., 2018	4.6	23.8	13.8	0.0	1.22	0.19
Apurímac, Haqira	472A1410	3804 – 3947	Abr., 2018	0.3	15.9	7.23	0.0	6.8	0.12
Ancash, Huasta	110018	3536 – 4109	Abr., 2018	2	26.9	13.75	0.0	0.53	0.07
Cusco, Cusco	100044	3213 – 4123	Set., 2018	-2.8	25.6	12.65	0.0	0.19	0.01
			Oct., 2018	2.8	24.5	13.4	0.0	0.8	0.1
Cusco, Acomayo	113038	3541 – 4061	Mar., 2018	7.5	23.2	15.34	0.0	0.35	0.15
Cusco, Velille	114119	3738 – 4068	Mar., 2018	-0.3	14	6.59	0.0	4.7	0.07
			Abr., 2019	0.1	14.6	7.18	0.0	6.9	0.08
			Set., 2019	-3.9	18.9	7.51	0.0	1.6	0.01
Cusco, Quillabamba	4729B3E6	1306	Nov., 2018	16.7	32.8	22.15	0.0	20.1	0.13
Lima, La Molina	472AC278	243	Abr., 2019	15.8	29.2	21.67	0.0	0	0
			Jun., 2019	12.6	22.3	16.16	0.0	0.4	0.01
Pasco, Simón Bolívar	110037	4100 – 4309	Feb., 2019	0.4	14.4	6.58	0.0	43	11.45
			Jul., 2019	-6.6	14.7	4.77	0.0	06:00	0.7
Puno, Juliaca	472E4156	3815	Set., 2019	-5.8	20	8.29	0.0	3.9	0.01
Puno, Azángaro	114040	3850	Ene., 2019	2.4	19.2	11.05	0.0	1.13	0.14
Promedio				2.86	21.25	11.76	0.0	5.74	0.83

EM. Estación meteorológica (código SENAMHI). (*) Datos de altitud tomados con GPS. Mn: mínimo. Max: máxima P: promedio

Anexo 3: Gráfico de correlaciones entre constantes hematológicas de muestras evaluadas



Anexo 4: Genotipos observados en el gen *EPASI* exón 7 (Cr 11: C28809802>G) con el electroferograma



Anexo 5: Códigos de referencia de los genomas bovinos empleados para el estudio bioinformático

Holstein	Aberdeen Angus	Simmental	Jersey	Brown Swiss
SRR1262663H	SRR1262630A	SRR1262806S	SRR1262789J	ERR2561415B
SRR1262755H	SRR1262651A	SRR1262818S	SRR1262790J	ERR2561395B
SRR1262787H	SRR1293227A	SRR1262831S	SRR1262791J	ERR1766310B
SRR1262788H	SRR1262647A	SRR1262833S	SRR1262802J	ERR1746320B
SRR1262785H	SRR1262628A	SRR1262839S	SRR1262797J	ERR1746326B
SRR1262780H	SRR1262648A	SRR1262846S	SRR1262803J	ERR1747023B
SRR1262756H	SRR1262644A	SRR1262815S	SRR1262794J	
SRR1262664H	SRR1262659A		SRR1262793J	
SRR1262539H	SRR1262633A			
SRR1262660H				
SRR1262754H				

Anexo 6: códigos de referencia de genes, ARNm y proteínas empleadas para el análisis bioinformático

Gen	Referencia de la secuencia – NCBI, USA		
	Genómico	ARNm	Proteína
<i>EPAS1</i>	NC_037338.1	NM_174725.2	NP_777150.1
<i>EPO</i>	NC_037352.1	NM_173909.2	NP_776334.1
<i>SLC2A1</i>	NC_037330.1	NM_174602.2	NP_777027.1
<i>HIF1a</i>	NC_037337.1	NM_174339.3	NP_776764.2
<i>VEGFA</i>	NC_037350.1	NM_001316955.1	NP_001303884.1
<i>NOS2</i>	NC_037346.1	NM_001076799.1	NP_001070267.1
<i>ARNT</i>	NC_037330.1	NM_173993.1	NP_776418.1
<i>EDN1</i>	NC_037350.1	NM_181010.2	NP_851353.1
<i>HIF3a</i>	NC_037345.1	NM_001105342.1	NP_001098812.1
<i>EGLN1</i>	NC_037355.1	XM_024986696.1	XP_024842464.1

Anexo 7: Polimorfismos de nucleótido simple identificados en regiones exónicas de 10 genes inducibles por hipoxia usando 41 genomas bovinos de cinco razas diferentes

