

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LA PROTEÍNA HSC70
EN LA EXPRESIÓN DEL GEN HSPA8 Y LA VIABILIDAD DE
EMBRIONES BOVINO *IN VITRO***

POR:

AIMÉ JAZMÍN GARZA ARREDONDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2021

GRAL. ESCOBEDO, N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LA PROTEÍNA HSC70
EN LA EXPRESIÓN DEL GEN HSPA8 Y LA VIABILIDAD DE
EMBRIONES BOVINO *IN VITRO***

POR:

AIMÉ JAZMÍN GARZA ARREDONDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIA ANIMAL**

MAYO, 2021

GRAL. ESCOBEDO, N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LA PROTEÍNA HSC70 EN LA
EXPRESIÓN DEL GEN HSPA8 Y LA VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINO
*IN VITRO***

**APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ PARTICULAR DE LA M.C. AIME
JAZMÍN GARZA ARREDONDO:**



DR. J. RUBEN CERVANTES VEGA
DIRECTOR DE TESIS



DRA. DIANA ELISA ZAMORA ÁVILA
CO- DIRECTORA DE TESIS



DR. UZIEL CASTILLO VELAZQUEZ
CO- DIRECTOR DE TESIS



DR. GUSTAVO MORENO DEGOLLADO
CO- DIRECTOR DE TESIS



DRA. DENISSE MELISSA GARZA HERNÁNDEZ
CO- DIRECTORA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios quien renueva mis fuerzas cada mañana y hoy me permite ver realizado otro de mis sueños.

A quienes son mi motor, al amor de mi vida, Adán Medellín González y a nuestro hermoso bebé Matías Emanuel, ya que, con sus oraciones, apoyo, palabras de ánimo, abrazos y sonrisas me impulsan a seguir adelante.

A mi madre, Irma Isela Arredondo Aguilar, quien me sigue enseñando con su ejemplo de esfuerzo y dedicación. Gracias por su amor incondicional.

A mis asesores, al Dr. Rubén Cervantes Vega por creer y adoptar este proyecto. Al Dr. Gustavo Moreno Degollado, por todo el apoyo brindado durante la realización del trabajo experimental. Dr. Uziel Castillo Velázquez por su amistad y todas esas horas dedicadas a transmitirme sus conocimientos con paciencia. A mi querida amiga, la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, gracias por guiarme e invertir tiempo en mí y en este proyecto.

A Luis Gerardo Mendoza Dávila, quien además de compartirme sus conocimientos y experiencias, me ha brindado su amistad.

Al Centro Nacional de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, en especial al Dr. Fernando De La Torre Sánchez, por su calidez y amabilidad al recibirme en el CNRG; a la Ing. Sandra Pérez Reynoso por su valiosa ayuda en la realización del trabajo experimental y su paciencia para enseñarme y al M.C. David Urbán Duarte por la importante asesoría brindada durante mis estancias en el Centro.

Al Centro de Investigación y Producción Agropecuaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por nuevamente abrir sus puertas para mí y permitirme realizar parte del trabajo experimental en sus instalaciones.

Al Centro de Biotecnología Reproductiva de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, en especial al Dr. Juan Francisco Villarreal Arredondo y al M.C. David Domínguez Díaz, por permitirme hacer uso del Laboratorio y apoyarme en la realización de algunos de los experimentos de este trabajo.

DEDICATORIA

*A mi padre, Jaime R. Garza López,
quien me sigue inspirando desde cielo.*

ABREVIATURAS

<i>IV</i>	<i>In vitro</i>
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
HSP	Proteína de choque térmico
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSC70	Proteína de choque térmico de 73 kDa de expresión constitutiva
kDa	kilodalton
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
IETS	Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones
GSH	Glutación
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
HSE	Elemento de respuesta al choque térmico
HSF1	Factor de choque térmico 1
HSF2	Factor de choque térmico 2
ng/ μ L	nanogramo/microlitro

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
HIPÓTESIS	12
JUSTIFICACIÓN	13
CAPÍTULOS	14
PRODUCCIÓN EMBRIONARIA <i>IN VITRO</i>	14
SUPLEMENTACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE EMBRIONES BOVINO	15
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	18
<i>Clasificación</i>	18
<i>Diferencias entre HSC70 y HSP70</i>	19
<i>Estructura de la HSC70</i>	20
<i>Localización de la HSC70 en la célula</i>	21
<i>Información del gen que codifica para la proteína HSC70</i>	22
<i>Regulación de la expresión del gen HSPA8 y de la proteína HSC70</i>	22
<i>Funciones de la proteína HSC70</i>	24
EL EMBRIÓN BOVINO Y LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	26
APOPTOSIS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Embriones <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sin suplementación de la proteína HSC70	31
Embriones <i>in vitro</i> suplementados con la proteína HSC70	32
Extracción de ARN de embriones bovinos (<i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>) por el método de Trizol modificado	33
Síntesis de ADN complementario (ADNc)	34
Análisis de la expresión de los genes HSPA1A, HSPA8 (genes que codifican para la síntesis de HSP70 y HSC70), Bax, Bcl-2 (gen pro apoptótico y anti apoptótico), MY01B y GAPDH (constitutivos); por PCR tiempo real	35

Análisis del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> posterior a la suplementación con la proteína HSC70	36
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	38
Expresión de los genes HSPA1A y HSPA8 y su relación con genes relacionados con la apoptosis en embriones bovino <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	38
Expresión del gen HSPA8 y su relación con genes apoptóticos en embriones bovino <i>in vitro</i> después de la suplementación con 50 y 100 ng la proteína recombinante HSC70	42
Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> posterior a la suplementación con la proteína HSC70	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la expresión del gen HSPA8 y de la suplementación con la proteína de choque térmico HSC70 sobre la viabilidad y expresión de genes relacionados con la apoptosis en cultivos de embriones bovinos. Se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes HSPA1A, HSPA8, Bcl-2 y Bax en embriones bovino *in vivo* e *in vitro* en el día siete de su desarrollo. Posteriormente, se determinó la expresión del gen HSPA8 y su relación con genes apoptóticos en embriones bovino *in vitro* post suplementación de los medios de cultivo con 50 y 100 ng de la proteína recombinante HSC70.

Se realizó la extracción de ARN de los embriones, a partir de un protocolo modificado con Trizol. El ARN obtenido se utilizó para la posterior síntesis de ADNc utilizando oligo-dT, posteriormente se realizó el análisis de la expresión de los genes HSPA1A, HSPA8, Bax, Bcl-2 (genes pro-apoptótico y anti-apoptótico respectivamente), β -actina, y GAPDH (genes constitutivos); por PCR tiempo real, utilizando sondas PrimeTime.

Los resultados indicaron que los embriones *in vitro* no suplementados con la proteína recombinante HSC70, muestran una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) al expresar una mayor cantidad de los genes HSPA8, Bax y Bcl-2, en comparación con los embriones *in vivo*. Además, que los embriones degenerados expresan una mayor cantidad del gen HSPA1A que los de calidad transferible. Por otra parte, aquellos embriones suplementados con la proteína recombinante HSC70 (con 50 y 100 ng) muestran una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en el patrón de expresión de los genes de estudio; observándose que a mayor suplementación (100 ng), existe una mayor expresión del gen HSPA8 que el grupo suplementado con 50 ng, sin embargo, estos últimos mostraron mejores características a la identificación (estadio de desarrollo y calidad) en comparación con los grupos control y aquellos suplementados con 100 ng. De manera adicional, se demostró que la adición de dosis bajas de la proteína recombinante HSC70 (25 y 50 ng) en los medios de cultivos, mejora el desarrollo embrionario (porcentaje de división embrionaria, embriones de seis células o más y blastocistos al día 6, blastocistos al día 7 y número de células en blastocisto al día 7) ($P < 0.05$) en comparación con aquellos sin suplementación.

INTRODUCCIÓN

La maduración del ovocito, la fertilización de los gametos y el cultivo *in vitro* (IV) de embriones, son biotecnologías que ofrecen mayores posibilidades para mejorar la genética animal.

El desarrollo embrionario *in vitro* está condicionado por factores como el origen de los gametos, las condiciones de cultivo, el microentorno y el estrés ambiental. El periodo de cultivo posterior a la fertilización es el tiempo durante el cual se lleva a cabo una serie de eventos que son considerados claves para la obtención de embriones de calidad transferible, ya que durante éste (cultivo IV), los embriones son expuestos a diversos estresores que normalmente no se encuentran en el tracto reproductor de la madre. Factores de estrés como la generación incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS), la exposición de los embriones a la luz y a temperaturas no constantes, entre otros, causan daños en el ADN, peroxidación lipídica, disminución en la síntesis de proteínas o desnaturalización de estas últimas, lo que conlleva a la disminución de la tasa de desarrollo embrionario (Balasubramanian et al., 2007).

Otro de los procesos que involucra la interrupción del desarrollo del embrión es la apoptosis (Roth et al., 2004), mecanismo que elimina las células dañadas, no funcionales o anormales (Paula-Lopes y Hansen, 2002). Se ha demostrado que estímulos como la radiación, quimioterapia y tóxicos del ambiente, pueden iniciar la apoptosis tanto en ovocitos como en embriones (Roth et al., 2004). Además, se demostró que el choque térmico induce apoptosis en embriones pre-implantados (Yuan et al., 2008), debido a la interacción de proteínas no específicas que dirigen a la formación de proteínas no funcionales (Mortensen et al., 2010) y a la alteración en la configuración nuclear y citoesquelética (Yuan et al., 2008).

Por otro lado, las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento de las proteínas y el mantenimiento de su estructura y su función, promoviendo la protección celular contra daños ocasionados por aumento en la temperatura, evitando la desnaturalización de las proteínas y la apoptosis (Rajhans et al., 2010).

Ellis y Hemmingsen (1989) describieron las chaperonas moleculares como mediadores del plegamiento de polipéptidos y del montaje de ciertas proteínas dentro de estructuras oligoméricas.

Las proteínas de choque térmico (HSP's) actúan como chaperonas moleculares previniendo la formación de estructuras no intermedias, dirigiendo la formación de proteínas funcionales (Liu et al., 2012). Además, protegen a la célula de agentes que inducen apoptosis, tales como choque térmico, anoxia, hipoxia, estrés metabólico, entre otros; estos agentes, provocan que las HSP's sean sintetizadas y expresadas de manera inmediata. La HSC70 es particularmente abundante en embriones de mamíferos. Esta chaperona molecular se localiza en el citosol, núcleo y cerca de la membrana celular. Participa en la importación de proteínas hacia el núcleo y otros organelos celulares, como retículo endoplasmático y mitocondria. Asimismo, mantiene la homeostasis proteica (plegamiento, translocación, montaje, desmontaje, diferenciación y degradación), conservando la estructura y funciones normales de éstas en condiciones normales y durante el estrés; suprimiendo la agregación de proteínas y las proteínas desnaturalizadas por calor (Liu et al., 2012).

Debido a que las funciones de la proteína constitutiva HSC70 contribuyen a la homeostasis y viabilidad celular, el objetivo de este trabajo fue, analizar el efecto de la expresión del gen HSPA8 y de la suplementación con la proteína HSC70 sobre la viabilidad y expresión de genes relacionados con la apoptosis en cultivos de embriones bovinos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la expresión del gen HSPA8 y de la suplementación con la proteína HSC70 sobre la viabilidad y expresión de genes relacionados con la apoptosis en cultivos de embriones bovinos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la expresión de los genes HSPA1A y HSPA8 y su relación con genes relacionados con la apoptosis: Bcl-2 (anti-apoptótico) y Bax (pro-apoptótico) en embriones bovino *in vivo* e *in vitro* en el día 7 de su desarrollo por PCR Tiempo Real.

Determinar la expresión del gen HSPA8 y su relación con genes apoptóticos en embriones bovino *in vitro* después de la suplementación con 50 ng y 100 ng de la proteína recombinante HSC70, por PCR Tiempo Real (qPCR).

Analizar la viabilidad celular en embriones cultivados *in vitro* en distintas condiciones de cultivo (sin suplementación y con suplementación de proteína HSC70) a través de la evaluación morfológica e identificación según su etapa de desarrollo y calidad de acuerdo al manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS).

HIPÓTESIS

La HSC70, administrada durante el cultivo de embriones *in vitro*, coadyuvará al mantenimiento de la homeostasis de las proteínas en condiciones normales y durante el estrés, regulando la apoptosis, aumentando así la viabilidad embrionaria.

JUSTIFICACIÓN

Las estadísticas proporcionadas por la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS), demuestran que durante el cultivo *in vitro* (*iv*) los embriones son expuestos a factores de estrés que provocan una disminución en la tasa de desarrollo embrionario, ya que, a nivel mundial, durante el año 2018, del total de ovocitos procedentes de aspiración folicular (OPU, ovum pick-up) y de ovarios de rastro, madurados y fertilizados *in vitro*, solo el 28% produjo embriones de calidad transferible. Por su parte, las estadísticas en México revelan que a la clasificación solo el 26% llegó a considerarse de esta calidad.

Debido a los bajos porcentajes de embriones producidos *iv*, se han desarrollado distintos estudios en torno a esta problemática, en algunos de ellos, los medios de cultivo de embriones han sido suplementados con antioxidantes (como el resveratrol y la peroxirredoxina II) con la finalidad de disminuir la apoptosis y con ello aumentar la viabilidad embrionaria. Dado que se ha concluido que las funciones de las HSP mantienen la homeostasis proteica y con ello la viabilidad de la célula, la HSC70, administrada durante el cultivo de embriones *in vitro*, aumentará el número de embriones transferibles, esto reeditará en la relación costo-beneficio de la producción embrionaria.

CAPÍTULOS

PRODUCCIÓN EMBRIONARIA *IN VITRO*

La tecnología de producción de embriones *in vitro*, se ha desarrollado con éxito en distintas especies de animales logrando la obtención de descendencia a partir de embriones transferidos. Sin embargo, los embriones de mamíferos producidos *in vitro* muestran una menor competencia y calidad en el desarrollo en comparación con los *in vivo* (Knijn et al., 2003).

La producción *in vitro* de embriones consta de tres pasos: la maduración del ovocito, la fertilización (que incluye la preparación de los espermatozoides) y el cultivo del cigoto (Holm et al., 2002). En particular, el periodo del cultivo después de la fertilización, es el tiempo durante el cual, ocurren eventos importantes de desarrollo que son considerados claves para la obtención de blastocitos con características transferibles (Rizos et al., 2002). Durante el cultivo *in vitro*, los embriones son expuestos a diferentes estresores que no se encuentran en el tracto reproductor de la madre (Gordon, 2003).

Algunas investigaciones han demostrado que los embriones producidos *in vitro* evidencian cambios en la expresión de genes que reflejan una respuesta al estrés ante condiciones no óptimas. Durante el desarrollo embrionario, condiciones como la apoptosis y el estrés oxidativo, se han relacionado con diferencias en la expresión de ciertos genes (Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2003a; Lonergan et al., 2003b). Además, las diferencias en los niveles de expresión de genes entre los embriones obtenidos *in vivo* y los producidos *in vitro* han sido asociadas con la tensión de oxígeno y la composición del medio durante el cultivo (Wrenzycki et al., 2001).

Generalmente el aumento en la tensión del oxígeno durante la producción de embriones *in vitro*, comparado con la del entorno *in vivo*, incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionando daño al ADN, lipoperoxidación y modificación oxidativa de proteínas, haciéndolas susceptibles a la proteólisis (Johnson y Nasr-Esfahani, 1994).

SUPLEMENTACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE EMBRIONES BOVINO

Un enfoque efectivo para lograr la optimización de los medios de cultivo consiste en proveer un ambiente *in vitro* similar al de los oviductos y el útero (Yuan et al., 2003). Bajo las condiciones *in vivo*, los ovocitos y los embriones son capaces de resistir al estrés oxidativo a través de antioxidantes presentes en el líquido folicular (Oyawoye et al., 2003) y a través de los producidos por los embriones en el oviducto (Gardiner y Reed, 1995). Antioxidantes endógenos como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa dependiente de selenio (SeGPX), vitamina C y E, limitan los efectos de daño por radicales libres en ovocitos y embriones *in vivo*. Debido a que los ovocitos y los embriones cultivados *in vitro* son mantenidos a mayores concentraciones de oxígeno en comparación con los del ambiente *in vivo* (Wang et al., 2007), los primeros son más vulnerables al daño por ROS (Fakruzzaman et al., 2015).

Distintas vías metabólicas y actividades enzimáticas pueden producir ROS de manera endógena en ovocitos y embriones (Guerin et al., 2001; Nasr-Esfahani y Johnson, 1991; Trimarchi et al., 2000). Además, factores externos como el consumo de oxígeno, cationes metálicos, luz y amino oxidasas también pueden incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno. Cuando la producción de ROS excede la capacidad antioxidante de un embrión, da lugar al estrés oxidativo. El estrés oxidativo parece dañar los embriones causando peroxidación de la membrana de fosfolípidos y alteración de muchos tipos de moléculas en la célula, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Fakruzzaman et al., 2015). La consecuencia de este daño altera las funciones mitocondriales, inhibiendo la división celular de los embriones, resultando finalmente en apoptosis (Kowaltowski y Vercesi, 1999; Hyslop et al., 1988; Yang et al., 1998).

Para mejorar la competencia del desarrollo de los blastocitos pre implantados muchos antioxidantes, han sido utilizados en los medios de maduración de ovocitos y de cultivo *in vitro* (Fakruzzaman et al., 2015).

Kang y sus colaboradores (1998), concluyeron que la peroxiredoxina II (PRDX II) coordina numerosas funciones celulares, incluidas la proliferación y diferenciación celular y la protección de proteínas y lípidos contra daño oxidativo. La PRDX II juega un importante rol en la maduración y desarrollo temprano de los embriones por la supresión

de la apoptosis (Leyens et al., 2004). Por otro lado, Fakruzzaman y sus colaboradores (2015) concluyeron que la suplementación con PRDX II en los medios de maduración *in vitro* de embriones bovino, promueve el desarrollo a un estado de blastocito y mejora calidad de los mismos a través de la reducción de ROS, mejorando la actividad mitocondrial embrionaria y modulando la expresión de genes relacionados con el desarrollo (Fakruzzaman et al., 2015).

Asimismo, el resveratrol es una fitoalexina identificada en más de 70 especies de plantas incluidas las uvas, las ciruelas y el maní (Baur y Sinclair, 2006). Además, es un importante compuesto poli-fenólico antioxidante que contribuye con los efectos beneficiosos del vino tinto al prevenir enfermedades cardiovasculares en humanos. Se ha demostrado que el resveratrol tiene efectos positivos en la quimiopreención del cáncer y en procesos inflamatorios, entre otros (Pirola y Fröjdö, 2008). Lee y sus colaboradores (2010), demostraron un efecto positivo del resveratrol en el desarrollo de embriones de cerdos producidos *in vitro*, mejorando la calidad de estos. Además, el desarrollo de blastocitos porcinos en presencia de bajas dosis de resveratrol, dio lugar a una disminución en la expresión de genes Bcl-2 y caspasas-3, sugiriendo un efecto proliferativo y anti-apoptótico respectivamente (Salzano et al., 2014). También se demostró que la suplementación con resveratrol en los medios de maduración *in vitro* de ovocitos bovino, incrementa la secreción de progesterona y disminuye la de estradiol en las células del cúmulo (Wang et al., 2014), promoviendo la expansión de las células y la formación del cuerpo polar, mejorando el desarrollo del blastocito.

También se demostró que los polifenoles del té verde son una alternativa de uso en el cultivo de ovocitos y embriones *in vitro*, debido a la actividad antioxidante de sus componentes (Wang et al., 2007).

Rodrigues-Cunha y sus colaboradores (2016), concluyeron que la suplementación con melatonina durante la maduración de los ovocitos demostró tener efectos citoprotectores en los complejos cúmulos ovocitos. Además, se ha concluido que la melatonina tiene efectos críticos sobre la implantación y el desarrollo del embrión (Dair et al., 2008). Estos efectos consisten en la expresión embrionaria temprana de receptores funcionales de melatonina (MT1 y MT2) en distintas especies animales (Shang y Zhdanova, 2007). Los efectos beneficiosos observados de melatonina en el desarrollo embrionario son parcialmente atribuidos a la habilidad de aumentar la expresión de genes anti-apoptóticos

(Bcl-2), de regular a la baja la expresión de genes pro-apoptóticos (Bax y caspasas-3), de reducir la producción de ROS y de regular el glutatión (GSH) (Gao et al., 2012; Mohseni et al., 2012); ya que el glutatión ha sido considerado como el principal compuesto sulfhidrilo no proteico en las células de mamíferos, que protege la célula de daño oxidativo (Meister, 1983). Otros estudios han señalado que el GSH juega un rol importante en muchos procesos biológicos incluidos la síntesis de ADN y proteínas, la protección celular durante el estrés oxidativo y la proliferación celular durante el desarrollo embrionario (Del Corso et al., 1994).

Igualmente, Sá Filho y sus colaboradores (2009), publicaron que los tratamientos con la hormona somatotropina bovina (bSTH) han sido utilizados durante los programas de OPU/IVP (Ovum-Pick-Up/Producción *in vitro*) para mejorar el número de folículos ováricos antes de la aspiración folicular. Los resultados positivos incluyen el mejoramiento en la calidad de ovocitos *in vitro*, incremento en el porcentaje de fertilización y un aumento en la capacidad de desarrollo embrionario (Pavlok et al., 1996; Bols et al., 1998; Tripp et al., 2000; Roth et al., 2002). Sin embargo, los efectos precisos de bSTH, no están claramente definidos, algunos autores han atribuido el crecimiento folicular a los niveles plasmáticos de IGF-1 o a los de la insulina (Gong et al., 1993a; Buratini et al., 2000; Gong, 2002).

Por otra parte, estudios han demostrado que los medios de cultivo suplementados con proteínas de choque térmico pueden ser utilizadas como tratamiento para reducir la toxicidad y agregación de poliglutamina, presente en la enfermedad de Huntington. Novoselova y sus colaboradores (2005), llevaron a cabo la purificación de la HSP70 y HSC70 de músculo bovino, las cuales se suplementaron en los medios de cultivo de células transfectadas con la enfermedad de Huntington, los resultados demostraron que se disminuyó hasta un 50% el número de células apoptóticas en comparación con el grupo control (sin suplementación); además se demostró que las que sufrían apoptosis se debía a la agregación de proteínas insolubles.

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento de proteínas y el mantenimiento de su estructura y funciones normales. Las proteínas de choque térmico (HSP's, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein) son consideradas chaperonas moleculares que protegen a las células de daño físico o químico causado por aumento en la temperatura, anoxia, hipoxia, estrés metabólico, citoquinas, óxido de nitrógeno, exposición a etanol, metales pesados, agentes que inducen apoptosis y otros químicos y drogas desnaturalizantes (Smith et al., 1998; Tsukahara et al., 2000), ante tales estímulos, las HSP's pueden sintetizarse y expresarse de forma inmediata. Además, de regular la homeostasis celular y mantener la supervivencia celular (Rodríguez-Arizza et al., 2005).

Clasificación

Las proteínas de choque térmico se clasifican en base a su peso molecular en kilodaltons (kDa), como HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP25 Y HSP20.

Los cuatro miembros principales de la familia de las HSP70 son: la proteína inducible por estrés (HSP70, 72 kDa), la expresada constitutivamente (HSC70, 73 kDa), la proteína reguladora de glucosa 78 (GRP78 o Bip, 78 kDa), que se encuentra mayormente en el retículo endoplasmático y la HSP75 (75 kDa), también conocida como mortalina o mtHSP70, que mayormente se encuentra en la mitocondria (Polanowska-Grabowska et al., 1997; Arispe y De Maio, 2000; Bausero et al., 2005).

La familia de las HSP70 se encuentra entre las proteínas más conservadas presentes en todos los reinos, desde las arqueobacterias hasta los mamíferos superiores (Gupta y Singh, 1994; Hunt y Morimoto, 1985; Lindquist y Craig, 1988). La homología entre las proteínas HSP70 en diferentes especies es alta. La conservación de las secuencias está vinculada a la conservación funcional y la similitud de las estructuras y función se ilustra en el siguiente hecho *in vitro*, la HSP70 de una especie (*Drosophila* y humano) puede proteger a las células de otras especies (ratón y roedores, respectivamente) contra estresores diferentes (Stricher et al., 2013).

Diferencias entre HSC70 y HSP70

La HSC70 humana comparte un 85% de similitud en la secuencia de aminoácidos con la HSP70 (Ali et al., 2003). La HSC70 puede formar un complejo estable con la proteína recién sintetizada HSP70 durante el choque térmico (Brown et al., 1993). Sus diferencias radican en lo siguiente: el dominio carboxilo terminal, que interviene en la mediación de la especificidad del sustrato y funciones biológicas particulares (Ahn et al., 2005) (Figura 1).

La HSC70 y la HSP70 tienen patrones de expresión distinta, la primera es la forma expresada constitutivamente y solo levemente inducida durante situaciones de estrés, mientras que la segunda es altamente inducida durante el estrés (Gebauer et al., 1998; Chen et al., 2006). Durante condiciones de estrés oxidativo, la HSC70 se asocia cuantitativamente menos con péptidos inmunogénicos en comparación con la HSP70 (Callahan et al., 2002). Además, afectan el tráfico de iones de manera diferente. Ambas interactúan directamente con la bicapa de lípidos, pero la HSC70 tiene un mayor efecto sobre el plegamiento de proteínas de membrana y la translocación de polipéptidos (Ahn et al., 2005).

La HSC70 representa el 1% del contenido total de proteína celular con niveles posiblemente más altos en las células transformadas (Stricher et al., 2013).

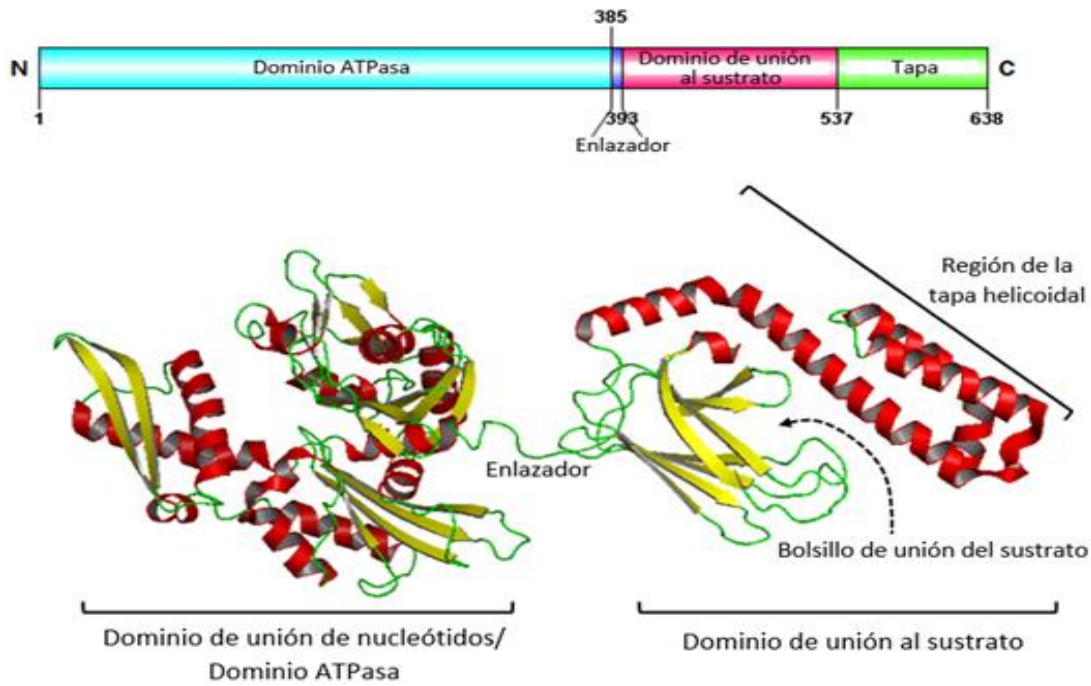


Figura 1. La HSP70 posee dos dominios principales. El primero de ellos, el dominio de ATPasa N-terminal que se une al ATP y lo hidroliza a ADP. El segundo es el dominio de unión al sustrato (SBD), el cual puede interactuar y asociarse transitoriamente con segmentos de péptidos lineales cortos de plegamiento. (Mayer y Bukau, 2005).

Estructura de la HSC70

La HSC70, también llamada HSP73, es una proteína asociada al choque térmico. La estructura básica de la HSC70 humana incluye tres partes: un dominio amino terminal adenosin trifosfatasa (ATPasa) de 44 kDa, un dominio de unión al sustrato de 18 kDa y un dominio carboxilo terminal de 10 kDa (Smith et al., 1998; Tsukahara et al., 2000; Sullivan y Pipas, 2002) (Figura 2). La secuencia del aminoácido carboxilo-terminal (Glu-Glu-Val-Asp), la cual es absolutamente conservada en todos los miembros de la familia HSC70 y HSP70 de eucariotas, es esencial para que lleve a cabo la unión con algunas chaperonas (Mosser et al., 2000). La HSC70 es una chaperona de unión ATP y tiene una actividad ATPasa intrínseca que puede hidrolizar ATP en ADP. El ATP de unión de las HSC70 y HSP70 muestra baja afinidad con el sustrato, mientras que la forma ADP de unión tiene alta afinidad con él. El cambio de la forma unión-ATP de HSC70 y HSP70 a la forma ADP es inducida por la actividad ATPasa, que además necesita la cooperación de co-chaperonas y otras proteínas (Yamagoshi et al., 2004). El sustrato de unión de la HSC70 es controlado por una reacción de unión a ATP, hidrólisis de ATP e intercambio ADP-ATP en el dominio ATPasa (Tsukahara et al., 2000). La liberación de ADP es el

paso limitante de la velocidad de la reacción ATPasa HSC70 y ciertas proteínas desplegadas como apocitocromo c, pueden estimular la hidrólisis de ATP al acelerar la tasa de intercambio ADP/ATP (Sadis y Hihgtower, 1992). La unión de ATP o ADP, particularmente en presencia de magnesio, incrementa la estabilidad térmica de HSC70 (Borges y Ramos, 2006).

