

DETECCIÓN DE ARN MENSAJEROS (ARNM) CONSTITUTIVOS Y RELACIONADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO EN BOVINOS Y OVINOS

Orozco-Lucero E^{1*}, Molina-García M¹, Cárdenas-Ochoa G¹, Orozco-Galindo B¹, Bojórquez-Salcedo M¹,
Chávez-Solano M², Zavala-Tapia J², Beristain-Ruiz D¹

¹Departamento de Ciencias Veterinarias, ²Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB), Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ), Cd. Juárez, México. * Autor responsable: Ernesto Orozco-Lucero (ernesto.orozco@uacj.mx).

RESUMEN

Introducción. El perfil de transcritos mensajeros (ARNm) de rumiantes tiene aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. El objetivo fue amplificar por PCR punto-final secuencias (obtener amplicones) correspondientes a transcritos bovinos y ovinos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo. **Materiales y Métodos.** Se obtuvieron ovarios bovinos de rastro y sangre ovina por punción venosa. Se diseccionó el epitelio ovárico bovino, se congeló con nitrógeno líquido y se homogenizó con mortero/jeringa-aguja. El ARN ovárico se extrajo con columna de sílica. Se extrajo ARN total sanguíneo ovino mediante *red blood lysis buffer* (enriquece el material leucocitario)/fenol-guanidino (Liu *et al.*, 2015). Ambos ARNs se resuspendieron en H₂O/DEPC, se cuantificaron espectrofotométricamente (A₂₆₀) y su pureza se verificó (A_{260/280}). Se retrotranscribió con oligo(dT) y se verificó la concentración y pureza del ADN complementario (ADNc). Los primers para transcritos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo se diseñaron con PrimerQuest, con parámetros que permiten generar amplicones por PCR punto-final y cuantificarlos por PCR tiempo-real. Alternativamente, las secuencias de los primers se obtuvieron de la literatura. Se realizó PCR punto-final. El tamaño de los amplicones se verificó en gel de agarosa/EtBr. Los amplicones se purificaron (columna de sílica) y se envió a secuenciar su ADN. Las secuenciaciones se analizaron por BLASTn/refseq_rna para bovino u ovino (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). **Resultados y Discusión.** Se obtuvieron por PCR punto-final amplicones del tamaño esperado (102-287 pb) para los transcritos correspondientes de rumiante. La especificidad de la secuencia se corroboró mínimo en un amplicón para cada transcrito correspondiente. Por tanto, se detectaron por PCR punto-final transcritos constitutivos (bovino: *ACTB*, *CHUK*, *B2M*, *MYL6*, *PPIA*; ovino: *YWHAZ*) y relacionados con estrés oxidativo (bovino: *DJ-1*, *KEAP1*, *PINK1*; ovino: *NRF2*; nuevo reporte experimental aquí). Dado el diseño de los primers, como los resultados de PCR punto-final, estos primers serán la base para analizar los transcritos correspondientes por PCR tiempo-real (Ponchel *et al.*, 2003). **Conclusiones.** Se detectaron, mediante PCR punto-final, transcritos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo en muestras ováricas y sanguíneas bovinas y ovinas, respectivamente. Esta estrategia servirá como base para PCR tiempo-real de dichos transcritos en todo tipo celular bovino y ovino, con potencial para la comprensión de su fisiología, o en aplicaciones biomédicas, biotecnológicas y de producción animal en estas especies.

