

FECHA DE ADQUISICIÓN _____
NUM. DE INVENTARIO 00147
PROCEDENCIA _____
NUM. CALIFICACIÓN _____
PRECIO _____
DIST. _____



TL00147

SF208208
.G37 37
2006 06
TESIS LAG
Ej.1 1.1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



EL ESTRÉS CALÓRICO EN LA REPRODUCCIÓN DE GANADO BOVINO

POR:

RUBICEL GARCÍA OROPEZA

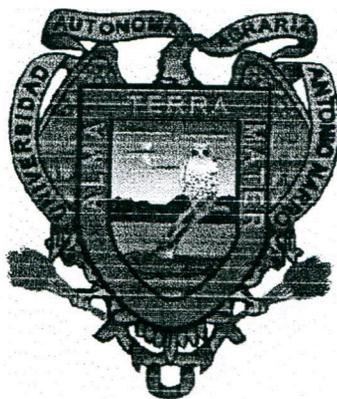
MONOGRAFÍA:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

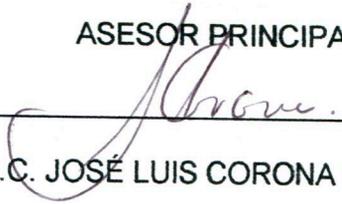


EL ESTRÉS CALÓRICO EN LA REPRODUCCIÓN DE GANADO BOVINO

POR:

RUBICEL GARCÍA OROPEZA

ASESOR PRINCIPAL

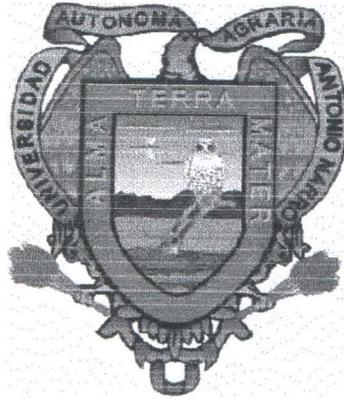

M.C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

Torreón, Coahuila, México

Noviembre de 2006

00147

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



EL ESTRÉS CALÓRICO EN LA REPRODUCCIÓN DE GANADO BOVINO

POR:

RUBICEL GARCÍA OROPEZA

ASESOR PRINCIPAL


M.C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

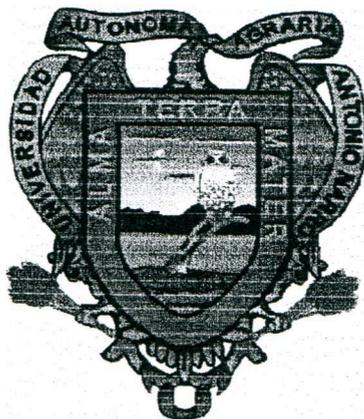
COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL


M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

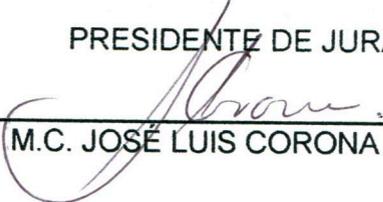


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
P. AAF. UB

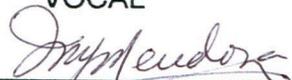
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



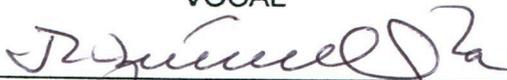
PRESIDENTE DE JURADO


M.C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

VOCAL


Q.B.P. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS

VOCAL


DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL SUPLENTE


M.C. GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ

AGRADECIMIENTOS

A MI ESCUELA

POR ABRIRME SUS PUERTAS Y DARME LA OPORTUNIDAD DE FORMARME PARA SER ALGUIEN EN LA VIDA.

A MIS MAESTROS

DE QUIENES POR SUS CONOCIMIENTOS APORTARON UN GRANITO DE ARENA Y ASÍ PODER CONCLUIR MI FORMACIÓN PROFESIONAL, EN ESPECIAL AL M.C. RAMÓN DELGADO, AL DR. CARLOS ELIZONDO, A LA MC MARGARITA MENDOZA, AL DR. GERARDO DUARTE, AL M.C GERARDO ARELLANO, A TODOS ELLOS GRACIAS POR COMPARTIRME DE SU SABIDURIA.

A MIS AMIGOS

POR TOSDOS LOS MOMENTOS QUE ME DEJARON CONVIVIR A SU LADO, A MI AMIGO JIMAREZ, JUAN JOSÉ, FOLRIBERTO, SANTOS Y A MIS AMIGOS QUE ESTUVIERON A MI LADO EN LOS MOMENTOS FELICES Y DE TRISTEZA, ROSENDO, JOB Y JUAN ANTONIO.

A MIS PADRES

CASTO GARCÍA OROPEZA Y SARA OROPEZA BALTAZAR, A MI PADRE QUIEN CON SUS COSEJOS ME DABA FUERZAS PARA SEGUIR ADELANTE, A MI MADRE POR EL INMENSO AMOR QUE ME HA BRINDADO.

A MIS HERMANOS QUE CON SUS ESFUERZOS PUDE CONCLUIR MIS ESTUDIOS A MI HERMANA LETICIA POR SU APOYO INCONDICIONAL.

A MI NOVIA GISELA POR SU GRAN APOYO QUE ME BRINDO DURANTE LA CARRERA.

Índice

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
FACTORES REGULADORES DEL ESTRÉS CALÓRICO	7
PLEGAMIENTO PROTEICO.....	9
Tiempo del proceso de plegamiento	10
FUNCIÓN DE CHAPERONAS	11
Clasificación.....	12
HSP 60	14
HSP 70	17
HSP 90	23
HSP 100	24
INDUCCIÓN DE HSPS	25
PARTICIPACIÓN DE LAS HSPS EN DISTINTOS PADECIMIENTOS NEURODEGENERATIVOS.....	26
CHOQUE	26
Alzheimer.....	27
Huntington.....	28
RESPUESTA AL ESTRÉS EN LA RELACIÓN HOSPEDERO/PATÓGENO.....	29
Hsps En Respuestas Inmunes	30
Vacunación con Hsps de patógenos	32
ESTRÉS CALÓRICO EN LA REPRODUCCIÓN.....	33
Diferencias Entre Razas Cebú Y Europeas	34
Disipación Del Calor	36
Alteraciones Endocrinas	39
Aromatasa.....	42
Factor-1 De Crecimiento Similar A La Insulina	46
Termotolerancia y aclimatación	49
Temperatura corporal.....	51
Índice de temperatura-humedad	53
ESTRATEGIAS PARA MINIMIZAR EL ESTRÉS CALÓRICO.....	54
Sombra	55
TRATAMIENTOS HORMONALES	56
Somatotropina.....	56
LECHE	58
EMBRIONES.....	60
ANTIOXIDANTES	64
ESTRÉS CALÓRICO EN EL SEMEN	66
CONCLUSIÓN	68

Resumen

Las respuestas al estrés calórico fueron observadas por F. Ritossa, en 1962. El calor y otros estresores, inducen la síntesis de proteínas del estrés calórico (Hsps, por sus siglas en inglés) en células eucarióticas y procarióticas, y son llamadas de acuerdo a su peso molecular (la Hsp 60, tiene un peso molecular de 60 KDa) y se clasifican en cinco principales grupos, Hsp 40, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 y las pequeñas Hsps. Las Hsps están reguladas por cuatro factores llamados factores del estrés calórico (HSF I, HSF II, HSP III y HSP IV). Algunas Hsps son llamadas chaperonas moleculares por su papel que juegan en el plegamiento proteico, asistiendo que las proteínas desdobladas alcancen su estado nativo correcto. Las Hsps también participan en la apoptosis, induciéndola o inhibiéndola. Se ha demostrado que las Hsps ayudan en el procesamiento del antígeno, propiedad usada para el desarrollo de vacunas para enfermedades bacterianas y neoplásicas, aunque algunas veces éstas son el blanco del sistema inmunitario, ocasionando enfermedades autoinmunes. Efectos adversos del estrés calórico se ven reflejados en la reproducción del ganado lechero, alterando la secreción de las principales hormonas reproductivas, la dinámica folicular, la competencia del oocito y la duración del estro. El efecto más importante del estrés calórico es la pérdida embrionaria durante los primeros días (0-2 días) de gestación, además de la drástica disminución del consumo de materia seca, así como en la producción y composición láctea. Las razas descendientes del *Bos indicus* presentan menos problemas reproductivos que las del *Bos taurus* por las diferentes propiedades

fisiológicas que existen entre las razas en su capacidad para disipar el calor. La determinación del estrés calórico es importante, los parámetros más utilizados son la frecuencia respiratoria y cardíaca, aunque estos parámetros son prácticos y fáciles son relativamente confiables, por lo que, deben ser evaluados junto con el índice de temperatura y humedad ambiental. Las estrategias para minimizar el estrés calórico en el ganado lechero, están basadas en la combinación de los principios de conducción y convección, radiación y evaporación, además de los tratamientos hormonales. En conclusión el estrés calórico afecta grandemente la fertilidad del ganado lechero siendo una de las posibles causas el papel que juega la Hsp 90 en la inhibición de la aromatasa.

Introducción

A principios de 1960 en el instituto de genética de Pavia (Italia), Adriano Buzzati Traversa organizó un curso acerca de la radiación y su acción biológica con el objetivo de introducir a 10 jóvenes a la genética moderna. Ferruccio Ritossa formaba parte de ese grupo. Ritossa decidió trabajar con *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), pues consideraba ser un término medio entre las bacterias y los humanos, ya que no había la posibilidad de trabajar con plantas que era lo que él prefería. En sus experimentos con glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* encontró un nuevo RNA que era sintetizado en los tejidos de las glándulas salivales. Ritossa se interesó en resolver que tipo de ácido nucleico era sintetizado (Ritossa,1996), y notó en uno de sus trabajos donde guardo tejidos a altas temperaturas éstos sufrían estrés calórico y fue así hasta 1962 cuando observó las respuestas al estrés calórico. Posteriormente se demostró que el estrés calórico induce la expresión de un nuevo grupo de proteínas a las que se les llamo proteínas del estrés calórico (Grover,2002).

Las proteínas del estrés calórico (HSPs) son familias de moléculas evolutivamente presentes en células eucarióticas y procarióticas, consideradas esenciales para su supervivencia. Su nombre deriva de la observación original, donde su expresión fue inducida en células después de la exposición a temperaturas elevadas. Sin embargo, después se demostró que muchas de estas moléculas son expresadas constitutivamente y aquellas que son inducibles pueden ser inducidas por una variedad de estresores físicos y químicos tales como radiación ultravioleta y gama, infecciones bacterianas y virales, medicamentos, privación de glucosa e hipoxia (Zugel y Kaufmann,1999;

Malago *et al.*,2002; Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002; Mckee,2003; Todryk *et al.*,2003; Gullo y Teoh,2004; Klettner,2004; Pespeni *et al.*,2005).

La adquisición de tolerancia al estrés es un aspecto de supervivencia de los organismos en la cual las Hsps juegan un papel importante. Virtualmente todos los organismos responden a un estrés medioambiental empleando su maquinaria de síntesis proteica para producir Hsps, también llamadas chaperonas moleculares (Schwartzburd,2001). La respuesta celular al estrés se conserva evolutivamente en todos los organismos, papel atribuido a la inducción de síntesis de Hsps y otras moléculas que confieren protección contra el estrés. Aunque la respuesta molecular desarrollada por las células es la que dicta si el organismo se adapta y sobrevive, o de lo contrario si el daño no es reparado, se conduce a la muerte (Grover,2002). Las células tienen un arsenal de chaperonas altamente conservadas, regulables y definidas para prevenir reacciones de plegamiento inadecuado, incrementando así la producción de proteínas nativas plegadas correctamente (Zugel y Kaufmann,1999; Mckee,2003; Rutherford,2003; Gullo y Teoh,2004; Klettner,2004; Pespeni *et al.*,2005).

Durante mucho tiempo se consideró que la agregación de proteínas era la parte final de la vida de las proteínas y que las proteínas degradadas eran depositadas en grandes agregados biológicamente inactivos conocidas como cuerpos de inclusión. Nuevos estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* y *Arabidopsis thaliana*, demostraron que las proteínas agregadas existentes pueden ser fácilmente desagregadas y ser plegadas nuevamente a su conformación nativa. Así, en teoría, un huevo hervido que está constituido de proteínas desnaturalizadas, no puede ser hervido

nuevamente. La desagregación de proteínas es alcanzada por un sistema que consta de máquinas de biochaperonas, CIPB (también llamada, Hsp 104) y DnaK (Hsp 70). La importancia de sólo una combinación de sistemas de chaperonas es activa en resolubilización y plegamiento de proteínas agregadas. Esta actividad de los sistemas de biochaperonas está directamente ligada a la supervivencia de los organismos mencionados a temperaturas elevadas (Mogk *et al.*,2002).

Estas chaperonas (Hsps) ó también conocidas como proteínas reguladas-glucosa (GRP) asisten el plegamiento inicial de proteínas o forman mecanismos de reparación de proteínas desdobladas o de proteínas agregadas constantemente (Gullo y Teoh,2004), ya que la capacidad de plegamiento celular puede ser sobrecargada y dar como resultado un plegamiento proteico incorrecto (Mogk *et al.*,2002).

Existe un alto grado de homología secuencial entre las chaperonas moleculares de todas las especies investigadas a la fecha. Aparentemente todas ayudan a las proteínas desplegadas de dos formas: en primer lugar durante el tiempo finito entre la síntesis y el plegamiento, donde las proteínas deben de estar protegidas de las interacciones inadecuadas proteína-proteína. Algunas proteínas deben permanecer desplegadas hasta que se inserten en la membrana de un orgánulo, por ejemplo, determinadas proteínas de las mitocondrias y los cloroplastos. En segundo lugar las proteínas deben plegarse rápida y precisamente a su estado nativo. Algunas deben ensamblarse en complejos con varias subunidades (Mckee,2003).

En condiciones normales, las Hsps cumplen una variedad de funciones, incluyendo ensamble, plegamiento intracelular y traslocación de proteínas

oligoméricas. Bajo condiciones de estrés celular actúan como agentes citoprotectores a través de su unión a proteínas desdobladas, protegiéndolas así de la desnaturalización. Las Hsps están también involucradas en un número de eventos asociados con el desarrollo embrionario. Las Hsps en mamíferos son típicamente conocidas como proteínas exclusivamente intracelulares, y su presencia en el medioambiente extracelular refleja un daño tisular. Así, la liberación de Hsps puede proporcionar señales de peligro que activan las respuestas inmunes (Todryk *et al.*,2003). En la actualidad se ha descubierto que las Hsps participan en enfermedades autoinmunes, enfermedades nerviosas y neoplásicas. En bovinos la exposición a estrés calórico conduce a apoptosis, así como a la síntesis de Hsps que posteriormente tendrán un papel protector antiapoptótico.

Factores Reguladores del Estrés Calórico

El gen codificador de proteínas del estrés calórico puede incluir algunas secuencias en general, que son llamadas elementos del estrés calórico (HSE). Estas secuencias de HSE son el sitio de unión para los factores del estrés calórico (HSF), que controlan la expresión de Hsps (Christians *et al.*,2003; Klettner,2004). Una de las principales y potenciales características unificadas de los genes de Hsps es constan de una secuencia corta de GAAnnTTC llamada elemento del estrés calórico, lugar donde se une el HSF. En microorganismos inferiores tales como *Drosophila melanogaster* existe un sólo HSF, mientras que en vertebrados se han identificado cuatro HSFs relacionados (I, II, III, IV) (Malago *et al.*,2002; Christians *et al.*,2003).

HSF, observándose que se comporta como un factor activador o supresor transcripcional (Christians *et al.*,2003).

Plegamiento Proteico

La estructura nativa de una proteína representa el estado termodinámicamente más favorable en el interior del embudo de plegamiento, como se observa en la figura 1. Todas las conformaciones no nativas de una proteína poseen una energía más alta, el plegamiento de proteínas puede ser imaginado como un balón rodando hacia abajo por la pendiente del panorama de energía.

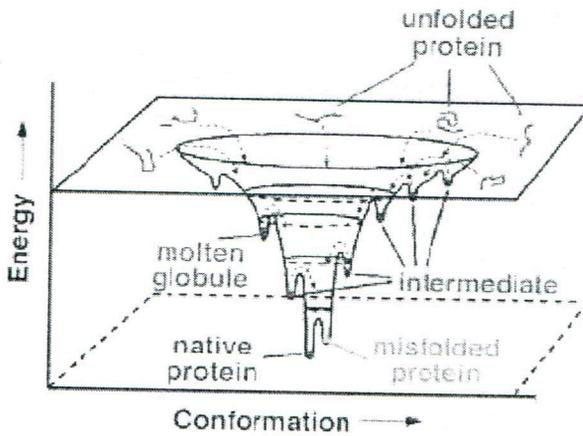


Fig.1 Túnel de plegamiento. En una visión más realista del panorama energético, los polipéptidos pueden plegarse a sus estados nativos mediante varias rutas diferentes. Muchas moléculas forman intermediarios transitorios, mientras otras pueden quedar en un estado mal plegado (Mogk *et al.*,2002).

Un embudo de plegamiento representa muchas vías diferentes de plegamiento que pueden ser usadas por las proteínas desdobladas para alcanzar la mínima energía (estructura nativa) rápida o lentamente dependiendo de la forma y el gradiente del embudo.

