



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FMVZ-UNAM

PARTICIPACIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES DURANTE LA MADURACIÓN  
IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS SOMETIDOS A ESTRÉS TÉRMICO

T E S I S DE MAESTRÍA  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SANDRA HERNÁNDEZ GARDUÑO

TUTOR PRINCIPAL:  
MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA FMVZ UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
MARÍA ANTONIETA COTE VÉLEZ IBT UNAM  
ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR FMVZ UNAM

MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

1. GENERALIDADES.....	1
1.1 FOLICULO.....	1
1.2 DESARROLLO FOLICULAR.....	1
1.2.1 INICIO DE LA FOLICULOGENESIS.....	1
1.2.2 FOLICULO PREANTRAL.....	1
1.2.3 FOLICULO ANTRAL.....	2
1.3 CICLO ESTRAL Y CINETICA FOLICULAR.....	2
1.4 DESARROLLO DEL OVOCITO.....	4
1.5 MADURACIÓN DEL OVOCITO.....	5
1.5.1 MADURACIÓN NUCLEAR DEL OVOCITO.....	6
1.5.2 MADURACIÓN CITOPLASMATICA.....	8
1.6 MADURACIÓN IN VITRO.....	9
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 EFECTOS DEL ESTRÉS TÉRMICO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.....	11
2.2 LOS GLUCOCORTICOIDES COMO MODERADORES DEL ESTRÉS.....	13
2.3 RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES.....	15
2.3.1 ESTRUCTURA.....	15
2.3.2 ACTIVACIÓN.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. MATERIAL Y METODOS.....	20
7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
7.2 COLECCIÓN Y TRANSPORTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
7.3 MADURACIÓN in vitro DE OVOCITOS BOVINOS.....	20
7.3.1 OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS BOVINOS.....	20
7.3.2 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS.....	21
7.3.3 TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS OVOCITOS BOVINOS PARA SU MADURACIÓN .....	22
7.3.4 MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS SIN ESTRÉS TÉRMICO.....	22
7.3.5 MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON ESTRÉS TÉRMICO.....	23
7.4 LOCALIZACIÓN DEL GR POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	23
7.5 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR WESTERN BLOT.....	24
7.6 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.....	25
7.6.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	26

7.7 ANALISIS ESTADISTICO.....	26
8. RESULTADOS.....	27
8.1 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS.....	27
8.2 LOCALIZACIÓN DEL GR POR MEDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	28
8.2.1 LOCALIZACIÓN DEL GR OVOCITOS INMADUROS.....	29
8.2.2 LOCALIZACIÓN DEL GR EN OVOCITOS MADURADOS SIN ESTRÉS TÉRMICO (38.5°C).....	30
8.2.3 LOCALIZACIÓN DEL GR EN OVOCITOS MADURADOS CON ESTRÉS TÉRMICO (41°C).....	32
8.3 EVALUACIÓN MORFOLOGICA DE OVOCITOS MADURADOS BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.....	32
8.4 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR WESTERN BLOT.....	34
8.5 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN.....	35
8.5.1 OVOCITOS INMADUROS.....	35
8.5.2 OVOCITOS MADURADOS SIN ESTRÉS TERMICO (38.5°C).....	36
8.5.3 OVOCITOS MADURADOS CON ESTRÉS TERMICO (41°C).....	40
9. DISCUSIÓN.....	44
9.1 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS.....	44
9.2 LOCALIZACIÓN DEL GR EN EL OVOCITO BOVINO.....	45
9.3 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR MEDIO DE WESTERN BLOT.....	47
9.4 EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL ESTRÉS TERMICO SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS BOVINOS .....	49
10. CONCLUSION.....	54
11. PERSPECTIVAS.....	55
12. LITERATURA CITADA.....	56

## **ABREVIACIONES**

GC: Glucocorticoides

GR: Receptor a Glucocorticoides

DMSO: Dimetilsulfoxido

DEX: Dexametasona

MET: Microscopia Electrónica de Transmisión

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona Luteinizante

VG: Vesícula Germinal

ERK1/2: Cinasa de Regulación Extracelular 1/2

MPF: Factor Promotor de la Maduración

CDK1: Cinasa de p34cdc2

MI: Metafase I

MII: Metafase II

RVG: Ruptura de Vesícula Germinal

CCO: Complejo Cumulus Ovocito

AMPc: Adenosin Monofosfato

MAPK: Proteína Cinasa Activadora de Mitogeno

IBMX: Isobutil Metilxantina

CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina

ACTH: Hormona Adrenocorticotropica

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas

GR $\alpha$ : Receptor a Glucocorticoides alfa

GR $\beta$ : Receptor a Glucocorticoides beta

HSP: Proteína de Choque Térmico

GRE: Elementos de Respuesta a Glucocorticoides

CC: Células del Cumulus

CG: Células de la Granulosa

ZP: Zona Pelucida

GL: Gota Lipídica

## RESUMEN

El estrés térmico es considerado un importante factor en la reducción de la fertilidad del ganado bovino. In vitro el incremento en la temperatura (40-42°C), durante la maduración de ovocitos, ha sido relacionado con daños o cambios que afectan el potencial de desarrollo, como alteraciones en la función de las células del cumulus, del citoplasma y de la configuración de la cromatina. Considerando que durante cualquier estado de estrés se producen importantes cantidades de glucocorticoides (GC) se ha propuesto que estos pueden estar mediando la respuesta al estrés térmico y que dichos eventos pueden determinar la apropiada maduración del ovocito. La presente investigación tuvo como objetivo determinar si los GC, vía su receptor, afectan la maduración ultraestructural de los ovocitos bovinos sometidos a estrés térmico. Para ello se maduraron ovocitos de bovino bajo una temperatura fisiológica (38.5°C) y con estrés térmico (41°C), los cuales se incubaron en presencia de un GC sintético (Dexametasona) y dimetilsulfoxido (DMSO), ambos a una concentración de 10<sup>-7</sup> M, por 24 horas. Por Western blot se realizó la identificación del receptor, su localización por inmunofluorescencia y la evaluación ultraestructural se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET). Los resultados mostraron que los ovocitos maduros presentaron una mayor concentración del GR que los inmaduros. In vitro bajo condiciones de estrés térmico, no se observó que los GC indujeran la translocación del GR del citoplasma al núcleo. El análisis ultraestructural mostro que los ovocitos sometidos a estrés térmico, control, DMSO y Dexametasona, presentaban pérdida de la integridad de las células del cumulus y daños en su ultraestructura a nivel nuclear y citoplasmático. En cuanto a lo que se refiere a la ultraestructura del ovocito numerosas vacuolas se observaron en el ooplasma, dando lugar a la formación de grandes espacios vacíos, también se observó material electrodenso, mientras que de manera similar las mitocondrias mostraron alteraciones encontrándose en la periferia de la célula. Los ovocitos madurados bajo condiciones fisiológicas (38.5°C) mostraron una adecuada ultraestructura, esto incluyó a los incubados con dexametasona. En conclusión, los resultados obtenidos el presente estudio parecen indicar que los glucocorticoides tienen poca o ninguna influencia durante la maduración de los ovocitos de bovino cultivados bajo condiciones de estrés térmico (41.0 ° C) ya que los cambios ultraestructurales observados parecen estar más relacionados al efecto de la temperatura y posiblemente al tiempo de incubación (24 h).

