



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIFERENCIAS EN LA VIABILIDAD CELULAR AL ESTRES CALORICO EN LINFOCITOS DE OVEJAS DE RAZAS ADAPTADAS A CLIMA CALIDO Y TEMPLADO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**ROSITA DENY ROMERO SANTOS**

ASESORES: DR. JOEL HERNANDEZ CERON  
MC ANA DELIA RODRIGUEZ CORTEZ



MEXICO, D. F.

2005

m. 348992



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mi madre para quien este ultimo paso significa el principio de muchas ilusiones y proyectos nuevos; donde ve reflejados sus esfuerzos y esperanzas de muchos años.

A todos aquellos que me amaron aunque hoy no estén con nosotros; que ni la distancia o el tiempo podrá separarnos, porque siempre estarán en mi corazón.

A mis amigos, porque familia no necesariamente son personas relacionadas por lazos de sangre.

*-Y ahora, señores -dijo D'Artagnan sin tomarse el trabajo de explicar su conducta a Porthos-, todos para uno y uno para todos, esa es nuestra divisa, ¿no es así?  
-Pero... -dijo Porthos.  
-¡Extiende la mano y jura! -gritaron a la vez Athos y Aramis.  
Vencido por el ejemplo, rezongando por lo bajo, Porthos extendió la mano y los cuatro amigos repitieron a un solo grito la fórmula dictada por D'Artagnan: "Todos para uno, uno para todos."*

*...A. Dumas L.T.M.*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo *receptonal*.

NOMBRE: Romero Santos

FECHA: 04 de octubre del 2005

FIRMA: Romero Santos

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer formalmente el apoyo económico de parte del PAPIT al proyecto no. IN222305, sin el cual no se habría logrado la realización de esta investigación.

A los H. Miembros del Jurado: Dr. Javier Valencia M., Dr. Aldo Alberti N., Dr. Jean Bouda, Dr. Joel Hernández C. y Dra. Guadalupe Ramírez D. por sus valiosos consejos.

A mis asesores, el Doc Joel, por la oportunidad que me ofreció y a Anita, que mas que asesorarme ha sido mi maestra, guía y amiga en un mundo nuevo y desconocido para mi, dentro del laboratorio.

Especial y muy sinceramente a Emma y Mario, por ser mis mosqueteros a toda prueba, a Lizy, Roro, Brandy, Vitor, Isra, Andy, Fab, Blass y Bimbo por formar parte de esta compañía y dar a mi vida luz en el momento mas oscuro.

A la Dra. Betty por todo su apoyo aunque mi fuerte no fuera la Patología, por enseñarme que los animales son nuestros iguales que necesitan de nuestro cuidado y protección.

A todos mis queridos profesores de la Fac, que durante la carrera dejaron una parte suya en mi y me enseñaron a amar lo que se hace.

A todos los integrantes del Departamento de Reproducción que de alguna forma son parte de la ecuación.

A mis compañeros que son responsables en parte de este ogro verde.

A la pollito para que vea que el estudio no deja nada bueno.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
HIPÓTESIS .....	5
OBJETIVOS .....	5
MATERIAL Y MÉTODOS .....	6
RESULTADOS .....	8
FIGURA 1 .....	8
FIGURA 2 .....	9
DISCUSIÓN .....	10
REFERENCIAS .....	14

## RESUMEN

ROSITA DENY ROMERO SANTOS. Diferencias en la viabilidad celular al estrés calórico en linfocitos de ovejas de razas adaptadas a clima cálido y templado (bajo la dirección de:) Dr. Joel Hernández Cerón y MC Ana Delia Rodríguez Cortez