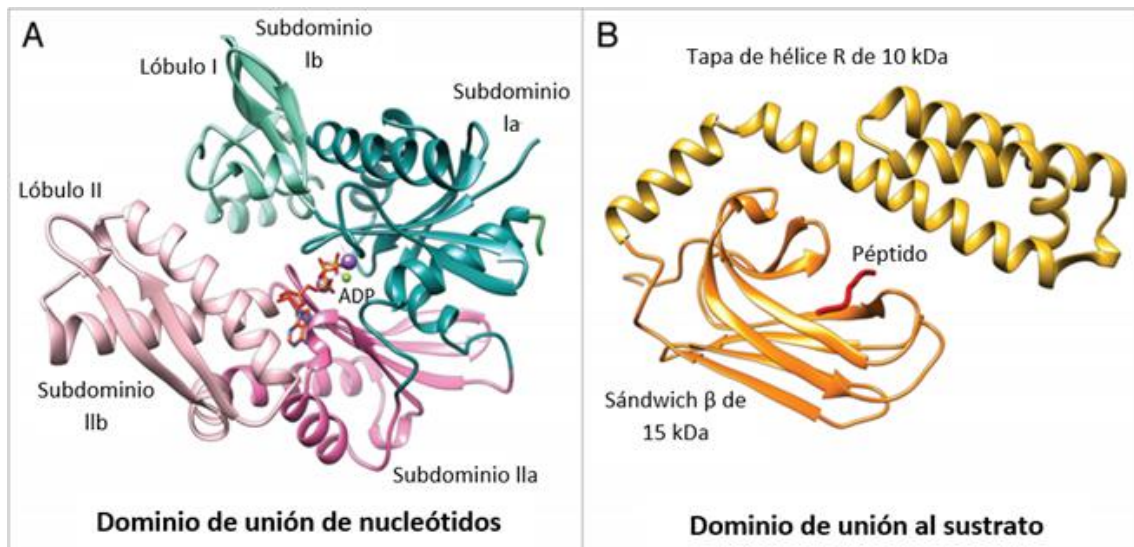


Figura 2. La HSC70 se compone de dos dominios, el dominio de unión de nucleótidos N-terminal (NBD) y el dominio de unión de sustrato c- terminal (SBD) (Stricher et al., 2013).

Localización de la HSC70 en la célula

La HSC70 es particularmente abundante en ovarios y embriones, es la chaperona molecular con mayor presencia en el citoplasma, pero también se localiza en el núcleo y cerca de la membrana celular (Liu et al., 2012). Puede interactuar con la bicapa de fosfolípidos, directamente en la membrana celular y formar canales que permitan el flujo de iones a través de ella. La actividad de los canales de HSC70 es dependiente de ATP y es bloqueada de manera reversible por ADP (Dworniczak y Mirault, 1987). En células eucariotas, bajo condiciones normales de crecimiento, la HSC70 citoplasmática puede entrar y salir del núcleo. La HSC70 se concentra en el núcleo cuando las células son expuestas a condiciones de estrés por choque térmico o estrés oxidativo ocasionado por peróxido de hidrógeno. El estrés inhibe el transporte nucleocitoplasmático de HSC70 y la secuestra en el núcleo, el transporte se restablece cuando la célula se recupera del estrés.

Durante la recuperación del choque térmico, la HSC70 nuclear se traslada al citoplasma de una forma temperatura-dependiente (Kodiha et al., 2005; Shiota et al., 2010).

Información del gen que codifica para la proteína HSC70

El HSPA8 es el gen que codifica para la proteína HSC70. El gen HSPA8 humano incluye nueve exones y está mapeado dentro de los cromosomas 11, 11q23.3-q25 (Sonna et al., 2002). A diferencia de la codificación genética de otros miembros de la familia HSP70, una característica importante del gen que codifica la HSC70 en vertebrados es que contiene intrones (Chen et al., 1996; Sonna et al., 2002). El gen HSPA8 se divide en 8 intrones. Los intrones 5, 6 y 8 contienen regiones altamente conservadas, cerca de 90 pb que codifican para U14 snoARN (Chen et al., 1996). En los humanos los exones del gen de la proteína HSC70 (número 2, 3, 6, 7 y 9) codifican para péptidos de longitud muy uniformes, de entre 61 y 69 aminoácidos, mientras que los exones 4, 8 y 5 codifican para péptidos de 51, 78 y 185 aminoácidos respectivamente. La región promotora del gen HSPA8 incluye una caja TATA, dos cajas CCAAT, dos elementos SP1 y dos elementos de respuesta al choque térmico (HSE) (Chen et al., 2002).

Regulación de la expresión del gen HSPA8 y de la proteína HSC70

La inducción en la expresión del gen para la proteína HSP70 por choque térmico, implica la unión del factor de transcripción al HSE en la región 5'. Existen dos factores de transcripción para el HSE, el factor de choque térmico 1 y el 2 (HSF1 y HSF2). El HSF1 es activado por choque térmico y otros estresores, mientras que el HSF2 está relacionado con la regulación de la expresión bajo condiciones de no estrés. En células no estresadas, la HSF1 está presente como monómero unido a HSP70. La desnaturalización de proteínas causada por choque térmico y otros estímulos, conducen a la utilización de HSP70 y a la eliminación de HSF1. Como resultado, el HSF1 se trimeriza, se une al HSE y conduce a la activación de la transcripción del gen (Hansen, 1999).

La expresión del gen HSPA8 (que codifica para la proteína HSC70) puede ser regulada y afectada por varios factores. Como en otras chaperonas moleculares, el estrés,

condiciones de calor, estímulos físicos y químicos peligrosos (como organoclorados, arsenito de sodio, azetidina, níquel y cadmio) pueden afectar la expresión del gen (Yokota et al., 2000; Chen et al., 2002; Geraci et al., 2004; Deane y Woo, 2005; 2006). Incluso el ejercicio puede inducir la expresión del gen HSPA8 y de la proteína HSC70 en el esqueleto humano (Morton et al., 2006). A su vez el etanol puede inducir y regular la transcripción de los genes para las proteínas HSC70 y GRP78 (Wilke et al., 2002).

El gen HSPA8 y la proteína HSC70 también pueden ser reguladas por estrógenos y progesterona en el núcleo ventromedial del hipotálamo, la activación de los receptores de estrógeno puede influir en la actividad del receptor de progesterona, de andrógenos y glucocorticoides elevando la expresión de HSC70 en las células donde esas proteínas se localizan. Se piensa que existen sitios de reconocimiento de HSC70 en la región extrema del carboxilo terminal en los receptores de progesterona, andrógeno y glucocorticoides, pero no en el receptor de estrógeno (Krebs et al., 1999; Wang et al., 2004).

Algunos compuestos y factores pueden disminuir la expresión del gen HSPA8 y de la proteína HSC70. Químicos como el fenilbutirato de sodio, butirato y glicerol pueden regular a la baja la expresión de HSC70 en células epiteliales de bronquios con fibrosis quística (Rubenstein y Zeitlin, 2000). Quercetina, un bioflavonoide también puede disminuir la síntesis de HSC70 (Aquino et al., 1998). Bifenilos policlorados 126 (PCB126), un contaminante ambiental global puede inducir estrés oxidativo celular y disminuir los niveles de expresión de la HSC70 en embriones de pez cebra. La inhibición de HSC70 por pentaclorobifenil (PCB126) puede ser revertida por la vitamina E, pudiéndose relacionar el efecto protector, de esta vitamina, contra el estrés celular (Kreiling et al., 2007; Na et al., 2009).

El nivel de la HSC70 es mucho más alto en las células glioma de rata C6 proliferante sin estrés comparadas con células diferenciadas sin estrés, en el cual la diferenciación fue inducida por AMPc. La elevación en la concentración del AMPc condujo a una reducción en los niveles de HSC70 y la inhibición del crecimiento celular. El AMPc no inhibe directamente la expresión de HSC70 por una represión transcripcional, si no por efecto inhibitorio de la vía MAPK (Helmbrecht y Rensing, 1999).

Funciones de la proteína HSC70

Como chaperona molecular, la HSC70 tiene un papel importante facilitando el plegamiento de las proteínas, además de mantener la estructura y función normal de estas.

La HSC70 fue originalmente caracterizada como una ATPasa sin recubrimiento que disociaba trisqueliones de vesículas cubiertas por clatrin (Buxbaum y Woodman, 1995). El transporte entre la membrana celular y otros compartimentos de la célula se inicia con el reclutamiento de proteínas de la capa citosólica. Las clatrin son unas de las proteínas con función de recubrimiento mejor caracterizadas al asociarse con proteínas adaptadoras, participan en las vías entre la membrana plasmática, endosomas y aparato de Golgi. Las proteínas de cubierta de las clatrin pueden mediar procesos de endocitosis, así como seleccionar y concentrar proteínas con carga, después se polimerizan para formar una estructura reticular en la superficie de la membrana plasmática y alteran la bicapa de fosfolípidos para formar una vesícula hacia el citosol y mediar la endocitosis. Tras la formación de una vesícula recubierta, los componentes de la capa se desarman, permitiendo la fusión con el compartimento objetivo. Interrumpir la unión de auxilina con HSC70 evita que las vesículas recubiertas de clatrina se descubran y también interrumpen el reciclaje y la endocitosis de las vesículas sinápticas (Schmid, 1997; Chang et al., 2002; Meyer et al., 2005; Augustine et al., 2006).

La HSC70 suprime la agregación de proteínas y las proteínas desnaturalizadas por el calor; además mantiene la homeostasis proteica (plegamiento de proteínas, translocación, montaje, desmontaje, diferenciación y degradación), en condiciones normales y durante el estrés. Se requiere para la expresión óptima de proteína como la mielina durante la diferenciación de oligodendrocitos (Aquino et al., 1998), además que regula el plegamiento y el montaje de miosina en el músculo esquelético (Srikakulam y Winkelmann, 2003).

La HSC70 facilita los eventos de maduración de proteínas e interactúa transitoriamente con polipéptidos nacientes en el proceso de síntesis y translocación dentro de los organelos (Beckmann et al., 1990; 1992). La HSC70, como otras chaperonas, interactúan con apolipoproteína B durante su maduración, además está relacionada con la maduración de los receptores esteroidales (Linnik y Herscovitz, 1998; Kimmins y MacRae, 2000).

La HSC70 puede regular la translocación de proteínas dentro de diferentes organelos celulares como retículo endoplasmático y mitocondria (Liu et al., 2012). Puede modular el sistema de transporte nucleocitoplasmático a través de la exportación nuclear de proteínas receptoras (Kose et al., 2005), adicionalmente, puede ayudar a importar proteínas del citoplasma al núcleo (Shi y Thomas, 1992).

La HSC70 está relacionada con el paso de las proteínas a los lisosomas para su degradación (Terlecky et al., 1992), ya que reconoce proteínas mal plegadas, para después entregarlas a glucoproteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP-2) para su posterior degradación (Lu et al., 2010). De igual manera, la HSC70 es necesaria para la activación de factor de choque térmico 1 en células de mamíferos (Ahn et al., 2005).

La HSC70 puede regular la apoptosis, el desarrollo embrionario y el envejecimiento celular (Beere, 2004; Sreedhar y Csermely, 2004; Kodiha et al., 2005). La insulina embrionaria puede regular algunas funciones de HSC70 como las de prevenir la apoptosis durante la embriogénesis temprana. La insulina embrionaria está relacionada con el desarrollo temprano, especialmente en la regulación de la supervivencia o muerte de las células a través de la inhibición de la apoptosis mediada por caspasas a través de la modulación de los niveles de HSC70 (De la Rosa et al., 1998).

EL EMBRIÓN BOVINO Y LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Estudios han demostrado que la activación del genoma embrionario del ganado se produce desde el estadio de una célula (Saeki et al., 1999). Además, se ha confirmado que el embrión puede sintetizar una mayor cantidad de HSP70 en respuesta al choque térmico en un estadio de dos células.

Los ovocitos bovinos inmaduros pueden sintetizar dos moléculas de HSC70 y una proteína correspondiente a HSP70, además, las tasas de síntesis de estas proteínas no se observan alteradas por el choque térmico. Después de la maduración de los ovocitos, la síntesis de las proteínas de HSC70 cesa y la tasa de síntesis de las otras HSP70 permanecen sin efecto al choque térmico (Hansen, 1999).

Por otra parte, Edwards y sus colaboradores (1997) demostraron que en grupos controles de embriones de dos células, existe una síntesis baja de HSP70, sin embargo, la síntesis de esta proteína se incrementa en condiciones de choque térmico. Los mismos patrones de síntesis de HSP70 anteriormente mencionados se observaron para los estadios de desarrollo de los blastocitos. Concluyendo que el incremento en la síntesis de HSP70 en embriones de dos células en respuesta al choque térmico podría deberse a la nueva transcripción o a la regulación post-traducciona de la síntesis de proteínas en algunos sistemas celulares, la síntesis de HSP70 puede incrementarse aún y en ausencia de transcripción, lo anterior debido al aumento en la eficiencia traslacional del ARNm de HSP70 (Theodorakis et al., 1988).

Además, α -amanitina, un inhibidor de la transcripción, no bloquea el incremento en la síntesis de HSP70 causado por choque térmico en el estadio de dos células, aunque sí en etapas posteriores (Edwards et al., 1997).

La transcripción del gen constitutivo de la proteína HSC70 ha sido detectado en ovocitos y embriones en las etapas de blastocito expandido (Wrenzycki et al., 1998).

APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso regulado génicamente, el cual permite que se lleve a cabo la muerte celular programada en organismos multicelulares. El mecanismo de la apoptosis incluye la condensación del núcleo, la fragmentación del ADN, la formación de protuberancias de la membrana, la ruptura del citoplasma y la formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitosis (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Diversos factores ocasionan que una célula sufra apoptosis a través de una de las dos vías principales, la intrínseca (vía de muerte mitocondrial) o la extrínseca (vía de muerte celular mediada por receptores). Ambas vías eventualmente activan caspasas para ejecutar la muerte celular (Budihardjo et al., 1999).

La vía intrínseca implica el aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa como respuesta a señales de muerte. Esas señales liberan moléculas pro-muerte como citocromo c y Smac/Diablo dentro del citoplasma. El citocromo c se une al factor de activación de la proteasa de Apoptosis 1 (Apaf-1) ayudando en la oligomerización y reclutamiento de procaspasas-9 para formar un apoptosoma funcional. Al mismo tiempo, Smac/Diablo bloquea al inhibidor de proteínas apoptóticas (IAPs) y el complejo apoptosoma procesa proteolíticamente la procaspasa-9 a una forma activa que finalmente conduce a la muerte celular por la activación de la caspasa-3 (Budihardjo et al., 1999; Zou et al., 1999; Van Gurp et al., 2003; Yan y Shi, 2005).

La vía extrínseca traduce las señales de muerte a través de la unión del “ligando de muerte extracelular” como TNF- α y el ligando Fas a sus respectivos receptores celulares. Una interacción homotípica toma lugar entre el dominio de muerte (DDs) del receptor del Factor de necrosis tumoral I y los receptores Fas con sus respectivas moléculas adaptadoras, TRADD y FADD (Locksley et al., 2001; Screamon y Xu, 2000; Yan y Shi, 2005). Finalmente, un complejo de señales inductoras de muerte (DISC), se forma para activar procaspasa-8, que a su vez desencadena caspasa-3 mediado por evento de muerte celular. La vía apoptótica inducida por Fas también puede reclutar la proteína adaptadora DaXX en lugar de FADD, para activar ASK-1 o el Regulador de la Señal de Apoptosis - Quinasa 1 (Chang et al., 1998), que activa SAPK/JNK, y de este modo se desencadena la apoptosis (Yang et al., 1997).

La vía extrínseca está vinculada a la intrínseca a través de las proteínas de la familia Bcl-2 (Gross et al., 1999), que incluyen miembros pro y anti apoptóticos. Este es el balance entre las proteínas de esta familia con funciones opuestas que deciden sobre la liberación de citocromo c y Smac/Diablo de la mitocondria (Green y Reed 1998; Willis et al., 2003).