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 FOLICULO OVARICO

El folículo es la unidad morfológica y funcional del ovario, el folículo maduro está formado por una capa exterior de células tecales, que envuelve por fuera a la membrana basal y a la capa interna de células de la granulosa. A su vez, las células de la granulosa rodean y confinan al complejo formado por el ovocito y las células del cumulus (Lattanzi, 2010). En el caso del bovino, la formación folicular se completa durante la vida fetal (Garverick *et al.*, 2007; Scaramuzzi *et al.*, 2011).

### 1.2 DESARROLLO FOLICULAR

El folículo primordial en bovinos mide unos 40  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal y Yossefi, 1997) y está formado por un ovocito de 30  $\mu\text{m}$  (Picton, 2001) rodeado por una capa de células de la pregranulosa no cuboides (planas) y una membrana basal; este permanecerá quiescente hasta que se dispara su crecimiento (Lattanzi, 2010).

#### 1.2.1 INICIO DE LA FOLICULOGENESIS

Con el inicio de la foliculogénesis a partir del día 140 de gestación en bovinos (Russe, 1983), las células de la granulosa de un folículo primordial muestran una morfología cuboide y un incremento en su número, convirtiéndose en un folículo primario (Russe, 1983; Hyttel *et al.*, 1997). Junto con la transición de las células de la granulosa a morfología cuboide el ovocito comienza la secreción de la matriz glicoproteica extracelular, la zona pelúcida (Fair *et al.*, 1995; Picton, 2001; Russe, 1983); además las células de la granulosa establecen un íntimo contacto el ovocito a través de uniones comunicantes o “gap junctions” (Hirshfield, 1994).

#### 1.2.2 FOLICULO PREANTRAL

Cuando el folículo primario entra en la fase de crecimiento, el ovocito aumenta de tamaño y las células de la granulosa comienzan a proliferar. Se origina entonces un folículo multilaminado denominado folículo secundario. (Lattanzi, 2010).

Aunque los folículos preantrales son capaces de responder a gonadotrofinas, su crecimiento es independiente de ellas y parece estar regulado por mecanismos



intraováricos e intrafolículos. La proliferación de las células de la granulosa, la diferenciación e hipertrofia de las células tecales y el crecimiento del ovocito determinan el incremento en el diámetro del folículo. En bovinos aparecen por primera vez alrededor del día 210 de gestación y alcanzan los 150  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. En estos folículos el ovocito mide entre 50 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro (Russe, 1983; Hyttel *et al*, 1997).

### 1.2.3 FOLICULO ANTRAL

Una vez que uno de los folículos deja el pool de folículos preantrales este se encuentra comprometido a desarrollarse de manera dependiente de gonadotropinas (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Durante el desarrollo folicular, la formación del antro folicular representa el comienzo de la transición de la regulación primaria intrafolicular a la regulación extraovárica (Lattanzi, 2010).

El crecimiento del folículo antral, a diferencia de lo que ocurre en los estadios anteriores, es rápido, y está caracterizado por la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, la diferenciación de la teca, y la acumulación de fluido folicular (Lattanzi, 2010).

En este momento el desarrollo de los folículos es considerado un proceso jerárquico (Scaramuzzi *et al.*, 2011), apareciendo en el bovino alrededor del día 230 de gestación (Russe, 1983) midiendo entre 120 y 280  $\mu\text{m}$  (Lussier *et al*, 1987; Monniaux *et al*, 1997), lo cual permite que el ovocito siga creciendo hasta un diámetro 120  $\mu\text{m}$  (Lattanzi, 2010).

### 1.3 CICLO ESTRAL Y CINÉTICA FOLICULAR

El crecimiento de los folículos antrales involucra tres eventos principales: reclutamiento, selección y dominancia (Ginther *et al*, 2001b).

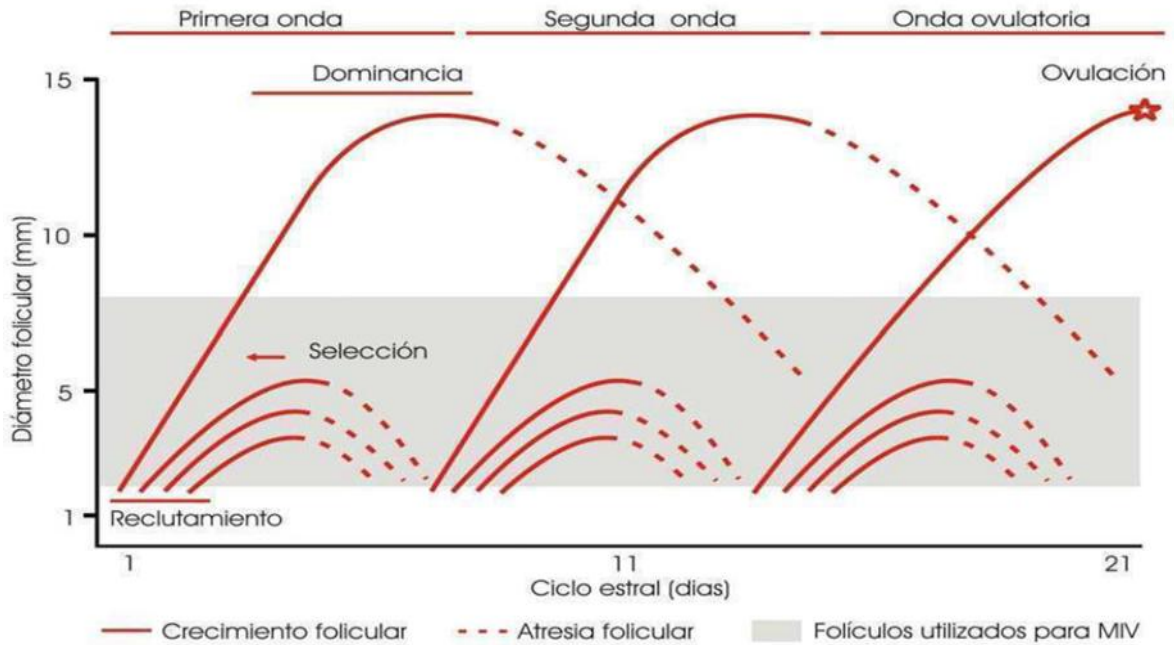
Los folículos son reclutados en grupos de crecimiento sincronizados, llamados cohortes, en respuesta a un incremento moderado en el nivel de FSH plasmática. Los folículos reclutados en un momento dado serían los más sensibles a dicho incremento debido a la mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa (Fortune, 1994).

La selección es el proceso por el cual un solo folículo continúa el crecimiento mientras que el resto de los folículos reclutados cesa el crecimiento y degenera en atresia. Este proceso tiene una primera fase de crecimiento común durante la cual la concentración de FSH plasmática declina paulatinamente debido a la inhibición que ejercen sobre la hipófisis hormonas secretadas por la cohorte de folículos en crecimiento (estradiol e inhibinas). Luego, las tasas de crecimiento de los folículos más grandes comienzan a diferenciarse apareciendo un folículo de mayor tamaño o dominante. Este folículo ejerce dominancia sobre el resto porque es más sensible a la FSH y produce más hormonas que inhiben la secreción de FSH, cuya concentración plasmática disminuye a niveles insuficientes para el desarrollo del resto de los folículos subordinados que degeneran en atresia (Lattanzi, 2010).