Palabras clave: *estrés oxidativo, rumiante, transcrito.*

INTRODUCCIÓN

Los procesos oxidativos son parte normal de la fisiología celular. No obstante, cuando la oxidación celular sobrepasa los niveles que pueden ser regulados por la célula se genera estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede generar estragos a nivel celular, tisular y sistémico en animales, incluyendo silvestres, domésticos y humanos. Si bien, en las últimas décadas se ha investigado sobre el estrés oxidativo en los sistemas animales, el conocimiento al respecto aún dista de estar completo (Repici y Giorgini, 2019). Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos

reguladores del estrés oxidativo en animales todavía cuenta con potenciales aplicaciones biotecnológicas y de salud y producción animal, así como en el uso de animales domésticos como modelos biomédicos. En relación al último aspecto, reportes como el de Lim *et al.* (2021) han demostrado que el bovino es un excelente modelo de estudio para humanos, lo que denota el valor de los rumiantes como modelos de estudio biomédico.

Dolgacheva *et al.* (2019) señalan que la respuesta celular al estrés oxidativo comprende complejas vías moleculares que incluyen proteínas con variadas funciones como: sensores de estrés, reguladores directos de especies reactivas de oxígeno, chaperonas, reguladores de la transcripción, glioxalinas, proteasas, adaptadores, reguladores de ubiquitinación-degradación de otras proteínas y proteínas quinasa. Parte fundamental de la maquinaria celular de la vía de la respuesta al estrés oxidativo está constituida por: DJ-1 (*protein deglycase DJ-1*; PARK7, *parkinsonism associated deglycase 7*), proteína multifuncional que orquesta en gran medida la respuesta contra el estrés oxidativo; KEAP1 (*Kelch like ECH associated protein 1*), proteína inhibidora del factor de transcripción NRF2 (*NFE2-related factor 2*; NFE2L2, *nuclear factor, erythroid-derived 2-like*), el cual regula de manera importante la expresión génica durante la respuesta contra el estrés oxidativo; y PINK1 (*PTEN induced kinase 1*), proteína quinasa que regula la actividad de numerosas proteínas importantes en la respuesta contra el estrés oxidativo (Dolgacheva *et al.*, 2019; Repici y Giorgini, 2019).

Considerando lo ya mencionado, los genes y transcritos que codifican para las proteínas DJ-1, KEAP1 y PINK1 son de suma importancia para el estudio del estrés oxidativo. En consecuencia, la investigación de los niveles de los transcritos *DJ-1*, *KEAP1* y *PINK1* es fundamental en dicha área. Esto se debe a que una alternativa robusta a la exploración de la expresión génica a nivel de proteína es la exploración a nivel de transcrito. Por ejemplo, a través de PCR cuantitativa, o también denominada PCR tiempo-real (Kuang *et al.*, 2018).

Vandesompele *et al.* (2002) hacen hincapié en la necesidad de controlar por la cantidad original de muestra en experimentos de PCR tiempo-real, para evitar sesgo en la cuantificación de transcritos problema (de interés). Dicho control cuantitativo consiste en generar un factor de normalización a cada muestra sometida a PCR tiempo-real, por medio de la cuantificación de transcritos constitutivos, o también denominados calibradores o *housekeeping*. Los transcritos constitutivos frecuentemente corresponden a aquellos que codifican proteínas con funciones metabólicas o estructurales importantes en la célula, como para tener una expresión génica robusta. No obstante, en este tipo de experimentos es crucial cerciorarse de la estabilidad del transcrito entre muestras. Es decir, asegurarse de que las condiciones experimentales por sí mismas no modifican los niveles del transcrito constitutivo (Vandesompele *et al.*, 2002). En bovinos (Cagnone *et al.*, 2012; Cagnone y Sirard, 2014) y ovinos (Masala *et al.*, 2018) algunos transcritos constitutivos frecuentemente utilizados para calibrar o normalizar experimentos de PCR tiempo-real son: *ACTB* (*actin beta*), *CHUK* (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*), *B2M* (*beta-2-microglobulin*), *MYL6* (*myosin light chain 6*), *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*) e *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*). Numerosos trabajos han calibrado datos de PCR tiempo-real empleando un factor de normalización generado a partir de un solo transcrito constitutivo. A pesar de ello, para disminuir el sesgo en este tipo de experimentos se requiere usar al menos dos transcritos constitutivos estables entre muestras para calcular más precisamente los niveles de transcritos problema. Por ende, contar con una serie de transcritos constitutivos como candidatos en un modelo experimental es de gran ventaja (Vandesompele *et al.*, 2002). Por otra parte, debe tomarse en cuenta que la generación de productos de amplificación (amplicones), mediante PCR punto-final, es un paso importante en la preparación de la metodología para cuantificar transcritos por PCR tiempo-real sin sondas (Ponchel *et al.*, 2003).