El plegamiento de proteínas es un proceso propenso a error, especialmente en el caso de proteínas grandes compuestas de diversos dominios (Mogk *et*

al.,2002). La intervención de intermediarios depende del tamaño del polipéptido, por ejemplo, un polipéptido puede o no formar intermediarios y después ser atrapados en pozos de energía local. Las moléculas pequeñas (de menos de 100 residuos) suelen plegarse sin formación de intermediarios. El plegamiento de polipéptidos más grandes suele requerir de la formación de varios intermediarios. Las Hsps juegan un papel importante durante el plegamiento de nuevas proteínas, las proteínas que serán degradadas para volver a ser plegadas tienen que ser ubiquinadas (protegidas por las Hsps), pues debido a que las Hsps no se degradan quedan a disposición de nuevas proteínas en proceso de degradación (Mckee,2003).

Tiempo del Proceso de Plegamiento

El tiempo de síntesis de las proteínas oscila entre unos pocos segundos a algo más de unos minutos. De acuerdo con un modelo destacado del plegamiento proteico, un polipéptido recién formado intenta todas las conformaciones posibles hasta que alcanza la más estable. Los cálculos de tiempo que se requieren para que cada enlace de una pequeña molécula proteica gire hasta que se consiga la forma biológica activa, indican que se requiere de un número astronómico de años. Aún cuando sólo se considere el número más pequeño de posibles rotaciones de enlace, el tiempo requerido para el plegamiento aún se mide en años. Por lo tanto, la mayoría de los investigadores han concluido que el plegamiento proteico es un proceso aleatorio que sólo se basa en la secuencia primaria (Mckee,2003).

Función de las Chaperonas

Algunas Hsps estabilizan temporalmente a proteínas parcialmente desdobladas o plegadas y así promueven la generación de una estructura terciaria correcta. Por ejemplo, la Hsp 70 mitocondrial (mtHsp 70), promueve la traslocación de proteínas para introducirlas en la mitocondria y es requerida para el plegamiento subsiguiente de proteínas nuevamente traslocadas (Zugel y Kaufmann,1999; Voos y Rottgers,2002). El Tim 44, es un componente de importación proteica mitocondrial de la membrana interna y se ha identificado que existe una interacción Tim 44-mtHsp 70 en levaduras. Esta interacción se posiciona en el sitio donde la pre-proteína entrará a la matriz mitocondrial, en donde el Tim 44 sirve como una palanca para la generación de una fuerza de traslocación generada por la mtHsp 70. Una mutación de ambas proteínas compromete la interacción Tim 44-mtHsp 70 mostrando una disminución significativa en la importación de proteínas (Voos y Rottgers,2002).

En *E. coli*, la DnaK homologa de la Hsp 70 estabiliza proteínas recién sintetizadas y promueve el ensamble de proteínas dentro de complejos multiméricos así como su desensamble. En eucariotas, la Hsp 70 (Hsc 73) participa en la degradación lisosomal de proteínas citolíticas mientras otras Hsp 70 similares juegan un papel esencial en la traslocación de proteínas al retículo endoplásmico (RE). En *E. coli*, la GroEL de 60 KDa y GroES de 15 KDa actúan juntas en el plegamiento y ensamblamiento de proteínas. Datos preliminares, sugieren que el complejo GroEL participa en la síntesis de la pared celular. La Hsp 60 homologa de GroEL esta presente en la matriz mitocondrial en eucariotas y participa en procesos de plegamiento de proteínas recientemente

importadas y en la prevención de agregación de polipéptidos desnaturalizados por el estrés calórico (Zugel y Kaufmann,1999).

Clasificación

Muchas células y organismos reaccionan ante el calor y a una variedad de estresores con una rápida síntesis de un grupo de proteínas conservadas evolutivamente, que van de un tamaño de 8 KDa a 150 KDa, llamadas Hsps (Malago *et al.*,2002). Estas proteínas son clasificadas dentro de varias familias de acuerdo a su peso molecular (Zugel y Kaufmann,1999; Malago *et al.*,2002; Mogk *et al.*,2002; Todryk *et al.*,2003). Las principales familias de Hsps incluyen a la Hsp 150, Hsp 110, Hsp 70, Hsp 60, Hsp 40, Hsp 20 y Hsp 8.5, como se observa en el cuadro 1 (Malago *et al.*,2002).

Otros autores las clasifican a la Hsps en tres principales grupos de acuerdo a su masa, por ejemplo: Hsp 90, Hsp 70 y un grupo que va de 50 KDa a 60 KDa, aunque pueden ser lejanamente subdivididas por su localización dentro de la célula (Gullo y Teoh,2004). Sin embargo también se incluyen las llamadas proteínas del estrés calórico pequeñas (sHsps), las cuales tienen un rango en su peso molecular de 14 a 29 KDa (Grover,2002), aunque otros reportes mencionan que el rango del peso molecular para la sHsps es de 15 a 42 KDa (Sun *et al.*,2002) y son expresadas (Hsp 25 o Hsp 27

Cuadro 1. Proteínas del Estrés Calórico Conocidas en Mamíferos

Familia	Hsps	Función
HSP 150	Hsp 150	Chaperona molecular en hipoxia e isquemia.
HSP110	Hsp 110	Chaperona molecular en hipertermia e isquemia.
Hsp 90	Hsp 105	Chaperona molecular en hipertermia e isquemia.
	Hsp 100	Chaperona molecular para proteínas secretoras.
	Hsp 90	Chaperona molecular en hipertermia e isquemia y para proteínas kinasa. Translocación de TNF- α citosólica y kinasas Raf a la membrana plasmática. Participa en las funciones de los receptores de hormonas esferoidales. Proliferación y crecimiento celular.
HSP 70	Grp 78	Chaperona molecular en hipertermia. Transporte de proteínas por el RE (Malago <i>et al.</i> ,2002). Confiere tolerancia al estrés calórico extremo, controla el plegamiento proteico y actividad en los receptores de hormonas esteroidales y kinasas proteicas (Watanabe <i>et al.</i> ,1997; Mogk <i>et al.</i> ,2002).
	Hsp 72	Chaperona molecular en hipertermia, hipoxia, e isquemia. Inhibe la producción de leucotrienos.
	Hsc 70	Chaperona molecular altamente inducida en hipertermia e isquemia. Regula las respuestas al estrés calórico (Malago <i>et al.</i> ,2002; Mogk <i>et al.</i> ,2002).
	Hsp 70	Chaperona molecular altamente inducida en hipertermia e isquemia. Regula las respuestas al estrés calórico (Malago <i>et al.</i> ,2002; Mogk <i>et al.</i> ,2002).
HSP 60	mtHsp 70	Chaperona molecular Hsp 70 mitocondrial.
	Hsp 60	Chaperona molecular (chaperonina) en hipertermia e isquemia.
	Hsp 65	Aumenta las respuestas al estrés para regresión tumoral.
HSP 40	TCP-1	Chaperona molecular (chaperonina) en hipertermia e isquemia.
	Hsp 47	Chaperona molecular para el colágeno.
HSP 20	Hsp 40	Cofactor de Hsp 70 para la mediación de más funciones de Hsp 70.
	Hsp 27	Chaperona molecular en hipertermia, químicos (peróxido de hidrógeno, medicamentos), e irradiación. Eleva la producción de IL-10.
	Hsp 20	Chaperona molecular en hipertermia, isquemia, y peróxido de hidrógeno.

Grp, proteínas reguladas por glucosa; Hsc, Hsp 70 constitutiva; mtHsp 70, Hsp 70 mitocondrial; TCP-1, complejo de proteína T; TNF, factor de necrosis tumoral; IL, interleucina (3).

principalmente) en muchas líneas celulares y en tejidos de mamíferos (Bryantsev *et al.*,2002). En contraste a la Hsp 60 y Hsp70, las sHsps no dependen del ATP y pueden unirse selectivamente a proteínas no nativas previniendo su agregación y manteniéndolas en un estado competente para el plegamiento dependiente del ATP por otras chaperonas (Sun *et al.*,2002).

En general, sólo cinco grupos de chaperonas han sido distinguidas: Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90, Hsp 100 y las sHsps (Voos y Rottgers,2002).

Hsp 60

La familia Hsp 60 es uno de los muchos componentes del sistema de plegamiento proteico en la matriz mitocondrial (Mogk *et al.*,2002). La CPN 60 normalmente se encuentra en la mitocondria, pero en células infectadas se puede localizar a nivel de su superficie. El mecanismo por el cual es transportada aún se desconoce, por lo que es frecuente encontrar que sea llamada CPN 60 endógena o exógena (Ranford y Henderson,2002).

Los miembros de la familia Hsp 60 son distinguidos por su característica estructural. Forman un homo-oligomero de 14 subunidades con 7 subunidades colocadas en un anillo, resultando una característica estructural de "doble anillo" que se encuentra en la mitocondria y cloroplastos de todas las procariontas (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002; Mckee,2003). Cada uno de los anillos de GroEL forma una cavidad en la que se unen polipéptidos desdoblados. Ambos anillos pliegan a los sustratos en una forma rápida y cada ciclo toma aproximadamente 15 segundos (Mogk *et al.*,2002).

El sistema de doble anillo esta capacitado para el acomodamiento de proteínas con un peso molecular de 50 kDa. Las proteínas que entran en esta cavidad son protegidas de interacciones con otros componentes del ambiente circundante. Los sustratos preferidos por Hsp 60 son de plegamiento intermedio que no han adquirido su estructura nativa. Los sustratos proteicos son unidos a un aminoácido hidrofóbico residual que es expuesto en la pared interna de la cavidad. Las uniones de ATP inducen a un amplio cambio conformacional de las subunidades que abren la cavidad y reducen el conjunto hidrofóbico total de la superficie de ésta, por lo que, las proteínas unidas deben ser liberadas del complejo Hsp 60 y pueden experimentar nuevos intentos de

plegamiento. La co-chaperona Hsp 10, homólogo de GroES de *Escherichia coli*, puede formar un tapón sobre el sistema de doble anillo, cerrando la apertura de la cavidad central, (figura 2). La Hsp 10 es observada por controlar el comportamiento de monómeros Hsp 60 y regular el ciclo del ATP asa (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002).

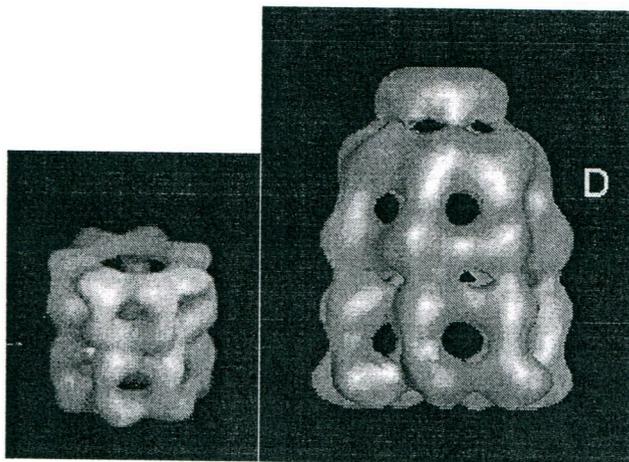


Fig.2 Modelo de relleno espacial de la chaperonina de *Escherichia coli* denominada complejo GroES-GroEL (McKee,2003).

Se ha demostrado que las proteínas mitocondriales recién importadas interactúan brevemente en forma física con Hsp 60, alcanzando después el compartimento de la matriz. Las proteínas unidas a Hsp 60 deben adquirir su estado nativo en una reacción ATP-dependiente. El plegamiento requiere catálisis por Hsp 60 y Hsp 10 que puede variar substancialmente dependiendo de las características del sustrato proteico. Hsp 60 y Hsp 10 son las dos principales clases de chaperonas de la matriz mitocondrial, lo más probable es que cooperen en la reacción de plegamiento de proteínas importadas en un orden secuencial. Un papel relevante en la traslocación de pre-proteínas fue observado por primera vez en la mtHsp 70. Después de la liberación de Hsp

70, las pre-proteínas interactúan con el complejo Hsp 60 (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002; Mckee,2003).

El plegamiento de proteínas en *E. coli* es asistido por el complejo GroEL-GroES, pero para ello es necesario pasar por los procesos de captura (habilidad de GroEL para interactuar recíprocamente con una variedad amplia de proteínas, en su estado no nativo) y encapsulación.

El volumen de la cavidad de GroEL en el estado T (en el cual se une el sustrato proteico "SP") es de 85,000 Å. El diámetro de los poros de los siete ejes de plegamiento es de 45 Å. Esto limita el acceso completo a la cavidad a proteínas pequeñas de 30 KDa. Sin embargo, muchas proteínas grandes, incluso aquellas que exceden de 100 KDa de peso, pueden formar complejos binarios con GroEL. En tal instancia, es claro que una parte substancial del SP debe estar fuera de la cavidad, así como otras partes limitadas en su interior.

Un factor importante en el que influye la unión de varios SPs a GroEL es que afecta al último estado conformacional, T o R. El estado T tiene mayor afinidad para el SP. La transición al estado R es inducida por la unión de ATP. El estado R tiene mayor afinidad por el ATP que el estado T.

La encapsulación es el proceso por el cual el SP es secuestrado completamente del medioambiente externo a la cavidad central de GroEL bajo la cubierta de GroES (Thirumalai y Lorimer,2001).

La CPN 60 es esencial para la supervivencia de las células, y por lo tanto su deficiencia es fatal. Se reportó un paciente con encefalopatía sistémica mitocondrial la cual fue causada por una deficiencia de múltiples enzimas en las mitocondrias, el paciente presentaba baja concentración de CPN 60 que fue la causa hipotética de la enfermedad. Otro paciente con deficiencia de

CPN 60 presentaba acidemia láctica congénita, causada por deficiencia de enzimas mitocondriales. La CPN 60 de mamíferos está implicada como señal de estrés endógeno, y es común en modelos de enfermedades autoinmunes. Por tanto, se ha sugerido las chaperoninas no sólo necesarias en el desarrollo normal de las funciones celulares, sino que también en mamíferos tienen un papel importante de defensa patógenos y contra daños por estrés (Ranford y Henderson,2002).

Las chaperoninas son un subgrupo de las llamadas chaperonas moleculares, las cuales contribuyen a un plegamiento correcto de las proteínas celulares en condiciones normales. También llamadas chaperoninas o CPN 60 (Ranford y Henderson,2002; Mckee,2003).

A su vez las chaperoninas (CPN 60) se dividen en dos grupos: chaperoninas (CPN 60) del grupo I: son las proteínas de células procarióticas (por ejemplo el heptámero GroEL es la más común de las chaperoninas clase I y consiste de dos anillos heptaméricos, apilados espalda con espalda, y que se comunican una con otra, operando de manera coordinada y que también se encuentran en la mitocondria de células eucariotas (Thirumalai y Lorimer,2001) y chaperoninas del grupo II: las células eucariotas poseen una chaperonina citosólica conocida como CCT (chaperonina que contiene TCP-1) (Ranford y Henderson,2002).

Hsp 70

En los mamíferos, la Hsp 70 es una proteína constitutiva (Hsc 70) que está localizada dentro del citoplasma y se expresa constitutivamente además de ser ligeramente inducible, en un estudio se identificó la presencia de Hsp 70 en

plasma de vacas lecheras Holstein-Friesian y su presencia indica que incluso organismos aparentemente sanos pueden experimentar estrés extrínseco o intrínseco, o ambos (Kristensen *et al.*,2004). Se piensa que la Hsp 70 forma parte del sistema de degradación proteica y que puede ayudar a la presentación del antígeno vía complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I (Todryk *et al.*,2003). La *S. cerevisiae*, contiene tres especies de Hsp 70 que se encuentran en la mitocondria, las cuales son codificadas por diferentes genes, SSC1, SSQ1 y ECM 10, los tres tipos de Hsps muestran alta homología, y aun cuando la levadura pueda funcionar sin la energía de la mitocondria, una supresión del gen SSC1, es letal bajo cualquier situación (Voos y Rottgers,2002). En oocitos de ratón la inyección de mRNA para Hsp70 incrementa su supervivencia ante el estrés calórico. De hecho la Hsp70 es importante para el desarrollo aún en ausencia de estrés calórico, pues la provisión de anticuerpos Hsp70 en un medio de cultivo disminuye el desarrollo en ratones y en ganado vacuno (Hansen,2002).

En contraste con GroEL, la chaperona HSP 70 o DnaK no encierra completamente al sustrato, si no que se une sólo a algunos segmentos de péptidos cortos de 5 aminoácidos. La DnaK consta de un dominio ATP asa N-terminal y un dominio de unión de sustratos C-terminal, la unión y liberación del sustrato esta regulada por hidrólisis de ATP a ADP y procesos de cambio ADP/ATP que están controlados por las co-chaperonas Dnaj y GrpE. En el estado de ATPasa se asocian y disocian sustratos a DnaK con alta velocidad pero la afinidad de DnaK a los sustratos es baja (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002; Mckee,2003).

El cambio conformacional ADP-ATP está correlacionado a un cambio en la afinidad al sustrato. En el estado de unión de ATP, el dominio de unión de péptidos es en una forma abierta con una baja afinidad de sustratos; en el estado de unión de ADP, el dominio de unión de péptidos es cerrado y tiene un alta afinidad de unión (Voos y Rottgers,2002).

En el estado ADP los sustratos se unen a DnaK con alta afinidad, pero los cambios de velocidad son bajos. La co-chaperona Dnaj, la cual por si misma interactúa con sustratos a través de reacciones hidrofóbicas estimula la actividad ATP de la DnaK. Evidencias experimentales sugieren que Dnaj "reconoce" al sustrato y éste lo pasa a DnaK por lo que el ATP es hidrolizado y un segmento del sustrato es marcadamente encerrado.