Este patrón de crecimiento de los folículos antrales (reclutamiento, selección y dominancia) no ocurre en forma continua ni al azar, sino en ciclos llamados ondas (Figura 1). En el bovino usualmente se pueden observar dos o tres ondas foliculares por cada ciclo estral, que se caracterizan por el reclutamiento de entre 5 y 10 folículos de 3 a 4 mm de diámetro (Van den Hurk y Zhao, 2005) de los cuales solo uno alcanzará el estadio preovulatorio.

Finalmente el folículo preovulatorio o folículo de de Graaf es el que presenta una esteroidogénesis más activa y el que presenta una mayor respuesta a las gonadotrofinas. Las células tecales producen mayor cantidad de andrógenos en respuesta a LH y las células de la granulosa incrementan su actividad aromatasa en respuesta a FSH, sintetizando cantidades máximas de estradiol. La acción conjunta de FSH y estradiol induce la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa (Lattanzi, 2010).

El pico preovulatorio de LH juega un papel central en el desencadenamiento de la cascada de eventos en los folículos preovulatorios, esencial para la ovulación de un ovocito fertilizable (Hsieh *et al*, 2007).



**Figura 1.** Diagrama esquemático del crecimiento folicular en el ciclo estral del bovino. Tomado de Lattazi, 2010.

Por consiguiente la ovogénesis y la foliculogénesis se encuentran inextricablemente vinculadas con el crecimiento del ovocito y desarrollo en una relación íntima y mutua con las células somáticas del folículo (Thibault *et al.*, 1997). Durante el curso de la foliculogénesis el ovocito adquiere la competencia a experimentar la meiosis y entonces adquiere la competencia de desarrollo, cambios bioquímicos y estados moleculares que permiten que el ovocito madure (Hyttel *et al.*, 1997).

#### 1.4 DESARROLLO DEL OVOCITO

Durante la vida fetal, alrededor del día 80, las ovogonias comienzan a dejar su ciclo mitótico para entrar en la profase I de la meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios (Byskov and Hoyer, 1994; Russe, 1983). La profase I de la meiosis se divide en cinco etapas: leptograma, cigograma, paquograma, diplotograma y diacinesis. Durante el leptograma los cromosomas comienzan a condensarse formando filamentos delgados, posteriormente en la etapa cigograma se inicia el apareamiento de los cromosomas homólogos y se forma el complejo

sinaptonémico. Este apareamiento se completa en el paquinema, durante el cual también se produce la condensación de los cromosomas. En este período los cromosomas homólogos están íntimamente unidos formando tétradas (unidades bivalentes con cuatro cromátidas) y se produce el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas, la recombinación. Durante el diplonema los cromosomas homólogos comienzan a separarse aunque continúan unidos por uno o más quiasmas. En este punto la meiosis se arresta en el estadio también conocido como vesícula germinal (VG) (Lattazi, 2004), la cual se caracteriza por que el ovocito está rodeado por una sola capa de cuatro a ocho células de la pregranulosa, así como de una lámina basal intacta (Gendelman y Roth, 2012a), en este momento la progresión de la meiosis es detenida, reiniciándose hasta que el ovocito sea seleccionado para continuar su proceso de maduración. (Lattazi, 2004).

### 1.5 MADURACIÓN DEL OVOCITO

La maduración del ovocito es definida como el reinicio y la terminación de la primera división meiótica y la subsecuente progresión a la metafase II (MII); durante esta los procesos de maduración nuclear y citoplasmática son esenciales para la fertilización y desarrollo embrionario temprano (Gordon, 2003). Dentro de los procesos nucleares se encuentran la ruptura de la vesícula germinal (RVG) para que los cromosomas homólogos se separen, expulsándose el primer cuerpo polar quedando la cromatina materna arrestada en metafase II. Los cambios que ocurren en el ovoplasma llamados maduración citoplasmática, incluyen modificaciones en el citoesqueleto, la redistribución de los organelos, reducción de los niveles de RNAm y cambios en los patrones de síntesis proteica (Sun et al., 2009). De esta forma la maduración del ovocito involucra ambos eventos necesarios para que este adquiera la capacidad de soportar la fertilización monoespermica, la formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario temprano (Wang *et al.*, 2009).

### 1.5.1 MADURACIÓN NUCLEAR DEL OVOCITO

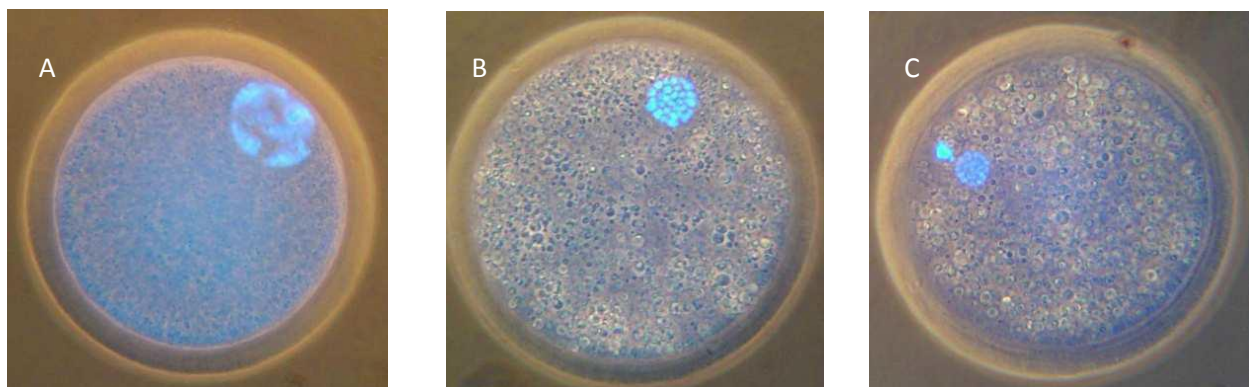
La maduración nuclear del ovocito involucra el reinicio de la meiosis, posterior a la primera fase de arresto, hasta la obtención del estadio de metafase en la segunda división de la maduración (Márquez y Gutiérrez 2009). La meiosis en el ovocito se reinicia en la pubertad después de un pico preovulatorio de LH (Lattazi, 2010), una vez que este pico se produce se incrementa la fosforilación y activación de ERK 1/2 (Cameron *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Tajima *et al.*, 2003; Panigone *et al.*, 2008; Conti *et al.*, 2012). ERK1/2 (por sus siglas en inglés; Kinasa de Regulación Extracelular 1/2), que pertenece a la familia de las MAPKS (por sus siglas en inglés; Proteínas Cinasas Activadoras de Mitógeno), la cual es activada durante la maduración del ovocito (Sun *et al.*, 2002; González *et al.*, 2010); el incremento de la actividad de ERK1/2 se presenta de manera inicial en las células de la granulosa y poco después en las células del cumulus. La actividad de ERK1/2 junto con el pico preovulatorio de LH son determinantes para que en el ovocito se lleve a cabo la RVG (Su *et al.*, 2003).

La RVG se produce en la profase I (Lattanzi., 2010), y para que esta se produzca es necesario que exista una regulación en las oscilaciones de la actividad cinasa de p34cdc2 (CDK1), una proteína cinasa que es regulada por la ciclina B. Ambos componentes conforman al factor promotor de la maduración (MPF por sus siglas en inglés). Es decir, CDK1 debe ser activada antes de la reanudación de la meiosis y es necesaria para la RVG, siendo su actividad incrementada hasta la metafase I (MI). Durante la transición entre MI y metafase (MI)I, una vez que el primer cuerpo polar es expulsado la actividad de CDK1 decrece significativamente, sin embargo esta es restablecida y mantenida en altos niveles durante el arresto en MII (Epping *et al.*, 2001); dado que los niveles de ciclina B modulan la activación de CDK1, el incremento de la síntesis de ciclina B durante la maduración meiótica es lo que permite la progresión de vesícula germinal a MII (Epping *et al.*, 2001).