En este trabajo se hipotetizó que la oveja de la raza Pelibuey desarrolló, durante su proceso de adaptación a los climas cálidos, mecanismos que les confieren resistencia al estrés calórico a nivel celular. En este estudio se comparó la resistencia al estrés calórico de linfocitos de la raza Pelibuey y Suffolk (raza adaptada a los climas templado y frío), en condiciones *in vitro*. Se utilizaron 15 ovejas Pelibuey y 15 Suffolk, no gestantes, las cuales recibieron la misma dieta y tuvieron la misma condición corporal al inicio del estudio (2.5 a 3.5). En tres ocasiones distintas a 5 ovejas de cada raza se les colectó 20 ml de sangre de la vena yugular, en tubos al vacío con citrato de sodio. Los linfocitos obtenidos fueron cultivados por duplicado (grupos testigo y estrés calórico) en cinco pozos (100 000 células/pozo) en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron incubados a 37 C durante 24 h (testigos) o 43 C por 6 h seguido por 18 h a 37 C (estrés calórico). Al finalizar el cultivo, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de azul formazán, el cual se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolium. Se comparó la proporción de células viables mediante un modelo estadístico lineal mixto, donde se incluyeron los efectos fijos de raza, ensayo y temperatura, así como sus interacciones. La proporción de células viables fue afectada por la temperatura [70.13 ± 2.98% (37 C) y 61.95 ± 2.95% (43 C) (P<0.0001)]. El porcentaje de viabilidad celular fue similar (P = 0.7343) entre las ovejas Pelibuey [68.40 ± 4.22% (37 C) y 60.65 ± 4.20% (43

C)] y Suffolk [ $71.86 \pm 4.22\%$  (37 C) y  $63.25 \pm 4.15\%$  (43 C)]. En este estudio no se encontró evidencia que los linfocitos de ovejas adaptadas a temperaturas cálidas (Pelibuey) fueran más resistentes a un estrés calórico que los linfocitos de ovejas adaptadas a climas templados y fríos (Suffolk).

## INTRODUCCIÓN

Los efectos del estrés calórico se han estudiado ampliamente en los bovinos y se conoce que las altas temperaturas afectan negativamente la fertilidad. El estrés calórico afecta el desarrollo folicular, la expresión de estro, la calidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano (1). La susceptibilidad de las diversas razas de bovinos depende de los mecanismos propios de cada una para termorregularse. En condiciones de altas temperaturas ambientales, el ganado adaptado a climas cálidos (*Bos indicus*) mantiene una temperatura corporal más baja que el ganado no adaptado (*Bos taurus*) (2, 3). En un estudio se observó que la calidad de los ovocitos durante la estación cálida se redujo en el ganado Holstein (*Bos taurus*) pero no en ganado Brahman (*Bos indicus*) (4). Asimismo, al comparar el porcentaje de concepción del ganado Holstein y Brahman durante las estaciones cálida y templada, se observó una reducción de la fertilidad en el ganado Holstein en la época cálida mientras que en el Brahman fue similar en las dos épocas (1). La diferencia del grado en que se afecta la función reproductiva en estas razas de ganado se puede explicar a través de la mayor capacidad de termorregulación que tiene el ganado Brahman en condiciones de estrés calórico; sin embargo, se puede deber en parte, a diferencias en la resistencia al estrés calórico a nivel celular (5). En condiciones *in vitro* se ha observado que un choque térmico provoca la muerte de una proporción menor de linfocitos de vacas Brahman y Senepol (razas termotolerantes) que de Holstein y Angus (razas termosensibles) (6). Asimismo, una menor proporción de linfocitos de vacas Brahman y Senepol presentaron apoptosis después de un estrés calórico, que linfocitos de vacas Holstein y Angus (7).



En las ovejas poco se ha documentado acerca de los efectos del estrés calórico en la reproducción. Observaciones hechas en Australia, han correlacionado las altas temperaturas durante el empadre con una disminución de la fertilidad (8), y se ha encontrado que el aumento de un grado en la temperatura rectal en ovejas bajo estrés calórico provoca una reducción de la fertilidad (9). Recientemente se observó en ovejas superovuladas, que la exposición a altas temperaturas afectó el desarrollo embrionario (10).

En ovejas también se han observado diferencias genéticas en la termotolerancia, así las razas que evolucionaron en climas cálidos regulan mejor su temperatura corporal durante estados de estrés calórico que las ovejas que lo hicieron en climas templados o fríos. En observaciones realizadas durante el verano en Estados Unidos, se encontró que las ovejas Blackbelly (raza de pelo) tuvieron una menor temperatura rectal y menor frecuencia respiratoria que ovejas de las razas Dorset y Suffolk (razas de lana) (11).