Bajo condiciones fisiológicas, la disociación del sustrato esta controlada por cambios ADP/ATP alternados, que son estimulados por la co-chaperona GrpE. Los ciclos de unión y liberación de sustratos, de acuerdo a recientes cálculos, son cortos (cerca de un segundo por ciclo) y más bien tienden repetirse muchas veces hasta que la proteína queda plegada y ya no se reconoce como sustrato. Sin embargo todavía no queda claro como estos ciclos de unión promueven el plegamiento de las proteínas desdobladas. De acuerdo a una hipótesis, la DnaK desdobla a los sustratos localmente, en contraste al desdoblamiento global por GroEL. Evidentemente, estos mecanismos tienen la gran ventaja de ser independientes del tamaño del sustrato proteico desdoblado. Fue demostrado que proteínas de todos los tamaños son encontradas entre los sustratos de Hsp 70 y que las proteínas grandes con 60 kDa son particularmente dependientes de la asistencia de Hsp 70 durante su plegamiento (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002).

La Hsp70 es una molécula que juega un papel importante en la resistencia celular al estrés calórico, actúa protegiendo a las células ante la exposición a elevadas temperaturas estabilizando la estructura proteica, inhibiendo la traslación y previniendo la apoptosis (Xanthoudakis y Nicholson,2000; Matwee *et al.*,2001; Hansen,2002). La función protectora de las chaperonas Hsp 27 y Hsp 70 contra la apoptosis, involucra varias interacciones con componentes de la maquinaria apoptósica (observar la figura 3). De manera interesantemente, estas Hsps promueven la inhibición de la función del apoptosoma (formado por el citocromo C, Apaf-1 y la caspasa 9), e independientemente de las diferentes proteínas blanco. Se ha demostrado que la unión de Hsp 27 al citocromo C (proteína transportadora de energía) tras su liberación de la mitocondria, previene la interacción productiva con Apaf-1, factor-1 activador de las proteasas de la apoptosis, lo que daría a la formación de apoptosoma.

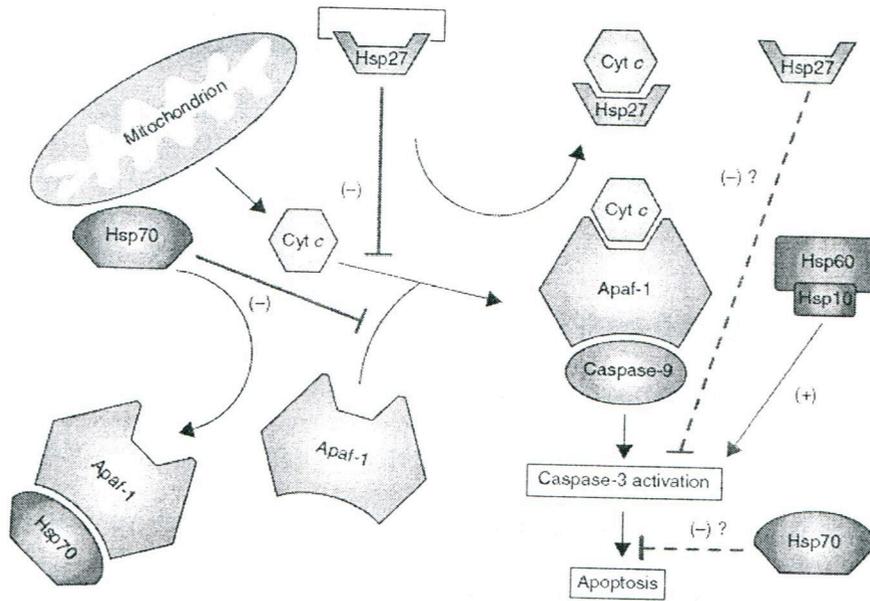


Fig. 3; Las vías propuestas para la modulación de la apoptosis a través de Hsps. La Hsp 27 y Hsp 70 que actúan apoderándose de Apaf-1 y el citocromo c (Cyt C), por lo que previenen la maduración por el apoptosoma. Dando como consecuencia una baja activación de la casaca de caspasas. Posteriormente, la influencia negativa sobre la activación de la caspasa 3, estos eventos también pueden ser ejercidos por la Hsp 27 y Hsp 90 que también inhiben la formación de un apoptosoma funcional por secuestro del Apaf-1. En contraste, la Hsp 60 sola o en combinación con la Hsp 10 puede estimular directamente la apoptosis promoviendo la maduración proteolítica de la caspasa 3 (Xanthoudakis y Nicholson,2000).

En una serie de experimentos complementarios se demostró que la Hsp 70 inhibe la apoptosis por unión directa a Apaf-1, por lo que evita el reclutamiento eventual de la procaspasa 9 al apoptosoma. Por ejemplo, la Hsp 70 y su homólogo constitutivo la Hsc 70, han demostrado interactuar con Bag-1, una proteína antiapoptósica asociada con Bcl-2 que se ha propuesto que sirve como una co-chaperona. En adición a la interacción con Apaf-1 y Bag-1, se ha propuesto que la Hsp 70 ejerce un efecto protector contra la apoptosis por asociación con una o más caspasas. En conclusión, los estudios describen la importancia de la interacción de las Hsps con la maquinaria apoptósica. Dado

que la homeostasis es un equilibrio entre la supervivencia y la muerte, las Hsps, así como otras chaperonas, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de este delicado balance (Xanthoudakis y Nicholson,2000; Klettner,2004).

La apoptosis espontánea es observada en embriones de bovino en la etapa de 16 células (etapa a los 4 días postinseminación) que coincide con el tiempo de la activación del genoma del embrión. Este modelo de desarrollo es paralelo a la resistencia al estrés calórico, aunque los embriones adquieren resistencia incrementada al estrés calórico (así como la habilidad para continuar con el desarrollo después del mismo) cuando los embriones progresan de la etapa de dos células a la etapa de mórula. Tal correlación sugiere que la apoptosis puede ser un mecanismo que los embriones de bovino adquieren para permitir la supervivencia después del estrés calórico. Dado que el estrés calórico induce apoptosis en una fracción de células (15 a 29%), y no en la mayoría de los blastómeros, la apoptosis puede asegurar que las células dañadas por estrés calórico sean removidas del embrión para facilitar el desarrollo. En estudios actuales fue hipotetizado que la apoptosis inducida por calor en embriones de bovino es mediada por el grupo II de las caspasas (el grupo II de las caspasas incluye a las caspasas 2, 3 y 7) (Paula-Lopes y Hansen,2002; Roth y Hansen,2004). En los experimentos realizados para probar si el inhibidor α -DEVD-fmk del grupo II de las caspasas disminuye la actividad de las caspasas en embriones de bovino cultivados y expuestos a estrés calórico de 41 °C (por 9 horas) y para evaluar si la apoptosis bloqueada por α -DEVD-fmk disminuye el desarrollo de los embriones en etapa de blastocitos expuestos a

estrés calórico de 41 °C (por 6-9 horas), los resultados indicaron que el grupo II de las caspasas son mediadoras de la apoptosis inducida por calor en los embriones y que la inhibición de estas caspasas tiene un efecto perjudicial sobre la resistencia del embrión al estrés calórico (Paula-Lopes y Hansen,2002).

Hsp 90

La proteína 90 del estrés calórico es una chaperona molecular abundante, altamente conservada y esencial para la viabilidad de células eucariotas. Al parecer, el funcionamiento de la Hsp 90 está regulado por fosforilación. La Hsp 90 protege el plegamiento, contribuyendo al mantenimiento de la estructura integral y la regulación adecuada de un subconjunto de proteínas citosólicas e interactúa con tres diferentes clases de proteínas: cochaperonas, reguladores y sustratos (Picard,2002). Esta clasificación es algo arbitraria (Picard,2002), pero en general los sustratos de interacción para las chaperonas son principalmente segmentos de proteínas hidrofóbicas expuestos en la solución circundante (Mogk *et al.*,2002; Voos y Rottgers,2002). Además del plegamiento proteico otra participación de la Hsp 90 es su intervención en el funcionamiento de los receptores de los glucocorticoides (Bohem,1994; Moseley,1997; Picard,2002, Bohem, 1994 #84, Moseley, 1997 #57). En términos generales, todos los receptores nucleares funcionan con un mecanismo similar; sin embargo, el modo de acción de los receptores de los glucocorticoides (GR) es uno de los mejor caracterizados. En su forma inactiva, es decir, en ausencia de los glucocorticoides (GC), el GR se encuentra asociado en complejos citosólicos con proteínas del tipo de las chaperoninas, como la HSP 56 y la

HSP 90. Esta asociación tiene dos efectos, el GR se retiene en el citosol, para adquirir una conformación que facilita su unión con el ligando. La unión del GC activa al GR, pues además de liberarlo de las chaperoninas, también propicia su migración al núcleo, en donde se une a los GRE (elementos reconocedores de glucocorticoides), sus elementos reguladores, y lleva a cabo su efecto activador de la transcripción (Laguna y Enrique,2002; Picard,2002).

Hsp 100

Las proteínas Clp (en procariotas) o Hsp 100 (en eucariotas), son miembros de la tercera familia de chaperonas mitocondriales, que realizan papeles importantes durante las etapas posteriores del ciclo de vida de una proteína. Las proteínas funcionales pueden ser dañadas y desdoblarse por varias situaciones de estrés, agregarse y eventualmente degradarse. Resultados obtenidos recientemente con el sistema bacteriano señalan que miembros de la familia Hsp 100 son mediadores de reacciones de protección, previniendo el daño celular causado por la acumulación de proteínas agregadas. La Clp B homóloga de Hsp 104, es la principal proteína que confiere resistencia a niveles extremos de temperaturas en las células eucariotas. Por otro lado la Hsp 100, también asiste la degradación irreversible de polipéptidos dañados por mecanismos proteolíticos específicos. Se cree que la Hsp 100, en cooperación con la Hsp 70 proporciona una actividad de desdoblamiento requerida para la eficiente y completa degradación proteolítica de sustratos proteicos desdoblados (Voos y Rottgers,2002).

Inducción De Hsps

- (a) El siguiente protocolo puede ser usado para inducir una respuesta de Hsps en ratones: El animal experimental se anestesia con una mezcla de xilazina y ketamina intraperitoneal (4ml/kg de peso corporal). La solución anestésica es hecha de 1.5 ml de xilazina (20/ml), 2.25 ml de ketamina (100mg/ml), y 6.5 ml de NACl al .9 %.
- (b) El animal es puesto en una almohadilla caliente a 37 °C, y un termómetro es puesto en el recto y continuamente se monitorea la temperatura corporal.
- (c) El animal es expuesto al calor hasta que alcanza una temperatura rectal de 41.0 °C, usando además dos lámparas puestas a 8-12 cm sobre el animal. La distancia entre las lámparas y el animal determina el tiempo necesario para alcanzar los 41 °C. Esto puede tomar típicamente entre 15-18 minutos lo cual es importante para que la duración total de la hipertermia sea menor de 40-45 minutos, ya que largos períodos de hipertermia están asociados con un incremento significativo de la mortalidad.
- (d) Para prevenir la deshidratación severa asociada a la hipertermia, se deben administrar fluidos subcutáneos tienen que ser administrados durante el periodo hipertérmico. Un ratón de 25-30 g debe recibir tres aplicaciones de .5 ml de NACl al .9 %: la primera aplicación se administra inmediatamente después de la inducción de la anestesia, la segunda aplicación es inyectada cuando el cuerpo alcanza la temperatura de 41°C, y la tercera aplicación al final del periodo hipertérmico. La administración de fluidos reduce significativamente la mortalidad asociada a los tratamientos con hipertermia.

(e) El animal es cuidadosamente observado durante la recuperación de la anestesia. Cuando se despierta completamente, es colocado en su caja, con acceso normal a comida y agua (Pespeni *et al.*,2005).

Participación de las Hsps en distintos padecimientos neurodegenerativos

La importancia de las Hsps en estas enfermedades es principalmente por su efecto neuroprotector, por ejemplo en el caso de choque cuya causa es la isquemia, la cual induce la expresión de Hsps (Hsp 27, Hsp 40, Hsp 70), siendo la Hsp 27 mayor en astrocitos, lo que puede ayudar a mantener la homeostasis tisular y de ese modo ayudan a las neuronas para resistir la agresión.

En ratones, la sobre expresión de Hsp 70 se presenta en un área reducida de la zona infartada, lo que a su vez resulta en menor muerte celular después de una isquemia transitoria. La sobre expresión transitoria de Hsp 70 protege al cerebro de las ratas contra la pérdida celular después de la isquemia focal o global y es efectiva cuando se libera por más de dos horas después de la agresión (Klettner,2004).

En modelos de cultivos celulares de enfermedades poliglutámicas la sobre expresión de Hsp 40 y Hsp 70 suprime la formación de agregaciones y muerte celular, siendo la Hsp 40 más eficiente que la Hsp 70 (Klettner,2004).

Choque

El choque se refiere a un ataque o crisis fulminante que puede ser causado por múltiples factores y es la segunda causa de muerte en el mundo. Induce una lenta incapacidad de los pacientes para sobrevivir, a menudo convirtiéndolos dependientes de instituciones o casas de cuidado. El choque isquémico es

causado por una disminución de flujo sanguíneo en ciertas áreas del cerebro. Las terapias son raras y se enfocan en el mejoramiento del flujo sanguíneo en el tejido afectado. En éste padecimiento se encuentran involucradas algunas Hsps. Generalmente la Hsp 70 es encontrada en células que tienen buen pronóstico de sobrevivir. En modelos de isquemia global el RNAm de Hsp 40 y Hsp 70 puede ser detectado en el hipocampo horas después del ataque isquémico, seguido de la expresión de las proteínas que disminuyen la pérdida de neuronas. En modelos de isquemia focal transitoria, también se induce la expresión de Hsp 70 y Hsp 40. La Hsp 70 se expresa sólo en neuronas de la penumbra del área infartada y no en el centro necrótico su expresión depende de la severidad del daño. La expresión de Hsps, también puede encontrarse en astrocitos, microglia y células endoteliales, mientras que la Hsp 27 es específicamente inducida en astrocitos (Klettner,2004).

Alzheimer

En contraste a la pérdida aguda de neuronas en choque, en enfermedades neurodegenerativas crónicas, los síntomas son reconocidos sólo después de una inmensa pérdida de las mismas. La enfermedad de Alzheimer es un desorden degenerativo progresivo del sistema nervioso central, caracterizado por deterioro senil prematuro. Este es un aspecto genético conocido de la enfermedad (5% de los pacientes tienen mutaciones del beta amiloide precursor de proteínas o presenil 1 y 2 respectivamente) (Smith *et al.*,1998 ; Klettner,2004), aunque la causa original de la enfermedad es todavía desconocida. La característica patogénica de la enfermedad de Alzheimer es la formación extracelular de placas seniles y neurofibrillas intracelulares. Los

inhibidores de la colinesterasa (galatamina, rivastigmina, donepezil, tacrina) son los tratamientos de elección (Klettner,2004).

En el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, la Hsp 70 se encuentra elevada en las placas seniles, la expresión de Hsp 90 está incrementada intra y extracelular. La Hsp 27 es fuertemente inducida en la corteza cerebral, en la enfermedad de Alzheimer, y una mayor expresión en astrocitos degenerados en áreas con abundantes placas seniles. Están también localizadas en la microglia de lesiones circundantes en cerebros con enfermedad de Alzheimer (Klettner,2004).

Huntington

Es una condición neurodegenerativa causada por la agregación de una proteína que contiene poli-glutamina (Smith *et al.*,1998). La poliglutamina induce a la formación de amiloides insolubles que forman inclusiones intracelulares en las neuronas. Los efectos patogénicos de estas inclusiones no han sido probados, pero se sugiere que hay una correlación en el número de inclusiones en la corteza de pacientes con esta enfermedad. Aún no se conoce el tratamiento efectivo de la enfermedad (Klettner,2004).

La sobreexpresión de proteínas poliglutámicas es citotóxica en cultivos celulares o incrementa la susceptibilidad a agresiones tóxicas y a la sobre expresión de proteínas que forman agregados. En estos agregados son localizadas la Hsp 40 y la Hsp 70; la sobre expresión de estas Hsps suprime la formación de agregados y reduce la muerte celular. Las proteínas poliglutámicas grandes son probablemente desdobladas y promueven la agregación, lo cual puede ser prevenido por las propiedades de las Hsp (Klettner,2004).

Respuesta al estrés en la relación hospedero/patógeno

Aunque las Hsps también están presentes en células no estresadas en bajas concentraciones, en las células estresadas se acumulan a altos niveles. Por ejemplo, en *E. coli*, GRoEL, homóloga de Hsp 60, fue la que primariamente se describió, y representa del 1 al 2% del total de proteínas contenidas bajo condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de estrés ésta concentración se incrementa 4 o 5 veces. Aunque las Hsps no se acumulan a tales niveles en eucariotas, su concentración también se incrementada después del estrés calórico. Cuando un patógeno microbiano entra al medio ambiente del hospedero se enfrenta a varios cambios, algunos de los cuales son altamente estresantes. Esto incluye alteraciones de temperatura, pH y PO₂. Además, el patógeno es expuesto a mecanismos de resistencia natural del hospedero tales como fagocitosis por fagocitos profesionales, enfrentándose también a reacciones de intermediarios del oxígeno y el nitrógeno. Para protegerse del hospedero, el patógeno activa varios mecanismos de evasión incluyendo la síntesis de Hsps. La importancia de las Hsps para la sobrevivencia del patógeno en este medioambiente estresante, es sustentada en experimentos con un patógeno mutante intracelular como *Salmonella typhimurium* el cual sobre expresa Hsps. Este mutante demostró ser resistente a una variedad de agentes oxidantes y calóricos. Inversamente, mutantes de *S. typhimurium* con defectos de genes específicos para la síntesis de Hsps son altamente susceptibles a la muerte activada por macrófagos y también expresan disminución de virulencia *in vivo* (Zugel y Kaufmann, 1999).