Las proteínas de choque térmico participan en los procesos de modulación de las vías de apoptosis. La familia de las proteínas HSP70 son muy diversas, incluyen proteínas constitutivas e inducibles por estrés con funciones superpuestas o únicas en diferentes compartimentos celulares y en diferentes contextos celulares (Mayer y Bukau, 2005). Las proteínas de la familia de las HSP70 son mayormente anti-apoptóticas e interactúan con las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis inhibiendo la muerte celular en una serie de pasos a través de actividades chaperona-dependientes e independientes.

En la figura 3, se muestra como la HSP70 con función anti-apoptótica, protege a las células de citotoxicidad inducida por TFN, monocitos, estrés oxidativo, agentes quimioterapéuticos, ceramidas y radiación (Jaattela et al., 1992; Jaattela y Wissing, 1993; Simon et al., 1995; Karlseder et al., 1996; Mosser et al., 1997). La estimulación de la cascada apoptótica por óxido nítrico y choque térmico desencadena la translocación de Bax desde el citoplasma hacia la mitocondria donde es inhibida por la sobre expresión de HSP70 (Gotoh et al., 2004). Además, la HSP70 inhibe la formación del complejo apoptosoma funcional por la interacción directa con Apaf-1 (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000). La HSP70 previene eventos tardíos dependientes de caspasas, como la activación de la fosfolipasa A2 citosólica y cambios en la morfología nuclear, además puede proteger a las células de la expresión de caspasa-3 (Jaattela et al., 1998). La HSP70 también puede inhibir JNK, suprimiendo la fosforilación de JNK ya sea directamente o a través de la quinasa SEK (Mosser et al., 1997, 2000; Meriin et al., 1999; Volloch et al., 1999). Por otra parte, la activación de Bid mediada por caspasa-8, permite que Bax migre dentro de la membrana mitocondrial para desencadenar la liberación de varios factores de muerte (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). La HSP70 regula la activación independiente de Bid (Gabai et al., 2002). Además, varios estímulos inductores de muerte, Fas, TFN- α , entre otros, los cuales son conocidos por causar apoptosis vía ASK-1, pero las HSP70 bloquean al TFN por inhibición de ASK-1 (Park et al., 2002).

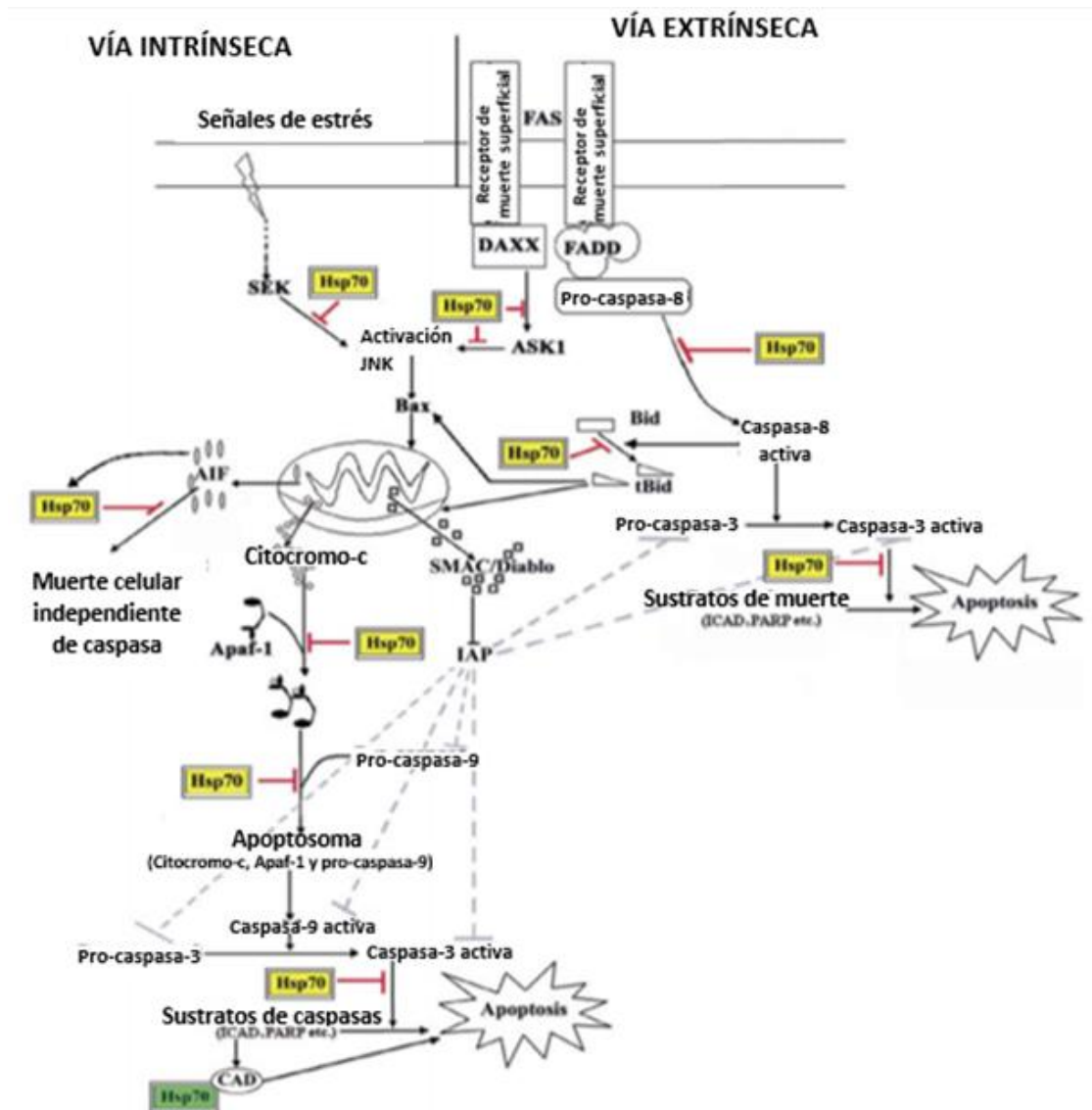


Figura 3. La HSP70 (recuadros amarillos) generalmente tiene una función antiapoptótica, ya que inhibe (líneas rojas) muchos pasos en las vías apoptóticas. Sin embargo, HSP70 (recuadros verdes), tiene un papel proapoptótico también, ya que es necesario para la actividad de la ADNasa activada por caspasas. (Arya et al., 2007)

Durante el desarrollo embrionario, previo a la implantación, la muerte celular programada se debe probablemente a estresores ambientales y a anomalías cromosómicas macroscópicas (Edwards, 1998). El proceso de apoptosis puede ser dividido en una fase de señalización río arriba y una fase de ejecución río abajo, seguida de la degradación de la célula (Kroemer et al., 1995). La regulación de la apoptosis puede ocurrir en cualquiera de estas fases y en múltiples niveles. La proteína supresora de tumores, p53, es conocida por su rol en la señalización de la apoptosis y el arresto del ciclo celular (Ko y Prives,

1996). Se piensa que la translocación nuclear es esencial para la función de la proteína p53 y esta actúa como un factor de transcripción de genes incluidos el gen BAX, relacionado con la apoptosis; y el gen p21, relacionado con arresto celular (Ko y Prives, 1996). Además, se ha demostrado que la proteína p53, se encuentra en el citoplasma de blastocitos bovino bajo condiciones normales de cultivo y estos blastocitos bovinos pueden regular la expresión del gen para la proteína HSP70 en respuesta al incremento de la temperatura (Kawarsky y King, 2001).

El choque térmico induce apoptosis activando la vía intrínseca o mitocondrial (Bettaieb y Averil-Bates, 2005), lo que conlleva a la despolarización mitocondrial, liberación del citocromo c y del factor de inducción de apoptosis y la formación del complejo apoptosoma (compuesto de citocromo c y del factor de inducción de apoptosis-1, Apaf-1) que activan procaspasa-9. Como resultado, procaspasa-9 se convierte en caspasa-9, que a su vez conduce a la activación de la caspasa-3, activación de la DNasa caspasa-activada y fragmentación del ADN (Beere, 2004; Sprick y Walczak, 2004). El complejo TFN- α induce apoptosis a través de la activación de receptores mediados o por la vía extrínseca. En esta vía el complejo TFN- α con su receptor estimulan la formación del complejo de señalización de muerte (DISC) y la activación de caspasa-8, que a su vez provoca la activación directa de caspasas río abajo, como la caspasa-3 (Sprick y Walczak, 2004). Hay evidencia que la inducción de apoptosis por TFN- α puede implicar también la vía mitocondrial. En particular, la caspasa-8 puede adherirse a la familia de proteínas Bcl-2 y Bid, para generar un fragmento C-terminal que se transloque en la mitocondria y cause despolarización y liberación de citocromo c (Luo et al., 1998). Se sabe que la activación de caspasa-9 puede ser importante para la señal pro-apoptótica por TFN- α y otros ligandos que activan la vía intrínseca, en casos donde se reduce la formación de DISC o cuando las cantidades de las proteínas antiapoptóticas como la proteína de choque térmico 70 o el inhibidor de la apoptosis son elevadas, de modo que las cantidades de caspasas-8 activadas son insuficientes para inducir la caspasa-3, sin implicación de actividad apoptogénica mitocondrial (Sprick y Walczak, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio Acuático-Pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco; y en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Además, se contó con el apoyo y la colaboración del Centro de Investigación y Producción Agropecuaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León (CIPA, UANL) y del Centro de Biotecnología Reproductiva de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León (CBR, UGRNL).

Embriones *in vivo* e *in vitro* sin suplementación de la proteína HSC70

Para cumplir con el primer objetivo específico donde se analizaron las concentraciones basales de los genes HSPA1A y HSPA8 antes de la suplementación con la proteína recombinante HSC70 en embriones *in vivo* e *in vitro*, se llevó a cabo la siguiente metodología, la cual fue aprobada por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

Los embriones de bovino, *in vivo* se obtuvieron a partir de un protocolo de superovulación, inseminación artificial (IA), lavado y recuperación de embriones en hembras de la raza Simbrah, a las cuales se les colocó un dispositivo intravaginal CIDR (Controlled Internal Drug Release; Pfizer® 1.9g de progesterona natural micronizada) como fuente de progestágeno por un período de 7 días. Al tiempo de la aplicación del dispositivo, se administró 2.0 mg de estradiol intramuscular (Benzoato de estradiol, Syntex®, 2.0 mg de benzoato de estradiol en 1.0 ml). Los días 4, 5 y 6 (post- aplicación del CIDR), se llevaron a cabo administraciones de 360 mg de hormona folículo estimulante (Folltropin-V, Bioniche®). El día 6 se aplicaron dos dosis de 25 mg (una cada 12 horas) de un análogo sintético de la prostaglandina F2 α (Lutalyse, Zoetis®, 5mg/ml de Dinoprost- trometamina). Durante el día 7, tiempo del retiro del CIDR, se aplicó una dosis más de hormona folículo estimulante y en el día 8 se inseminó por la mañana y tarde. En el día 7 posterior a la inseminación artificial se llevó a cabo el lavado y

recuperación de embriones. Previamente, las hembras recibieron 6.0 ml de lidocaína al 2% vía epidural, con la finalidad de disminuir la peristalsis y el dolor. Se determinó la respuesta ovárica mediante palpación rectal de los cuerpos lúteos y para llevar a cabo la colección de los embriones se introdujo una sonda Foley de 2 vías; por una de las vías se suministró el medio Complete Flush (Syngro®, Bioniche), recuperando el medio y los embriones a través de masajes en los cuernos uterinos por la otra vía. Los embriones fueron lavados con la misma solución (Complete Flush, Syngro®, Bioniche) y después depositados en cajas de Petri. Se realizó la búsqueda de embriones al estereoscopio y se clasificaron según el manual de la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS). Posteriormente, los embriones fueron almacenados, tres por tubo eppendorf, en 100 µl de Trizol® (Invitrogen) a 5°C para su posterior extracción de ARN.

En cuanto a la producción *in vitro* de embriones bovinos, se llevaron a cabo aspiraciones foliculares de ovarios, pertenecientes a ganado Simmental, Simbrah, Charolais y Brahman. La media de la condición corporal de estas últimas fue de 3.5, en base a una escala del 1 al 5. El contenido aspirado fue filtrado y los ovocitos lavados en solución TCM 199, los ovocitos seleccionados fueron madurados *in vitro* e incubados a 38.5°C en 5% de CO₂ en aire humidificado durante 24 horas. Después fueron fertilizados utilizando el medio de fertilización, y los ovocitos y los espermatozoides se incubaron bajo las mismas condiciones que el procedimiento de maduración *in vitro*. Después de 18 horas de la fecundación *in vitro*, los cigotos presuntivos fueron desnudados por pipeteo y se transfirieron a medio de cultivo por 60 horas. Posteriormente se llevaron a cabo evaluaciones de los embriones presuntivos, y aquellos que presentaron división se transfirieron nuevamente a medio de cultivo. Los embriones se mantuvieron en esta condición hasta el día 7, cuando se llevó a cabo la identificación y clasificación de los mismos por grado y calidad acorde a lo establecido en el manual de la IETS, y posteriormente se efectuó la extracción de ARN por el método de trizol modificado.

Embriones *in vitro* suplementados con la proteína HSC70

En cuanto la producción *in vitro* de embriones, los medios de maduración (IVM), fertilización (FCDM), cultivo temprano (CDM1) y cultivo tardío (CDM2) utilizados en el experimento, se suplementaron con albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos

grasos y fueron elaborados en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP. Los ovarios se obtuvieron a partir de hembras sacrificadas en el rastro municipal de Guadalajara, Jalisco y se transportaron en solución salina al 0.9% a temperatura ambiente (20 a 24°C) hasta el CNRG. Los folículos ováricos de 3-6 mm fueron puncionados y aspirados con una aguja calibre 18 G y jeringa de 10 mL; el fluido folicular y el paquete celular se colocaron en un tubo cónico de 50 mL a una temperatura de 38.5°C, se dejó sedimentar durante 15 minutos para obtener el paquete celular el cual se colocó en cajas de búsqueda, se seleccionaron los complejos cúmulus-ovocito con un citoplasma uniforme, granular y rodeados de una masa compacta de células cumulares. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en el medio de maduración IVM, adicionado con HCG, FSH, β -estradiol, cisteamina y factor de crecimiento epidérmico durante 23 horas a 38.5°C, saturación de humedad y atmósfera de 5% CO₂ en aire. Los ovocitos maduros fueron transferidos a medio FCDM, en co-cultivo con espermatozoides para ser fertilizados durante 18 horas en las condiciones antes mencionadas, el semen fue descongelado y procesado en gradientes de Percoll® 45:90%. Los presuntos cigotos fueron transferidos a medio CDM1 y en ese momento fueron divididos al azar en tres grupos, uno de ellos fue suplementado con 50 ng, el otro con 100 ng de la proteína recombinante HSC70 (Sigma-Aldrich) y uno más que permaneció sin suplementación de HSC70 y fue considerado como el grupo control; fueron cultivados por 56 horas a 38.5°C, saturación de humedad y atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y 90 % N₂ en aire. Después, los embriones de más de seis células fueron transferidos a medio CDM2 y nuevamente fueron suplementados (con 50 ng y 100 ng) o no (control) con la proteína HSC70 de acuerdo al grupo al que pertenecían anteriormente, en donde permanecieron en cultivo por 120 horas en las condiciones antes mencionadas. Al término del cultivo, los embriones fueron categorizados y colocados en tubos eppendorf con Trizol, para su posterior extracción de ARN.