El objetivo de esta investigación fue amplificar por PCR punto-final secuencias (para obtener amplicones) correspondientes a transcritos bovinos y ovinos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo, como un primer paso hacia la futura evaluación de los mismos transcritos por PCR cuantitativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron ovarios de bovino sacrificado en rastro. Se diseccionó el epitelio ovárico y se congeló sobre mortero con nitrógeno líquido. Enseguida, el epitelio se pulverizó con una combinación de maceración con mortero y pase del homogenado por jeringa y aguja. El ARN ovárico total se extrajo con una columna comercial de sílica para aislamiento de ARN, según las instrucciones del fabricante. La sangre ovina (1.5-2 mL) se obtuvo por punción venosa de una adulta en pie, en la cual la sangre se recibió en un tubo al vacío conteniendo EDTA. Se extrajo ARN total sanguíneo por medio del *red blood lysis buffer*, el cual permite enriquecer el material leucocitario (Liu *et al.*, 2015), en combinación con un reactivo comercial a base de fenol-guanidino.

Los ARNs de ambas especies se resuspendieron en H₂O/0.1% (v/v) dietilpirocarbonato (DEPC), se cuantificaron (para dosificar posteriormente) con espectrofotómetro a 260 nm de absorbancia (A₂₆₀), mientras que su pureza se evaluó mediante la proporción A_{260/280}. Para cada especie se seleccionó un ARN con A_{260/280} ≥ 1.75. Los ARNs totales seleccionados se incubaron con oligo(dT) para hibridarse con los transcritos mensajeros. Se retrotranscribió según las instrucciones del fabricante del kit comercial y se verificó la concentración (para dosificar posteriormente) y pureza (≥ 1.8) del ADN complementario (ADNc).

Los primers, cuyas secuencias blanco corresponden a transcritos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo, se diseñaron con PrimerQuest. En este software se emplearon parámetros (longitud de primer = 19-24 nucleótidos; longitud de amplicón = 150-350 pb; T_m = 54-62°C; GC = 45-55%) que permiten generar amplicones por PCR punto-final, así como cuantificarlos por PCR tiempo-real sin sondas (p. ej., SYBR Green). Además, la especificidad teórica de los primers se evaluó con el algoritmo BLASTn/refseq_rna, empleando bases de datos específicas para *Bos taurus* u *Ovis aries* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Con esta estrategia se buscó indicios de hibridación inespecífica de los primers en secuencias correspondientes a transcritos de la especie respectiva. Únicamente se utilizaron primers con los que se corroboró su especificidad teórica para el transcrito blanco a analizar en este trabajo. Alternativamente, las secuencias de los primers se obtuvieron de la literatura (Cagnone *et al.*, 2012; Cagnone y Sirard, 2014). Los detalles de los primers, así como las identidades (número de acceso en GenBank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) de sus secuencias blanco (transcritos) se muestran en el Cuadro 1. Para algunos transcritos se evaluó un solo par de primers; en otros, dos pares de primers.