La importancia de las Hsps para la supervivencia del patógeno en el hospedero es sostenida en una gran variedad de patógenos intracelulares, aunque la

inducción de Hsps es menos relevante para algunos otros microbios, incluyendo *L. monocytogenes*. La capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en macrófagos aun en ausencia de la síntesis elevada de Hsps, explica el potencial de este patógeno para evadir el medioambiente estresante endosomal al inicio de la fagocitosis. Así, el impacto de las Hsps sobre la supervivencia microbiana en el hospedero varía en diferentes infecciones (Zugel y Kaufmann,1999).

La infección es un proceso bimodal determinado por el hospedero y el patógeno. Durante la infección, tanto el patógeno como el hospedero incrementan su producción de Hsps. La inducción de síntesis de Hsps del hospedero en respuesta al encuentro con el patógeno tiene por lo menos dos causas principales. En primer lugar, los macrófagos infectados son confrontados con mecanismos antimicrobianos que tienen activados ellos mismos durante la infección. La eficiente protección contra sus propias moléculas efectoras (por ejemplo radicales libres), es vital para la supervivencia de los propios macrófagos. En segundo lugar, desde adentro del fagocito, muchos microbios, especialmente aquellos que persisten en el hospedero, interfieren en el metabolismo intracelular del mismo (Zugel y Kaufmann,1999).

Hsps en Respuestas Inmunes

Numerosas publicaciones han demostrado que la Hsp 70, Hsp 90 y GRP 94 tienen un papel importante en la presentación de antígenos a través de complejos péptidos-Hsp derivados de células presentadoras de antígenos (CPA) (Gullo y Teoh,2004). Por ejemplo, la expresión de Hsp 70 en células tumorales de ratón influye en el procesamiento y presentación del antígeno a

células TCD4 por células presentadoras de antígenos e incrementa su expresión en las células tumorales promoviendo la presentación de péptidos en la superficie, vía MHC clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I). La expresión de Hsp 70 en células tumorales también aumenta el reconocimiento por las células T en otras vías diferentes al CMH (Zugel y Kaufmann,1999; Todryk *et al.*,2003). Esto es atribuido a la Hsp 70 que por las características de participar en el procesamiento y presentación de antígenos, posee la capacidad de eliminar tumores pre-existentes así como los metastáticos en ratones (Gullo y Teoh,2004). Otro aspecto de importancia es que la Hsp 70 expresada en la superficie celular de células parasitadas funciona como el blanco para las células asesinas naturales (Células NK) (Zugel y Kaufmann,1999).

En estudios de inmunización con células que secretan GRP 94 conteniendo el sitio de unión- ATP y no el sitio de unión- péptido resultó en la supresión tumoral en ratones (Gullo y Teoh,2004).

Un aspecto importante que hay que recordar es que en una infección, tanto el hospedero como el antígeno se enfrentan a estrés, lo que conlleva a la síntesis de Hsps (Gullo y Teoh,2004), ésto representa un problema para el sistema inmunitario del hospedero ya que tiene que distinguir a las proteínas del hospedero y a las del antígeno, y comúnmente, la alta homología entre las Hsps de ambas partes, por ejemplo la CPN 60 de humanos y la de *E. coli* son en un 52% idénticas y 67% similares en la cantidad de aminoácidos, producen trastornos de autoinmunidad (Ranford y Henderson,2002). Cada vez hay más evidencias de una posible interacción entre la infección bacteriana y la inducción de algunas enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se ha

encontrado reacción de células T CD8 con CPN 60 del hospedero, como causa de reacciones inflamatorias crónicas en el intestino de ratones. Sin embargo, paradójicamente CPN 60 puede aminorar o inhibir la progresión de algunas enfermedades autoinmunes (Ranford y Henderson,2002).

Vacunación con Hsps de Patógenos

Las Hsps representan a antígenos en numerosas infecciones microbianas, por lo que se ha sugerido el uso potencial de las Hsps derivadas de patógenos para vacunación. De hecho, en varios modelos de enfermedades infecciosas, diferentes estrategias de vacunación usando Hsps producen significativa protección inducida. Por ejemplo, la inmunización de ratones, con GroES y GroEL de *Helicobacter pilory* protegió a los animales de una infección posterior y del desarrollo de la enfermedad gastrointestinal. Además, la vacunación de ratones con Hsp 60 de *Histoplasma capsulatum* indujo protección contra histoplamosis pulmonar. Otros ejemplos de una respuesta inmunoprotectora anti-Hsps ha sido demostrado en ratones con infección de *Yersinia enterolítica*. La inmunización de ratones con Hsp 60 de *Y. enterolítica* indujo una fuerte reacción de las células T contra la Hsp 60 de *Y. enterolítica*, la cual confirió protección en un posterior desafío con *Yersinia* (Zugel y Kaufmann,1999).

En otros experimentos, usando vacunación con DNA del virus de la encefalitis japonesa (VEJ) con proteínas no estructurales y Hsp 70.1 en ratones, dio como resultado una fuerte respuesta inmune haciendo resistentes a los ratones en desafíos letales con VEJ. Aunque estos estudios tienen limitaciones inherentes, es claro que estrategias de vacunacion/transfección con Hsps pueden ser

usadas para obtener fuertes respuestas inmunes celulares pero no humorales (Gullo y Teoh,2004). En un experimento en el cual no se obtuvo la misma respuesta, fue con el parásito intracelular *Brucella abortus*, en la cual anteriormente se pensaba que las Hsps participaban en la patogénesis de *B. abortus*, y posteriormente se reportó que esto era incierto (Ko y Splitter,2003). Se desarrolló una vacuna de virus recombinante conteniendo varias proteínas de *B. abortus* en ratas BALB/c. En la inoculación del virus recombinante/GroEL, GroEL produjo anticuerpos específicos para la vacuna. Aunque la inducción de respuestas específicas para GroEL y la vacuna viral demostró una aparente producción de anticuerpos en las ratas, no se mantuvo un nivel de protección significativo (Baloglu *et al.*,2000).

Estrés Calórico en la Reproducción

El estrés calórico en el ganado tiene un impacto adverso en múltiples funciones fisiológicas importantes para la reproducción (Hansen y Arechiga,1999; Jordan,2003). El estrés calórico reduce el flujo sanguíneo en el tracto reproductivo, altera la secreción de las hormonas reproductivas y la dinámica del crecimiento folicular, compromete la competencia del oocito (Block *et al.*,2002) y la función uterina, altera la duración del estro (alrededor de 10 horas, en comparación con 18 horas cuando no hay estrés calórico) (Mellado,1995; Jordan,2003), la calidad del calostro, la tasa de concepción, el estado endocrino, los mecanismos luteolíticos (Jordan,2003) y reduce el desarrollo embrionario (Block *et al.*,2002; Jordan,2003). Sin embargo, el estrés calórico afecta en menor grado la reproducción del ganado que descende del *Bos indicus* y ciertas razas del *Bos taurus* adaptadas tropicalmente, en

comparación con el ganado descendiente del *Bos taurus* (Block *et al.*,2002). En la actualidad, el índice de temperatura-humedad (THI), es el mejor, simple y práctico indicador para medir el calor del medioambiente, causal de estrés calórico en el ganado lechero (Du Preez,2000).

Diferencias entre Razas Cebú y Europeas

Durante la evolución del ganado *Cebú* (*Bos indicus*) y *Bos taurus*, han adquirido genes que les confieren termotolerancia a nivel fisiológico y celular (Mellado,1995; Hansen,2004). El ganado *Cebú* es capaz de regular mejor la temperatura corporal en respuesta al estrés calórico en comparación con las razas que descienden del *Bos taurus*. Además, la exposición a elevadas temperaturas es menos dañina sobre las células del ganado Cebú que sobre las células de razas europeas. La habilidad superior para regular la temperatura corporal durante el estrés calórico es el resultado de una tasa metabólica inferior en el *Bos indicus* teniendo así mayor capacidad para disipar calor. Por ejemplo, la tasa de producción de calor por unidad superficial en vacas no lactantes y en ayunas fue estimada en 100 Mcal/m² para Holstein, 75 Mcal/m² para Jersey y 57 Mcal/m² para Red shini x Holstein. Las propiedades del pelo en el ganado Cebú elevan la conducción y convección, además reducen la absorción solar (Mellado,1995). El *Bos indicus* diverge del *Bos taurus* más o menos entre 850,000 o 110,000 años (Hansen,2004) y evidencias encontradas sostienen la existencia de un gen en el ganado, designado como el gen del pelo liso, que es de herencia dominante y responsable de producir una capa de pelo corto y liso (Olson,2003). El ganado con este tipo de pelo mantiene una temperatura rectal (RT) baja. El efecto del gen del pelo liso sobre

la RT depende del grado de estrés calórico y parece estar afectado por la etapa y/o estado de lactación. El gen es encontrado en ganado Senepol y razas criollas (originarias de España) en América del Sur y América Central (Olson *et al.*,2003).

Aunque las propiedades de la piel explican la termotolerancia del ganado Cebú, una posible causa es que la cantidad de anastomosis arteriovenosa es más alta en el ganado *B. indicus*, lo que facilita el incremento del flujo sanguíneo a la piel durante el estrés calórico, aunque a consecuencia de esta respuesta, el canal reproductivo recibe menos cantidad de sangre, lo que significa una reducción en el intercambio de nutrientes en los diferentes segmentos del aparato genital (Mellado,1995).

Se ha reportado que el ganado Cebú tiene una alta densidad de glándulas sudoríparas en comparación con las razas europeas (Mellado,1995; Hansen,2004), aunque no hay diferencias en la densidad de glándulas sudoríparas entre Sahiwal y Jersey. Además, las glándulas sudoríparas del *B. indicus* tienen mayor tamaño, están más juntas y tienen más capas de células en la parte epitelial que las del *B. taurus* (Hansen,2004).

El estrés calórico tiene menos efectos severos sobre la calidad de semen de toros Cebú que sobre toros de razas europeas. Este fenómeno no sólo refleja adaptaciones de termorregulación general si no también adaptaciones específicas que elevan el enfriamiento local de la sangre que entra al testículo. Esta conclusión es basada sobre los resultados de un estudio reciente comparando las características anatómicas del sistema termorregulador entre el Nelore (cruza de Charolais x Cebú), y toros Angus. Se encontró en los resultados que el radio de la arteria testicular en relación al volumen testicular

fue mayor para toros Nelore, intermedio para toros cruzados y menor para toros Angus. El espesor de la pared de la arteria testicular, y la distancia entre la sangre venosa y arterial en el cono testicular fue menor en el Nelore, intermedio en razas cruzadas y mayor en el Angus. Tales diferencias anatómicas, dan una temperatura intraarterial testicular baja en el Nelore, intermedia en razas cruzadas y mayor en el Angus (Hansen,2004).

Disipación del Calor

El calor al que están sujetas las vacas proviene fundamentalmente de fuentes exógenas (medio ambiente) y endógenas (metabolismo interno del animal: digestión microbiana del tracto gastrointestinal, la actividad física, la producción de leche). El vapor del agua, las moléculas del aire y polvo, el bióxido de carbono y el ozono absorben radiación solar, y ésta es emitida a la superficie de la tierra y a la superficie de los animales. La cantidad de calor que absorbe el animal expuesto a la radiación solar directa depende del color de su pelo, por ejemplo, las vacas negras absorben una mayor radiación solar que las vacas blancas. Las vacas Holstein de color predominante blanco, presentan menos días abiertos y servicios por concepción. Por otro, lado las vacas de pelo blanco presentan el problema del piel despigmentada, lo cual ocasiona quemaduras o cáncer de la piel como consecuencia de la mayor penetración de la radiación solar en los animales de colores claros (Mellado,1995; Hansen,2004).

La sudoración y el jadeo son los principales mecanismos para la disipación del calor de vacas sometidas a estrés calórico. La evaporación del agua (sudor) ocurre en la superficie de la piel de las vacas y en el tracto respiratorio; de esta

manera, en ambientes calientes, las vacas incrementan la tasa de evaporación como resultado del aumento en la sudoración y de la frecuencia respiratoria, esto último puede llevar al desarrollo de una alcalosis respiratoria la cual va en aumento paralelo al incremento de la temperatura ambiental, ya que al aumentar la pérdida del CO_2 se puede reducir el bicarbonato disponible para su uso como amortiguador en el rumen por medio de la secreción salival y cuando la alcalosis respiratoria se presenta, el organismo incrementa la excreción de bicarbonato en la orina y lo disminuye en la saliva, mientras que en el rumen, las temperaturas elevadas causan una reducción en el PH (Mellado,1995; West,2003). Además de lo anterior se reduce la motilidad del rumen y de los intestinos con lo que se provoca que se vuelva más lenta la tasa de pasaje del alimento por el canal digestivo.

La pérdida del calor por evaporación del sudor representa el mecanismo más importante para la disipación del calor en el bovino (Mellado,1995). En regiones con elevada humedad, la disipación del calor por evaporación del agua se complica, debido a que el aire saturado de humedad interfiere con la evaporación del agua de la superficie del animal. Además de los medios evaporativos para la disipación del calor, los bovinos pierden calor a través de la conducción, convección y radiación (Mellado,1995; West,2003). Para que ocurra una pérdida de calor por los medios antes mencionados, se requiere que exista un gradiente térmico entre el cuerpo del animal y su medioambiente. La pérdida de calor por convección se basa en el principio de que el calor fluye de los objetos calientes a los objetos fríos; en consecuencia, para lo anterior se requiere el contacto físico de los objetos y una conductividad térmica de las superficies en contacto. El hecho de que las vacas se sumerjan parcialmente

en los estanques de agua donde el calor corporal se transfiere al líquido es el ejemplo de como los animales hacen uso de este principio para la disipación del calor, debido a que la temperatura del agua es inferior a la temperatura corporal de la vaca (Mellado,1995).

Los mecanismos termorreguladores en el ganado son similares a los de otros homeotermos. El ganado regula la temperatura corporal igualando el calor producido por el metabolismo a través de flujo de calor del animal al entorno ambiental. El flujo del calor ocurre a través de procesos dependientes de la temperatura del entorno (por ejemplo; pérdida de calor sensible: conducción, convección, radiación) y humedad (pérdida latente; evaporación a través del sudor y jadeo) (Hansen,2004). Una respuesta fisiológica al estrés calórico es la reducción en la producción de calor, lo cual es causado en gran parte por la disminución en el consumo de alimento (Wolfenson *et al.*,2000; De Rensis *et al.*,2002; Sapolsky *et al.*,2002; West,2003; Hansen,2004), producción de leche y secreción de la hormona tiroidea. El estrés calórico también lleva a la activación de mecanismos para la pérdida de calor (Hansen,2004). El flujo sanguíneo se incrementa hacia la periferia para que la pérdida de calor vía conducción y convección aumente (Hansen y Arechiga,1999; Hansen,2004). Sin embargo, aunque estas respuestas adaptativas incrementan la disipación del calor corporal al medioambiente, esto también conlleva a una perfusión baja en la vasculatura placentaria y por lo tanto un crecimiento fetal retardado (Hansen y Arechiga,1999).

Alteraciones Endocrinas

Al inicio del estrés calórico se incrementan los niveles sanguíneos de ACTH, cortisol (Mellado,1995; Hansen y Arechiga,1999), prolactina, epinefrina, norepinefrina (Mellado,1995; Du Preez,2000), dopamina, histamina y serotonina para la termorregulación en los mamíferos (Du Preez,2000); sin embargo, si la hipertermia se prolonga, sólo, permanecen elevados los niveles de las catecolaminas (Mellado,1995; Du Preez,2000). La adrenalina es primariamente sintetizada y almacenada en la médula adrenal, y es secretada a la circulación, actuando en órganos distantes en situaciones de estrés y promoviendo una respuesta fisiológica rápida a emergencias tales como frío, fatiga y estrés. La noradrenalina y adrenalina circulantes inducen efectos metabólicos, incluyendo glicogenólisis en el hígado y músculo esquelético, y un incremento en el nivel de ácidos grasos volátiles en la circulación como resultado de la estimulación de lipólisis en el tejido adiposo (Du Preez,2000). Además, como consecuencia de que las glándulas sudoríparas de los bovinos carecen de inervación, y el funcionamiento de éstas parece ser regulado mediante la epinefrina y norepinefrina, los niveles se incrementan en el plasma sanguíneo con las temperaturas elevadas (Mellado,1995). Se ha reportado que la ACTH bloquea el comportamiento sexual inducido por el estradiol (Hansen y Arechiga,1999; Sapolsky *et al.*,2002), mientras que otra hormona, también liberada, es la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que inhibe el comportamiento y la fisiología reproductiva, y la administración de antagonistas de CRH revierten parcialmente la supresión de la liberación de LH inducida por el estrés. También la liberación de opioides durante el estrés suprime la reproducción y, similar a la CRH, involucra la inhibición de la liberación de

GnRH (hormona liberadora de ganadotropinas), inhibición que parece tener un mecanismo similar por el cual la CRH ejerce sus acciones negativas en la reproducción (Hansen y Arechiga,1999). La disminución de la liberación de GnRH y la liberación basal de LH por estimulación de la GnRH, ocurre predominantemente en hembras. En la figura 4 se presenta un esquema de como el estrés calórico influye en la disminución de estas dos hormonas reproductivas (Mellado,1995; Wolfenson *et al.*,2000; Sapolsky *et al.*,2002).