Durante la maduración nuclear el ovocito presenta cambios que se refieren a la estructura de la cromatina (Figura 2), los cuales proveen un importante

mecanismo para reprimir la transcripción global antes de la reanudación de la meiosis (Epping *et al.*, 2001).

Los cambios estructurales que se presentan en el ovocito durante la maduración nuclear, inician al término de la profase I donde se produce la RVG y los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros. En la metafase I, los cromosomas homólogos se hallan dispuestos en el plano ecuatorial, unidos entre sí por los extremos. Posteriormente en la anafase I los cromosomas homólogos se separan dirigiéndose a los respectivos polos. Una vez que llegan a los polos, en la telofase I, uno de los grupos de cromosomas homólogos es expulsado del ovocito como corpúsculo polar mientras que el otro grupo continúa con la segunda división meiótica. Al llegar al estadio de MII los cromosomas se encuentran dispuestos en el plano ecuatorial con cada cromátida hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En este punto la meiosis se arresta nuevamente y se reiniciará cuando el ovocito sea fecundado por un espermatozoide (Lattanzi, 2010); donde finalmente después de la separación de los cromosomas en la anafase II, el citoplasma del huevo o cigoto, se divide nuevamente produciendo un segundo corpúsculo polar que dará inicio a las divisiones mitóticas (Márquez y Gutiérrez, 2009).



**Figura 2.** Ovocitos en diferentes estadios de maduración nuclear, tinción con DAPI. (A) Ovocito en estado de vesícula germinal, (B) Ovocito en metafase I y (C) Ovocito en metafase II. Tomado de Lattazi (2010).

### 1.5.2 MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA

La maduración citoplasmática es definida como un proceso esencial en los ovocitos para que se pueda dar la fertilización y desarrollo embrionario temprano. Los cuales generalmente pueden ocurrir en paralelo con la maduración nuclear, ya que mantienen una relación interconectada (Epíng *et al.*, 2001).

Los eventos claves de la maduración citoplasmática involucran la redistribución de organelos citoplasmáticos y cambios en la dinámica del citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 2009).

Durante la maduración, la posición de las mitocondrias cambia desde una localización periférica a una distribución dispersa en todo el citoplasma. La cantidad de ribosomas aumenta a partir del inicio de la maduración, observándose también un aumento de la síntesis de proteínas (Epíng *et al.*, 2001).

Otras estructuras que también son redistribuidas son los gránulos corticales (exclusivos de ovocitos y producidos por el aparato de Golgi); originalmente estos se ubican en el centro del ovocito pero conforme este progresa a la metafase son translocados hacia la periferia del ovocito, constituyendo uno de los signos estructurales más obvios de la maduración citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2009).

Los gránulos corticales se caracterizan por ser pequeñas vesículas que contienen enzimas, los cuales al migrar a una posición 0.4-0.6  $\mu\text{m}$  por debajo de la membrana plasmática pueden experimentar la exocitosis por fusión con la membrana plasmática del ovocito una vez que el ovocito es fertilizado (Dulcibella y Buetow, 1994; Vázquez *et al.* 2010). La exocitosis de los gránulos corticales (reacción cortical) es uno de los mecanismos usados por el ovocito para prevenir la poliespermia, pues cambia las propiedades físicas y químicas de la zona pelúcida debido a su composición que incluyen enzimas proteolíticas (además de una población diversa de proteínas, moléculas estructurales y glicosaminoglicanos) (Ferreira *et al.*, 2009; Mejía, 2011).

Además de los reguladores del ciclo celular, otras moléculas son importantes para la progresión de la maduración y el desarrollo embriogénesis temprana; la síntesis y la acumulación de estas moléculas en el ovocito son consideradas como un marcador de la maduración citoplasmática. Así, el glutatión es un marcador

biológico de la maduración citoplasmática; su concentración intracelular se incrementa conforme el ovocito progresa de vesícula germinal a la etapa de metafase II. Varios estudios han demostrado que esta enzima juega un papel fundamental en la protección celular contra el daño oxidativo de la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), pero después de la fertilización, su actividad se relaciona con la descondensación de la cromatina del espermatozoide, la subsecuente activación del ovocito y la formación del pronúcleo masculino, además de promover el desarrollo embrionario temprano (Ferreira *et al.*, 2009 y Curnow *et al.*, 2010; Mejía, 2011).

## 1.6 MADURACIÓN *IN VITRO*

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es una técnica importante que permite el estudio básico de los eventos biológicos que ocurren durante la maduración del mismo, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Sagirkaya *et al.*, 2007). Para obtener los ovocitos a gran escala, los ovarios utilizados se pueden adquirir después del sacrificio de las hembras o por ovariectomía. La forma más común y económica para la obtención de los ovocitos con fines experimentales, es el aprovechamiento de los ovarios de vacas sacrificadas en los rastros (Gordon, 2003).

Experimentalmente se sabe que el éxito del desarrollo *in vitro* de ovocitos está íntimamente relacionado con el grado de desarrollo estructural que adquiere durante la etapa folicular previa. El folículo es una estructura ovárica con dos funciones, producción de hormonas y producción de ovocitos aptos para ser fecundados (Gordon, 2003). Los ovocitos que residen dentro de los folículos ováricos están recubiertos por células de la granulosa (células del *cumulus*), formando el complejo cumulus-ovocito (CCO), manteniendo una comunicación con estas células a través de uniones comunicantes (Tripathi *et al.*, 2010). De manera particular la división meiótica del ovocito está detenida durante el crecimiento folicular y son los ovocitos de los folículos preantrales los que tiene la particularidad de salir del arresto meiótico, el cual se arresta después de la ovulación y termina después de la fecundación del ovulo. *In vitro* la división



meiótica puede reanudarse de forma espontánea después de que el ovocito es retirado del folículo (Pincus y Enzmann, 1935). Por lo cual diversos estudios establecen que la remoción de los ovocitos del ambiente folicular, a partir de la aspiración de los mismos, puede resultar en una reducida proporción de embriones, sugiriendo que no todos los ovocitos tienen la capacidad para madurar correctamente (maduración citoplasmática) (Mermillod y Marchal, 1999; Gendelman y Roth, 2012a). Esto pudiera deberse a que algunos de los ovocitos reanudaran la meiosis sin sufrir la una preparación adecuada (Hyttel *et al.*, 1997; Adona *et al.*, 2008). Por tal motivo se ha propuesto el precultivo del CCOs con inhibidores de la meiosis para bloquear así la reanudación espontanea de la misma (Gendelman y Roth, 2012a).

El bloqueo de la reanudación meiótica ha llegado a ser inducido por diversas estrategias, dentro de las cuales se incluyen el incremento en el contenido del AMPc del ovocito (Sirard y Coenen, 1994; Lonergan *et al.*, 1997; Avery *et al.*, 1998; Adona *et al.*, 2008). Fármacos, como la butirolactona-1 (BL-1) son utilizados como inhibidores de la meiosis ya que actúan sobre la familia de CDKs y otras proteínas cinasas como las MAPK (Kitagawa *et al.*, 1993, 1994; Gendelman y Roth, 2012a); R y S-roscovitine son inhibidores reversibles de CDK (Meijer *et al.*, 1997; Gendelman y Roth, 2012a), e (Isobutil metilxantina) IBMX mantienen el arresto meiotico por elevación del AMPc a partir de la inhibición de la actividad fosfodiesterasa (De Azevedo *et al.*, 1997; Gendelman y Roth, 2012a). Recientemente se ha mostrado, por lo menos en el ratón, que los niveles intracitoplasmáticos de AMPc en el ovocito son esenciales para el mantenimiento del arresto meiotico (Tripathi *et al.*, 2010).