Nro.	Gen	Posición genómica (ARS-UCD1.2)	Exón	Alelos		MAF	HW p-val
				Ref.	Alt.		
1	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28735330	Exón 1	G	T	0.012	1.000
2	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28735379	Exón 1	A	G	0.390	0.800
3	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28735447	Exón 1	C	T	0.085	1.000
4	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28796379	Exón 3	C	T	0.012	1.000
5	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28800528	Exón 5	A	G	0.024	1.000
6	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28800793	Exón 6	C	T	0.024	0.025
7	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28809802	Exón 7	G	C	0.098	1.000
8	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28817869	Exón 9	C	T	0.061	1.000
9	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28817936	Exón 9	A	G	0.329	0.560
10	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28817954	Exón 9	C	T	0.098	1.000
11	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28819218	Exón 10	A	G	0.415	0.709
12	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28819233	Exón 10	C	T	0.049	1.000
13	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28821484	Exón 12	G	A	0.085	1.000
14	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28821496	Exón 12	G	A	0.085	0.486
15	<i>EPAS1</i>	Cr.11: 28823432	Exón 15	T	C	0.378	1.000
16	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873425	Exón 5	C	T	0.085	1.000
17	<i>EPO</i>	Cr.25: 35873867	Exón 5	C	T	0.110	0.776
18	<i>SLC2A1</i>	Cr.3: 103320850	Segmento 2	C	T	0.146	0.360
19	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73857457	Exón 2	G	C	0.012	1.000
20	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73873649	Exón 10	T	C	0.024	1.000
21	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73875740	Exón 12	A	G	0.012	1.000
22	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73880558	Exón 15	C	T	0.012	1.000
23	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73880763	Exón 15	G	A	0.037	1.000
24	<i>HIF1a</i>	Cr.10: 73881087	Exón 15	T	G	0.037	1.000
25	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17282116	Exón 1	T	A	0.110	1.000
26	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17282555	Exón 1	T	C	0.024	1.000
27	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17282857	Exón 1	A	G	0.037	1.000

28	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296458	Exón 7	A	T	0.049	1.000
29	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296719	Exón 7	C	T	0.085	0.486
30	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296773	Exón 7	G	A	0.146	1.000
31	<i>VEGFA</i>	Cr.23: 17296897	Exón 7	G	T	0.146	0.360
32	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19388736	Segmento 26	A	C	0.220	1.000
33	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19391869	Segmento 23	G	A	0.110	0.108
34	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19394936	Segmento 20	G	A	0.195	0.929
35	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19394960	Segmento 20	T	C	0.110	1.000
36	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19397984	Segmento 18	C	T	0.207	1.000
37	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19399220	Segmento 17	G	A	0.037	0.074
38	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19400180	Segmento 16	G	A	0.366	1.000
39	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19401836	Segmento 14	G	A	0.037	0.074
40	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19401890	Segmento 14	C	T	0.049	1.000
41	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19402813	Segmento 13	C	T	0.012	1.000
42	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19402899	Segmento 13	C	T	0.390	1.000
43	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403710	Segmento 12	A	G	0.183	1.000
44	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19403717	Segmento 12	C	T	0.402	1.000
45	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19419359	Segmento 3	G	C	0.122	0.927
46	<i>NOS2</i>	Cr.19: 19420234	Segmento 2	G	A	0.012	1.000
47	<i>ARNT</i>	Cr.3: 19931202	Exón 6	G	A	0.195	0.929
48	<i>ARNT</i>	Cr.3: 19935387	Exón 8	G	T	0.061	1.000
49	<i>ARNT</i>	Cr.3: 19935389	Exón 8	G	A	0.061	1.000
50	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44156806	Segmento 5	T	G	0.012	1.000
51	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157052	Segmento 5	G	A	0.073	1.000
52	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157199	Segmento 5	C	T	0.061	1.000
53	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157327	Segmento 5	G	A	0.061	1.000
54	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157334	Segmento 5	T	C	0.061	1.000
55	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157445	Segmento 5	A	G	0.049	1.000
56	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157461	Segmento 5	T	C	0.061	1.000
57	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157526	Segmento 5	G	A	0.024	1.000
58	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44157571	Segmento 5	G	A	0.037	1.000
59	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44159580	Segmento 4	C	T	0.037	1.000
60	<i>EDNI</i>	Cr.23: 44161432	Segmento 2	G	T	0.061	1.000

61	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44161460	Segmento 2	A	G	0.207	0.414
62	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44163220	Segmento 1	A	G	0.122	1.000
63	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44163308	Segmento 1	A	G	0.159	1.000
64	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44163357	Segmento 1	C	T	0.171	1.000
65	<i>EDN1</i>	Cr.23: 44163394	Segmento 1	C	T	0.073	1.000
66	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53569571	Exón 5	C	T	0.134	0.924
67	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53570220	Exón 6	G	C	0.183	0.417
68	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53571933	Exón 7	C	T	0.012	1.000
69	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53579258	Exón 10	C	G	0.366	0.923
70	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53587915	Exón 15	C	T	0.134	0.924
71	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53587932	Exón 15	G	A	0.390	0.685
72	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53588468	Exón 15	T	C	0.415	0.308
73	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53588799	Exón 15	T	G	0.476	0.299
74	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53588845	Exón 15	C	T	0.122	1.000
75	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53589718	Exón 15	C	G	0.012	1.000
76	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53589944	Exón 15	C	T	0.171	0.525
77	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53590048	Exón 15	C	T	0.488	0.478
78	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53590134	Exón 15	T	G	0.024	1.000
79	<i>HIF3a</i>	Cr.18: 53590253	Exón 15	C	T	0.171	0.525