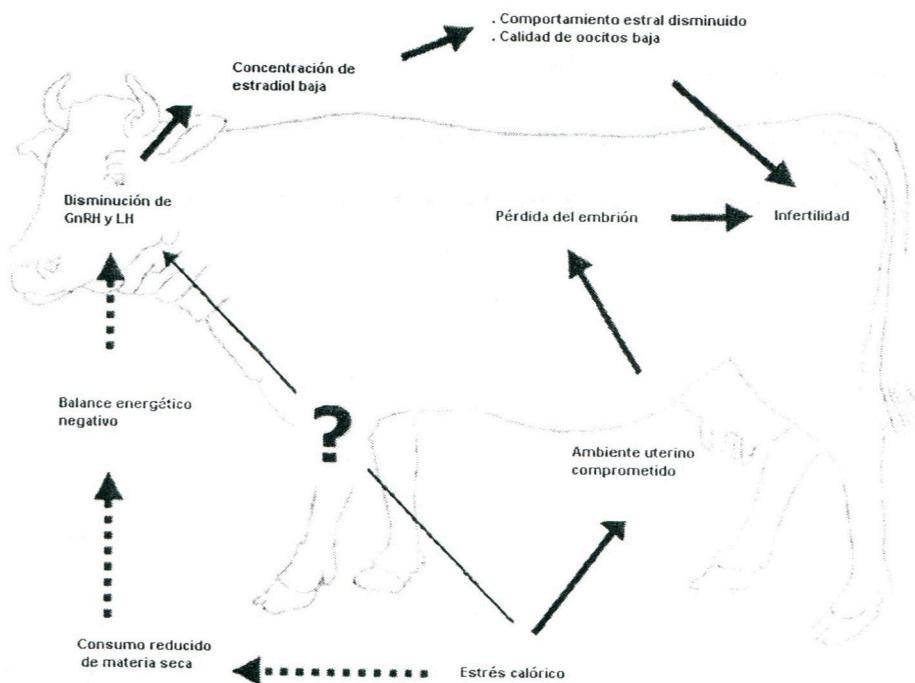


Fig. 4; Una descripción esquemática de un posible mecanismo del efecto del estrés calórico sobre la reproducción en vacas lecheras lactando. El estrés calórico puede actuar en más de una vía para reducir la fertilidad en vacas lecheras lactando. El estrés calórico puede reducir el consumo de materia seca e inhibir indirectamente la secreción de GnRH y LH del sistema hipotálamo-pituitaria (líneas punteadas). Sin embargo, no está claro si el estrés calórico puede también influir directamente en el sistema hipotálamo-pituitaria (líneas delgadas continuas) para reducir la secreción de GnRH y LH. El estrés calórico puede comprometer directamente al medioambiente (líneas gruesas) uterino y causar pérdida de embriones e infertilidad (Rensis y Scaramuzzi,2003).

En adición, los glucocorticoides (GCs) reducen la sensibilidad de los receptores de la LH en las gonadas (este efecto ocurre predominantemente en machos).

Estos modelos se presentan en sistemas *in vitro* e *in vivo* de roedores, humanos y otros primates (Sapolsky *et al.*,2002). Aunque la principal razón posible por la que el estrés calórico reduce la expresión del estro es por la letargia física producida (Hansen y Arechiga,1999; De Rensis *et al.*,2002), la actividad física reducida es probablemente una respuesta adaptativa para limitar la producción de calor (Hansen y Arechiga,1999). En 1988, se encontró que las concentraciones plasmáticas de progesterona pueden ser reducidas en el ganado lechero bajo estrés calórico, posteriormente se demostró que no hay diferencias en las concentraciones plasmáticas de progesterona. En una revisión en el 2000 se concluyó que el estrés calórico crónico reduce las concentraciones de progesterona, y que las concentraciones de progesterona pueden ser elevadas después del estrés calórico agudo (Hansen y Arechiga,1999; Wolfenson *et al.*,2000; De Rensis *et al.*,2002; Jordan,2003; Willard *et al.*,2003), aunque la disminución de LH parece no tener una influencia importante sobre la secreción de las hormonas del ovario. En 1999 se demostró que la inyección de un agonista de la GnRH o hCG (gonadotropina coriónica humana) en el día 5 del ciclo estral resulta en una ovulación del folículo dominante de la primera oleada y la formación de un CL accesorio, y en consecuencia, una elevación de los niveles de progesterona (Ullah *et al.*,1996; De Rensis *et al.*,2002; Jordan,2003). Sin embargo, las vacas lecheras lactando que recibieron inyecciones de hCG en el día 5 o 6 postinseminación no mejoraron la tasa de concepción durante el estrés calórico. Un mecanismo potencial por el cual la hCG puede elevar la tasa de concepción es por la minimización de estrógenos durante el reconocimiento de la preñez (Jordan,2003). Aunque la aldosterona se debe incrementar en el

plasma como respuesta a la pérdida de agua en los animales, en la vaca los niveles de ésta hormona se reducen durante el estrés calórico, una explicación de esta respuesta es que permite una mayor excreción de sodio en la orina, lo cual compensa las pérdidas elevadas de potasio en el sudor del animal (Mellado,1995).

Aromatasa

El gen de la familia P450 es muy grande, contiene más de 480 miembros en 74 familias, de las cuales la P450_{arom} es el único miembro de la familia 19. Esta es responsable de la unión al C19 del sustrato esteroide androgénico y catalizando una serie de reacciones que llevan a la formación del anillo fenólico A, característico de los estrógenos (Simpson,2002; Simpson *et al.*,2002).

La aromatasa es una enzima compleja que cataliza la síntesis de andrógenos, y por consiguiente, tiene un potencial único para influir en el balance fisiológico entre las hormonas esteroidales sexuales. El citocromo P450 aromatasa (P450_{arom}) y el NADPH-citocromo P450 reductasa, son los dos componentes esenciales del complejo enzimático, están altamente conservados entre los mamíferos y vertebrados. La expresión de la aromatasa ocurre en las gónadas y el cerebro, y es esencial para el desarrollo reproductivo y la fertilidad. En adición, en varias especies, incluyendo los humanos, la expresión de la aromatasa tiene una distribución más amplia en los tejidos, incluyendo placenta, tejido adiposo, hígado fetal y hueso (Conley y Hinshelwood,2001). Los estrógenos son productos del metabolismo de los andrógenos catalizados por el complejo enzimático conocido como aromatasa (Manuel Silva y Price,2000; Conley y Hinshelwood,2001; Simpson *et al.*,2002; Montaña y

Ruiz,2005). La androstenidiona y la testosterona son los sustratos más comunes, conocidos y probablemente los más importantes para ser convertidos a estrona a través del citocromo P450 aromatasa (Manuel Silva y Price,2000; Conley y Hinshelwood,2001). La estrona es convertida a estradiol por la 17- β hidroxisteroide deshidrogenasa (Manuel Silva y Price,2000). El aumento de los receptores para la LH en las células de la granulosa del folículo dominante, posiblemente aumenta la actividad de la aromatasa en respuesta a las gonadotropinas, o provoca un cambio de dependencia de FSH a LH en el folículo. En el folículo, la leptina en concentraciones fisiológicas, estimula la actividad de la aromatasa. Pero las concentraciones altas en el folículo y en el líquido folicular pueden bloquear la esteroidogénesis y se relaciona con bajas concentraciones de oxígeno intrafolicular, impidiendo al oocito desarrollar competencia (Montaño y Ruiz,2005).

En el ovario, la expresión de P450_{arom} es más alta en las células de la granulosa de folículos preovulatorios que en los folículos pequeños. En algunas especies tales como los humanos y roedores, la P450_{arom} puede también estar localizada en el cuerpo luteo. En el testículo, la actividad de la aromatasa se observa en las células de Sertoli antes de la pubertad y en las células de Leyding de roedores machos adultos. La biosíntesis de estrógenos y la expresión de P450_{arom} en el cerebro es necesaria para el comportamiento sexual normal. La aromatasa en el cerebro ha sido estudiada primaria y ampliamente en ratas. Una alta actividad fue encontrada en el área basal medial del hipotálamo y en las regiones amigdaloides de ratas. Específicamente, la actividad de la aromatasa fue alta en la amígdala, núcleo preóptico periventricular y núcleo preóptico medial y con baja actividad en el

núcleo supraquiasmático, hipotálamo anterior, hipotálamo anterior periventricular, núcleo arcuato, la corteza y varias otras regiones. En el ovario y testículos, las gonadotropinas FSH y LH actúan a través del incremento del AMPc intracelular para inducir la expresión de P450 arom. De forma contraria, en el cerebro, los agentes que incrementan la concentración de AMPc causan una disminución de la actividad de la aromatasa, mientras que los andrógenos pueden actuar para inducir la expresión del gen (Conley y Hinshelwood,2001).

Se ha sugerido que en el ganado el líquido folicular tiene efectos moduladores directos sobre el crecimiento y la maduración folicular. En una prueba *in vitro* se uso aromatasa activa de fragmentos de la pared folicular fue utilizada para probar si el líquido folicular (de folículos dominantes o no dominantes) modula la actividad de la aromatasa, observando que el líquido de folículos dominantes en una concentración de 24 o 12% (obtenido durante la fase folicular y luteal, respectivamente) inhibió significativamente la actividad de la aromatasa. La actividad inhibitoria fue baja o ausente en el líquido de folículos no dominantes.

En la segunda parte del estudio, se intentó la identificación de compuestos involucrados en esta actividad moduladora fue intentada usando SDS-PAGE, demostrándose que una proteína (90 kDa, pI 5.8) fue significativamente abundante en el líquido de folículos dominantes. Esta proteína tiene características similares a la Hsp 90, por lo que, en la parte final de este estudio, la presencia de Hsp 90 en células del ovario y líquido folicular fue investigada usando análisis de inmunohistoquímica y Western Blot. Después de la inmunohistoquímica, una señal positiva fue detectada en células de la granulosa, principalmente de folículos grandes y, en menor magnitud, en células tecales y oocitos. Los análisis de Western Blot demostraron la

presencia de Hsp 90 en fragmentos de la pared y líquido folicular. En adición la Hsp 90 purificada de folículos de bovinos *in vitro* suprimió la actividad de la aromatasa (Driancourt *et al.*,1999), por lo que se propuso que la Hsp 90 es un regulador funcional de la maduración folicular a través de su acción sobre la aromatasa (Driancourt *et al.*,1999).

Otros estudios indicaron que la concentración de estradiol en el plasma es baja durante el estrés calórico (Hansen y Arechiga,1999; Wolfenson *et al.*,2000) y se ha reportado que en células de la granulosa de folículos pequeños (2-4 mm) cultivados, la secreción de estradiol se incrementó con el tiempo y esta correlacionada con el incremento de mRNA P450_{arom} (Manuel Silva y Price,2000). La disminución de la capacidad esteroidogénica de los folículos bajo estrés calórico involucra una baja actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, y una baja concentración de estradiol en el líquido folicular del folículo dominante en el día 8 del ciclo estral. Esta disminución fue debida primariamente a una reducción drástica de la producción de androstenidiona por células de la teca durante el verano (4.1 vs 1.1 ng/10⁵ en células viables). La producción de estradiol por células de la granulosa disminuye en verano a cerca del 50% a diferencia de la producción en invierno. Además, el porcentaje de células viables de la granulosa de folículos colectados en verano tenía una disminución del 60% en comparación con las de invierno, contribuyendo a una reducción de la secreción *in vivo* de estradiol a la circulación. La producción reducida de androstenidiona por células de la teca fue encontrada en células incubadas *in vitro* a altas temperaturas, y en folículos colectados en invierno de vacas previamente expuestas a tres días de estrés calórico agudo (Wolfenson *et al.*,2000).

Los andrógenos y los estrógenos tienen papeles metabólicos generales que no están directamente involucrados en los procesos reproductivos. Estas acciones incluyen: función vascular, metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como la mineralización del hueso y el cerramiento de las epífisis de hombres y mujeres. En las mujeres con postmenopausia, así como en el hombre (postandropausia), los estrógenos no son solamente un factor endocrino, además de que son producidos en un número de sitios extragonadales y actúan localmente en éstos en una forma paracrina e intracrina. Estos sitios incluyen: senos, hueso, vasculatura, y cerebro. Dentro de estos sitios, la acción de la aromatasa puede generar localmente niveles altos de estradiol sin afectar significativamente los niveles circulatorios. La circulación del precursor esteroidal es el sustrato esencial para la síntesis de estrógenos extragonadales. Hay que tomar en cuenta que los niveles de precursores androgénicos disminuyen marcadamente en la mujer con el avance de la edad, posiblemente a la mitad en comparación con los años reproductivos. Esto puede ser una razón fundamental por que la mujer corre un peligro incrementado por la pérdida de minerales en los huesos, exponiéndola a fracturas. Por esto se ha pensado en un posible desarrollo de moduladores selectivos de aromatasa (SAMS) que bloquean su expresión, por ejemplo, en los senos, pero permitiendo la síntesis intacta en otros tejidos tales como el hueso (Simpson *et al.*,2002).

Factor-1 de Crecimiento Similar a la Insulina

Es un complejo proteico sintetizado principalmente en el hígado, conformado por dos ligandos IGF-I y IGF-II (factor de crecimiento similar a la insulina I y II

respectivamente) y sus correspondientes receptores, además de seis proteínas transportadoras (IGFBPs), las cuales son responsables de la bioactividad del IGF-I. En el ovario, el IGF estimula la proliferación de células de la granulosa, promueve la esteroidogénesis, la foliculogénesis, la ovulación, la fertilización, la implantación y el desarrollo embrionario. El receptor tipo I está en células de folículos normales o atrésicos, ya sea en estados primarios o preovulatorios. El IGF-I influye en la reproducción promoviendo la síntesis de receptores de FSH y LH seguido por la esteroidogénesis y la producción de inhibinas en células foliculares (Montaño y Ruiz,2005).

Reportes anteriores mencionaban que el estrés calórico no reduce las concentraciones de IGF-1(Hansen y Arechiga,1999), pero en la actualidad, se ha reportado que el estrés calórico, afecta la actividad ovárica en bovinos; lo cual resulta en la alteración de la secreción de gonadotropinas y la reducción de factores intraováricos tales como el IGF-I y de las proteínas transportadoras del IGF-I (IGFBPs) u otros factores intraováricos (Jousan y Hansen,2004).

En un estudio en que se usaron como modelo embriones producidos *in vitro*, se hipotetizó que el IGF-1 puede proteger a los embriones en la preimplantación por la reducción de los efectos del estrés calórico sobre el número celular total, la proporción de blastomeros que sufren apoptosis, y el porcentaje de embriones que se desarrollan a la etapa de blastocito (Jousan y Hansen,2004). Los embriones fueron cultivados con y sin IGF-1; en el día 5 después de la inseminación, los embriones > 16 células fueron cultivados a 38.5 °C por 24 horas o sujetos a 41 °C por 9 horas y después a 35 °C por 15 horas. El estrés calórico redujo el número celular total en 24 horas después de la iniciación del

estrés calórico e incrementó el porcentaje de blastómeros que sufrían apoptosis. Los efectos del estrés calórico fueron menores para los embriones tratados con IGF-1, el cual incrementa la masa celular del embrión. La adición de IGF-1 en un medio de cultivo reduce la incidencia de apoptosis espontánea en embriones de varias especies, incluyendo al humano, conejo, ratón y bovino y bloquea la apoptosis inducida por radiación ultravioleta, factor- α de necrosis tumoral, en embriones en preimplantación. La adición de IGF-1 en un medio de cultivo también reduce el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el desarrollo en embriones de ratones en preimplantación (Jousan y Hansen,2004). Otro compuesto con efectos similares es el óxido nítrico, un radical libre gaseoso, que en ratas está involucrado en la regulación de varias funciones fisiológicas del ovario tales como la esteroidogénesis, la maduración meiótica del oocito, y la ovulación. La NOS (óxido nítrico sintetasa) y la NOS inducible, son las dos isoformas del óxido nítrico presentes en el ovario, consideradas por influir en la muerte celular programada de células foliculares. Sin embargo, los mecanismos responsables para la inhibición de la apoptosis mediada por el NO no están claros, aunque se ha reportado un número de blancos nucleares para el NO, entre ellos las Hsps. Aunque la exposición a estrés calórico puede inducir apoptosis, se ha demostrado que la inducción de las Hsps confieren resistencia a estímulos apoptóticos subsecuentes (Yoon *et al.*,2002).

Parámetros para la Determinación del Estrés Calórico

El uso de la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria como parámetros para determinar el estrés calórico en el ganado lechero es prácticamente fácil

pero relativamente confiable. Estos parámetros fisiológicos siempre deben ser usados junto con valores del THI (índice de temperatura-humedad) para determinar y evaluar el estrés calórico en el ganado lechero (Du Preez,2000). En el cuadro 2, se presentan los principales parámetros para la determinación del estrés calórico.