Finalmente, como es conocido durante cada ciclo estral el número de folículos en desarrollo difiere según la especie (depende también en forma directa del peso de los animales), donde el tamaño del ovocito esta correlacionado con la capacidad del desarrollo del folículo. Generalmente los ovocitos competentes para madurar deben medir como mínimo 110µm de diámetro, por lo que cuanto mayor sea el tamaño folicular mayor será la capacidad de desarrollo del ovocito para lograr la RGV, la capacidad fecundante y posterior desarrollo (Gordon, 2003).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 EFECTOS DEL ESTRÉS TÉRMICO EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

El estrés térmico representa un importante problema económico en animales de campo. (Risponli *et al.*, 2011). Las elevadas temperaturas son el mayor factor responsable de la reducción de la fertilidad durante las estaciones calurosas o en áreas tropicales (Barati *et al.*, 2008). Un gran número de investigaciones en bovinos han mostrado consecuencias directas sobre la maduración del ovocito bajo la exposición a temperaturas elevadas; en donde se comprometen los eventos reproductivos por disminución de la expresión del comportamiento del estro, alteraciones del desarrollo folicular en el ovario y reducción en la competencia del ovocito (Risponli *et al.*, 2011, Barati *et al.*, 2008).

En lo que respecta a la disminución en el desarrollo competitivo del ovocito, se ha observado que este se presenta durante el verano (Katanani *et al.*, 2002; Roth y Hansen., 2004a), comprometiéndose así el resto de los periodos reproductivos (2 a 3 ciclos estrales después de las estaciones calurosas) (Roth *et al.*, 2001; Roth y Hansen., 2005), de esta forma la exposición de vacas a un estrés térmico estacional afecta la capacidad del ovario en el cual se encuentran desarrollando los ovocitos (Gendelman y Roth, 2010).

Si bien los ovocitos preovulatorios bovinos resultan muy sensibles a las elevadas temperaturas (Putney *et al.*, 1988; Ju *et al.*, 2005), lo mismo ocurre con el ovocito maduro, lo cual ha sido demostrado tanto en estudios *in vivo* (Putney *et al.*, 1989; Roth y Hansen., 2004a) como *in vitro* (Payton *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 1997; Roth y Hansen *et al.*, 2005).

En estudios *in vitro*, la exposición directa de ovocitos de bovino en estado de vesícula germinal (VG) a elevadas temperaturas (41°C), por 12 horas, redujo la habilidad de la célula para completar la maduración nuclear y el desarrollo posterior una vez fertilizado (Letz *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 2005). Se sabe que este tipo de tratamientos, sobre los ovocitos mantenidos en VG, presentan resultados similares al de las condiciones *in vivo* influenciadas por un estrés térmico estacional, determinándose que dicho efecto se encuentra asociado con

una reducción en los niveles de transcripción de genes involucrados en la maduración del ovocito (Gendelman y Roth, 2010).

Se piensa que probablemente la reducción en los niveles de transcripción durante la maduración está relacionado con los resultados encontrados en diversos estudios en donde se ha demostrado que bajo un proceso de estrés térmico existe fragmentación de DNA antes o durante el proceso de maduración de los ovocitos (Roth y Hansen., 2004), así como con reducciones en los niveles de RNAm (Lecuarre *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2005). Bajo esta serie de alteraciones, también se sabe que el metabolismo de síntesis del ovocito se ve afectado por la exposición a altas temperaturas (Cetica *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2005), reflejándose en una reducción en la síntesis de proteína en un 30 a 50% de los ovocitos expuestos al estrés térmico (Edwards y Hansen 1997).

Por otra parte, también se han reportado cambios marcados en la maduración del ovoplasma, los cuales incluyen alteraciones en el citoesqueleto y redistribución de organelos (Hosoe y Shioya, 1997; Edwards *et al.*, 2005); dichos estudios demuestran que el choque térmico afecta eventos intracelulares asociados con la maduración citoplasmática, como la translocación de gránulos corticales (Payton *et al.*, 2004), que junto con las alteraciones nucleares, decrecen la subsecuente división y disminución de la tasa de formación a blastocistos (Wang *et al.*, 2009).

Así, *in vitro* empleando ovocitos de bovino en estado de MII se ha reportado que el choque térmico cambia la configuración del huso y compromete el subsecuente desarrollo de los ovocitos seguido del proceso de fertilización (Ju *et al.*, 2005). Además, en esta especie la prolongada exposición de los ovocitos a 41.0°C resulto en un menor número de ovocitos con cuerpo polar discernible, pudiendo esto ser atribuido a alteraciones funcionales de las células del *cumulus* (Letz *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 2005). De manera similar las elevadas temperaturas (40 a 41°C) durante la maduración *in vitro* han mostrado un incremento en la muerte celular programada en ovocitos (Barati *et al.*, 2008).

## 2.2 LOS GLUCOCORTICOIDES COMO MODERADORES DEL ESTRÉS

El estrés se caracteriza por ser una alteración de la homeostasis de un animal, en donde una serie de respuestas adaptativas son estimuladas cuando el ambiente es inequitativo y se somete a una excesiva perturbación a los sistemas fisiológicos. Usualmente el estresor activa el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y el sistema simpático-adrenal (Tilbrook *et al.*, 2000), el cual representa un sistema neuroendocrino de retroalimentación dinámica que se enfoca a la regulación de los estresores (Gupta *et al.*, 2007).

El receptor a glucocorticoides (GR por sus siglas en inglés) son producidos y liberados por la corteza adrenal bajo el control del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Cuando el cuerpo percibe el estrés, la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) estimula a la glándula pituitaria a liberar a la hormona adrenocorticotropica (ACTH) por, de esta forma la corteza adrenal inicia la síntesis de GC en respuesta a la ACTH (Revollo y Cidlowski., 2009). Una vez producidos por la corteza adrenal los GC son liberados hacia la circulación sanguínea (Revollo y Cidlowski., 2009).

De esta forma los GC son la última parte de una respuesta adaptativa que busca mantener la homeostasis durante situaciones estresantes (Revollo y Cidlowski., 2009).

Se sabe que los GC ejercen diversos efectos en numerosos procesos metabólicos (Van Merris *et al.*, 2007); algunas de las respuestas más comúnmente encontradas son el incremento en la producción de glucosa y la inmunosupresión (Revollo y Cidlowski., 2009). Sin embargo, también causa la inhibición de la fisiología reproductiva, al disminuir la liberación hipotalámica de GnRH, con lo cual influye reduciendo los niveles de los esteroides reproductivos (Sapolsky *et al.*, 2000). De esta forma se dice que los glucocorticoides tienen un profundo efecto en todos los sistemas del organismo, incluyendo el sistema reproductivo (Brann y Mahesh 1991), en este sentido se sabe que elevados niveles de glucocorticoides durante condiciones estresantes o después de su empleo durante una terapia medica generan un impacto negativo en la reproducción (González *et al.*, 2010).