El borrego Pelibuey o Tabasco tiene su origen en las ovejas que llegaron con los españoles durante los siglos XVI procedentes de las Islas Canarias y en las ovejas que llegaron durante el tráfico de esclavos procedentes de África (12). El borrego Pelibuey está adaptado a los climas cálidos (tropical y subtropical) y se desconoce si la tolerancia a las altas temperaturas también obedece a adaptaciones celulares, como ocurre en el ganado bovino de la raza cebuina.

## **HIPÓTESIS**

Los linfocitos de ovejas Pelibuey son más resistentes a un estrés calórico de 43 C durante 6 h que los linfocitos de ovejas Suffolk, en condiciones *in vitro*.

## **OBJETIVO**

Evaluar las diferencias en resistencia al estrés calórico de linfocitos de una raza adaptada al clima cálido (Pelibuey) y de una adaptada al clima templado y frío (Suffolk), en condiciones *in vitro*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los linfocitos fueron utilizados como modelo celular debido a la facilidad de su colección y cultivo; considerando que los efectos de un incremento en la temperatura están bien descritos (6). Se utilizó un total de 15 ovejas de la raza Pelibuey y 15 Suffolk, no gestantes, las cuales se alojaron, en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) en Topilejo D. F. Localizado en el km 29 de la carretera federal México-Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° latitud oeste, a una altura de 2760 msnm. El clima de la región es tipo c(w) (w)b(ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y precipitación pluvial de 800 a 1200mm (13). El experimento se realizó durante la primavera en tres ocasiones (5 ovejas de cada raza). Las ovejas recibieron la misma dieta y contaban con la misma condición corporal al inicio del estudio (2.5 a 3.5, en escala del 1 al 5) y con edades de 2 años. En cada ocasión se tomaron 20 ml de sangre de la vena yugular por cada animal, para lo cual se utilizaron tubos al vacío preparados con 200 µl de citrato de sodio (0.35 g/ml)

La sangre fue transportada y mantenida a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio de cultivos celulares en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Una vez centrifugada a 800 g durante 20 min, se obtuvo la capa leucoplaquetaria por medio de una pipeta Pasteur de vidrio, la cual se depositó en tubos cónicos de 15 ml; posteriormente, se adicionaron 5 ml de DPBS (Buffer Salino de Fosfatos modificada por Dulbecco) 1:10 y se homogeneizó cada muestra. Cuidadosamente se colocó 1 ml de una preparación de 222 ml de Ficoll 9% (F 5415 SIGMA) + 50 ml de Telebrix 60%

(Ioxitalamate de meglumine GUERBET) en el fondo del tubo cónico, con ayuda de una pipeta Pasteur evitando que se mezclara con la sangre y el DPBS 1:10. Las muestras así preparadas se centrifugaron a 250 g durante 20 min.

Al terminar de centrifugar se separó la capa de linfocitos que se formó en la interfase y se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 ml. La capa de células se suspendió en 10 ml de DPBS 1:10 y centrifugó a 90 g durante 10 min. Se realizaron 2 lavados de esta manera.

Los linfocitos fueron cultivados por duplicado (grupos testigo y estrés calórico) en 5 pozos de placas de cultivo de 96 pozos, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron incubados a 37 C durante 24 h (testigos) o 43 C por 6 h seguido por 18 h a 37 C (estrés calórico). Al finalizar el cultivo la viabilidad celular fue determinada mediante el método de azul formazán. Este método se basa en la propiedad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolium (MTT Sigma, M-5655) al producto azul formazán. Esta capacidad de transformación se toma como proporcional al número de células vivas, ya que el MTT se transforma al azul formazán por medio de la enzima succinato-tetrazolium reductasa, la cual inicia la cadena respiratoria en la mitocondria y únicamente es activa en células vivas, por lo que, esta característica ayuda a discriminar las células viables. Las lecturas se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Spectra Shell Microplate Reader MRX (Dynatech, Laboratories) a 630nm. Los datos obtenidos por el espectrofotómetro se analizaron con el programa Universal Assay Zap.(14) Se determinó la proporción de linfocitos vivos y se comparó mediante un modelo estadístico lineal mixto, donde se incluyeron los efectos fijos de raza, ensayo y temperatura, así como las interacciones.