Extracción de ARN de embriones bovinos (*in vivo* e *in vitro*) por el método de Trizol modificado

A partir del protocolo propuesto por Pavani y sus colaboradores (2015), se extrajo el total del ARN utilizando un protocolo a partir de 100 μ l de Trizol® (Invitrogen) y acorde a lo descrito por el fabricante. Después se realizó la incubación de las muestras a temperatura

ambiente por un tiempo de 3 minutos. Enseguida, se agregaron 50 μl de cloroformo por muestra y se mezcló por inversión por 15 segundos; a continuación, se centrifugó a 10,350 rpm por 30 minutos a 4°C. Al término de esto, la mezcla se separó en 3 fases de las cuales se tomó la fase superior incolora y esta fue transferida a un nuevo tubo eppendorf. Después, se precipitó el ARN, agregando a cada tubo 2.5 volúmenes de isopropanol. Enseguida, se centrifugaron a 10,350 rpm por 30 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla encontrada en el fondo del tubo se lavó con 150 μl de etanol al 70% y se centrifugó a 8200 rpm por un tiempo de 30 minutos. Finalmente, se eliminó el alcohol, la pastilla de ARN se dejó secar por 30 minutos a 37°C y se re suspendió con 20 μl de agua DEPC (dietilpirocarbonato).

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se llevó a cabo con el kit GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR System de Promega®. En un tubo eppendorf, se adicionó un volumen correspondiente de 5 μl de ARN, 1 μl de oligo desoxitimidina (oligo dT 0.5mg/ μl), 1 μl de la mezcla de random primers. Posteriormente se incubaron los tubos en un termoblock sin agitación a 70°C por 5 minutos, inmediatamente después fueron colocados en agua con hielo por al menos 5 minutos. En seguida, se adicionaron a cada tubo 4.9 μl de agua libre de nucleasas, 4 μl de buffer de la enzima RT (First Strand) 5X, 1.6 μl de MgCl_2 , 1 μl de la mezcla de los nucleótidos de PCR, 0.5 μl del inhibidor de ribonucleasa y 1 μl de la enzima transcriptasa reversa, a continuación, se incubaron los tubos en un termoblock a 25°C por un tiempo de 5 minutos. Posteriormente, se amplificó la reacción incubándola a 42°C por 45 minutos y se inactivó calentándose a 70°C por 15 minutos. El ADN complementario obtenido, fue cuantificado con el fluorómetro Quantus™ y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Análisis de la expresión de los genes HSPA1A, HSPA8 (genes que codifican para la síntesis de HSP70 y HSC70), Bax, Bcl-2 (gen pro apoptótico y anti apoptótico), MYO1B y GAPDH (constitutivos); por PCR tiempo real

Todos los cebadores y las sondas utilizadas (Tabla 1) fueron diseñados por IDT (Integrated DNA Technologies). Cada reacción se utilizó por triplicado usando el GoTaq Probe qPCR Master Mix de PROMEGA®. El protocolo utilizado consistió en la activación de la GoTaq polimerasa por un ciclo a 95°C por un tiempo de 2 minutos, posteriormente, la desnaturalización por 15 segundos a 95°C, y la alineación y extensión por 40 ciclos a 60°C por un minuto en un sistema de detección por tiempo real (Applied Biosystems 7500/7500 Fast).

Tabla 1. Cebadores (forward y reverse) y sondas utilizadas en la PCR tiempo real

<i>Gen</i>	<i>Número de acceso (GeneBank)</i>	<i>Secuencia de cebadores y sondas</i>	<i>Tamaño del producto (pb)</i>
HSPA1A	NM_174550.1	F:CACCATTGAGGAGGTGGATTAG R:TAGCTGATGGCTGATGAAAGG S:FAM/ATGGAGACT/Zen/GTTGGGATCCAAGGC	128
HSPA8	NM-174345.4	F:CCAGGTTGCTGACTCTTTCA R:GGAAGACACCCACACAAGAATA S:FAM/TGCAGTTGG/Zen/CATTGATCTTGGCAC	96
BAX	NM_173894.1	F:CGAGTTGATCAGGACCATCAT R:ATGTGGGTGTCCCAAAGTAG S:HEX/TCGAAGGAA/Zen/GTCCAATGTCCAGCC	579
BCL-2	NM_001166486.1	F:GATTTCTCCTGGCTGTCTCTG R:GCCTGTGGGCTTCACTTAT S:FAM/TTGCATCAC/Zen/CCTGGGTGCCTA T	792
MYO1B	NM_001102199.1	F:CTGGTTTGTGCTGGCTTTAC R:CCATCCTACAGGGTTCCTAATG S:FAM/CAGTTACTG/Zen/GCGATAATGGACAGC GT.	155

Los resultados de las diferencias en las expresiones de los genes estudiados fueron analizados por cuantificación relativa mediante $\Delta\Delta\text{CT}$. Y se informan como la expresión relativa o diferencia de n veces en comparación con el calibrador después de la normalización del nivel de la transcripción al nivel medio de los genes de control endógeno, gliceraldehído-e-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y *Bos taurus* miosina (MYO1B).

Análisis del desarrollo embrionario *in vitro* posterior a la suplementación con la proteína HSC70

De manera adicional y bajo el protocolo de producción *in vitro* de embriones bovino anteriormente mencionado, se suplementaron (con 25 y 50 ng) o no (0, grupo control) los medios de cultivo temprano (CDM1) y tardío (CDM2) con la proteína recombinante HSC70.

Lo anterior con la finalidad de evaluar el desarrollo embrionario a través de las variables, porcentaje de división embrionaria, embriones de seis células o más y blastocistos al día 6, blastocistos al día 7 y número de células en blastocisto al día 7.

El conteo de las células en los blastocitos al día 7 del cultivo, días se llevó a cabo a través del protocolo de tinción diferencial descrito por Thous et al., (2001).

Análisis estadístico

Las expresiones de los genes fueron examinadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por distintas pruebas de comparaciones múltiples; Newman-Keuls (efecto de la suplementación con 50 ng versus el control), Dunn (embriones *in vitro* e *in vivo*, efecto de la suplementación con 100 ng versus el control), Kruskal-Wallis

(suplementados con la proteína recombinante versus no suplementado) y Bonferroni (embriones transferibles y degenerados). Para graficar los resultados obtenidos se utilizó el software GraphPad Prism versión 4.0 para Windows.

Para el análisis de la viabilidad celular en embriones cultivados *in vitro* en distintas condiciones de cultivo (sin suplementación y con suplementación de proteína HSC70), los datos se sometieron a un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM (SAS). Previo al análisis, los datos, expresados como proporciones (p) que no cumplieron con el supuesto de normalidad, fueron transformados a su arco seno (\sqrt{p}), para ser analizados con GLM y posteriormente se re-transformaron a los valores reales y se expresaron como porcentajes en los resultados.

RESULTADOS

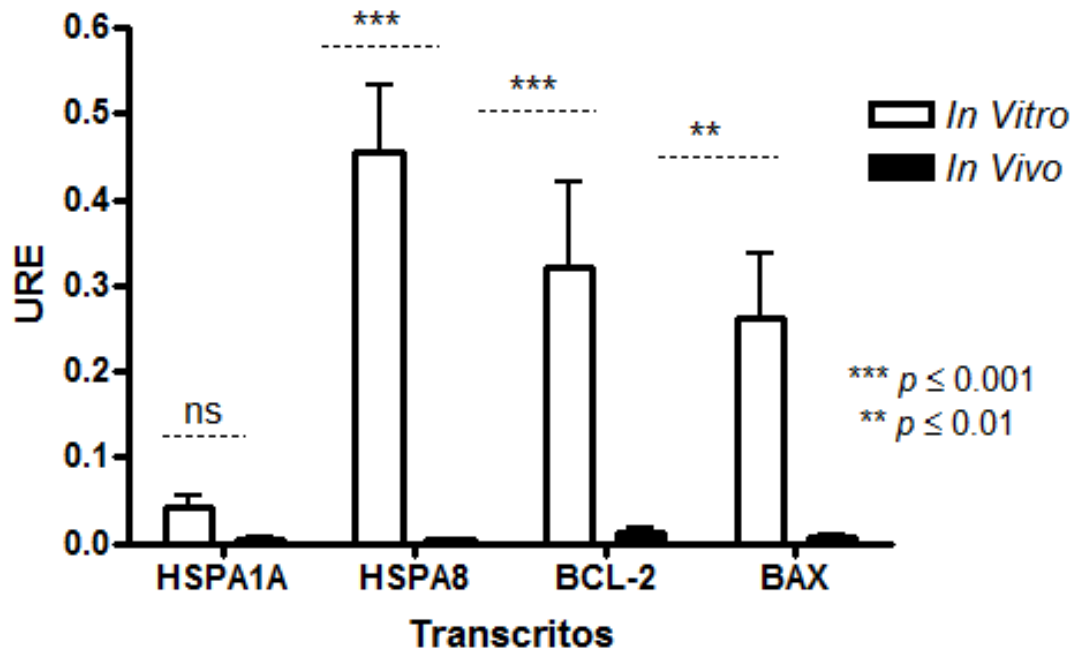
Expresión de los genes HSPA1A y HSPA8 y su relación con genes relacionados con la apoptosis en embriones bovino *in vivo* e *in vitro*

En relación a los embriones obtenidos *in vivo*, después de realizar el protocolo de superovulación (SO), inseminación artificial y lavado de embriones en dos hembras bovino de la raza Simbrah, se obtuvieron seis embriones; los cuales fueron categorizados como mórulas y blastocitos calidad 1 (n=3 mórulas y n=3 blastocistos). Los embriones fueron depositados en grupos de tres (3 mórulas y 3 blastocistos) en tubos eppendorf con 100 µl de Trizol® (Invitrogen) a 5°C para su posterior extracción de ARN. Se extrajo el total del ARN por el método de Trizol modificado. El ARN obtenido se utilizó para la posterior síntesis de ADNc y se cuantificó por fluorescencia obteniendo resultados de 31 ng/µL (en el grupo de blastocistos) y 41 ng/µL (en el grupo de mórulas).

Y los resultados obtenidos de los embriones producidos *in vitro* a partir de aspiraciones foliculares de ovarios pertenecientes a ganado Simmental, Simbrah, Charolais y Brahman, fueron los siguientes. Al término del protocolo de producción embrionaria, se llevó a cabo la identificación de los embriones en base a códigos numéricos para el desarrollo y la calidad de los mismos. Los embriones utilizados para la investigación se encontraron en un estadio de blastocito de calidad transferible. Los cuales fueron almacenados en tubos eppendorf con trizol (3 embriones por tubo) a 5°C para su posterior extracción de ARN por medio del protocolo modificado. El ARN obtenido se utilizó para la síntesis de ADNc y a la cuantificación por fluorescencia se obtuvieron resultados entre 9 y 22 ng/µL.

Una vez obtenido el ADNc de los embriones *in vivo* e *in vitro*, se analizaron las expresiones de los genes a través de PCR tiempo real obteniendo los siguientes resultados.

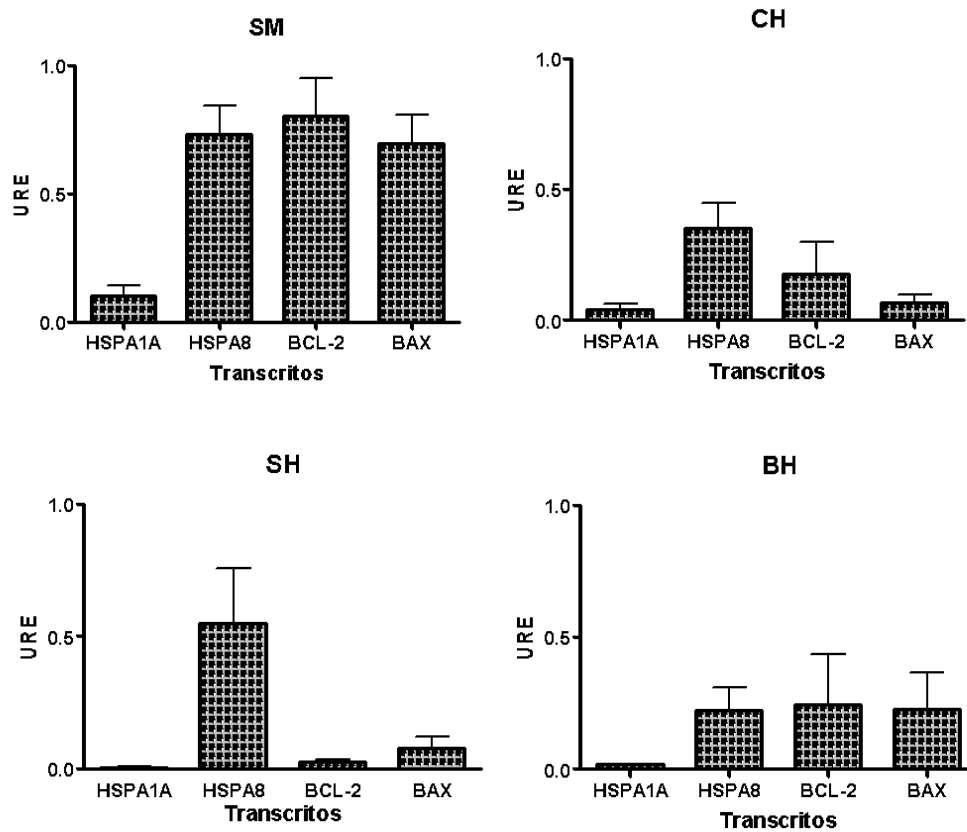
En la Gráfica 1 se puede observar que los niveles de expresión basal de los genes HSPA8, Bcl-2 y Bax son significativamente mayores en los embriones *in vitro*, comparándolos con los *in vivo* (***) $p < 0.001$ / ** $p < 0.01$). Además, la expresión al alta del gen HSPA8 pudiera asociarse con una regulación de la apoptosis, ya que, aunque se observa expresión del gen pro-apoptótico Bax, la expresión de Bcl-2 con función anti apoptótica es mayor.



Gráfica 1. Expresión basal de genes de estudio en embriones *in vitro* vs *in vivo*.

En la Gráfica 2, se muestra la expresión basal de los genes estudiados en embriones *in vitro* de calidad transferible en las razas Simmental (SM), Charolais (CH), Simbrah (Sh) y Brahman (BH).