Cuadro 1. Detalles de los primers

Tipo de transcr	Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Ft	Tm (°C)	sp	Número de acceso en GenBank
Co	<i>ACTB_Fw1</i>	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCT	1	59.5	<i>Bt</i>	NM_173979.3
Co	<i>ACTB_Rv1</i>	GCCATGCCAATCTCATCTCGTT	1	57.8	<i>Bt</i>	
Co	<i>CHUK_Fw1</i>	TGATGGAATCTCTGGAACAGCG	1	57	<i>Bt</i>	NM_174021.2
Co	<i>CHUK_Rv1</i>	TGCTTACAGCCCAACAACCTTGC	1	58.6	<i>Bt</i>	
Co	<i>B2M_Fw1</i>	AGACACCCACCAGAAGATGG	1	56.6	<i>Bt</i>	NM_173893.3
Co	<i>B2M_Rv1</i>	GGGGTTGTTCCAAAGTAACG	1	54	<i>Bt</i>	
Co	<i>MYL6_Fw1</i>	TTCGGGTGTTTGACAAGGAAGGGA	2	60.5	<i>Bt</i>	NM_175780.1
Co	<i>MYL6_Rv1</i>	ATCCTCAGCCATTCAGCACCAT	2	58.9	<i>Bt</i>	
Co	<i>PPIA_Fw1</i>	TTTATGTGCCAGGGTGGTGACT	2	58.7	<i>Bt</i>	NM_178320.2
Co	<i>PPIA_Rv1</i>	TCTTGCTGGTCTTGCCATTCT	2	59	<i>Bt</i>	
E	<i>DJ-1_Fw1</i>	CGGAAGTCATTACAGCTACTC	N	52.6	<i>Bt</i>	NM_001015572.1
E	<i>DJ-1_Rv1</i>	AGGAGGATGGCTTCTCAA	N	52.9	<i>Bt</i>	
E	<i>DJ-1_Fw2</i>	CATTACAGCTACTCCGAGAAC	N	52.6	<i>Bt</i>	NM_001015572.1
E	<i>DJ-1_Rv2</i>	GCTTCTCAACACAGTGACC	N	53.5	<i>Bt</i>	
E	<i>KEAP1_Fw1</i>	GAGTGTTACTACCCAGAGAG	N	51.3	<i>Bt</i>	NM_001101142.1
E	<i>KEAP1_Rv1</i>	AAGAACGTAGATCCTTCCC	N	51.1	<i>Bt</i>	
E	<i>KEAP1_Fw2</i>	TACCCAGAGAGAAACGAGTG	N	53.5	<i>Bt</i>	NM_001101142.1
E	<i>KEAP1_Rv2</i>	TAGATCCTTCCCTGGTGAAC	N	53.5	<i>Bt</i>	
E	<i>PINK1_Fw1</i>	CTGGAGGAGTATCTGATCG	N	51.2	<i>Bt</i>	NM_001099701.2
E	<i>PINK1_Rv1</i>	CTGGCTCATTGTGCTAAAG	N	51.3	<i>Bt</i>	
Co	<i>YWHAZ_Fw2</i>	GAAAGGGATTGTGGACCAG	N	51	<i>Oa</i>	NM_001267887.1
Co	<i>YWHAZ_Rv2</i>	GGCTTCATCAAATGCTGTCT	N	51	<i>Oa</i>	
E	<i>NRF2_Fw2</i>	GATTCTGACTCTGGCATTTC	N	51	<i>Oa</i>	XM_015093345
E	<i>NRF2_Rv2</i>	GGACTTACAGGCACTTCT	N	51.3	<i>Oa</i>	

Abreviaturas: 1 (Cagnone *et al.*, 2012); 2 (Cagnone y Sirard, 2014); *ACTB* (*actin beta*); *B2M* (*beta-2-microglobulin*); *Bt* (*Bos taurus*); *CHUK* (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*); Co (constitutivo); *DJ-1* (*protein deglycase DJ-1*); E (estrés oxidativo); Ft (fuente); Fw (*forward*); *KEAP1* (*Kelch like ECH associated protein 1*); *MYL6* (*myosin light chain 6*); N (nuevo diseño); *NRF2* (*NFE2-related factor 2*; *NFE2L2*, *nuclear factor, erythroid-derived 2-like*); *Oa* (*Ovis aries*); *PINK1* (*PTEN induced kinase 1*); *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*); Rv (*reverse*); sp (especie); Tm (temperatura de fusión); transcr (transcrito); e *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*).

