

## **Proteína de choque térmico HSC70 en el cultivo de embriones bovinos sometidos a estrés calórico**

### **Proteína de choque térmico HSC70 na cultura de embriões bovinos submetidos a estresse térmico**

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-038

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

#### **Juan prisciliano Zárate-Martínez**

Doctor en Reproducción y Genética Animal por la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia, Chihuahua, Chi., México

Institución: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Lugar de Trabajo: Campo Experimental La Posta, Centro de Investigación Regional Golfo Centro

Dirección: Km 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro, C. P 94277, Municipio de Medellín de Bravo, Veracruz de Ignacio de la Llave, México

Correo electrónico: zarate.juan@inifap.gob.mx; jzarate@uv.mx

#### **José Fernando de La Torre Sánchez**

Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Estatal de Colorado, Denver, Colorado Estados Unidos de Norte América.

Institución: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Lugar de trabajo: Centro Nacional de Recursos Genéticos

Dirección: Boulevard de la biodiversidad 400, Rancho las Cruces, C. P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

Correo electrónico: delatorre.fernando@inifap.gob.mx; delatorf@gmail.com

#### **Eliab Estrada Cortes**

Doctor en Biología de la reproducción por el Programa de Biología Celular y Molecular, Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Florida, Gainesville, Florida, Estados Unidos de Norte América

Institución: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Lugar de trabajo: Campo Experimental Centro Altos de Jalisco

Dirección: Boulevard de la biodiversidad 2470, Rancho las Cruces, C. P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

Correo electrónico: estrada.eliab@inifap.gob.mx

#### **Sandra Pérez Reynozo**

Maestra en Ciencias de Producción Animal por la Universidad La Salle Campus Bajío, León Guanajuato, México

Institución: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Lugar de trabajo: Centro Nacional de Recursos Genéticos

Dirección: Boulevard de la biodiversidad 400, Rancho las Cruces, C. P. 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

Correo electrónico: perez.sandra@inifap.gob.mx

**Francisco Javier Padilla Ramírez**

Doctor en Ciencia Animal por la Universidad de Texas A&M College Station, Texas, Estados Unidos de Norte América

Institución: Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

Lugar de trabajo: Departamento de Producción Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100. La Venta del Astillero C. P. 45110, Zapopan, Jalisco, México.

Correo electrónico: fjavier.padilla@academicos.udg; javier.longino@gmail.com

**Vicente Eliezer Vega Murillo**

Doctor en Mejoramiento Genético por la Universidad de Nebraska-Lincoln, Departamento de Ciencia Animal, Estado Unidos de Norte América

Lugar de Trabajo Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus Veracruz, Av. Miguel Ángel de Quevedo S/N Esquina Yañez C. P. 91710, Veracruz, Veracruz de Ignacio de la Llave, México

Correo electrónico: vvega@uv.mx; vvega1963@hotmail.com

**RESUMEN**

Existe una gran posibilidad de mejorar la producción de embriones *in vitro* al enriquecer los medios de cultivo adicionando moléculas que regulen las condiciones óptimas de los gametos. El objetivo de este estudio fue adicionar la proteína de choque térmico recombinante HSC70, para evaluar su efecto en la producción de embriones *in vitro*. Se adicionaron 25 ng/mL de la proteína HSC70 al cultivo de embriones sometidos a estrés térmico, formando cuatro tratamientos T1= medio adicionado con HSC70 a 41 °C, T2= medio sin HSC70 a 41 °C, T3= medio adicionado con HSPC70 a 38.5 °C y T4= medio sin HSC70 a 38.5 °C. Bajo el protocolo de producción *in vitro* de embriones bovino en los medios de cultivo temprano (CDM1) y tardío (CDM2), 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 7 u 8 y número de células en blastocisto al día 7. El conteo de las células en los blastocitos al día 7 del cultivo, se llevó a cabo a través del protocolo de tinción diferencial de Hoescht 33342. Los datos se sometieron a un análisis de varianza con un arreglo factorial con el procedimiento GLM de SAS (2013), que incluyó los factores de proteína, temperatura y su interacción. El número de células se analizó asumiendo una distribución Poisson por tratarse de un conteo. Los resultados mostraron que el factor proteína fue significativa ( $p= 0.01$ ) para todas las variables de respuesta y existe un efecto positivo de la proteína HSC70, agregada al medio de cultivo, sin importar la temperatura a la que fueron cultivados; este efecto se expresó tanto en un mayor porcentaje de embriones, como en una mayor tasa ( $p<0.05$ ) de proliferación celular. Se concluye que la adición de HSC70 al medio de cultivo de embriones sometidos a estrés calórico obtuvo un mayor porcentaje de blastocistos, un mayor número de sus células y disminuyó significativamente el estrés mecánico durante el cultivo de embriones no sometidos a estrés calórico al encontrarse un menor número de blastocistos en los grupos control.