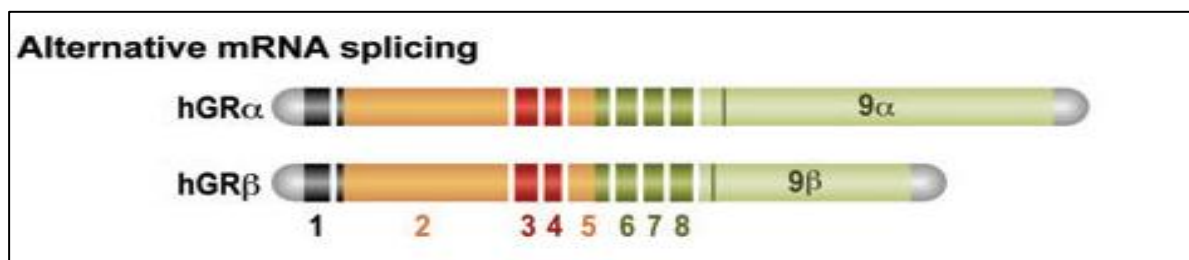
Los GC difunden a través de la circulación al fluido folicular que rodea al ovocito, generando niveles intrafolículos de cortisol libre activo que resulta ser usualmente más elevados que la concentración a nivel sanguíneo (Andersen *et al.*, 2002; Andersen 2003); ejerciendo su acción a través de receptores presentes en las células ováricas (Schreiber *et al.*, 1982; Tetsuka *et al.*, 1999; González *et al.*, 2010), como las células de la granulosa (Brann y Mahesh 1991) y recientemente se ha propuesto que el ovocito podría estar respondiendo directamente a ellos (Mejía., 2011). Sin embargo, ya sea durante la maduración *in vitro* o *in vivo*, aún se conoce poco acerca del mecanismo por el cual, los glucocorticoides ejercen su acción en esta célula (González *et al.*, 2010).

En lo que respecta al efecto de la fisiología del estrés en la maduración del ovocito, estudios *in vitro* han descrito cambios o alteraciones de tipo morfológico y fisiológico durante el proceso de maduración, por lo que múltiples investigaciones se han enfocado en determinar cómo los GC influyen en la presentación de estos daños o cambios. Por ejemplo, *in vitro*, en el caso de los ovocitos de cerda, se ha observado que la presencia de un GC sintético (dexametasona) ejerce un efecto inhibitorio en la reanudación de la meiosis, acción que se atribuye a un efecto de dicho compuesto a través del GR; señalándose que la adición de dexametasona en la fase final de la progresión de la meiosis (durante las últimas 12 horas del cultivo), produce la inhibición de la RGV del ovocito, lo que da como resultado una marcada reducción de la maduración de ovocitos al finalizar el periodo de cultivo de 48 horas (Rabin *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1999). En el caso de la rata se ha reportado que las altas concentraciones de dexametasona afectan la maduración y desarrollo embrionario temprano (Van Merris *et al.*, 2007). Sin embargo, aún es poco conocido el mecanismo por el cual los GC ejercen su acción inhibitoria sobre el ovocito durante su fase de maduración (Yang *et al.*, 1999). No obstante estos efectos han sido atribuidos a una reducción parcial del MPF?? (Chen *et al.*, 2000), que junto con las proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPKs), son el principal sistema de regulación del ciclo celular meiótico del ovocito (Abrieu *et al.*, 2001; Fan y Sun , 2004; Liang *et al.*, 2007; Motlik *et al.*, 1998; González *et al.*, 2010).

## 2.3 RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES

La respuesta biológica de las células a los GC es mediada por una proteína receptora específica, la cual se menciona se encuentra presente de manera ubicua en todos los tejidos (Beato, 1989; Franklyn, 2004). El GR es un receptor de esteroides que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que activan factores de la transcripción (Revollo y Cidlowski., 2009), por lo que su ligando (GC) pueden libremente difundir a través de la membrana celular y ejercer sus acciones mediante un mecanismo de señalización llamado vía genómica clásica (Bartis *et al.*, 2007), es decir el receptor a glucocorticoides actúa como un factor ligando-activador de la transcripción (Gupta y Lalchandama, 2002).

En los mamíferos el gen de los receptores esteroideos se ha conservado evolutivamente por lo que deriva de un ancestro en común originado hace millones de años. El receptor a glucocorticoides más estudiado es el de humano, del cual se han descrito 2 isoformas moleculares; el GR $\alpha$  y el GR $\beta$  (Fig. 3), con 777 y 742 aminoácidos, respectivamente. Ambas isoformas se han encontrado juntas en casi todos los tejidos (Holm *et al.*, 1999). Sin embargo la isoforma predominante en humanos es hGR $\alpha$  la cual es capaz de unirse a GC endógenos y mediar una gran variedad de señales de activación y represión, en contraste hGR $\beta$  se expresa en menor cantidad y presenta menor capacidad de unión a la hormona (Revollo y Cidlowski., 2009).

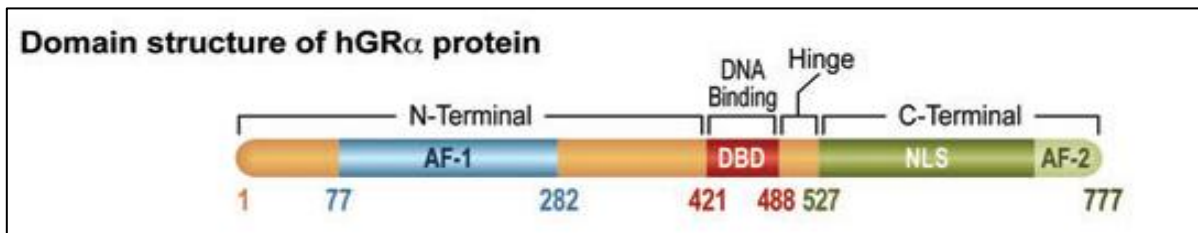


**Figura 3.** Isoformas moleculares del GR en humanos; GR $\alpha$  y GR $\beta$  Tomado de: Revollo y Cidlowski, (2009).

### 2.3.1 ESTRUCTURA

El GR es una proteína que modula distintas funciones y que presenta en su conformación dominios estructurales (Fig. 4), los cuales comprenden un dominio

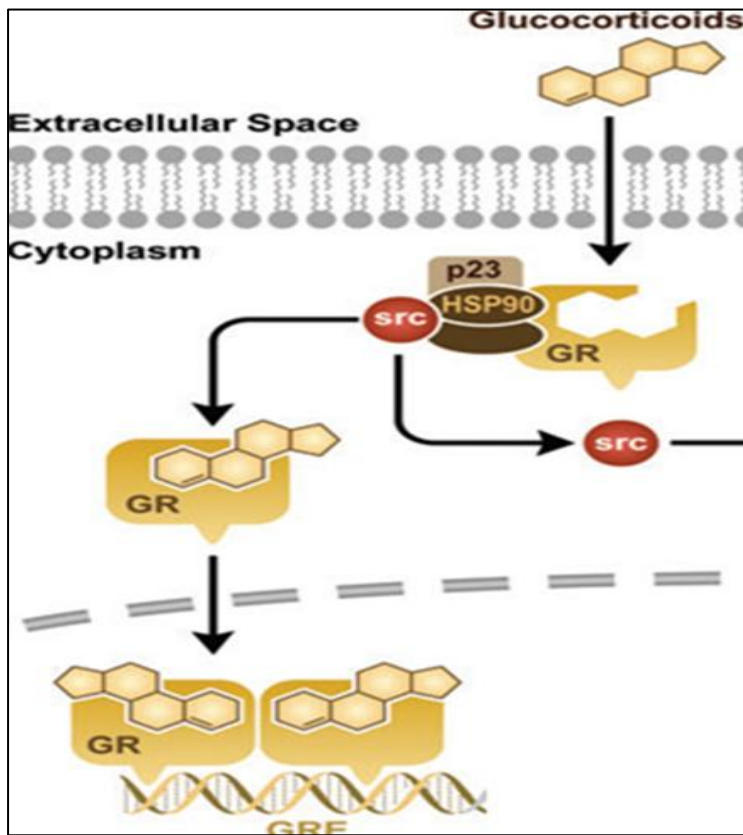
de unión al ADN, un dominio de unión al ligando y dos con función activadora de la transcripción (AF1 y AF2) (Onard *et al.*, 2004). Específicamente el dominio de activación de la transcripción se localiza en el extremo N-terminal, el cual contiene el AF1 encargado de que el receptor interactúe con la maquinaria de transcripción; por otra parte el dominio central de unión al ADN contiene dos dedos de zinc que son requeridos para la dimerización del receptor así como para la interacción con el ADN. Por su parte el extremo C-terminal contiene el dominio de unión al ligando, el cual provee la señalización de localización nuclear (NLS), así como un segundo factor de activación (AF2) (Revollo y Cidlowski., 2009).