Tipo de transcr	Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Ft	Tm (°C)	sp	Número de acceso en GenBank
Co	<i>YWHAZ_Fw1</i>	AGAAAGCCTGCTCTCTTG	N	52	<i>Oa</i>	NM_001267887.1
Co	<i>YWHAZ_Rv1</i>	CTTCGTCTCCTTGGGTATC	N	52	<i>Oa</i>	
E	<i>NRF2_Fw1</i>	CCAGTCACTCTCTGAACTT	N	51.2	<i>Oa</i>	XM_015093345
E	<i>NRF2_Rv1</i>	GGGCACTATCTATCTCTTCC	N	51.6	<i>Oa</i>	
E	<i>NRF2_Fw2</i>	GATTCTGACTCTGGCATTTC	N	51	<i>Oa</i>	XM_015093345
E	<i>NRF2_Rv2</i>	GGACTTACAGGCACTTCT	N	51.3	<i>Oa</i>	

Abreviaturas: 1 (Cagnone *et al.*, 2012); 2 (Cagnone y Sirard, 2014); *ACTB* (*actin beta*); *B2M* (*beta-2-microglobulin*); *Bt* (*Bos taurus*); *CHUK* (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*); Co (constitutivo); *DJ-1* (*protein deglycase DJ-1*); E (estrés oxidativo); Ft (fuente); Fw (*forward*); *KEAP1* (*Kelch like ECH associated protein 1*); *MYL6* (*myosin light chain 6*); N (nuevo diseño); *NRF2* (*NFE2-related factor 2*; *NFE2L2*, *nuclear factor, erythroid-derived 2-like*); *Oa* (*Ovis aries*); *PINK1* (*PTEN induced kinase 1*); *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*); Rv (*reverse*); sp (especie); Tm (temperatura de fusión); y transcr (transcrito).

El cocktail de reacción empleado se muestra en el Cuadro 2. Se realizó PCR punto-final según el programa estipulado en el Cuadro 3. El tamaño de los amplicones se verificó por electroforesis en gel al 1-1.8% (p/v) agarosa, conteniendo 0.375 µg/mL bromuro de etidio (EtBr). Los amplicones se purificaron con una columna comercial de sílica para limpieza de productos de PCR. Los amplicones purificados se enviaron a una unidad de servicio externo para secuenciar su ADN. Al igual que con la evaluación de la especificidad teórica de los primers, los resultados de secuenciación de amplicones se analizaron con el algoritmo BLASTn/refseq_rna, comparando con bases de datos correspondientes a *Bos taurus* u *Ovis aries* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Cuadro 2. Detalles del cocktail de PCR

Componente	Volumen	Concentración/cantidad final
PCR Master Mix (2X)	10 µL	1X
Primer-Fw (5 µM)	1.1 µL	275 nM
Primer-Rv (5 µM)	1.1 µL	275 nM
ADNc (50 ng/µL)	1.5 µL	75 ng
Agua inyectable	6.3 µL	---
Volumen total	20 µL	---

Abreviaturas: ADNc (ADN complementario); Fw (*forward*); µL (microlitros); µM (micromolar); ng (nanogramos); nM (nanomolar); Rv (*reverse*); y X (concentrado).