Cuadro 2. Diagrama de parámetros para la determinación y evaluación del estrés calórico en ganado lechero (Du Preez,2000)

Factor	Parámetro	Determinantes
Medioambiental	THI	Temperatura Humedad relativa Radiación Viento
Animal/vacas lecheras	Comportamiento: Confort	Desempeño subóptimo Frecuencia respiratoria
	Fisiológico	Temperatura corporal Frecuencia respiratoria Frecuencia cardiaca Producción y composición de leche Hormonas y metabolitos: cortisol plasmático, ácido vanílico.
	Genético	Aclimatación Adaptación

Termotolerancia y Aclimatación

La habilidad de las Hsps para conferir termotolerancia en células cultivadas y en animales ha sido bien documentada. La termotolerancia se refiere a la habilidad de un organismo para sobrevivir a un estrés no letal con una exposición anterior al calor lo suficiente como para causar acumulación de

Hsps. Sin tener en cuenta los estímulos, los puntos de la termotolerancia son 1) supervivencia de las células u organismo a un estrés no letal; 2) síntesis de Hsps; 3) Duración relativamente corta (horas a días) y se correlaciona a la presencia celular elevada de Hsps y la declinación con la disminución de las Hsps. Los requerimientos de las Hsps para la termotolerancia y el papel de las Hsps en el plegamiento y transporte proteico sostienen la hipótesis de que el estado de termotolerancia es dependiente de una o todas las funciones relacionadas con las Hsps, especialmente a través de la conducción de proteínas desnaturalizadas y fragmentos proteicos parcialmente sintetizados.

La aclimatación al calor se refiere a la habilidad de un organismo para realizar un trabajo en un medioambiente con temperaturas elevadas, así como continuar el trabajo bajo temperaturas elevadas no letales. En adición, la aclimatación al calor resulta de una serie de elevaciones en la temperatura central, generada por la realización de un trabajo en el calor. La hipertermia pasiva es normalmente asociada solamente con la aclimatación parcial. En contraste, a la termotolerancia, en la cual se sufre un rápido decaimiento correlacionado a la declinación de las Hsps, la aclimatación al calor puede ser obtenida por períodos prolongados para que el organismo continúe sufriendo elevaciones periódicas en la temperatura central. Finalmente, no hay modelos celulares de aclimatación al calor, la que, no sólo reduce la temperatura central y provee mayor calor para transferirlo a la piel, ó la capacidad de disipación de calor sino que también permite al organismo tolerar la alta temperatura central (Moseley, 1997).

Inicialmente, la acumulación de Hsps-inducida por estrés, se asocio con la termotolerancia, y posteriormente a la tolerancia a una variedad de estresores, incluyendo, isquemia, irradiación ultravioleta, citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral- α (IFN- α). El hecho de que la sobre expresión de Hsps confiera tolerancia, en ausencia de estrés, el bloqueo de la acumulación de Hsps a través de anticuerpos altera fuertemente la tolerancia al estrés. Esto sostiene la hipótesis de que las Hsps confieren tolerancia al estrés aunque no está completamente entendido, pero se relaciona al papel principal de las Hsps en el procesamiento de las proteínas desnaturalizadas por estrés (Moseley,1997).

Temperatura Corporal

La temperatura corporal normal de una vaca lechera varia entre 38.3 y 38.8 °C. En el cuadro 3, se presenta la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria y cardiaca en promedio, de vacas Holstein bajo condiciones normales y de estrés, considerando el THI (Du Preez,2000). Cuando el ganado presenta una temperatura rectal de 40 °C como resultado de una exposición a una temperatura ambiente de 32.2 °C por 72 horas postinseminación, presenta una tasa de concepción del 0%, comparadas con la tasa de concepción del 48% cuando la temperatura rectal es de 38.5 °C en las vacas que se encuentran en una temperatura ambiente de 21.1 °C (Jordan,2003). Varios estudios demuestran que la temperatura corporal en razas lecheras europeas se incrementa cuando la temperatura ambiental supera los 21 °C. La exposición prolongada del ganado lechero al calor (33.5 °C) resulta en un efecto general

Cuadro 3. Promedio diario de la temperatura corporal (rectal), frecuencia respiratoria, y frecuencia cardiaca de vacas lecheras Holstein-friesian lactando bajo condiciones normales (n=10) y de estres (n=10), de acuerdo al índice de temperatura y humedad (THI) en Bethal, en 1998 (latitud 26°16' S, longitud 29°31' E y altitud 1663m)

Período De Estrés Térmico (THI>70), Febrero De 1998										Sin Estrés Térmico (THI< 70), Junio De 1998									
Día	Fecha	Temperatura Ambiental (°C)	THI	Temperatura Corporal (°C)	Frec. Respiratoria (Min.)	Frec. Cardiaca (Min)	Día	Fecha	Temperatura Ambiental (°C)	THI	Temperatura Corporal (°C)	Frec. Respiratoria (Min)	Frec. Cardiaca (Min)						
		2: 00							2: 00										
1	11-2-98	27.7	73.4	39.2	90	80	1	5-7-98	16.4	55.2	38.5	52	76						
2	12-2-98	28.3	72.6	39.8	80	72	2	6-7-98	16.7	56.0	38.7	48	70						
3	13-2-98	29.2	75.1	39.5	82	74	3	7-7-98	17.4	56.8	38.5	44	66						
4	14-2-98	29.3	75.4	39.3	79	78	4	8-7-98	15.0	53.6	38.8	50	84						
5	15-2-98	31.3	76.4	39.6	96	81	5	9-7-98	22.6	63.7	38.4	60	80						
6	16-2-98	30.9	77.7	39.7	92	75	6	10-7-98	21.4	62.7	38.6	56	76						
7	17-2-98	29.9	75.9	39.2	76	76	7	11-7-98	16.6	56.0	38.5	40	68						
8	18-2-98	25.2	73.2	38.9	78	82	8	12-7-98	16.4	55.2	38.6	46	72						
9	19-2-98	27.2	73.4	39.3	65	78	9	13-7-98	21.3	62.6	38.5	48	67						
10	20-2-98	24.3	70.9	39.8	75	74	10	14-7-98	17.4	56.8	38.4	42	64						
Promedio		29.1	73.9	39.3	81.3	77			18.1	57.9	38.6	49	72						

reduciendo las concentraciones plasmáticas del cortisol. Los niveles plasmáticos reducidos de glucocorticoides que ocurren durante la aclimatación al calor son mecanismos regulatorios benéficos para reducir la producción de calor del animal (Du Preez,2000).

Índice de Temperatura-Humedad

Se han determinado los valores del THI (índice de temperatura-humedad) como mínimo, medio y máximo, en 64, 72 y 76 unidades respectivamente, los valores del THI han sido utilizados para determinar la seguridad del ganado ante las condiciones climáticas, obsérvese el cuadro 4 (West,2003), por lo que el estrés calórico es definido frecuentemente cuando ocurre un THI que excede de 72 unidades (Ominski *et al.*,2002; Jordan,2003). La producción en vacas Holstein declina .88 kg por cada unidad incrementada en el THI promedio, y el consumo de materia seca disminuye .85 kg por cada grado incrementado en la temperatura ambiental (West,2003). Ravagnolo, encontró que la tasa de no retorno a celo empieza a declinar cuando el THI es de 66 y 70 unidades (2002).

Cuadro 4. Categorías de índices de seguridad climática en el ganado (LWSI), de acuerdo a los valores del índice de temperatura-humedad (THI) (Du Preez,2000).

Valor del THI	LWSI
70 o menos	Normal
71-78	Alerta
79-83	Peligro
83 o más	Emergencia

El rango en la temperatura ambiental para una producción óptima de leche oscila entre los 5 °C y los 25 °C (Mellado,1995; West,2003), se ha reportado que la temperatura crítica para las vacas lecheras es de 25 a 26 °C (Mellado,1995; Hansen y Arechiga,1999; West,2003) y si la temperatura ambiental alcanza valores muy altos, la del aparato reproductivo se incrementa (Mellado,1995).

Cuando en el ambiente se superan los 26 °C o cuando la temperatura rectal rebasa los 39 °C durante más de 16 horas, tanto el consumo de alimento como la producción de leche empiezan a declinar. En vacas de raza europea la producción declina 3.5 kg por día, a partir de que la temperatura ambiental llega a los 31 °C. Con una temperatura similar, pero manteniendo un nivel de consumo característico de un animal no sujeto a estrés calórico, la producción de leche disminuye 2.12 kg por día (Mellado,1995). La alimentación durante las horas frescas del día o en la noche es una técnica que ha sido recomendada por varias investigaciones y nutriólogos y ha sido utilizada por productores de leche para disminuir los efectos del estrés calórico (Ominski *et al.*,2002).

Estrategias para Minimizar el Estrés Calórico

En 1986 se identificaron tres estrategias de manejo para minimizar los efectos del estrés calórico: 1) modificación física del medioambiente (sombra, aspersores y ventilación); 2) el desarrollo genético de razas tolerantes al calor, y 3) prácticas de mejoramiento en el manejo nutricional. Basándose en el conocimiento actual, la combinación de estas tres prácticas son necesarias

para optimizar la producción en vacas lecheras en climas calientes y en climas húmedos (West,2003).

Para incrementar la comprensión de la función reproductiva y su alteración por el estrés calórico, se han creado estrategias para la reducir los deterioros consecuentes del estrés calórico sobre la reproducción. Esto incluye inducción hormonal para inseminación a tiempo fijo, lo cual reduce las pérdidas en la eficiencia reproductiva causada por una baja detección de estros y la transferencia de embriones, lo cual puede incrementar la tasa de preñez al permitir al embrión esquivar el período cuando éstos son más sensibles a temperaturas elevadas, por ejemplo, el primer y segundo día después de la fecundación (Hansen y Arechiga,1999).

Sombra

La sombra, es una de las primeras estrategias que han demostrado moderar los efectos estresantes en un clima caliente y proteger a los animales de la radiación solar directa e indirecta. Se estima que el calor total se reduce a un 30 ó 50% con una buena sombra, uno de los métodos primariamente implementados y económicos para minimizar el calor de la radiación solar. Las vacas en un medioambiente con sombra en comparación con las vacas sin sombra tienen una temperatura rectal baja (38.9 vs 39.4 °C), una frecuencia respiratoria reducida (54 vs 82 respiraciones/minuto) y un 10% más en la producción de leche. Aunque la sombra reduce la acumulación de calor de la radiación solar no hay efecto sobre la temperatura del ambiente o humedad relativa, en climas calientes y húmedos, es necesario el enfriamiento adicional en vacas lecheras lactando. El enfriamiento del medioambiente de las vacas

lecheras se basa en la combinación de los principios de convección, conducción, radiación y evaporación. El movimiento de aire (por medio de ventiladores); los aspersores, para la evaporación y enfriamiento de aire; las sombras, para minimizar la transferencia de radiación solar; son usados para elevar la disipación de calor. Las vacas en un medio ambiente fresco con ductos de aire y aspersión encendidos por 20 minutos y apagados durante 10 minutos incrementaron 2 kg de leche en comparación con el grupo control (sólo sombra) (West,2003).

Tratamientos Hormonales

Uno de los tratamientos más usuales en la inseminación a tiempo fijo ha sido el conocido OvSinch, también llamado 1721, que consiste en la aplicación de GnRH (en el día 1), PGF_{2α} (día 7), GnRH (día 9) y a las 16 o 18 horas se procede a la inseminación. Este método ha demostrado mejorar la tasa de preñez y disminuir el periodo de parto-concepción (De Rensis *et al.*,2002; Willard *et al.*,2003). También el uso de GnRH entre los días 11 y 14 después de la inseminación mejora la tasa de preñez en vacas, a través de su efecto en la liberación de gonadotropinas para obtener una buena luteinización (Peters *et al.*,2000). Willard, et al (2003), reportan una elevación aparente de tejido luteal y un incremento en la concentración sérica de progesterona, además de un incremento en la tasa de preñez, utilizando GnRH en el día 5 y 11 postinseminación.

Somatotropina

La baja fertilidad en vacas lecheras es un problema mundial en regiones calientes, localizadas aproximadamente a 40° al norte y 40° al sur. Aunque

durante el otoño hay bajas temperaturas, y los animales no son expuestos a un estrés semejante al del verano, la tasa de concepción en vacas lecheras sigue siendo baja. Esto quizá sea un efecto residual del estrés sufrido en el verano sobre las funciones foliculares del ovario, reportándose que vacas expuestas a estrés calórico durante un ciclo estral, mostraron dinámicas foliculares alteradas y dominancia folicular atenuada en el ciclo posterior. El efecto tardado del estrés calórico del verano sobre la fertilidad en el otoño es, por definición, un fenómeno transitorio, confirmado por los hallazgos de la calidad del oocito, que fue relativamente baja al inicio del otoño, mejorando lenta y gradualmente al final del otoño e inicio del invierno (Roth *et al.*,2002).

Además del uso de la somatotropina como un promotor lactacional, amplía las lactaciones más allá de los 305 días y como consecuencia discontinúa inseminaciones durante los períodos de estrés calórico (Hansen y Arechiga,1999), esto es atribuido a sus efectos de la sBT en la expresión del estro, se ha observado que vacas tratadas con somatotropina (bST) no expresan un estro tan manifiesto, lo cual incrementa el porcentaje de ovulaciones no detectadas, una hipótesis es que la bST altera el centro del comportamiento del cerebro que controla la expresión del estro, por lo que su uso se recomienda cuando el sistema de manejo reproductivo elimina la necesidad de la expresión del estro (Moreira *et al.*,2001), aunque la sBT también puede incrementar la temperatura corporal y la frecuencia respiratoria durante el estrés calórico (Hansen y Arechiga,1999; West,2003), se ha demostrado que la bST y FSH tienen un efecto positivo y que puede ser potencialmente usados para mejorar la tasa de concepción en otoño (Moreira *et al.*,2001; Roth *et al.*,2002). Una sola inyección de bST en un protocolo de

inseminación artificial a tiempo fijo incrementa la tasa de concepción en el ganado, pues mejora la calidad de los oocitos, posiblemente mejoran la calidad del oocito por alteración del ambiente folicular que rodea al oocito, y por vía directa o indirecta sobre el sistema IGF-I (Roth *et al.*,2002).

Se ha observado que los receptores de la somatotropina están localizados en los oocitos y células de la granulosa en bovinos, la maduración incrementada del oocito por inducción de bST es dependiente de las células del cumulus. La bST y la FSH exógenas incrementan la concentración plasmática de IGF-I, que participa en el desarrollo y función folicular mejorando la calidad del oocito (Roth *et al.*,2002).

Leche

La selección de rendimiento en leche reduce la capacidad termorregulatoria del ganado en estrés calórico, además de una gran reducción en la fertilidad estacional (Hansen y Arechiga,1999; Chebel *et al.*,2004; Finocchiaro *et al.*,2005), en ovinos al igual que en las vacas productoras de leche se observa un efecto de disminución en calidad, cantidad y composición de la leche, cuadro 5 (Finocchiaro *et al.*,2005).

El ácido valínico es un producto de la adrenalina cuando el organismo sufre una crisis nerviosa y es encontrado en la leche, aunque su concentración en la leche es usada como un parámetro indicador del estrés calórico en vacas lecheras, se debe conocer más sobre la farmacodinamia de la adrenalina en la leche.

Cuadro 5. Composición promedio diaria de la leche y concentraciones de cortisol en plasma en vacas lactando con sistemas de ventilación y aspersión (n=10) y de vacas sin sistemas de enfriamiento (n=10) durante el verano en relación a los valores de índice de temperatura y humedad (THI) en Brierspan en 1998 (latitud 26°33' S, longitud 25°36' E, altitud 1350 m.)

Día	Fecha	Temperatura Ambiental (°C)	THI	Vacas-no refrescadas												
				Vacas-refrescadas					Vacas-no refrescadas							
				Concentración de cortisol en plasma NMOL ⁻¹		Composición de leche			Concentración de cortisol en plasma NMOL ⁻¹		Composición de la leche					
		2:00		Grasa buffer %	Proteína %	Lactosa %	CCS M ⁻¹	Grasa buffer %	Proteína %	Lactosa %	CCS M ⁻¹	Grasa buffer %	Proteína %	Lactosa %	CCS M ⁻¹	
1	1-02-98	36	79.5	65.8	4.9	3.5	5.1	45	2.7	3.1	5.0	70				
2	2-02-98	38	80.5	62.5	4.2	4.1	5.0	55	3.7	3.1	5.1	188				
3	3-02-98	32	76.9	56.7	3.8	3.3	5.0	38	3.1	3.0	5.0	87				
4	4-02-98	27	72.7	51.9	4.0	3.4	5.1	29	3.4	3.1	5.1	60				
5	5-02-98	33	77.6	59.2	4.2	3.6	5.1	61	3.2	3.1	5.1	156				
PROMEDIO POR 5 DÍAS				33.2	77.4	59.2	4.2	3.6	5.1	46	3.1	3.1	5.1	112		

SSC= cuenta de células somáticas.

Otro factor importante durante el estrés calórico es la disminución de la tiroxina (T4) (Mellado,1995; West,2003), que afecta el desarrollo mamario, la lactogénesis, la producción de leche y consumo de alimento, provocando una disminución del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria, lo cual restringe la transferencia de nutrientes de la sangre a la ubre y como consecuencia una disminución en la síntesis y composición de la leche (Mellado,1995).