**Figura 4.** Estructura del GR $\alpha$  en humanos Tomado de: Revollo y Cidlowski, (2009).

### 2.3.2 ACTIVACIÓN

El GR en su estado inactivo se encuentra en el citoplasma unido en su extremo C-terminal a un complejo hetero-oligomérico, compuesto por dos proteínas de 90KDa, que pertenecen a la familia de proteínas activadas por calor (del inglés; heat shock proteins o hsp) o también llamadas chaperonas, además de otras proteínas (Barnes *et al.*, 1998; Adock *et al.*, 2000). Una vez que el GR se une a su ligando se incrementa la fosforilación del mismo lo cual induce un cambio en la conformación que desencadena la disociación del complejo hsp90 (Adock *et al.*, 2000). De esta forma el complejo hormona-receptor, se traslada al núcleo donde se une a secuencias del ADN llamadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE del inglés glucocorticoid response elements) (Figura 5), para controlar de manera positiva o negativa la dirección de la expresión de los genes blanco a GC (Carsson *et al.*, 1990; Maroder *et al.*, 1993).



**Figura 5.** Vía genómica clásica de acción del GR. Tomado de: Revollo y Cidlowski, (2009).



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Como se ha mencionado bajo condiciones de estrés térmico los glucocorticoides evitan la maduración apropiada del ovocito y que dicha acción debe ser mediada a través del receptor a glucocorticoides. Sin embargo, hasta hoy no se ha identificado ultraestructuralmente como los glucocorticoides afectan la maduración del ovocito, por lo que ello podría representar un importante inicio en el desarrollo de estrategias dirigidas a moderar los efectos del estrés térmico a nivel reproductivo en vacas.

### **4. HIPÓTESIS**

Los glucocorticoides, vía su receptor, afectan la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos sometidos a estrés térmico por lo que estos presentaran cambios o alteraciones ultraestructurales en su desarrollo.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los glucocorticoides, vía su receptor, afectan la maduración ultraestructural de los ovocitos bovinos sometidos a estrés térmico.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Sincronizar el proceso de maduración de ovocitos bovinos, manteniéndolos en estado de vesícula germinal antes de ser sometidos a la maduración *in vitro*.
2. Determinar la localización del receptor a glucocorticoides en ovocitos inmaduros y maduros con y sin la presencia de estrés térmico.
3. Identificar si el estrés térmico influye en el grado de maduración ultraestructural citoplasmática y nuclear del ovocito bovino.

## 7. MATERIAL Y METODOS

### 7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ovarios de vacas sacrificadas en el rastro municipal ubicado en la localidad de Temamatla, Estado de México.

### 7.2 COLECCIÓN Y TRANSPORTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El transporte de los ovarios del rastro al laboratorio se realizó bajo condiciones de temperatura ambiente (25-27°C) en medio de transporte el cual estaba constituido de cloruro de sodio al 9% y 1% de gentamicina (10mg/ml).

### 7.3 MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS BOVINOS

#### 7.3. 1 OBTENCIÓN DE LOS OVOCITOS BOVINOS

Una vez en el laboratorio los ovarios se colocaron en un vaso de precipitado que contenía 50 ml de medio de transporte a 25°C. Los ovarios fueron lavados de 2-5 veces hasta retirar los *dendritus* celulares y el resto de sangre.

Para la recuperación de los ovocitos, en este estudio, se decidió utilizar la combinación de dos técnicas: la disección y aspiración de ovarios. Esta decisión fue tomada debido a que en la mayoría de los casos la superficie de los ovarios colectados presentaban escasos folículos visibles con el diámetro requerido para ser puncionados; primero se realizó la aspiración de los folículos que contaban con un diámetro de 2-8 mm y la disección únicamente se realizó a aquellos ovarios que presentaban a la vista una mayor cantidad de folículos. Esto permitió tomar primero aquellos ovocitos que tenían el mayor potencial de desarrollo y obtener la mayor cantidad de ovocitos presentes en cada ovario, reduciendo así el tiempo de selección de ovocitos morfológicamente normales.

Para la aspiración del complejo *cumulus*-ovocito (CCO) se utilizó una jeringa hipodérmica de 5ml con una aguja de 18G X 38mm conteniendo 1-2ml de medio de manipulación el cual estaba constituido por TCM-199 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) y 25mM de Hepes.

Para la disección de los ovarios se utilizó una hoja de bisturí, realizando cortes transversales y longitudinales en la superficie de los ovarios; las incisiones fueron

lavadas con medio de manipulación a 23-25 °C, empleando para ello una jeringa hipodérmica de 10ml y una aguja del número 18.

El líquido colectado del lavado, así como el obtenido de la aspiración se colocó en cajas Petri. Los ovocitos se colocaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico y al mismo tiempo se realizó la clasificación y cuantificación de los mismos. La clasificación se realizó de acuerdo al número de capas de las células de la granulosa, coloración uniforme del citoplasma, integridad de la zona pelúcida siguiendo la clasificación de Loss (1989).

Una vez realizada la clasificación de los ovocitos se depositaron en una caja Petri, la cual contenía medio de manipulación mantenido a 25°C. Los ovocitos seleccionados fueron lavados 3 veces por goteo con el medio de manipulación con la finalidad de retirar el *dendritus* celular.

### 7.3.2 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS

Antes de dar inicio al proceso de maduración in vitro, los ovocitos obtenidos fueron sometieron a una preincubación con un inhibidor de la meiosis (3 isobutil 1-metilxantina), esto con la finalidad de que los ovocitos obtenidos se mantuvieran sincronizados en estado de vesícula germinal antes de iniciar el proceso de maduración con los distintos tratamientos. Los ovocitos seleccionados como calidad 1 y 2 se colocaron en TCM-199 previamente estabilizado por 24 horas a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa y adicionado con 10% (v/v) de suero fetal bovino. Una vez estabilizado el medio de maduración, se adiciono 0.1 UI/ml de hCG, 0.5 µg/ml de FSH, 0.2mM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina y 75µm de 3 isobutil 1-metilxantina (IBMX) (Sigma) disuelto en DMSO. Las células fueron preincubadas por 16 horas a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Una vez culminado el proceso de preincubación con el inhibidor, se procedió a remover el inhibidor por medio de lavados con medio de manipulación.