## RESULTADOS

Las interacciones entre las variables no fueron significativas ( $P = 0.7343$ ), por lo que sólo se presentan los resultados de los efectos principales. Se encontró que el estrés calórico a  $43^{\circ}\text{C}$  causó una disminución significativa de la viabilidad celular [ $70.13 \pm 2.98\%$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) y  $61.95 \pm 2.95\%$  ( $43^{\circ}\text{C}$ ) ( $P < 0.0001$ )] (Figura 1).

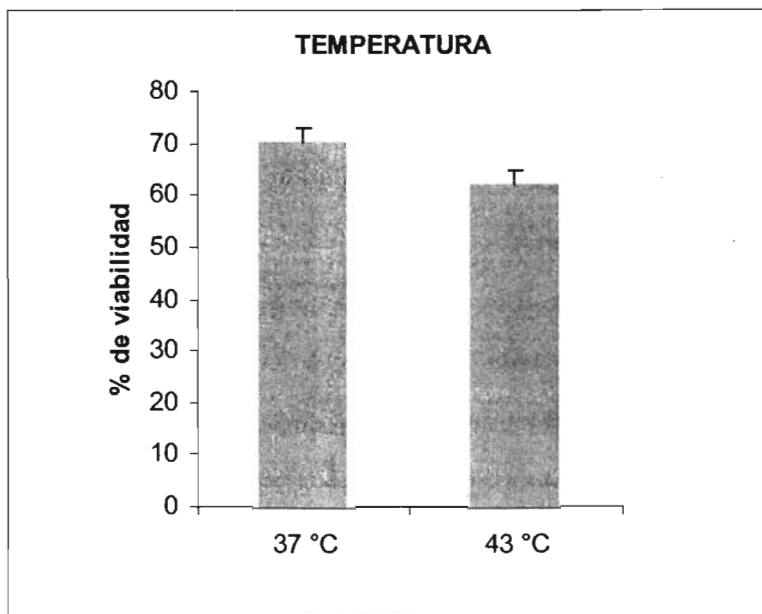


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de linfocitos de ovejas en ambas razas (Pelibuey y Suffolk) expuestos a un estrés calórico de  $43^{\circ}\text{C}$  durante 6 h en condiciones *in vitro* ( $P < 0.0001$ ).

El porcentaje de viabilidad celular fue similar ( $P = 0.7343$ ) entre las ovejas Pelibuey [ $68.40 \pm 4.22\%$  (37 C) y  $60.65 \pm 4.20\%$  (43 C)] y Suffolk [ $71.86 \pm 4.22\%$  (37 C) y  $63.25 \pm 4.15\%$  (43 C)].

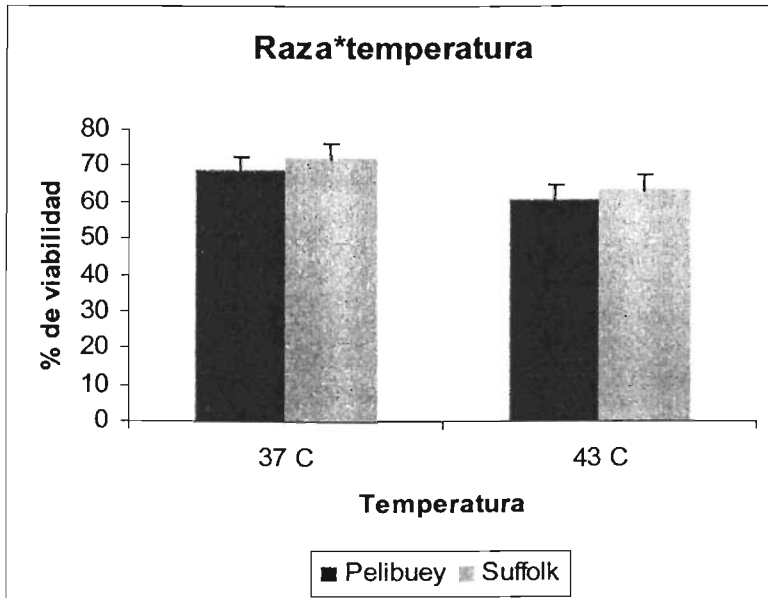


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de linfocitos de ovejas Pelibuey y Suffolk expuestos a un estrés calórico de 43 C durante 6 h en condiciones *in vitro*. ( $P = 0.7343$ )