Cuadro 3. Detalles del programa de PCR punto-final

Núm. ciclos	Fase	Tiempo	T° (°C)
1	Precaentamiento	3' 00"	95
35	Desnaturalización	0' 30"	95
	Alineamiento	0' 30"	Tm
	Extensión	0' 30"	72
1	Extensión final	8' 00"	72
1	Mantenimiento	∞	4

Abreviaturas: ' (minutos); " (segundos); ∞ (infinito); T° (temperatura); y Tm (temperatura de fusión).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se generaron por PCR punto-final amplicones de los tamaños esperados (entre 102 y 287 pb) para los transcritos correspondientes de bovino y ovino (Cuadro 4). Aunque la técnica de PCR efectuada con primers diseñados cuidadosamente cuenta con una alta especificidad, es necesario analizar por secuenciación si el amplicón realmente

corresponde a la secuencia blanco propuesta al inicio de un estudio. Esto se debe a que, a pesar de haber empleado primers de calidad y teóricamente específicos, aún existe una baja probabilidad de haber amplificado por PCR un producto inespecífico. Por este motivo, los amplicones generados en esta investigación se purificaron y analizaron por secuenciación. La especificidad de la secuencia se corroboró al menos en un amplicón para cada transcrito correspondiente.

Cuadro 4. Tamaño esperado y observado de amplicones

Tipo de transcr	Nombre	sp	Tamaño (pb)
Co	<i>ACTB</i> _par1	<i>Bt</i>	102
Co	<i>CHUK</i> _par1	<i>Bt</i>	181
Co	<i>B2M</i> _par1	<i>Bt</i>	235
Co	<i>MYL6</i> _par1	<i>Bt</i>	228
Co	<i>PPIA</i> _par1	<i>Bt</i>	287
E	<i>DJ-1</i> _par1	<i>Bt</i>	275
E	<i>KEAP1</i> _par1	<i>Bt</i>	246
E	<i>PINK1</i> _par2	<i>Bt</i>	193
Co	<i>YWHAZ</i> _par2	<i>Oa</i>	185
E	<i>NRF2</i> _par2	<i>Oa</i>	287

Abreviaturas: *ACTB* (*actin beta*); *B2M* (*beta-2-microglobulin*); *Bt* (*Bos taurus*); *CHUK* (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*); Co (constitutivo); *DJ-1* (*protein deglycase DJ-1*); E (estrés oxidativo); *KEAP1* (*Kelch like ECH associated protein 1*); *MYL6* (*myosin light chain 6*); *NRF2* (*NFE2-related factor 2*; *NFE2L2*, *nuclear factor, erythroid-derived 2-like*); *Oa* (*Ovis aries*); par (número de par de primers evaluado); pb (pares de bases); sp (especie); *PINK1* (*PTEN induced kinase 1*); *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*); Tm (temperatura de fusión); transcr (transcrito); *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*).

Cabe resaltar que el transcrito *NRF2* ovino no había sido previamente reportado experimentalmente, sino solo predicho bioinformáticamente (número de acceso en GenBank: XM_015093345). En consecuencia, la generación

en este trabajo de un amplicón correspondiente a dicho transcrito de esta especie constituye un nuevo reporte experimental para el transcrito *NRF2* en *Ovis aries*. Este hallazgo podría contribuir en el avance de las investigaciones sobre el estrés oxidativo en ovinos.