**Palabras clave:** Medios de cultivo *In vitro*

**RESUMO**

Existe uma grande possibilidade de melhorar a produção de embriões *in vitro*, enriquecendo os meios de cultura com a adição de moléculas que regulam as condições ideais dos gametas. O objetivo deste estudo foi adicionar a proteína recombinante de choque térmico HSC70, para avaliar seu efeito na produção de embriões *in vitro*. 25 ng/mL da proteína HSC70 foram adicionados ao cultivo de embriões submetidos ao estresse térmico, formando quatro tratamentos T1= meio adicionado de HSC70 a 41 °C, T2= meio sem HSC70 a 41 °C, T3= meio adicionado de HSPC70 a 38,5 °C e T4= meio sem HSC70 a 38,5 °C. Sob o protocolo de produção *in vitro* de embriões bovinos em meio de cultura precoce (CDM1) e tardio (CDM2), a fim de avaliar o desenvolvimento embrionário através das variáveis, porcentagem de divisão embrionária, embriões de seis células ou mais e blastocistos no dia 7 ou 8 e número de células em blastocisto no dia 7. As contagens de células em blastocistos no dia 7 de cultura foram realizadas usando o protocolo de coloração diferencial Hoescht 33342. Os dados foram submetidos a uma análise de variância com arranjo fatorial com o procedimento GLM de SAS (2013), que incluiu os fatores de proteína, temperatura e sua interação. O número

de células foi analisado assumindo uma distribuição de Poisson, pois é uma contagem. Os resultados mostraram que o fator proteína foi significativo ( $p=0,01$ ) para todas as variáveis de resposta e que há efeito positivo da proteína HSC70, adicionada ao meio de cultura, independente da temperatura em que foram cultivadas; esse efeito foi expresso tanto em maior percentual de embriões, quanto em maior taxa ( $p<0,05$ ) de proliferação celular. Conclui-se que a adição de HSC70 ao meio de cultivo de embriões submetidos ao estresse térmico obteve maior porcentagem de blastocistos, maior número de suas células e diminuição significativa do estresse mecânico durante o cultivo de embriões não submetidos ao estresse térmico como menor número de blastocistos nos grupos controle.

**Palavras-chave:** Meios de cultura *in vitro*

## 1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas del shock térmico (Hsp) cumplen diversas funciones fisiológicas: colaboran en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas en formación, interviniendo en su ensamble, translocación y secreción, así como también en la degradación o reparación de proteínas anormales, actuando como chaperonas moleculares (Bharati *et al.*, 2017). Cuando las células son sometidas a distintos estímulos como el estrés del shock calórico, radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, etc., las Hsp se sobre expresan. De esta manera confieren protección a las células, volviéndolas resistentes a la apoptosis (Neuer *et al.* 2000). Las alteraciones en el entorno del embrión preimplantado pueden afectar la competencia para establecer la preñez y fenotipo de los terneros resultantes y, debido a que 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, la necesidad de obtener gametos sanos para su uso, que no podemos “fabricar”, pero si podemos mejorar el medio de cultivo en el que tiene lugar el contacto entre los gametos por lo que, debemos intentar diseñar medios químicamente definidos que no dejen ningún cabo suelto en cuanto a la posible acción incontrolada de moléculas (Coy, 2012). Por todo lo anterior, es necesario determinar si adicionar proteínas de choque térmico en el medio de cultivo de embriones bovinos *in vitro*, tenga un aporte benéfico. Este trabajo tuvo como objetivo adicionar 25 ng/mL de la proteína de choque térmico recombinante HSC70, para evaluar su efecto en la producción de embriones *in vitro* sometidos a estrés calórico.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