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSIÓN

La resistencia de los linfocitos de ovejas adaptadas a climas tropicales (Pelibuey) y las no adaptadas (Suffolk), fue similar. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en bovinos, en los cuales es clara la mayor resistencia de los linfocitos de vacas de razas adaptadas a los climas tropicales (Brahman) comparativamente con los linfocitos de vacas de razas no adaptadas (Angus). (6)

El ganado *Bos indicus* ha desarrollado mecanismos que le confieren termotolerancia, tales como mayor densidad de glándulas sudoríparas por  $\text{cm}^2$ , menor tejido graso subcutáneo y pelo corto (5). Estos mecanismos le proporcionan ventajas para eliminar el calor a través de los mecanismos de convección (transferencia de calor de los órganos internos hacia las mucosas por medio del flujo sanguíneo), irradiación (calor que un cuerpo despiden al ambiente) y evaporación (sudoración y jadeo) (5). Los ovinos Pelibuey también cuentan con mecanismos que les dan mayor capacidad para eliminar el calor, uno de ellos es la presencia de pelo en lugar de lana. Esta característica física, les permite perder calor con mayor eficiencia que las ovejas de lana, bajo condiciones de estrés calórico. Así, en condiciones de 30 a 37 C (estrés calórico) las ovejas Pelibuey mantienen menor frecuencia respiratoria y menor temperatura corporal, que las ovejas Suffolk (Díaz, datos no publicados). En el presente estudio se hipotetizó que las ovejas Pelibuey, al igual que el ganado *Bos indicus*, también tienen mecanismos a nivel celular que les confieren resistencia al estrés calórico; sin embargo, los resultados indican que los linfocitos de ovejas Pelibuey y Suffolk tienen la misma sensibilidad a un estrés térmico. En el ganado bovino *Bos indicus*, se ha observado que la resistencia a nivel celular también les confiere

resistencia a los embriones durante condiciones de estrés térmico. Así, en condiciones *in vitro* los embriones de vacas Brahman son menos susceptibles a un estrés térmico de 41 C durante 6 h, que los embriones de vacas adaptadas a climas templados y fríos (Holstein y Angus). La termotolerancia a nivel embrionario también se extiende a ganado *Bos taurus*, que sufrieron un proceso de adaptación a climas tropicales. El ganado Romosinuano, es un ganado criollo colombiano, que tiene su origen en el ganado que trajeron los españoles en el siglo XVI; este ganado se adaptó a las condiciones tropicales (pelo corto, menos depósitos de grasa) y también desarrolló adaptaciones a nivel celular, las cuales les confieren a sus embriones resistencia al estrés térmico en condiciones *in vitro*. (15).

El hecho de que no haya habido diferencia en la resistencia a nivel celular al estrés térmico entre las dos razas ovinas, contrasta con lo conocido en bovinos. La falta de diferencias puede ser definitiva; sin embargo, se deben considerar otras posibilidades para evaluarla. En este estudio se determinó la viabilidad celular, después de someter las células a un estrés calórico de 43 C durante 6 h, mientras que en el estudio de Kamwanja et al., 1994 (6), en bovinos, el estrés térmico fue de 45 C durante 3 h. Es posible que la agresión térmica no haya sido de suficiente magnitud para poder ver la diferencia en resistencia. Cabe señalar que los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el presente trabajo fueron superiores a los obtenidos en bovinos por Kamwanja et al., 1994 (6), lo cual indica que la agresión celular fue mayor en este último estudio.

Por otra parte, en este trabajo se midió la viabilidad celular mediante la técnica de formazán, y aunque esta técnica está validada para la evaluación de cultivos celulares, existen otros medios para medir el efecto de un estrés en la viabilidad celular. Se conoce que, en condiciones *in vitro*, el estrés térmico desencadena el mecanismo de apoptosis,



tanto en linfocitos como en embriones (7). En linfocitos se ha observado que un estrés térmico desencadena la apoptosis en una mayor proporción de linfocitos de vacas Holstein y Angus, que en vacas Brahman y Senepol (7). Debido a que el mecanismo de apoptosis se desencadena antes de la muerte celular y que es posible medirlo, se debe considerar esta posibilidad para evaluar la diferencia en resistencia al estrés térmico entre razas.