Por todo lo anterior, en este trabajo se detectaron por PCR punto-final transcritos constitutivos (bovino: *ACTB*, *CHUK*, *B2M*, *MYL6*, *PPIA*; ovino: *YWHAZ*) y relacionados con estrés oxidativo (bovino: *DJ-1*, *KEAP1*, *PINK1*; ovino: *NRF2*). Debido al diseño de los primers (doble propósito: generar amplicones con termocicladores ya sea de PCR punto-final o PCR tiempo-real, así como cuantificarlos con termocicladores de PCR tiempo-real), además de los resultados satisfactorios de PCR punto-final, estos mismos primers podrán utilizarse para monitorear por PCR tiempo-real sin sondas (p. ej., protocolos basados en SYBR Green) los niveles de los transcritos correspondientes en grandes y pequeños rumiantes. Ya que la amplificación robusta y específica por PCR punto-final es un requisito indispensable para cualquier protocolo de PCR, la efectividad mostrada por los primers en el presente estudio permitirá su uso en futuros trabajos con PCR tiempo-real sin sondas (Ponchel *et al.*, 2003). En este último aspecto, la evaluación cuantitativa de transcritos constitutivos permitirá calibrar los niveles de transcritos problema (Vandesompele *et al.*, 2002), en este caso relacionados con estrés oxidativo en bovinos y ovinos. Remarcablemente, como lo indican Vandesompele *et al.* (2002), para la calibración o normalización de datos de PCR cuantitativa es más recomendable una estrategia basada en un factor de normalización de al menos dos de los transcritos constitutivos más estables entre muestras. Dicha estrategia basada en varios transcritos constitutivos estables, en lugar de normalizar basándose en un solo transcrito constitutivo estable, disminuye el sesgo en la cuantificación por PCR tiempo-real (Vandesompele *et al.*, 2002). La detección de transcritos problema (relacionados con el estrés oxidativo) en esta investigación, abre la posibilidad de aportar al análisis de la expresión génica de las vías del estrés oxidativo, en distintos tipos de célula en bovinos y ovinos. Asimismo, la detección de varios transcritos constitutivos bovinos en este trabajo ayudará a disminuir el sesgo en estudios cuantitativos de transcritos problema, por lo pronto en la especie mencionada. Todo lo anterior podría tener subsecuentes aplicaciones en diversos campos de investigación en bovinos y ovinos.

CONCLUSIONES

Mediante PCR punto-final se detectaron transcritos constitutivos y relacionados con estrés oxidativo en epitelio ovárico de bovino y en sangre de ovino. Esto incluyó un nuevo reporte experimental de un transcrito ovino. El uso de estos primers permitirá el análisis de tales transcritos por PCR cuantitativa en cualquier tipo celular de bovinos y ovinos. Lo anterior tendrá un uso potencial en investigaciones en grandes y pequeños rumiantes, ya sea empleando estas especies como modelos biomédicos, para un mayor entendimiento de la fisiología en bovinos y ovinos, así como en estudios aplicados de biotecnología y producción animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cagnone GL, Dufort I, Vigneault C, Sirard MA (2012). Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biol Reprod.* 86(2):50. DOI: 10.1095/biolreprod.111.094391.
- Cagnone GL, Sirard MA (2014). The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology.* 81(5):712-722.e1-3. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.005.

- Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, Zinchenko VP, Abramov AY (2019). Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr.* 51(3):175-188. DOI: 10.1007/s10863-019-09798-4.
- Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One.* 13(5):e0196438. DOI: 10.1371/journal.pone.0196438.
- Lim JC, Grey AC, Vaghefi E, Nye-Wood MG, Donaldson PJ (2021). Hyperbaric oxygen as a model of lens aging in the bovine lens: The effects on lens biochemistry, physiology and optics. *Exp Eye Res.* 212:108790. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108790.
- Liu X, Li Q, Wang X, Zhou X, Liao Q, He X, Zhang J, Sun J, Wu J, Cheng L, Zhang Y (2015). Comparison of six different pretreatment methods for blood RNA extraction. *Biopreserv Biobank.* 13(1):56–60. DOI: 10.1089/bio.2014.0090.
- Masala L, Ariu F, Bogliolo L, Bellu E, Ledda S, Bebbere D (2018). Delay in maternal transcript degradation in ovine embryos derived from low competence oocytes. *Mol Reprod Dev.* 85(5):427-439. DOI: 10.1002/mrd.22977.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (2022a). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consultado: 13/08/2022).
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (2022b). GenBank. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consultado: 22/05/2022).
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 3:18. DOI: 10.1186/1472-6750-3-18.
- Repici M, Giorgini F (2019). DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical insights and therapeutic perspectives. *J Clin Med.* 8(9):1377. DOI: 10.3390/jcm8091377.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.