La producción *in vitro* de embriones aspirados de ovarios de vacas sacrificadas en rastro se realizó utilizando los medios de maduración (IVM), fertilización (FCDM), cultivo temprano (CDM1) y cultivo tardío (CDM2), se suplementaron con albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos elaborados en el laboratorio Acuático Pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP. Los ovocitos se colocaron 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,  $\beta$ -estradiol, cisteamina y factor de crecimiento epidérmico durante 23 horas a 38.5°C, saturación de humedad y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Después, los embriones de más de seis células fueron transferidos a medio CDM1 (cultivo temprano), y fueron suplementados (con 50 ng) o no (control) con la proteína HSC70 de acuerdo al tratamiento (T) al que pertenecían y nuevamente fueron suplementados (con 25 ng) o no (control) con la proteína HSC70 de acuerdo al T al que pertenecían anteriormente al realizar el pase a CDM2 (cultivo tardío), en donde permanecieron en cultivo por 120 horas en las condiciones antes mencionadas pero la temperatura fue elevada de 38.5 a 41.0 °C para someterlos a estrés calórico por lo que se tuvieron cuatro tratamientos T1= medio adicionado con HSC70 a 41 °C, T2= medio sin HSC70 a 41 °C, T3= medio adicionado con HSPC70 a 38.5 °C y T4= medio sin HSC70 a 38.5 °C. Bajo el protocolo de producción *in vitro* de embriones bovino anteriormente mencionado, se suplementaron con 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 7 u 8 y número de células en blastocisto al día 7. El conteo de las células en los blastocitos al día 7 del cultivo, se llevó a cabo a través del protocolo de tinción diferencial, el cual consistió en 9 pasos: Paso 1). poner a los embriones en gotas de 50  $\mu$ L de PBS/PVP precalentadas y fueron lavados tres veces mediante su paso a diferentes gotas de este medio; Paso 2). se pasaron a estos embriones a una gota de 50  $\mu$ L conteniendo 4% de formaldehído y se mantuvieron ahí por 15 min.; Paso 3). se repitió el primer paso; Paso 4). Se incubaron los embriones a temperatura ambiente por 30 min en gotas de 50 $\mu$ L de medio de permeabilización; Paso 5). Se lavaron los embriones tres veces en gotas de 50  $\mu$ L de solución de lavado; paso 6). Se incubaron los embriones a temperatura ambiente por 5 min en gotas de 50 $\mu$ L conteniendo tinción de Hoescht 33342; Paso 7). Se repite el paso 1; Paso 8). Se toman los embriones con 7 $\mu$ L de Gild Antifade Mountatn -PBS/PVP y se colocaron en una laminilla; Paso 9). Se toma un cubreobjetos y se le agrega vaselina a cada esquina para colocarlo gentilmente sobre la gota donde se encuentran los embriones ya teñidos (modificando la técnica de Thouas *et al.*, 2001). Posteriormente a esta tinción, se procedió a tomar una foto mediante el microscopio de fluorescencia con una fuente de luz UV conectados a la computadora con el sistema CASAS y con el programa Pyle Viewer se utilizó la opción para observar imágenes con la opción AC1300-200uc y Single Shot para obtener una sola imagen o captura. 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) y sometidos a estrés calórico, los datos se sometieron a un análisis de varianza con un arreglo factorial

con el procedimiento GLM de SAS (2013), que incluyó los factores de proteína, temperatura y su interacción. 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 su análisis. Posteriormente las medias de cuadrados mínimos se re transformaron a la escala observada y se expresaron como porcentajes. Para el caso de número de células se analizó asumiendo una distribución Poisson por tratarse de un conteo.