En estudios para comprobar si la elevación del estado antioxidante puede mejorar la fertilidad, el rendimiento de leche y la resistencia de embriones cultivados a temperaturas elevadas, tres experimentos en tres hatos lecheros fueron realizados para evaluar el efecto de múltiples inyecciones intramusculares de vitamina E (500 mg) y de selenio (50 mg) en vacas Holstein de 21 a 8 días próximos a parir y de 30 a 80 días postparto, en los resultados no se encontró ningún efecto positivo de las inyecciones de vitamina E y selenio (Paula-Lopes *et al.*,2003).

La selección genética para la tolerancia al calor es posible, pero una selección continua para un mayor rendimiento en la producción sin la consideración de la tolerancia al calor puede resultar en una mayor susceptibilidad al estrés calórico (West,2003).

Embriones

El reconocimiento de la preñez en los rumiantes requiere de la producción de interferones en el blastocito en preimplantación (Demmers *et al.*,2001). El interferón- τ producido por los trofoblastos (Demmers *et al.*,2001; Hansen y Tekin,2005), es expresado en concentraciones elevadas durante un periodo

corto (13-16 días, tiempo en el que ocurre el reconocimiento de la preñez), y su actividad principal en la reproducción es su efecto antiluteolítico (Demmers *et al.*,2001; Hansen,2002; Spencer *et al.*,2004; Hansen y Tekin,2005), actúa directamente sobre el endometrio, alterando la producción de la PGF2 α , a través de la inhibición de la expresión de los receptores de la oxitocina, se ha demostrado que el interferón- τ bloquea los receptores de la oxitocina por inhibición de los receptores de estrógenos (Demmers *et al.*,2001; Spencer *et al.*,2004), esto es lo que ocurre en condiciones normales cuando es embrión es capaz de sobrevivir a los efectos deletéreos del estrés calórico.

La tolerancia al calor en vacas lecheras en etapas tempranas de la preñez (día 0-2) es menor es decir, son extremadamente sensibles al estrés calórico, mientras que los embriones de 3 o más días pueden ser más resistentes (Chebel *et al.*,2004; Spencer *et al.*,2004). Una vez establecida la preñez las vacas son menos susceptibles, siendo esto como algo beneficio para la preñez. Si el embrión es susceptible a temperaturas elevadas; la exposición del embrión a estrés calórico *in vitro* altera el desarrollo y viabilidad (Ealy *et al.*,1995). La producción de radicales libres pueden ser un mecanismo por el cual el estrés calórico altera la función celular. La depleción de antioxidantes intracelulares (Ealy *et al.*,1995; Paula-Lopes *et al.*,2003), como la Glutathion (GSH), inhibe las respuestas termoprotectivas en mórulas de ratas (Ealy *et al.*,1995). Los efectos negativos del estrés calórico en la viabilidad de embriones de ratón en la fase de preimplantación pueden ser reducidos por antioxidantes como la vitamina E y glutatión (Paula-Lopes *et al.*,2003). Reportes anteriores mencionan que la suplementación de GSH, vitamina E o taurina, reducen los efectos del estrés calórico en mórulas de ratas y bovinos

(Ealy *et al.*,1995). Block, et al, en sus experimentos produciendo embriones *in vitro* en estrés calórico de 41 °C por 6 horas, menciona que la adición de varios antioxidantes no reduce los efectos del estrés calórico (2002). Se reporta que hay un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno en embriones de bovino expuestos a estrés calórico en el día 0 y 2 relativo al fertilización. La idea consistente de que la producción de radicales libres no es un determinante crucial de los efectos del estrés calórico en embriones de bovino es resultado de experimentos en los cuales la adición de varios antioxidantes no reducen los efectos del estrés calórico en el desarrollo embrionario (Rivera *et al.*,2004). Esto es basado primariamente en el encuentro de que el bajo contenido de oxígeno no reduce los efectos del estrés calórico. Si un incremento de los radicales libres es importante para la inhibición del desarrollo, una observación es que los efectos del estrés calórico pueden ser mayores en presencia de oxígeno elevado. Sin embargo, los embriones cultivados con bajo oxígeno no fueron resistentes al estrés calórico (Rivera *et al.*,2004).

En diferentes estudios, se ha demostrado que la preimplantación de embriones de vacas Brahman es menos afectada por el estrés calórico que en los embriones de vacas Holstein y Angus (Block *et al.*,2002). Se ha encontrado que el desarrollo de embriones de dos células disminuye al ser expuestos a 41 °C por tres horas pero no por una hora. En contraste, el desarrollo de mórula a blastocito no es afectado por el estrés calórico de 41 °C por 1 o 3 horas (Ealy *et al.*,1995).

Paula Lopes realizó experimentos con embriones (> de ocho células, día 5) de razas termotolerantes (Brahmán y Senepol), expuestos a 41°C por 6 horas, lo

que provoco una disminución del desarrollo a la etapa de blastocito y el número de células por embrión (2003). La temperatura (41 °C) usada para evaluar los efectos del estrés calórico en embriones producidos *in Vitro*, son similares a la temperatura rectal de vacas estresadas por calor, por ejemplo, en un experimento donde vaquillas expuestas a una temperatura ambiental de 38 °C, presentaban una temperatura corporal promedio de 40 °C (Rivera y Hansen,2001).

La exposición de embriones de bovino de dos células a 41 °C por 6 horas resulta en un 15% de mitocondrias que sufren inflamación, esto también se observa en otro tipo de células, es un fenómeno que resulta de la pérdida del potencial de la membrana como resultado de la abertura de los poros por la alta permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial. La incrementación del calcio y la generación de oxígeno reactivo promueven la abertura de los poros y la permeabilidad transitoria, lo cual causa alteración de la fosforilación y prevención de la síntesis del ATP mitocondrial (Rivera *et al.*,2004).

En dos experimentos realizados para comprobar si la capacidad de embriones de vacas Brahman expuestos a estrés calórico se debe a la contribución genética del oocito o del esperma, o es una combinación de ambos. En un primer experimento, oocitos de vacas Holstein y Brahman, fertilizados con esperma de un toro Angus (diferente toro fue usado para cada caso para eliminar los efectos del toro) y colectados en el día 4, los embriones de 9 células fueron colectados al azar y asignados como grupo control (38.58 °C) y tratados (41.8 °C por 6 horas), el segundo experimento se realizó con oocitos de vacas Holstein fertilizados con semen de toros de raza Brahman o Angus.

Los resultados demostraron que el oocito y no el espermatozoides juega uno o varios papeles importantes para la resistencia a los efectos de deletéreos del estrés calórico en embriones de vacas Brahmán (Block *et al.*,2002). De lo contrario, el uso de semen de toros termotolerantes en la inseminación artificial sería una buena solución para mejorar la fertilidad de animales sensibles al estrés calórico (Rensis y Scaramuzzi,2003).

Otros estudios con vacas lecheras lactando indicaron que puede haber pérdida embrionaria tardía, que ocurre entre los 27-31 y 41-45 días después de la IA (inseminación artificial) teniendo un rango del 10-21%. En algunos casos la pérdida de preñez ha sido reportada por ser superior al 21% o incluso del 60.5% en vacas inseminadas a tiempo fijo durante el estrés calórico (Chebel *et al.*,2004). Jousan, *et al.*, reporta una tasa de pérdida embrionaria del 10% para hembras lactando y un 4.7% en vaquillas (en etapas temprana, mediana y tardía) (2005).

El advenimiento de la ultrasonografía juega un papel importante pues permite el diagnóstico exacto de la preñez a los 25 días en el ganado lechero, y darse cuenta de la pérdida de preñez a un tiempo más corto y poder reincorporar a las vacas a un nuevo protocolo reproductivo.

Antioxidantes

Durante el metabolismo celular se producen formas de oxígeno altamente reactivas (radicales libres que representan del 1-2% del oxígeno metabolizado) (Diaz *et al.*,2002; Paula-Lopes *et al.*,2003) que dan lugar a la degeneración oxidativa de los fosfolípidos que forman las membranas (Fehrenbach y Northoff,2001; Diaz *et al.*,2002). Esto conduce a un daño estructural, y al final,

la pérdida de la integridad celular. La predisposición a la peroxidación lipídica en las membranas depende directamente del contenido en ácidos grasos que poseen. Entre estas membranas se incluyen las eritrocitarias y otras como las subcelulares de las mitocondrias y de la fracción microsomal de las células. La lipoperoxidación tisular da lugar a una degeneración hialina y por último a la calcificación celular (Diaz *et al.*,2002).

El balance entre la producción y disposición de moléculas oxidantes es esencial para la homeostasis de los tejidos. En períodos con incremento de la producción de radicales libres o la disminución del retiro de los principales radicales acumulados altera la función celular. Muchos sistemas antioxidantes están presentes en la célula para asegurar el retiro de los radicales libres. Entre estos sistemas, la glutatión peroxidasa que es una enzima selenio-dependiente localizada en el citosol y que utiliza el potencial de reducción de la glutatión para reducir el peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos del agua. La vitamina E, es un fuerte agente reductor presente en las membranas que puede dar electrones a lípidos que sufren peroxidación. Los daños reproductivos a consecuencia de los radicales libres incluye la alteración de la función del espermatozoide y preimplantación de embriones (Chandolia *et al.*,1999; Paula-Lopes *et al.*,2003; Rensis y Scaramuzzi,2003). El estado antioxidante puede ser un determinante en la función reproductiva del ganado lechero. La administración de vitamina E o vitamina E en combinación con selenio han sido reportados como reductores de la incidencia de desordenes reproductivos postparto tales como retención de membranas fetales, metritis y quistes ováricos (Paula-Lopes *et al.*,2003). Sin embargo la administración de

vitamina E en la inseminación o a 30 días postparto no tiene ningún efecto benéfico sobre la tasa de preñez durante el verano, ni la administración de selenio o beta-caroteno. En contraste, la suplementación de beta-caroteno por períodos prolongados tiene un efecto benéfico sobre la fertilidad en vacas lecheras (Rensis y Scaramuzzi,2003). Las temperaturas elevadas incrementan la peroxidación en el hígado y la actividad de las enzimas involucradas en la producción de radicales libres tales como la xantina oxidasa (Paula-Lopes *et al.*,2003), en vacas lecheras expuestas a estrés calórico la actividad total antioxidante en sangre disminuye (Paula-Lopes *et al.*,2003; Rensis y Scaramuzzi,2003).

Estrés Calórico en el Semen

En un experimento, donde el objetivo fue comprobar si el estrés calórico alteraba la función espermática en razas sensibles (Angus y Holstein) y razas tolerantes (Brahman y otras razas cruzadas con Brahman), se realizó usando semen congelado, que fue centrifugado e incubado a 41 y 42 °C por cuatro horas. Se observó que el estrés calórico reduce el % de motilidad espermática y la velocidad del movimiento. El estrés calórico redujo la motilidad en mayor grado en toros cruzados con Brahmán, en menor grado en toros Brahman, mientras que en el semen de los toros de raza Holstein la motilidad no fue afectada (Chandolia *et al.*,1999; Hansen y Arechiga,1999). La Hsp70 sirve como un protector en el esperma expuesto a estrés antes de la fertilización (Matwee *et al.*,2001), además, dos miembros de la familia Hsp70 (Hsp70-2 y Hsc70T en ratones) son reguladas y expresadas específicamente en células

espermatogénicas. Se ha demostrado que la presencia de Hsp70 -2 esta relacionada con la fertilidad, pues una disminución causa infertilidad en los machos, aunque en las hembras esto no produce algún efecto negativo en la fertilidad (Eddy,1999). En estudios realizados con semen de jabalíes, se encontró una disminución de la Hsp 90 (al 64 %) durante en congelamiento y descongelamiento, en la primera hora del enfriamiento a 5 °C, la motilidad y espermatozoides normales disminuyó después de descolgelamiento a -100 °C. Los resultados revelaron que la disminución de Hsp 90 precede a la disminución de las características del semen y el tiempo entre la disminución de Hsp 90 y la disminución de la motilidad del esperma fue estimada en 2-3 horas, por lo que la Hsp 90 juega un papel importante en la motilidad del esperma en jabalíes (Huang *et al.*,1999; Huang *et al.*,2000).

La tasa de fertilización puede ser reducida por el estrés calórico maternal, pues el esperma y el oocito se ven comprometidos, ya que el esperma depositado en el tracto reproductivo de una hembra hipertérmica es afectado potencialmente. En conejos, embriones formados de la fertilización de oocitos con esperma chocado con calor tenían un desarrollo comprometido, se desconoce si un fenómeno similar ocurre en el ganado (Hansen y Arechiga,1999). La interacción esperma-oocito involucra varios eventos que culminan en la fertilización, se ha reportado que la presencia de anticuerpos anti-Hsp 70 en bovinos reduce la unión del esperma a la zona pelucida del oocito, es probable que la Hsp70 juegue un papel importante durante el desarrollo embrionario, aunque la presencia de anticuerpos para la Hsp70 disminuyen significativamente la progresión a la etapa de blastocito en embriones de ratas (Matwee *et al.*,2001).

Conclusión

La disminución de la fertilidad del ganado lechero ocasionada por las temperaturas elevadas del verano, es ocasionado principalmente por dos aspectos: 1) la alta sensibilidad de los embriones en etapas tempranas de la preñez (0-2 días).

2) la baja detección de estros, aspecto atribuido a la disminución de las concentraciones de estrógenos y a la inactividad física del ganado, medida adoptada por los animales para una menor generación de calor.

En adición, hay que recordar el papel importante que juegan los estrógenos en la expresión del estro en el ganado, y posiblemente la disminución ocasionada por el estrés calórico, se debe a la inhibición de la actividad de la aromatasa producida por la Hsp 90 y a la disminución de células de la granulosa, la Hsp 90 es encontrada en una mayor concentración en folículos preovulatorios, por lo que se sugiere probar si el uso de anticuerpos anti-Hsp 90, incrementa la actividad de la aromatasa y por consiguiente las concentraciones de estrógenos, así mismo observar si hay una mayor detección de estros que tendría por consecuencia una mejor tasa de concepción.

Glosario

Chaperonas: clase funcional de familias de proteínas no relacionadas que asisten el correcto ensamblamiento no covalente de otras estructuras-polipéptidos *in Vitro*, sin ser componentes de las mismas cuando realizan su función biológica normal (Oxford,2000). Son proteínas que previene la agregación de otras proteínas o facilitan el plegamiento o replegamiento de nuevas proteínas recién sintetizadas o desdobladas, respectivamente. Muchas chaperonas (no todas) son sintetizadas principalmente después de estrés, por lo que son llamadas proteínas del estrés. Las chaperonas son usualmente inespecíficas; pues interactúan con varias proteínas recién dañadas o sintetizadas. Sin embargo, también existe un gran número de chaperonas altamente específicas, las cuales ayudan al plegamiento de una sola proteína o de un grupo restringido de proteínas (Nardai *et al.*,2006). Las chaperonas moleculares son definidas como "proteínas que unen y estabilizan conformaciones inestables de otras proteínas, la unión y liberación es en forma controlada para facilitar el correcto desempeño *in vivo*, ya sea plegando, ensamblando oligómeros, trasportandolos a un compartimiento subcelular en particular o disponiéndolas para su degradación". La capacidad para reconocer y unirse a proteínas desdobladas, para suprimir la agregación proteica y para influenciar la entrega de proteínas plegadas se tiene en cuenta para definir las actividades de las chaperonas moleculares (Sun *et al.*,2002). Es una clase de proteínas, que previene asociaciones inadecuadas, asisten el plegamiento correcto o ensamblamiento de otras proteínas *in vivo*, sin ser parte de la estructura madura (Rutherford,2003). Las chaperonas moleculares son consideradas como una clase funcional de familias de proteínas que asisten el

ensamblamiento correcto no-covalente de otras estructuras que contienen polipéptidos, *in vivo*, sin ser componentes de las estructuras ensambladas cuando realizan sus funciones biológicas normales (Ellis,1993).

Chaperonina: es una subclase de las chaperonas moleculares implicada en el plegamiento de otras proteínas. Incluye dos tipos de proteínas: a) la chaperonina de 60 kDa (también llamada chaperonina-60 o CPN 60), b) la chaperonina de 10 kDa (también llamada chaperonina-10 o cpn 10. Son proteínas oligoméricas que ayudan en el plegamiento de proteínas nuevas o proteínas desnaturalizadas (Ranford y Henderson,2002).

Competencia del oocito: es el potencial que tiene un oocito fertilizado para dar lugar a un desarrollo normal del embrión (Hansen,2002).

Estradiol: es sintetizado por el ovario del cual es secretado directamente a la circulación, su formación depende de la presencia de la hormona luteinizante y de hormona liberadora de FSH (FSHRH), es sintetizado a partir de testosterona por el complejo aromatasa, el cual es utilizado en las células de la granulosa ovárica y su producción es estimulada por la folitropina; la lutropina, por otro lado, estimula la producción de testosterona, el sustrato de las aromatasa en las células tecaes ováricas. Es importante en la inducción de las características de la hembra, el 17 beta-estradiol, participa en la primera mitad del ciclo estral (antes de la ovulación), estimulando la proliferación de las capas epitelial y estromal del endometrio antes de la ovulación (Oxford,2000).