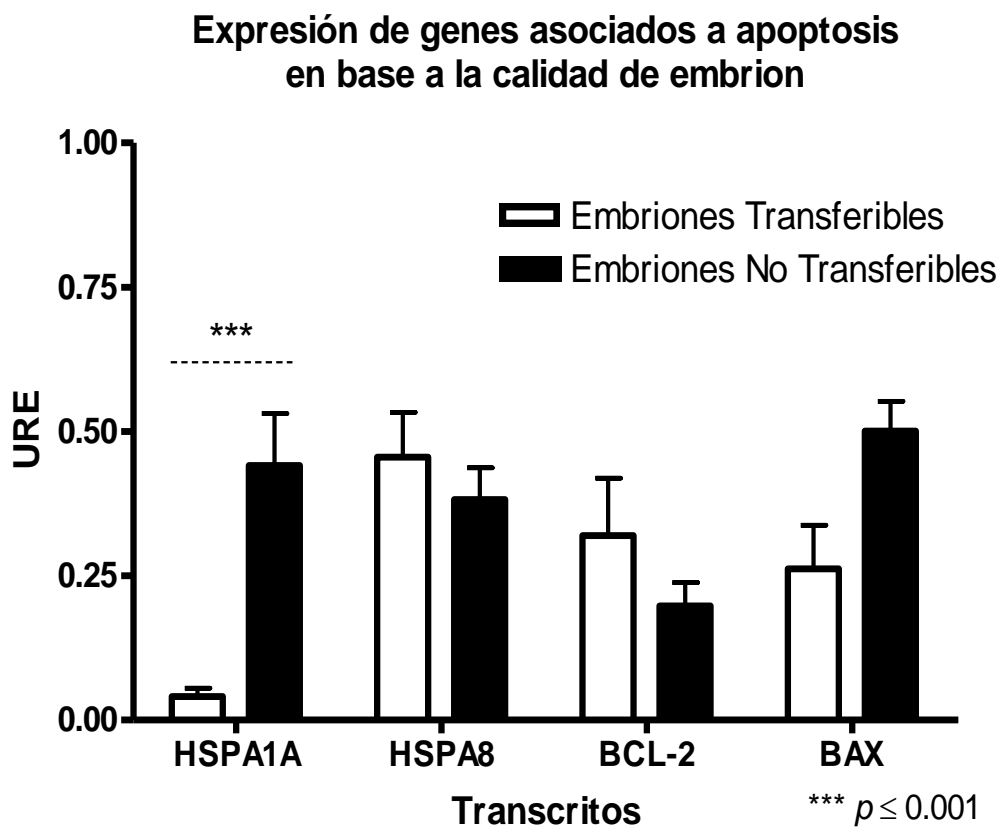
El nivel de expresión del gen HSPA8 es mayor que el de HSPA1A, en todas las razas, sugiriendo que la proteína HSC70 juega un papel en el mantenimiento de la homeostasis proteica la cual pudiera ser relacionada con la calidad de transferibles de los embriones obtenidos. Lo anterior, también podría asociarse a una regulación en la apoptosis, ya que, aunque el gen Bax se expresa, también se incrementa la expresión de Bcl-2.



Gráfica 2. Expresión basal de genes en embriones *in vitro* de calidad transferible por raza.

En la siguiente gráfica (Gráfica 3), se muestra la expresión basal de los genes estudiados en base a la calidad embrionaria (transferible y no transferible).

En donde se observa que el nivel de expresión del gen HSPA1A (que codifica para la proteína inducida por estrés HSP70) es significativamente mayor ($p < 0.001$) en los embriones degenerados en comparación con los embriones clasificados por su calidad como transferibles; además, se observó una mayor expresión del gen pro apoptótico (Bax) en embriones no transferibles en comparación con el otro grupo de estudio.



Gráfica 3. Expresión basal de genes en base a la calidad embrionaria.

Expresión del gen HSPA8 y su relación con genes apoptóticos en embriones bovino *in vitro* después de la suplementación con 50 y 100 ng la proteína recombinante HSC70

Al final del cultivo, se identificó y clasificó a los embriones en base a códigos numéricos para el estadio de desarrollo y calidad de los mismos, lo anterior acorde al manual de la IETS.

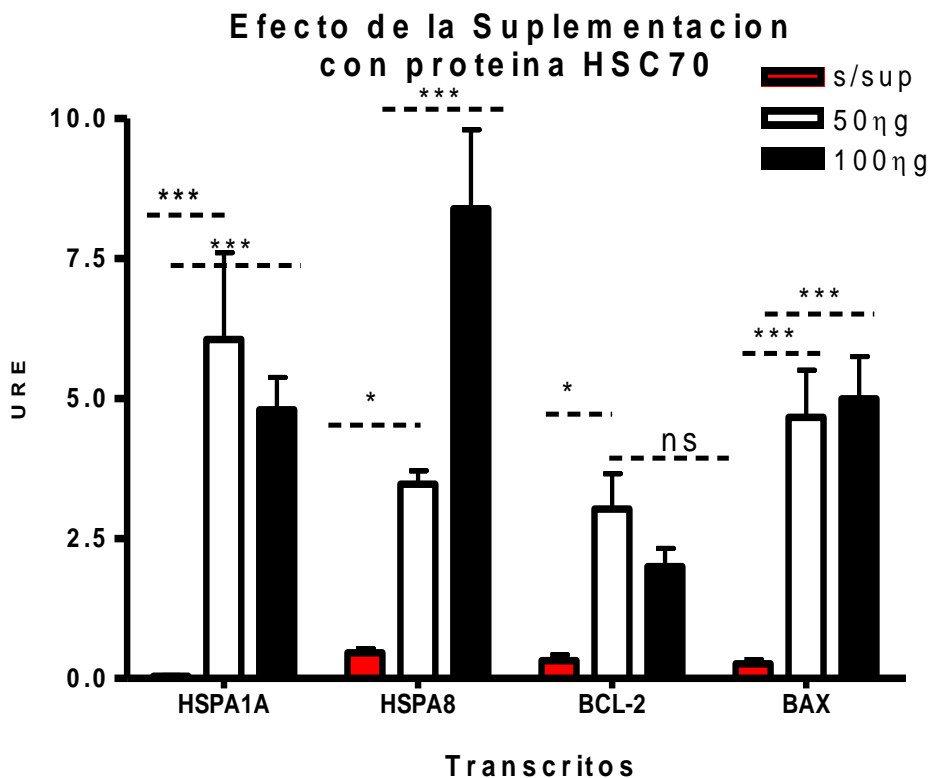
Los embriones que fueron suplementados con 50 ng de la proteína recombinante se encontraron con mejores características tanto de desarrollo como de calidad, ya que el 63% de los resultantes de este grupo fueron categorizados como blastocitos y el 100% de ellos con una calidad perteneciente al código 1 (excelente o buena). Seguidos por el grupo control (sin suplementación) que también obtuvo el 63% de blastocitos, pero solo el 60% fueron identificados con el código 1 de calidad. En el grupo suplementado con 100 ng, solo se obtuvieron embriones con una calidad de muerto o en degeneración (código 4).

Los embriones utilizados para la investigación fueron almacenados en tubos eppendorf con Trizol a 5°C para su posterior extracción de ARN por medio del protocolo modificado. El ARN obtenido se utilizó para la síntesis de ADNc y a la cuantificación por fluorescencia se obtuvieron resultados entre 10 y 20 ng/μL.

Después de obtener el ADNc de los embriones producidos *in vitro* suplementados con la proteína HSC70, se analizaron las expresiones de los genes a través de PCR.

En la Gráfica 4 se observa diferencia en la expresión de los genes de estudio en embriones producidos *in vitro* suplementados con 50 y 100 ng de la proteína recombinante de choque térmico (HSC70), niveles que son comparados respecto al control (sin suplementación).

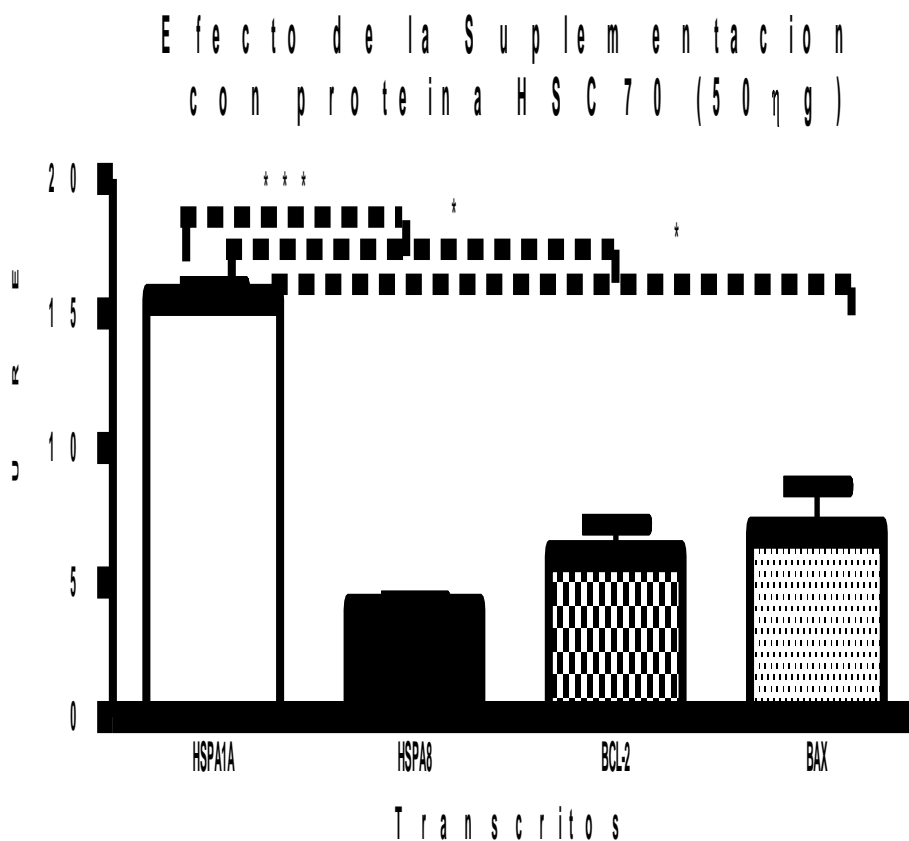
Se observó que los embriones suplementados con la proteína recombinante expresan, de manera significativa, una mayor cantidad de los genes HSPA1A, HSPA8, Bcl-2 y Bax ($p < 0.01$). Además, los resultados en esta gráfica indican que se expresa en mayor proporción el gen HSPA1A que codifica para la proteína inducible por estrés (HSP70) cuando los embriones son suplementados con dosis bajas (50 ng) ($p < 0.001$). Por otra parte, la suplementación a dosis altas (100 ng) con la HSC70 da lugar a una mayor expresión del gen HSPA8 en comparación con aquellos no suplementados o con los suplementados con dosis bajas ($p < 0.001$). En cuanto a los genes asociados a la apoptosis, se muestra que el gen pro apoptótico Bax tiene una expresión mayor en ambas concentraciones en comparación con el control ($p < 0.01$); caso contrario al gen anti apoptótico Bcl-2 que tuvo una mayor expresión a dosis bajas de suplementación.



Gráfica 4. Comparación de la expresión de genes de embriones *in vitro* suplementados (con HSC70) respecto al control (sin suplementación).

En la Gráfica 5 podemos observar las expresiones de los genes de estudio en embriones bovinos producidos *in vitro* suplementados con 50 ng de la proteína recombinante HSC70 respecto al control (sin suplementación).

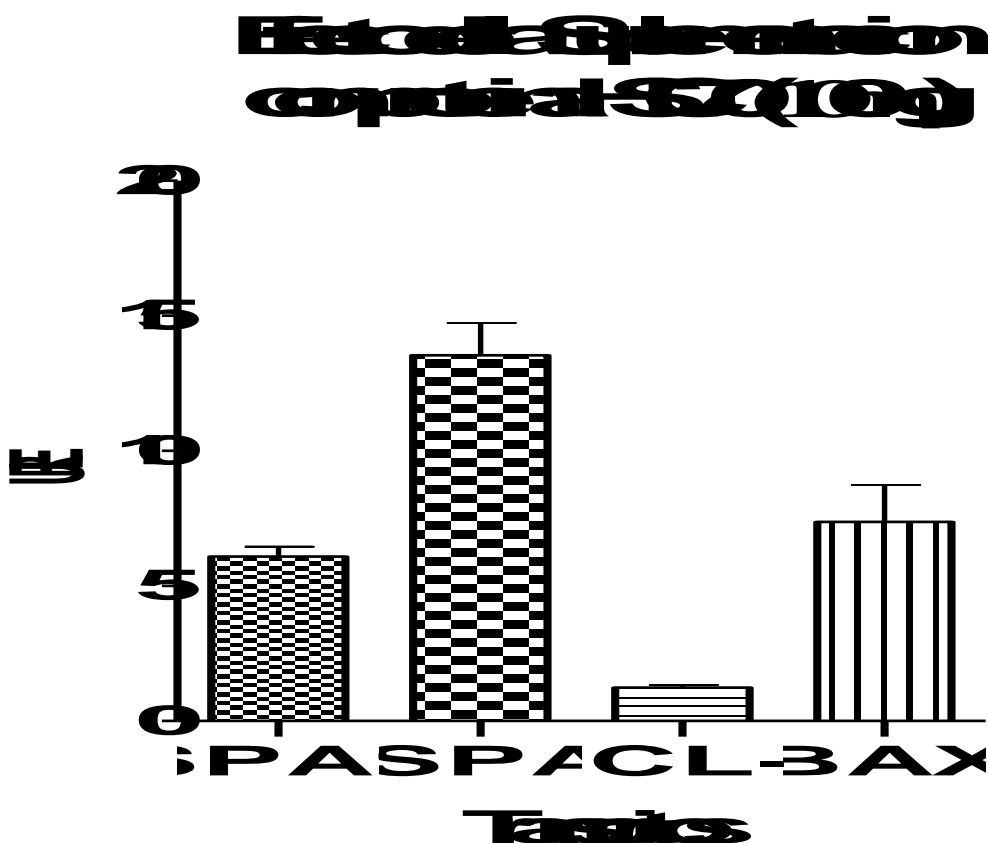
Apreciando que el aumento en el gen que codifica para la proteína inducida por estrés (HSPA1A) pudiera disminuir la expresión del gen HSPA8 que codifica para la proteína constitutiva HSC70. Además, que la suplementación con dosis bajas de la proteína recombinante pudiera regular las expresiones de los genes apoptóticos, lo cual pudiera relacionarse con las buenas características (estadio de desarrollo y calidad) en la que se encontraba los embriones en el momento que fueron certificados e identificados.



Gráfica 5. Nivel de expresión de genes de estudio en embriones *in vitro* suplementados con 50 ng (con HSC70) respecto al control (sin suplementación).

En la Gráfica 6 podemos observar las expresiones de los genes de estudio en embriones bovinos producidos *in vitro* suplementados con 100 ng de la proteína recombinante HSC70 respecto al control (sin suplementación).

Observando que el aumento en la suplementación da lugar a una mayor expresión del gen HSPA8 que codifica para la proteína HSC70; la cual pudiera regular a la alta la expresión del gen pro apoptótico Bax, disminuyendo la de Bcl-2. Lo anterior pudiera relacionarse con el poco desarrollo de los embriones y la mala calidad de los mismos en este grupo de estudio. Sin embargo, no se puede asegurar que los tratamientos son iguales, aunque no se encontraron diferencias significativas, lo cual no descarta el posible efecto de esta suplementación sobre el efecto biológico.



Gráfica 6. Nivel de expresión de genes de estudio en embriones *in vitro* suplementados con 100 ng (con HSC70) respecto al control (sin suplementación).

Desarrollo embrionario *in vitro* posterior a la suplementación con la proteína HSC70

Durante la evaluación del desarrollo embrionario (porcentaje de división embrionaria, embriones de seis células o más y blastocistos al día 6, blastocistos al día 7 y número de células en blastocisto al día 7), se obtuvo que aquellos suplementados con 25 y 50 ng (tratamiento 25 y 50 respectivamente) fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) para todas las variables de respuesta evaluadas con respecto al tratamiento sin suplementación (tratamiento 0), excepto el número de células totales en blastocisto al día 7 donde el tratamiento 50 fue significativamente mayor comparado con los tratamientos 0 y 25 (Tabla 2).

Tabla 2. Desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* suplementados con dos concentraciones de HSC70.