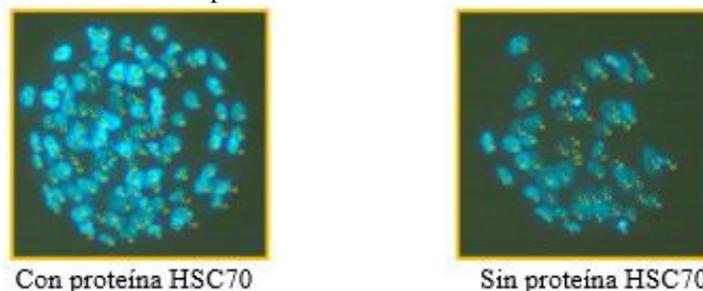
### 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados mostraron que el factor proteína fue significativa ( $p= 0.01$ ) para todas las variables de respuesta (Cuadro 1).

Niveles de Significancia de los efectos en los modelos				
Factor	División Embrionaria %	Embriones + de 6 células %	Blastocitos a día 7 y 8 %	Número de células
Proteína	0.01	0.01	0.01	<.0001
Temperatura	1.00	0.30	0.30	0.17
Proteína*Temperatura	0.20	0.39	0.39	0.47

Existe un claro efecto positivo de la proteína de choque térmico, agregada al medio de cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro*, sin importar la temperatura a la que fueron cultivados; éste efecto se expresa tanto en un mayor porcentaje de embriones que alcanzan distintos estadios de desarrollo a tiempos determinados, como en una mayor tasa ( $p<0.05$ ) de proliferación celular (Figura 1).

Figura 1. Conteo de células embrionarias por medio de la tinción de Hoechst 33342, donde se observó un mayor número de células en los tratamientos con adición de proteína HSC70 en el medio de cultivo.



En el Cuadro 2 se observa que en los tratamientos, el factor proteína marcó diferencias ( $p<0.05$ ) para las variables de respuesta BD7-8 y NC, obteniéndose mayores valores para el tratamiento que no fue estresado con una mayor temperatura ( $38.5\text{ °C} = 1.75 \pm 0.04^a$  y  $41\text{ °C} = 0.84 \pm 0.05^b$  BD7-8) y de igual forma para el NC ( $107.58 \pm 2.23^a$  y  $87.27 \pm 2.17^b$ , respectivamente), con

la adición de la proteína de choque térmico sometidos a temperatura de 38.5 y 41 °C fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) tal como lo reporta Garza *et al.* (2021) en los tratamientos de su trabajo utilizando 25 y 50 ng/mL. Cabe hacer mención que el tratamiento a 41°C sin proteína HSPC70 fue el tratamiento con mayor estrés y con la menor producción de embriones, mientras que el tratamiento a 38.5 °C con la adición de proteína HSP70 obtuvo la mayor producción de embriones.

Medias de Cuadrados Mínimos y errores estándar (transformadas a valores observados)

Factor		División Embrionaria %	Embriones + de 6 células %	Blastocitos a día 7 y 8 %	Número de células
Proteína	Con Proteína	58.42 ± 0.09 <sup>a</sup>	47.08 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.12 ± 0.04 <sup>a</sup>	119.63 ± 2.31 <sup>a</sup>
	Sin Proteína	44.47 ± 0.16 <sup>b</sup>	37.41 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>b</sup>	78.48 ± 2.04 <sup>b</sup>
Temperatura	38.50	51.33 ± 0.10 <sup>a</sup>	44.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	107.58 ± 2.23 <sup>a</sup>
	41.00	51.35 ± 0.13 <sup>a</sup>	40.34 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	87.27 ± 2.17 <sup>a</sup>
Proteína * Temperatura	Proteína 38.50	55.09 ± 0.17 <sup>a</sup>	47.39 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	141.14 ± 3.18 <sup>a</sup>
	Proteína 41.00	61.26 ± 0.24 <sup>a</sup>	46.76 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.09 <sup>a</sup>	101.40 ± 3.18 <sup>a</sup>
	SinProte 38.50	47.56 ± 0.24 <sup>a</sup>	40.81 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.09 <sup>a</sup>	82.00 ± 2.86 <sup>a</sup>
	SinProte 41.00	41.39 ± 0.26 <sup>a</sup>	34.08 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.10 <sup>a</sup>	75.11 ± 2.89 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Literales diferentes dentro de columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ )

Es evidente que debido a la mejora de las condiciones de cultivo que provocan estas proteínas de choque térmico, no solo regulando el estrés calórico al que fueron sometidos los cigotos, sino también el estrés mecánico al que son sometidos los ovocitos durante el proceso de cultivo y maduración ya que hubo una gran diferencia entre el número de blastocistos, posiblemente debida a una disminución en la muerte celular entre estos dos tratamientos con la adición o no de HSPC70, respectivamente y cultivados a 38.5 °C, esto de acuerdo a lo reportado por Neur *et al.* (2000), quienes observaron un control de la apoptosis y disminución de la fracción del ADN en el estadio de blastocistos (Matwee *et al.* 2001). En este estudio se encontraron evidencias para considerar a las proteínas de choque térmico como una sustancia que enriquezca los medios de cultivo sobre todo durante el cultivo tardío, como lo señala Coy y Murcia (2012), a manera de buscar que estos medios permitan no dejar ningún cabo suelto en cuanto a la posible acción incontrolada de moléculas. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar la cinética y expresión génica de los embriones en condiciones de cultivo *in vitro* durante la adición de la proteína HSP70.

#### **4 CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio muestran que la adición de HSC70 al medio de cultivo CDM de embriones sometidos a estrés calórico ayudó a obtener un mayor porcentaje de blastocistos, así como un mayor número de sus células y disminuyó significativamente el estrés mecánico durante el cultivo de embriones no sometidos a estrés calórico al encontrarse un menor número de blastocistos y de sus células sin la adición de HSC70 en su medio de cultivo, posiblemente causado por una mayor apoptosis celular en estos.

#### **AGRADECIMIENTOS**

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el soporte económico de año sabático, a la Universidad de Guadalajara (U de G) y al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) por las facilidades para la realización de este trabajo de investigación y capacitación en biotecnologías de la reproducción.

## REFERENCIAS

- Bharati, J., Dangi, S. S., Bag, S., Maurya, V. P., Singh, G., Kumar, P., & Sarkar, M. 2017. 252 Expression dynamics of HSP90 and nitric oxide synthase (NOS) isoforms during heat stress 253 acclimation in Tharparkar cattle. *International Journal of Biometeorology* 61(8): 1461–254 1469. doi: 10.1007/s00484-017-1323-37
- Coy, P., y Murcia, C. D. E. Medios de cultivo para fecundación in vitro: ¿qué les falta para ser perfectos? *Rev Asoc Est Biol Rep* 2012; 17(1):44-52.
- Garza, A. A. J. 2021. Efecto de la suplementación con la proteína HSC70 en la expresión del gen HSPA8 y la viabilidad de embriones bovino *in vitro*. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Agronomía Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Gral. Escobedo, Nuevo León. México. 64 p.
- Matwee, C, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur PK and King WA. The role of heat shock proteins 70 in fertilisation and embryo development. *Mol. Hum Reprod.* 2001. 7: 829-837.
- Neuer A., Spandorfer S. D., Giraldo P., Jeremias J., Dieterle S., Korneeva, I., Witkin, S. S. 2000. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7, 10-16.
- SAS. Statistical Analysis System. SAS User's guide. SAS/STAT R, Version 9.3. Cary, NC, 319 USA; SAS Institute Inc., 2011.
- Thouas, G. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive Bio Medicine Online*, 2001;13: 25- 29.