Otra opción que también se debe evaluar, consiste en medir la respuesta de las células a través de la determinación de la cantidad de la proteína de choque calórico 70 (HSP70) producida por las células expuestas al estrés térmico. Esta proteína se produce en respuesta a la alta temperatura y tiene como función proteger a las proteínas para no sufrir daño por calor debido a su acción como chaperona molecular para restablecer las proteínas dañadas (16, 17,18). En un estudio donde se inyectó mRNA que codifica para la proteína HSP70 en ovocitos de ratón, se incrementó su resistencia al estrés calórico. (19) Se conoce que las células que resisten mejor la alta temperatura, producen mayores cantidades de ésta proteína (20,21). De esta forma, también se debe considerar esta posibilidad para medir la diferencia en la resistencia al estrés térmico a nivel celular entre razas de ovinos.

## **CONCLUSIÓN**

En este estudio no se encontró evidencia que los linfocitos de ovejas adaptadas a temperaturas cálidas (Pelibuey) fueran más resistentes a un estrés calórico que los linfocitos de ovejas adaptadas a climas templados y fríos (Suffolk). Aunque se requiere realizar otros estudios como podrían ser la medición de apoptosis o de HSP70 en estas células y en embriones de estas mismas razas.

## REFERENCIAS

1. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger III CE, Chase CC Jr. Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001; 55: 91-103.
2. Turner HG. Genetic variation of rectal temperature in cows and its relationship to fertility. *Anim Prod* 1982; 35: 401-412.
3. Madalena FF, Lemos AM, Teodoro RL, Barbosa RT, Monteiro JBN. Dairy production and reproduction in Holstein-Friesian and Guzerat crosses. *J Dairy Sci* 1990; 73:1872-1886.
4. Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1998; 49:657-665.
5. Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:349-360.
6. Kamwanja LA, Chase Jr CC, Gutierrez JA, Guerriero VJ, Olson TA, Hammond AC, Hansen PJ. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidants status. *J Anim Sci* 1994; 72: 438-444.
7. Paula-Lopes FF, Chase CC Jr, Al-Katanani YM, Krininger CE III, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. 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* 2003; 125: 285-294.

8. Lindsay DR, Knight TW, Smith JF, Oldham CM. Studies in ovine fertility in agricultural regions of Western Australia: ovulation rate, fertility and lambing performance. *Aust J Agri Res* 1975; 26:189-198.
9. Sawyer GJ. The influence of radiant heat load on reproduction in the Merino ewe. II The relative effects of heating before and after insemination. *Aust J Agric Res* 1979; 30:1143-1149.
10. Navqui SMK, Maurya VP, Gulyani R, Joshi A, Mittal JP. The effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Ruminant Res* 2004; 55:57-63.
11. Ross TT, Goode D, Linnerud AC. Effects of high ambient temperature on respiration rate, rectal temperature, fetal development and thyroid gland activity in tropical and temperate breed of sheep. *Theriogenology* 1985; 24:259.
12. Delgado JV, Perezgrovas R, Camacho M E, Fresno M, Barba C. The Wool-Less Canary Sheep and their relationship with the present breeds in America. *Agri* 2000; 28: 27-34.
13. García, M E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kooppen. México (DF) Universidad Nacional Autónoma de México. 1981.
14. Rodríguez-Cortéz AD. Efecto de la Leptina en la esteroidogénesis y multiplicación en las células de la teca *in vitro*. (tesis de maestría) Mexico, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
15. Hernandez-Ceron J, Chase CC Jr, Hansen PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J Dairy Sci.* 2004; 1:53-8.

16. Al- Katatnani YM and Hansen PJ. Induce thermotolerance in bovine two- cell embryos and role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 62:174-180.
17. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev.* 1997; 2:138-45.
18. Cotto JJ, Morimoto RI. Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochemical Society Symposium Vol.64* 1999 pp.105-118.
19. Hendrey J, Kola I. Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of Hsp70. *Mol Reprod Dev.* 1991; 1:1-8.
20. Guerriero VJr, Rapes DA. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J Anim Sci* 1990; 68:2779-2783.
21. Edwards JL, King W A, Kawarsky SJ, Ealy A D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology* 2001; 55:209-223