Tratamiento	No. de presuntos cigotos cultivados	División embrionaria (%)	Embriones ≥ 6 células (%)	Blastocistos al día 6 (%)	Blastocistos al día 7 (%)	No. de células totales en blastocisto al día 7
0	384	70.27 \pm 3.9a	51.03 \pm 7.7 ^a	10.81 \pm 1.5a	15.98 \pm 5.0a	132.81 \pm 17.8a
25	387	80.64 \pm 4.6b	65.81 \pm 5.0b	17.48 \pm 3.5b	24.92 \pm 1.9b	127.08 \pm 18.4a
50	374	82.72 \pm 3.2b	66.23 \pm 4.6b	19.34 \pm 1.9b	28.25 \pm 4.9b	188.24 \pm 18.4b

Datos de 6 réplicas. Los valores son expresados como porcentajes y corresponden a MMC \pm EEM de las proporciones. Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Durante muchos años se ha trabajado en la búsqueda de reproducir artificialmente los eventos de la maduración de los gametos, fertilización de los mismos y el desarrollo embrionario temprano; y lo que anteriormente sólo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha comenzado a utilizar con fines comerciales.

Los resultados de producción *in vitro* de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que avanzaron los conocimientos acerca de las necesidades de estos. Para ello, fue necesario transformar los medios de cultivo primitivos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero fetal, en medios de cultivo donde sus componentes pudieran ser estudiados en función del efecto que generan sobre el desarrollo embrionario, su calidad posterior a la criopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables.

Por otra parte, las proteínas de choque térmico (HSP) se encuentran entre las primeras proteínas producidas durante el desarrollo embrionario y son cruciales para la función celular. Aunque las HSP se han estudiado ampliamente en humanos y ratones, existe poca información sobre las funciones de los genes que las codifican en embriones bovinos (Zhang et al., 2011).

La identificación de genes de las HSP que contribuyen de manera específica a la supervivencia del embrión puede ser una oportunidad para mejorar la protección de los embriones *in vitro* frente a diferentes condiciones tóxicas y mejorar las tasas de gestación en el ganado (Hansen, 2007). En este estudio, se demostró que los genes HSP investigados, se expresan de forma distinta entre blastocistos y embriones degenerados (no transferibles). Por otra parte, se ha informado que cambios relativamente pequeños (disminución o aumento) en los niveles de expresión de HSP pueden resultar en anomalías del crecimiento y muerte celular (Nollen y Morimoto, 2002). Además, la evaluación de la expresión de isoformas de transcripción alternativas en los embriones examinados en este estudio da testimonio de la importancia de la inclusión de este enfoque en los estudios de expresión génica. Las diferencias de expresión génica entre blastocistos y embriones degenerados observadas en este estudio con efectos significativos en el desarrollo requiere más investigación; pero dado que las HSP se encuentran entre las primeras proteínas producidas durante el desarrollo embrionario (Neuer et al., 1999), la

determinación de los patrones de expresión de estos genes en blastocistos versus embriones degenerados podría conducir a la identificación de genes específicos involucrados en el éxito reproductivo.

Por otra parte, los resultados de esta investigación concuerdan con lo dicho por Balasubramanian y sus colaboradores (2007) quienes concluyeron que la disminución en la tasa de desarrollo embrionario durante la producción *in vitro*, puede asociarse a factores de estrés como la exposición de los embriones a temperaturas no constantes que conllevan a la apoptosis. Ya que la temperatura por encima de la homeotermia puede ser perjudicial para el desarrollo embrionario por lo que las células pueden producir proteínas de choque térmico para tratar de mitigar estos efectos. Mortensen y sus colaboradores (2010), examinaron la capacidad de desarrollo de los ovocitos equinos después de una exposición al calor (42°C, por 2 o 4 horas) durante las etapas tempranas y tardías de la maduración *in vitro*. Se compararon las tasas de maduración nuclear del ovocito, la división después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y desarrollo embrionario avanzado (mórula o blastocisto) contra los controles no expuestos. Las concentraciones de ARNm de la proteína de choque térmico 70 (HSPA1A) fueron determinadas mediante PCR tiempo real en los blastocistos resultantes y fueron comparados con los embriones derivados *in vivo* de yeguas control, encontrando que la exposición de los ovocitos al calor al inicio de la maduración *in vitro* no tuvo ningún efecto. Sin embargo, la exposición a 42°C al final del cultivo de maduración redujo las tasas de maduración nuclear de los ovocitos tanto para los expuestos durante 2 horas (43/105= 43%) en comparación con el control (70/103=68%; $p < 0.01$) como aquellos expuestos por 4 horas (47/106= 44%) en comparación con el grupo control (60/103= 59%; $p < 0.05$). Además, la exposición tardía al calor redujo el desarrollo de las etapas de mórula y blastocisto después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI; 18/89= 20%) en comparación con el control (43/128= 34%; $p < 0.05$). Siete días después de la exposición al calor de los ovocitos, los blastocistos resultantes tenían una mayor expresión del gen HSPA1A, en relación con los del grupo control. Los embriones producidos *in vitro* e *in vivo* de menor calidad tenían concentraciones de HSPA1A significativamente más altas que los embriones producidos *in vivo* de mayor calidad. Y en general los embriones producidos *in vitro* (incluidos los controles) tenían niveles aumentados de HSPA1A en relación con los embriones producidos *in vivo*. Siendo estos resultados similares a los obtenidos en este estudio donde se pudo demostrar que los embriones obtenidos *in vitro* expresan una

mayor cantidad de los genes de estudios (incluidos el HSPA1A) en comparación con los *in vivo*, lo que sugiere una respuesta ante el daño ambiental. Por otra parte, la suplementación con la proteína recombinante HSC70 estimuló la expresión del gen HSPA1A en ambas concentraciones (50 y 100 ng); pero aquellos suplementados con dosis bajas (50 ng) y que expresaron una mayor cantidad del gen HSPA1A, resultaron ser los de mejor calidad al momento de la identificación, en comparación con los suplementados con dosis altas (100 ng) y con el control (sin suplementación).

Las bajas tasas de división y proporción de ovocitos convertidos en blastocistos luego de la FIV, se relacionan con los daños en sus componentes citoplasmáticos y nucleares generados por el choque térmico durante la maduración *in vitro*. El aumento de la actividad apoptótica y en la producción de especies reactivas de oxígeno son considerados los principales mecanismos implicados en el deterioro de la calidad, tanto en ovocitos, como en los embriones bovinos expuestos a choque térmico. Teniendo en cuenta estos mecanismos es posible utilizar agentes de termorresistencia, como los inhibidores de apoptosis y antioxidantes (Wang et al., 2007; Salzano et al., 2014; Wang et al., 2014; Fakruzzaman et al., 2015, Rodrigues-Cunha et al., 2016), así como de proteínas que mitiguen los efectos del choque térmico durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario.

Por lo anterior durante esta investigación se demostró que la suplementación de los medios de cultivo de embriones con la proteína recombinante HSC70, promueve la proliferación y la viabilidad celular, manteniendo la homeostasis proteica a través de la regulación de los genes apoptóticos; coincidiendo con lo dicho por Liu y sus colaboradores (2012); estos autores determinaron que estas proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares cuya expresión aumenta después de que las células son sometidas a diferentes estresores, que tienen una función protectora que ayuda a la célula a hacer frente a condiciones letales.

La función citoprotectora de las HSP se explica en gran medida por su función anti apoptótica (Lanneau et al., 2007; Arya et al., 2007); lo cual coincide con los datos obtenidos en este estudio. Las HSP interactúan con las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis en varios pasos. Estos incluyen la inhibición de la translocación de Bax en las mitocondrias, la liberación del citocromo c de las mitocondrias, la formación del apoptosoma y la inhibición de la activación de la actividad de caspasa. También modula

las vías de señalización JNK, NK-kB y Akt en la cascada apoptótica. Sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado por Arya y sus colaboradores (2007), quienes demostraron que la HSC70 también tiene un papel pro apoptótico, ya que en esta investigación se observó que durante la suplementación con 100 ng de HSC70 hubo una expresión significativa en el gen HSPA8 (asimismo demostrando que la expresión de la proteína está relacionada con la suplementación), pero también se apreció un incremento, aunque no significativo, del gen pro apoptótico Bax lo cual pudiera relacionarse con el nulo número de embriones de calidad transferible obtenidos de este grupo.

CONCLUSIONES

Es posible realizar la extracción de ARN a partir de un mínimo de tres embriones bovinos a través del método de trizol modificado.

Los embriones bovinos producidos *in vitro*, expresan una mayor cantidad de los genes HSPA1A, HSPA8, Bax, Bcl-2, en comparación con los *in vivo*.

Los niveles de expresión de los genes HSPA1A, HSPA8, Bax, Bcl-2 son distintas entre los blastocitos y embriones degenerados.

La proteína HSC70 juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y viabilidad de los embriones producidos *in vitro*; aumentando el número de células de los mismos y de blastocistos producidos *in vitro* en el día siete del cultivo.

La proteína constitutiva de choque térmico tiene una función anti apoptótica; sin embargo, los resultados de esta investigación demostraron que también posee actividad pro apoptótica a la suplementación con dosis altas (100 ng de la proteína recombinante HSC70).

Se sugiere suplementar los medios de cultivo de embriones con dosis entre 25 y 50 ng de la proteína recombinante HSC70, con la finalidad de encontrar la dosis mínima-óptima que mejore la producción de embriones bovino *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn S. G., Kim S. A., Yoon J. H., Vacratsis P. (2005). Heat shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 392, 145-152.

Ali K. S., Dorgai L., Ábrahám M., Hermes E. (2003). Tissue- and stressor- specific differential expression of two hsc70 genes in carp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 503-509.

Aquino D. A., Peng D., Lopez C., Farooq M. (1998). The constitutive heat shock protein-70 is required for optimal expression of myelin basic protein during differentiation of oligodendrocytes. *Neurochemical Research*, 23, 413-420.

Arya R., Mallik M, Lakhotia S. C. (2007). Heat shock genes-integrating cell survival and death. *Journal of Bioscience*, 32, 595-610.

Arispe N., De Maio A. (2000). ATP and ADP modulate a cation channel formed by HSC70 in acidic phospholipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30839-30843.

Augustine G. J., Morgan Jr., Villalba-Galea C. A., Jin S., Prasad K., Lafe E. M. (2006). Clathrin and synaptic vesicle endocytosis: studies at the squid giant synapse. *Biochemical Society Transactions*, 34, 68-72.

Balasubramanian S., Son W. J., Mohana-Kumar B., Ock S. A., Yoo J. G., Im G. S., Choe S. Y., Rho G. J. (2007) Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 68, 265-275.

Baur J. A., Sinclair D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493-506.

Bausero M. A., Gastpar R., Multhoff G., Asea A. (2005). Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *Journal of Immunology*, 175, 2900-2912.

Beckmann R. P., Lovett M., Welch W. J. (1992). Examining the function and regulation of hsp70 in cells subjected to metabolic stress. *Journal of Cell Biology*, 117, 1137-1150.

Beckmann R. P., Mizzen L. A., Welch W. J. (1990). Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248, 850-854.

Beere H. M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117, 2641-2651.

Beere H. M., Wolf B. B., Cain K., Mosser D. D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R. I., Cohen G. M., Green D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*; 2, 469-475.

Bettaieb A., Averil-Bates D. A. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40° protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 205, 47-57.

- Bols P. E. J., Ysebaert M. T., Van Soo A., De Kruif A. (1998). Effects of long term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield during an OPU-IVF program. *Theriogenology*, 49, 983-995.
- Borges J. C., Ramos C. H. I. (2006). Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452, 46-54.
- Brown C. R., Martin R. L., Hansen W. J., Beckmann R. P., Welch W. J. (1993). The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *Journal of Cell Biology*, 120, 1101-1112.
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 15, 269-290.
- Buratini J. R. T., Price C. A., Visintin J. A., Bo G. A. (2000). Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BSTH) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, 54, 421-431.
- Buxbaum E., Woodman P. G. (1995). Selective action of uncoating ATPase towards clathrin-coated vesicle from brain. *Journal of Cell Science*, 108, 1295-1306.
- Callahan M. K., Chaillot D., Jacquin C., Clark P. R., Ménoret A. (2002). Differential acquisition of antigenic peptides by HSP70 and HSC70 under oxidative conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33604-33609.
- Chang H. C., Newmyer S. L., Hull M. J., Ebersold M., Schmid S. L., Mellman I. (2002). Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*; 159: 477-487.
- Chang H. Y., Nishitoh H., Yang X., Ichijo H., Baltimore D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*, 281, 1860-1863.
- Chen H. S., Jia J., Su H. F., Lin H. D., Chen J. W., Lin S. J. (2006). Downregulation of the constitutively expressed Hsc70 in diabetic myocardium is mediated by insulin deficiency. *Journal of Endocrinology*, 190, 433-440.
- Chen M. S., Featherstone T., Laszlo A. (1996). Amplification and altered expression of the hsc70/U14 snoRNA gene in a heat resistant Chinese hamster cell line. *Cell Stress and Chaperones*, 1, 47-61.
- Chen M. S., Goswami P. C., Laszlo A. (2002). Differential accumulation of U14 snoRNA and hsc70 mRNA in Chinese hamster cells after exposure to various stress conditions. *Cell Stress and Chaperones*, 7, 65-72.
- Dair E. L., Simoes RS., Simões MJ., Romeu LR., Oliveira-Filho RM., Haidar MA., Baracat EC., Soares Jr. JM. (2008). Effect of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertility and Sterility*, 89, 1299-1305.
- De la Rosa E. J., Vega-Núñez E., Morales A. V., Serna J., Rubio E., de Pablo F. (1998). Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro) insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9950-9955.

- Deane E. E., Woo N. Y. (2005). Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 776-783.
- Deane E. E., Woo N. Y. (2006). Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquatic Toxicology*, 79, 9-15.
- Del Corso A., Cappiello M., Mura U. (1994). Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry*, 26, 745-750.
- Dworniczak B., Mirault M. E. (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock cognate protein. *Nucleic Acids Research*, 15, 5181-5197.
- Edwards J. L., Ealy A. D., Monterroso V. H., Hansen P. J. (1997). Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 48, 25-33.
- Edwards M. J. (1998). Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? *Cell Stress and Chaperones*, 3, 213-220.
- Ellis R. J., Hemmingsen S. M. (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends in Biochemical Science*, 14, 339-342.
- Fakruzzaman M., Bang J. I., Lee K. L., Kim S. S., Ha A. N., Ghanem N., Han C. H., Cho K. W., White K. L., Kong I. K. (2013). Mitochondrial content and gene expression profile in oocyte-derived embryos of cattle selection the basis of brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, 142, 19-27.
- Fakruzzaman M., Ghanem N., Bang J. I., Ha A. N., Lee K. L., Sohn S. H., Wang Z., Lee D. S., Kong I. K. (2015). Effect of peroxiredoxin II on the quality and mitochondrial activity of pre-implantation bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 159, 172-183.
- Gabai V. L., Mabuchi K., Mosser D. D., Sheran M. Y. (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 3415-3424.
- Gao C., Han H. B., Tian X. Z., Tan D. X., Wang L., Zhou G. B., Zhu S. E., Liu G. S. (2012). Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *Journal of Pineal Research*, 52, 305-311.
- Gardiner C. S., Reed D. J. (1995). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 30-36.
- Gebauer M., Zeiner M., Gehring U. (1998). Interference between proteins Hsp46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 6238-6244.
- Geraci F., Pinsino A., Turturici G., Savona R., Giudice G., Sconzo G. (2004). Nickel, lead, and cadmium induce differential cellular responses in sea urchin embryos by activating the synthesis of different HSP70s. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 873-877.