Estrés: son las respuestas acumulativas de un animal como resultado de la interacción con su medio ambiente vía receptores, es un fenómeno de adaptación, por lo que todas las respuestas a estímulos son dirigidas para cubrir primariamente los cambios en el medio ambiente. La estimulación intensa o prolongada puede inducir respuestas dañinas en el organismo (Flower,1995). Es la incapacidad de un animal para adaptarse a su medio ambiente, este fenómeno se refleja en la incapacidad para desempeñar su potencial genético, por ejemplo, velocidad de crecimiento, producción de leche, resistencia a enfermedades y fertilidad (Dobson y Smith,2000). Es la suma de fuerzas externas en un animal homeotérmico que actúan para desplazar la temperatura corporal de su estado normal (Hansen y Arechiga,1999). Lee (1965) presentó una definición de estrés y que es usada por biólogos, en la cual denota al estrés como la magnitud de fuerzas externas sobre un organismo que tienden a desplazar al sistema de su estado normal y la tensión es el desplazamiento interno del estado basal (West,2003). El estrés calórico se define como cualquier combinación de condiciones ambientales, que causan que la temperatura de la zona termoneutral de los animales sea superior (Boñuelos y Sánchez,2005).

Factor I del estrés calórico: es un factor de transcripción responsable de la inducción de proteínas del estrés calórico (Hsps) en células eucariotas, es un miembro de una gran familia, en la cual otros miembros son activos en estrés prolongado o proveen inducción de tipos específicos de Hsps durante el estrés o desarrollo (Nardai *et al.*,2006).

FSH: también llamada folitropina, es una de las dos hormonas glicoproteicas gonadotrópicas secretadas por la pituitaria anterior; de 34 kDa (humano), 33 kDa (ovinos) y 29 kDa (porcinos). En la hembra estimula el crecimiento de folículos de Graaf del ovario, mientras que en el macho estimula el epitelio de los túbulos seminíferos para incrementar la gametogénesis (Oxford, 2000).

gro: símbolo para los grupos de genes encontrados en bacterias especialmente *E. coli* (Oxford, 2000).

groEL: símbolo para cualquier familia de genes de bacterias que codifican chaperoninas (Oxford, 2000).

Hidrófobo: que posee antagonismo con el agua, incapaz de unirse o mezclarse con el agua (Mckee, 2003).

Homeotermos: los bovinos, al igual que el resto de los mamíferos, son homeotermos; es decir, poseen capacidad para estabilizar su temperatura corporal a pesar de las fluctuaciones ambientales (Mellado, 1995).

Hormona Liberadora de gonadotropinas (GnRH): también llamada gonadoliberina o factor liberador de la hormona luteinizante y hormona folículo estimulante, es liberada por el hipotálamo a la circulación portal hipofísea en respuesta a estímulos endocrinos y químicos, es considerada como un neuropéptido que causa la liberación de FSH y LH de la pituitaria anterior. En

los mamíferos se expresa también en la placenta y su función incluye acciones de neurotransmisor, neuromodulador y de hormona local (Oxford,2000).

Proteínas del estrés calórico (Hsp): pertenecen a un grupo específico de proteínas que son sintetizadas por células eucarióticas y procarióticas, ejemplo, bacterias, hongos y *Drosophila melanogaster*, después de ser expuestas a temperaturas superiores a lo normal, otros estresores, tales como daño por radicales libres, tienen un efecto similar. Muchos miembros de la familia de Hsps no son inducidas pero están presentes en las células. Las Hsps están clasificadas de acuerdo a su peso molecular, en tres clases, Hsp 60, Hsp 70 y la Hsp 90, son caracterizadas por su papel como chaperonas moleculares. Una función principal de la Hsp 70 es en el lumen del retículo endoplasmático uniendo proteínas, estas proteínas son altamente conservadas, las proteínas de *E. coli* y humanos son idénticas en un 50% en su estructura primaria. La hsp 70 posee dominios ATPasa y de unión de péptidos (Oxford,2000).

Las proteínas del estrés calórico son comúnmente conocidas como "proteínas del estrés", pues son inducidas por muchos tipos de estresores, que resulta en la inducción específica de modelos de la gran familia de las Hsps (Nardai *et al.*,2006).

Ubiquinación: en la ubiquinación, varias moléculas de una proteína eucariota pequeña de 76 residuos que se denominan ubiquitinas se unen covalentemente a algunas proteínas destinadas a la degradación. Una vez que la proteína esta ubiquinada, se degrada por un complejo proteolítico con varias subunidades que se denominan proteosomas. Debido a que las moléculas de

ubiquitina no se degradan en este proceso, quedan a disposición de nuevos procesos de degradación proteica. La ubiquitina se encuentra en varios compartimentos celulares (p. ej. citoplasma y núcleo), pertenece a una clase de las proteínas que se denominan proteínas de agresión. Éstas, que también se llaman proteínas del choque térmico (Hsps), se denominan de esta manera debido a que su síntesis se acelera (y en algunos casos se inicia) cuando las células son agredidas (Mckee,2003).

LITERATURA CITADA

- Baloglu, S., T. E. Toth, G. G. Schurig, N. Sriranganathan y S. M. Boyle (2000). "Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against a *B. abortus* challenge." Vet Microbiol **76**(2): 193-9.
- Block, J., C. C. Chase, Jr. y P. J. Hansen (2002). "Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution." Mol Reprod Dev **63**(1): 32-7.
- Bohem, S. P. (1994). "Modulation of Steroid Receptor Signal Transduction by Heat Shock Proteins." The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones: 313-334.
- Boñuelos, V. R. y R. S. Sánchez (2005). "La proteína del estrés calórico Hsp 70 funciona como un indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas." REDVET **5**(3): 1-18.
- Bryantsev, A. L., S. A. Loktionova, O. P. Ilyinskaya, E. M. Tararak, H. H. Kampinga y A. E. Kabakov (2002). "Distribution, phosphorylation, and activities of Hsp25 in heat-stressed H9c2 myoblasts: a functional link to cytoprotection." Cell Stress Chaperones **7**(2): 146-55.
- Conley, A. y M. Hinshelwood (2001). "Mammalian aromatases." Reproduction **121**(5): 685-95.
- Chandolia, R. K., E. M. Reinertsen y P. J. Hansen (1999). "Short communication: lack of breed differences in responses of bovine spermatozoa to heat shock." J Dairy Sci **82**(12): 2617-9.
- Chebel, R. C., J. E. Santos, J. P. Reynolds, R. L. Cerri, S. O. Juchem y M. Overton (2004). "Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows." Anim Reprod Sci **84**(3-4): 239-55.
- Christians, E. S., Q. Zhou, J. Renard y I. J. Benjamin (2003). "Heat shock proteins in mammalian development." Semin Cell Dev Biol **14**(5): 283-90.
- De Rensis, F., P. Marconi, T. Capelli, F. Gatti, F. Facciolo, S. Franzini y R. J. Scaramuzzi (2002). "Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG." Theriogenology **58**(9): 1675-87.
- Demmers, K. J., K. Derecka y A. Flint (2001). "Trophoblast interferon and pregnancy." Reproduction **121**(1): 41-9.
- Diaz, Z. S., C. B. Valladares y J. R. Montes De Oca (2002). "El selenio en la producción ovina del Valle de Toluca." VII Curso bases de la producción ovina.
- Dobson, H. y R. F. Smith (2000). "What is stress, and how does it affect reproduction?" Anim Reprod Sci **60-61**: 743-52.
- Driancourt, M. A., P. Guet, K. Reynaud, A. Chadli y M. G. Catelli (1999). "Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90, in dominant follicles of cattle." J Reprod Fertil **115**(1): 45-58.
- Du Preez, J. H. (2000). "Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa." Onderstepoort J Vet Res **67**(4): 263-71.
- Ealy, A. D., J. L. Howell, V. H. Monterroso, C. F. Arechiga y P. J. Hansen (1995). "Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants." J Anim Sci **73**(5): 1401-7.
- Eddy, E. M. (1999). "Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis." Rev Reprod **4**(1): 23-30.

- Ellis, R. J. (1993). "The general concept of molecular chaperones." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **339**(1289): 257-61.
- Fehrenbach, E. y H. Northoff (2001). "Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins." Exerc Immunol Rev **7**: 66-89.
- Finocchiaro, R., J. B. van Kaam, B. Portolano y I. Misztal (2005). "Effect of heat stress on production of Mediterranean dairy sheep." J Dairy Sci **88**(5): 1855-64.
- Flower, E. M. (1995). Restrain and Handling of Wild and Domestic Animals. Iowa, Blackwell Publishing.
- Grover, A. (2002). "Molecular biology of stress responses." Cell Stress Chaperones **7**(1): 1-5.
- Gullo, C. A. y G. Teoh (2004). "Heat shock proteins: to present or not, that is the question." Immunol Lett **94**(1-2): 1-10.
- Hansen, P. J. (2002). "Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective." J. Anim. Sci. **80**(E. Suppl. 2): E33-E44.
- Hansen, P. J. (2004). "Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress." Anim Reprod Sci **82-83**: 349-60.
- Hansen, P. J. y C. F. Arechiga (1999). "Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow." J Anim Sci **77 Suppl 2**: 36-50.
- Hansen, P. J. y S. Tekin (2005). "Pregnancy-associated immunoregulatory molecules discovered in ruminants and their possible relevance to other species." Chem Immunol Allergy **88**: 109-16.
- Huang, S. Y., Y. H. Kuo, W. C. Lee, H. L. Tsou, Y. P. Lee, H. L. Chang, J. J. Wu y P. C. Yang (1999). "Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa." Theriogenology **51**(5): 1007-16.
- Huang, S. Y., Y. H. Kuo, H. L. Tsou, Y. P. Lee, Y. T. King, H. C. Huang, P. C. Yang y W. C. Lee (2000). "The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a specific inhibitor of heat-shock protein 90 (HSP90)." Theriogenology **53**(5): 1177-84.
- Jordan, R. E. (2003). "Effects of Heat Stress on Reproduction." J. Dairy Sci. **86**: E104-E114.
- Jousan, F. D., M. Drost y P. J. Hansen (2005). "Factors associated with early and mid-to-late fetal loss in lactating and nonlactating Holstein cattle in a hot climate." J Anim Sci **83**(5): 1017-22.
- Jousan, F. D. y P. J. Hansen (2004). "Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock." Biol Reprod **71**(5): 1665-70.
- Klettner, A. (2004). "The induction of heat shock proteins as a potential strategy to treat neurodegenerative disorders." Drug News Perspect **17**(5): 299-306.
- Ko, J. y G. A. Splitter (2003). "Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans." Clin Microbiol Rev **16**(1): 65-78.
- Kristensen, T. N., P. Lovendahl, P. Berg y V. Loeschcke (2004). "Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes." Cell Stress Chaperones **9**(2): 143-9.
- Laguna, J. y P. G. Enrique (2002). Bioquímica de Laguna. México, Manual Moderno.
- Malago, J. J., J. F. Koninkx y J. E. van Dijk (2002). "The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium." Cell Stress Chaperones **7**(2): 191-9.
- Manuel Silva, J. y C. A. Price (2000). "Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450

- aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro." Biol Reprod **62**(1): 186-91.
- Matwee, C., M. Kamaruddin, D. H. Betts, P. K. Basrur y W. A. King (2001). "The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development." Mol Hum Reprod **7**(9): 829-37.
- Mckee, T. (2003). Bioquímica la base molecular de la vida. Colombia, McGraw Hill Interamericana.
- Mellado, M. (1995). "Respuesta fisiológica, producción de leche, eficiencia reproductiva y salud del ganado lechero expuesto a temperaturas ambientales elevadas." Vet. Mex. **26**(4): 389-399.
- Mogk, A., M. P. Mayer y E. Deuerling (2002). "Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology." Chembiochem **3**(9): 807-14.
- Montaño, L. E. y C. Z. T. Ruiz (2005). "¿Por que no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas cebú postparto en el tropico colombiano?" Rev Col Cienc Pec **18**(2): 127-135.
- Moreira, F., C. Orlandi, C. A. Risco, R. Mattos, F. Lopes y W. W. Thatcher (2001). "Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows." J Dairy Sci **84**(7): 1646-59.
- Moseley, P. L. (1997). "Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism." J Appl Physiol **83**(5): 1413-7.
- Nardai, G., E. M. Vegh, Z. Prohaszka y P. Csermely (2006). "Chaperone-related immune dysfunction: an emergent property of distorted chaperone networks." Trends Immunol **27**(2): 74-9.
- Olson, T. A. (2003). "Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle^{1,2,3}."
- Olson, T. A., C. Lucena, C. C. Chase, Jr. y A. C. Hammond (2003). "Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle." J Anim Sci **81**(1): 80-90.
- Ominski, K. H., A. D. Kennedy, K. M. Wittenberg y S. A. Moshtaghi Nia (2002). "Physiological and production responses to feeding schedule in lactating dairy cows exposed to short-term, moderate heat stress." J Dairy Sci **85**(4): 730-7.
- Oxford (2000). "Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology."
- Paula-Lopes, F. F., Y. M. Al-Katanani, A. C. Majewski, L. R. McDowell y P. J. Hansen (2003). "Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos." J Dairy Sci **86**(7): 2343-51.
- Paula-Lopes, F. F., C. C. Chase, Jr., Y. M. Al-Katanani, C. E. Krininger, 3rd, R. M. Rivera, S. Tekin, A. C. Majewski, O. M. Ocon, T. A. Olson y P. J. Hansen (2003). "Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures." Reproduction **125**(2): 285-94.
- Paula-Lopes, F. F. y P. J. Hansen (2002). "Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock." Biochem Biophys Res Commun **295**(1): 37-42.
- Pespeni, M., M. Hodnett y J. F. Pittet (2005). "In vivo stress preconditioning." Methods **35**(2): 158-64.

- Peters, A. R., T. A. Martinez y A. J. Cook (2000). "A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle." Theriogenology **54**(8): 1317-26.
- Picard, D. (2002). "Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1640-8.
- Ranford, J. C. y B. Henderson (2002). "Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments." Mol Pathol **55**(4): 209-13.
- Ravagnolo, O. y I. Misztal (2002). "Effect of heat stress on nonreturn rate in Holstein cows: genetic analyses." J Dairy Sci **85**(11): 3092-100.
- Rensis, F. D. y R. J. Scaramuzzi (2003). "Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review." Theriogenology **60**(6): 1139-51.
- Ritossa, F. (1996). "Discovery of the heat shock response." Cell Stress Chaperones **1**(2): 97-8.
- Rivera, R. M., G. M. Dahlgren, E. P. L. A. De Castro, R. T. Kennedy y P. J. Hansen (2004). "Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development." Reproduction **128**(1): 33-42.
- Rivera, R. M. y P. J. Hansen (2001). "Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range." Reproduction **121**(1): 107-15.
- Roth, Z., A. Arav, R. Braw-Tai, A. Bor y D. Wolfenson (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." J Dairy Sci **85**(6): 1398-405.
- Roth, Z. y P. J. Hansen (2004). "Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation." Biol Reprod **71**(6): 1898-906.
- Rutherford, S. L. (2003). "Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability." Nat Rev Genet **4**(4): 263-74.
- Sapolsky, M. R., L. M. Romero y U. A. Munck (2002). "How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions." Endocrine Reviews **21**(1): 55-89.
- Schwartzburd, P. M. (2001). "Self-cytoprotection against stress: feedback regulation of heme-dependent metabolism." Cell Stress Chaperones **6**(1): 1-5.
- Simpson, R. E. (2002). "Aromatase and Its Inhibitors: Significance for Breast Cancer Therapy." Annu. Rev. Physiol: 317-338.
- Simpson, R. E., C. Clyne y G. Rubin (2002). "AROMATASE—A BRIEF OVERVIEW." Annu. Rev. Physiol **64**: 93-127.
- Smith, D. F., L. Whitesell y E. Katsanis (1998). "Molecular Chaperones: Biology and Prospects for Pharmacological Intervention." The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics **50** (4): 493-513.
- Spencer, T. E., R. C. Burghardt, G. A. Johnson y F. W. Bazer (2004). "Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy." Anim Reprod Sci **82-83**: 537-50.
- Sun, W., M. Van Montagu y N. Verbruggen (2002). "Small heat shock proteins and stress tolerance in plants." Biochim Biophys Acta **1577**(1): 1-9.
- Thirumalai, D. y G. H. Lorimer (2001). "Chaperonin-mediated protein folding." Annu Rev Biophys Biomol Struct **30**: 245-69.

- Todryk, S. M., M. J. Gough y A. G. Pockley (2003). "Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential." Immunology **110**(1): 1-9.
- Ullah, G., J. W. Fuquay, T. Keawkhong, B. L. Clark, D. E. Pogue y E. J. Murphey (1996). "Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress." J Dairy Sci **79**(11): 1950-3.
- Voos, W. y K. Rottgers (2002). "Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 51-62.
- Watanabe, A., T. Miyamoto, N. Katoh y Y. Takahashi (1997). "Effect of stages of lactation on the concentration of a 90-kilodalton heat shock protein in bovine mammary tissue." J Dairy Sci **80**(10): 2372-9.
- West, J. W. (2003). "Effects of heat-stress on production in dairy cattle." J Dairy Sci **86**(6): 2131-44.
- Willard, S., S. Gandy, S. Bowers, K. Graves, A. Elias y C. Whisnant (2003). "The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress." Theriogenology **59**(8): 1799-810.
- Wolfenson, D., Z. Roth y R. Meidan (2000). "Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects." Anim Reprod Sci **60-61**: 535-47.
- Xanthoudakis, S. y D. W. Nicholson (2000). "Heat-shock proteins as death determinants." Nat Cell Biol **2**(9): E163-5.
- Yoon, S. J., K. H. Choi y K. A. Lee (2002). "Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression." Mol Reprod Dev **61**(4): 504-10.
- Zugel, U. y S. H. Kaufmann (1999). "Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases." Clin Microbiol Rev **12**(1): 19-39.