- Gong J. G. (2002). Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 229-241.
- Gong J. G., Bramley T., Webb R. (1993a). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97, 247-254.
- Gordon I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 2nd ed., p.273.
- Gotoh T., Terada K, Oyadomari S., Mori M. (2004). Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell death and Differentiation*, 11, 390-402.
- Green D. R., Reed J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development*, 13, 1899-1911.
- Guerin P., El Mouatassim S., Menezo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7, 175-189.
- Gupta R. S., Singh B. (1994). Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Current Biology*, 4, 104-14.
- Hansen, P. J. (2007) To be or not to be. Determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 68, 40-48.
- Hansen P. J. (1999). Possible role for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 1, 5-29.
- Helmbrecht K., Rensing L. (1999). Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochemical Research*, 24, 1293- 1299.
- Holm P., Booth P. J., Callesen H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo and in vitro derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. *Reproduction*, 123, 553-65.
- Hunt C., Morimoto R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 82, 6455-6459.
- Hyslop P. A., Hinshaw D. B., Halsey Jr. W. A., Schraufstatter I. U., Sauerheber R. D., Spragg R. G., Jackson J. H., Cochrane C. G. (1988). Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1665-1675.
- Jaattela M., Wissing D. (1993). Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *Journal of Experimental Medicine*, 177, 231-236.

- Jaattela M., Wissing D., Bauer P. A., Li G. C. (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *European Molecular Biology Organization Journal*, 11, 3507-3512.
- Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal*, 17, 6124-6134.
- Johnson M., Nasr-Esfahani M. (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays*, 16, 31-38.
- Kang S. W., Chae H. Z., Seo M. S., Kim K., Baines I. C., Rhee S. G. (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 6297-6302.
- Karlseder J., Wissing D., Holzer G., Orel L., Sliutz G., Auer H., Jaattela M., Simon M. M. (1996). HSP70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220, 153-159.
- Kawarsky S. J., King W. A. (2000). Expression and localization of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. *Zygote*, 9, 39-50.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Kimmins S., MacRae T. H. (2000). Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress and Chaperones*, 5, 76-86.
- Knijn H. M., Garrett J. O., Vos PALM., Hendriksen P. J. M., van der Weijden., Maddox-Hyttel P., Dieleman S. J. (2003). Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 69, 1371-1378.
- Ko L. J., Prives C. (1996). P53: puzzle and paradigm. *Genes and Development*, 10, 1054-1072.
- Kodiha M., Chu A., Lazrak O., Stochaj U. (2005). Stress inhibits nucleocytoplasmic shuttling of heat shock protein hsc70. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289, 1034-1041.
- Kose S., Furuta M., Kioke M., Yoneda Y., Imamoto N. (2005). The 70-Kd heat shock cognate protein (hsc70) facilitates the nuclear export of the import receptors. *Journal of Cell Biology*, 171, 19-25.
- Kowaltowski A. J., Vercesi A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 463-471.
- Krebs C. J., Jarvis E. D., Pfaff D. W. (1999). The 70-kDa heat shock cognate protein (Hsc73) gene is enhanced by ovarian hormones in the ventromedial hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96, 1686-1691.

- Kreiling J. A., Creton R., Reinisch C. (2007). Early embryonic exposure to polychlorinated biphenyls disrupts heat-shock protein 70 cognate expression in zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 70, 1005-1013.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vaissière J. L., Mignotte B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. The *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9, 1277-1287.
- Lanneau D., de Thonel A., Maurel S., Didelot C., Garrido C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 1, 53-60.
- Lee K., Wang C., Chaille J. M., Machaty Z. (2010). Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 330-335.
- Leyens G., Knoop B., Donnay I. (2004). Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 69, 243-251.
- Li H., Zhu H., Xu C. J., Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Lindquist S., Craig E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, 631-677.
- Linnik K. M., Herscovitz H. (1998). Multiple molecular chaperones interact with apolipoprotein B during its maturation. The network of endoplasmic reticulum-resident chaperones (ERp72, GRP94, calreticulin, and BiP) interacts with apolipoprotein b regardless of its lipidation state. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21368-21373.
- Liu T., Daniels C. K., Cao S. (2012). Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology and Therapeutics*, 136, 354-374.
- Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Moreira P. M., Pintado B., de la Fuente J. (2003a). Temporal divergence in the pattern of Messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, 69, 1424-31.
- Lonergan P., Rizos D., Kanka J., Nemcova L., Mbaye A. M., Kingston M., Wade M., Duffy P., Boland M. P. (2003b). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126, 337-346.
- Lu T. L., Huang G. J., Wang H. J., Chen J. L., Hsu H. P., Lu T. J. (2010). Hispolon promotes MDM2 downregulation through chaperone-mediated autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 398, 26-31.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490.

- Mayer M. P., Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Science*, 62, 670-684.
- Meister A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220, 472-477.
- Meriin A. B., Yaglom J A., Gabai V. L., Zon L., Ganiatsas S., Mosser D. D., Sherman M. Y. (1999). Protein- damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP-72. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 2547-2555.
- Meyer D. M., Crottet P., Maco B., Degtyar E., Cassel D., Spess M. (2005). Oligomerization and dissociation of AP-1 adaptors are regulated by cargo signals and by ArfGAP1-induced GTP hydrolysis. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 4745-4754.
- Mayer, M. P., Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Science*, 62, 670-684.
- Mohseni M., Mihandoost E., Shirazi A., Sepehrizadeh Z., Bazzaz J. T., Ghazi-khansari M. (2012). Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. *Mutation Research*, 738-739, 19-27.
- Mortensen C. J., Choi Y-H., Ing N. H., Kraemer D. C., Vogelsang M. M., Katrin-Hinrichs. (2010) Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures in vitro or in vivo after exercise of donor mares. *Theriogenology*, 74, 374-383.
- Morton J. P., MacLaren D. P. M., Cable N. T., Bongers T., Griffiths R. D., Campbell I. T., Evans L., Kayani A., McArdle A., Drust B. (2006). Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute non damaging treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*, 101, 176-182.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 5317-5327.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A. B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., Massie B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 7146-7159.
- Na Y. R., Seok S. H., Baek M. W., Lee H. Y., Kim D. J., Park S. H., Lee H. K., Park J. H. (2009). Protective effects of vitamin E against 3,3', 4,4',5- pentachlorobiphenyl (PCB126) induced toxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 72, 714-719.
- Nasr-Esfahani M. M., Johnson M. H. (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development*, 113, 551-560.
- Neuer A., Spandorfer S. D., Giraldo P., Jeremias J., Dieterle S., Korneeva, I., Witkin, S. S. (1999). Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7, 10-16.
- Nollen E. A., Morimoto R. I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *Journal of cell science*, 115, 2809-2816.

- Novoselova T. V., Margulis B. A., Novoselov S. S., Sapozhnikov A. M., van der Spuy J., Cheetham M. E., Guzhova I. V. (2005). Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 94, 597-606.
- Oyawoye O., Gadir A. A., Garner A., Constantinovici N., Perrett C., Hardiman P. (2003). Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF relationship to outcome. *Human Reproduction*, 18, 2270-2274.
- Park H. S., Cho S. G., Kim C. K., Hwang H. S., Noh K. T., Kim M. S., Huh S. H., Kim M. J., Ryoo K., Kim E. K., Kang W. J., Lee J. S., Seo J. S., Ko Y. G., Kim S., Choi E. J. (2002). Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 7721-7730.
- Paula-Lopes F. F., Hansen P. J. (2002) Heat Shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of reproduction*, 66, 1169-1177.
- Pavani K. C., Baron E. E., Faheem M., Chaveiro A., Moreira Da Silva F. (2015). Optimisation of total RNA extraction from bovine oocytes and embryos for gene expression studies and effects of cryoprotectants on total RNA extraction. *Cytology and genetics*, 49, 232-239.
- Pavlok A., Koutecka L., Krejci P., Slavik T., Cerman J., Slaba J., Dorn D. (1996). Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Animal Reproduction Science*, 41, 183-192.
- Pirola L., Fröjdö S. (2008). Resveratrol one molecule, many targets. *IUBMB Life*, 60, 323-332.
- Polanowska-Grabowska R., Simon C. G., Jr. Falchetto R., Shabanowitz J., Hunt D. F., Gear A. R. L. (1997). Platelet adhesion to collagen under flow causes dissociation of a phosphoprotein complex of heat-shock proteins and protein phosphatase 1. *Blood*, 90, 1516-1526.
- Rajhans R., Sai-Kumar G., Dubey P. K., Taru-Sharma G. (2010) Effect of timing of development on total cell number and expression profile of HSP-70.1 and GLUT-1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes preimplantation embryos produced in vitro. *Cell biology international*, 34, 463-468.
- Rizos D., Lonergan P., Boland M. P., Arroyo-Garcia R., Pintado B., de la Fuente J., Gutiérrez-Adán A. (2002). Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocyst produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, 66, 589-95.
- Rodrigues-Cunha M. C., Mesquita L. G., Bressan F., del Collado M., Balieiro J. C. C., Schwarz K. R. L., de Castro F. C., Watanabe O. Y., Watanabe Y. F., de Alencar Coelho L., Leal C. L. V. (2016) Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 86, 1685-1694.
- Rodriguez-Arizza A., López-Sánchez L. M., González R., Corrales F. J., López P., Bernardos A., Muntané J. (2005). Altered protein expression and protein nitration pattern during D-galactosamine-induced cell death in human hepatocytes: a proteomic analysis. *Liver International*, 25, 1259-1269.
- Roth Z., Arav A., Braw-Tal R., Bor A., Wolfenson A. (2002). Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 1398-1405.

- Roth Z., Hansen P. J. (2004) Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of reproduction*, 71, 1898-1906.
- Rubenstein R. C., Zeitlin P. L. (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *American Journal of Physiology, Cell-Physiology*, 278, 259-267.
- Sá Filho M. F., Carvalho N. A. T., Gimenes L. U., Torres-Júnior J. R., Nasser L. F. T., Tonhati H., Garcia J. M., Gasparini B., Zicarelli L., Baruselli P. S. (2009). Effect of recombinant bovine somatotropin (bSTH) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. *Animal Reproduction Science*, 113, 51-59.
- Sadis S., Hightower L. E. (1992). Unfolded proteins stimulate molecular chaperone Hsc70 ATPase by accelerating ADP/ATP Exchange. *Biochemistry*, 31, 9406-9412.
- Saeki K., Matsumoto K., Kaneko T., Hosoi Y., Kato H., Iritani A. (1999). Onset of RNA synthesis in early bovine embryos detected by reverse transcription-polymerase chain reaction following introduction of exogenous gene into their pronuclei. *Theriogenology*, 51, 192.
- Sahng E. H., Zhdanova I. V. (2007). The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects. *PLOS ONE Journal*, 2, 587.
- Saleh A., Srinivasula S. M., Balkir L., Robbins P. D., Alnemri E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology*, 2, 476-483.
- Salzano A., Albero G., Zullo G., Neglia G., Abdel-Wahab A., Bifulco G., Zicarelli L., Gasparini B. (2014). Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science*, 151, 91-96.
- Schmid S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein and protein sorting: an integrated process. *Annual Review of biochemistry*, 66, 511-548.
- Screaton G., Xu X. N. (2000). T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Current Opinion in Immunology*, 12, 316-322.
- Shi Y., Thomas J. O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 2186-2192.
- Shiota M., Kusakabe H., Izumi Y., Hikita Y., Nakao T., Funae Y., Miura K., Iwao H. (2010). Heat shock cognate protein 70 is essential for Akt signaling in endothelial function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 491-497.
- Simon M. M., Reikerstorfer A., Schwarz A., Krone C., Luger T. A., Jaattela M., Schwarz T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblast. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 926-933.
- Smith D. F., Whitesell L., Katsanis E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacological Reviews*, 50, 493-513.
- Sonna L. A., Fujita J., Gaffin S. L., Milli C. M. (2002). Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology*, 92, 1725-1742.

- Sprick M. R., Walczak H. (2004). The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644, 125-132.
- Sreedhar A. S., Csermely P. (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 101, 227-257.
- Srikakulam R., Winkelmann D. A. (2003). Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *Journal of Cell Science*, 117, 641-652.
- Stricher F., Macri C., Ruff M., Muller S. (2013). HSPA8/HSC70 chaperone protein. Structure, function and chemical targeting. *Autophagy*, 9, 1937-1954.
- Sullivan C. S., Pipas J. M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 179-202.
- Terlecky S. R., Chiang H L., Olson T. S., Dice J. F. (1992). Proteins and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73- kDa heat shock cognate protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 9202-9209.
- Theodorakis N. G., Banerji S. S., Morimoto R. I. (1988). HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 4357-4368.
- Thouas G. (2001) Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoblast cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*, 3, 25-29.
- Trimarchi J. R., Liu L., Porterfield D. M., Smith P. J., Keefe D. L. (2000). Oxidative phosphorylation-dependent and-independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 62, 1866-1874.
- Tripp M. W., Ju J C, Hoagland T. A., Riesen J. W., Yang X., Zinn S. A. (2000). Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. *Theriogenology*, 53, 1581-1590.
- Tsukahara F., Yoshioka T., Muraki T. (2000). Molecular and functional characterization of HSC54, a novel variant of human heat-shock cognate protein 70. *Molecular Pharmacology*, 58, 1257-1263.
- Van Gurp M., Festjens N., Vann Loo G., Saelens X., Vandenabeele P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 487-497.
- Volloch V., Gabai V. L., Rits S., Sherman M. Y. (1999). ATPase activity of the heat shock protein hsp72 is dispensable for its effects on dephosphorylation of stress kinase JNK and on heat-induced apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 461, 73-76.
- Wang D. Y., Fulthorpe R., Liss S. N., Edwards E. A. (2004). Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Molecular Endocrinology*, 18, 402-411.

- Wang F., Tian X., Zhang L., He C., Ji P., Li Y. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 101, 577-586.
- Wang Z. G., Yu S. D., Xu Z. R. (2007). Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocyte. *Animal Reproduction Science*, 100, 22-31.
- Wilke N., Sganga M. W., Gayer G C., Hsieh K. P., Miles M. F. (2002). Characterization of promoter elements mediating ethanol regulation of hsc70 gene transcription. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 173-180.
- Willis S., Day C. L., Hinds M. G., Huang D. C. (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of Cell Science*, 116, 4053-4056.
- Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H. (1998). Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplementally with BSA. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112, 387-98.
- Wrenzycki C., Herrmann D., Keskinetepe L., Martins Jr. A., Sirisathien S., Brackett B., Niemann H. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Human Reproduction*, 16, 893-901.
- Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306.
- Yan N., Shi Y. (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell of Developmental Biology*, 21, 35-56.
- Yang H. W., Hwang K. J., Kwon H. C., Kim H. S., Choi K. W., Oh K. S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*, 13, 998-1002.
- Yang X., Khosravi-Far R., Chang H. Y., Baltimore D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 89, 1067-1076.
- Yokota S. I., Yanagi H., Yura T., Kubota H. (2000). Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *European Journal of Biochemistry*, 287, 1658-1664.
- Yuan Y., Hao Z. D., Liu J., Wu Y., Yang L., Liu G. S., Tian J. H., Zhu S. E., Zeng S. M. (2008) Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 70, 168-178.
- Yuan Y. Q., Van Soom A., Coopman F. O., Mintiens K., Boerjan M. L., Van Zeveren A., de Kruif A., Peelman L. J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 59, 1585-1596.
- Zhang B., Peñagaricano F., Driver A., Chen H., Khatib H. (2011). Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *Journal of dairy science*, 94, 4174-4182.

Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. (1999). An APAF-1. cytochrome c procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 11549-11556.