### 7.3.3 TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS OVOCITOS BOVINOS PARA SU MADURACIÓN

Una vez finalizada la preincubación de los ovocitos se procedió a iniciar la maduración de los mismos, en los que se incluyó o no el estrés térmico (temperatura a 41°C y 38.5°C, respectivamente) con y sin la presencia de Dexametasona, formándose en total 7 grupos experimentales (Cuadro 1).

Como ovocitos inmaduros fueron usados aquellos clasificados como calidad 1 y 2 con no más de 10 capas de células del *cumulus*. Estas últimas fueron retiradas colocando a los ovocitos en medio TCM-199 adicionado con 0.1% (v/v) de hialorunidasa (Sigma) y 4 mg/ml de BSA (fracción V) y sometidos a vortex por 4 minutos (Mejía, 2011). Posteriormente fueron lavados 3 veces con medio de manipulación.

A continuación se describen los tratamientos a los que fueron sometidos los ovocitos para valorar la participación de los glucocorticoides durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos.

**Cuadro 1.** Tratamientos de maduración aplicados a los ovocitos.

TRATAMIENTO	ESTRÉS TÉRMICO	
	SI	NO
<b>Inmaduros</b>		
<b>Control</b>	41°C	38.5°C
<b>DMSO</b>	41°C	38.5°C
<b>Dexametasona</b>	41°C	38.5°C

### 7.3.4 MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS SIN ESTRÉS TÉRMICO

El medio de maduración utilizado para todos los tratamientos se compuso de TCM-199, estabilizado por 24 horas a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa, previamente adicionando 10% (v/v) de suero fetal bovino. Una vez estabilizado el medio de maduración, se adiciono 0.1 UI/ml de hCG, 0.5 µg/ml de FSH, 0.2mM de piruvato de sodio y 50 µg/ml de gentamicina (Mejía, 2011). Para los tratamientos que incluyeron Dimetilsulfoxido (DMSO) y Dexametasona (DEX)

estos compuestos se incluyeron en el medio de maduración a una concentración de  $10^{-7}$  M para ambos casos. Los ovocitos fueron incubados por un periodo de 24 horas a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Al finalizar el periodo de incubación a los ovocitos destinados para el análisis de inmunofluorescencia se les retiraron las células del *cumulus* colocándose en medio TCM-199, 0.1% (v/v) de hialorunidasa (Sigma) y suplementados con 4 mg/ml de BSA (fracción V, Amresco, Solon, OH) y sometidos a vortex por 4 minutos. ). Posteriormente fueron lavados 3 veces con medio de manipulación.

#### 7.3.5 MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON ESTRÉS TÉRMICO.

En lo que corresponde al medio de maduración utilizado para los tratamientos con estrés térmico este se compuso por TCM-199, estabilizado por 24 horas a 41°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa, previamente adicionando 10% (v/v) de suero fetal bovino. Una vez estabilizado el medio de maduración, se adiciono 0.1 UI/ml de hCG, 0.5 µg/ml de FSH, 0.2mM de piruvato de sodio y 50 µg/ml de gentamicina (Mejía, 2011). De manera similar a los tratamientos sin estrés térmico se incluyó al medio de maduración una concentración de  $10^{-7}$  M de DMSO y DEX.

Una vez finalizado el proceso de maduración (24 horas) a los ovocitos se les retiraron las células del *cumulus* colocándose en medio TCM-199, 0.1% (V/V) de hialorunidasa (Sigma) y suplementados con 4 mg/ml de BSA (fracción V) y sometidos a vortex por 4 minutos. Posteriormente fueron lavados 3 veces con medio de manipulación.

#### 7.4 LOCALIZACIÓN DEL GR POR INMUNOFLUORESCENCIA

Para llevar a cabo la determinación de la participación del receptor a glucocorticoides en el proceso de maduración se utilizaron 30 ovocitos por tratamiento los cuales fueron seleccionados aleatoriamente.

Los ovocitos desnudados fueron fijados con 4% de paraformaldehído por 40 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Los ovocitos se permeabilizaron con 0.2% de Tritón X-100

y 0.1% de Tween-20 en DPBS por 40 minutos. Una vez finalizado el proceso de permeabilización se procedió a realizar 2 lavados con PBS, después de los lavados se realizó el bloqueo por 1 hora con PBS-BSA al 1% a temperatura ambiente. Posteriormente se incubo con el primer anticuerpo anti GR en 0.05% de PBS-BSA a una dilución 1:25, durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS posteriores a la incubación. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó con anti- conejo conjugado a FITC en 0.05% de PBS-BSA a una dilución 1:200, por 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados en PBS y finalmente se montaron en portaobjetos con medio de montaje Vectashield adicionado con DAPI. La señal fue detectada por medio de un microscopio de fluorescencia marca OLYMPUS BX51. Con una onda de excitación de 494nm y una onda de emisión de 520nm para fluoresceína (FITC), en el caso de DAPI con una excitación de 358nm y emisión de 461nm.

En el caso de los ovocitos examinados bajo microscopia confocal la señal fue detectada por medio de un microscopio confocal marca Zeiss axiovert100M. . Con una onda de excitación de 494nm y una onda de emisión de 520nm para fluoresceína (FITC), en el caso de DAPI con una excitación de 358nm y emisión de 461nm

## 7.5 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR WESTERN BLOT

Para la identificación del GR, únicamente se utilizaron ovocitos inmaduros y madurados a 38.5°C.

A los ovocitos tanto maduros como inmaduros, se les retiraron las células del cumulus, una vez desnudos fueron colocados en amortiguador de lisis isotónico y se congelaron a -20°C, hasta su utilización.

Para llevar a cabo la extracción citoplasmática se utilizó el protocolo descrito por Mejía, (2011). Por lo cual los ovocitos fueron centrifugados a 300 rpm por 5 minutos, después de la centrifugación la pastilla fue resuspendida en 100 µl de buffer de lisis el cual estaba constituido por: 25mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ph 7.8, 10 mM de CDTA (1,2 cyclohexylenedinitrilotetracetic acid), 2 mM de DTT (Dithiothreitol), 10%

glicerol y 1% triton X100. Y se dejó incubando por un lapso de 20 minutos en movimiento suave a 4°C.

Posteriormente los ovocitos fueron sonicados en baño maría en ciclos de 2 minutos y de 1 minuto en hielo, esto se realizó 3 veces. Después de sonicados los ovocitos fueron centrifugados a 12,000 rpm por 5 minutos.

El sobrenadante fue hervido con amortiguador de muestra durante 5 minutos y corrido en SDS-PAGE al 8%. Como control positivo se utilizó el lisado total de musculo y suero fetal bovino como control negativo. La cantidad de proteína utilizada por carril fue de 32.6µg y de 36.7 µg para los ovocitos imaduros y maduros respectivamente.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) durante 2 horas a 250 mA. La membrana se bloqueó por una hora a temperatura ambiente con albumina al 0.5% en TBS –Tween 20.

Posteriormente la membrana fue incubada toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo anti GR (Santa Cruz Biotechnology, la Joya Cal, sc8992) a una dilución de 1:500 en TBS-Tween 0.1%. Al término de la incubación con el anticuerpo primario la membrana fue lavada 5 veces con TBS-Tween 0.1% por 7 minutos y 3 veces más por 5 minutos solo con TBS. Posteriormente se incubo por 1 hora con el segundo anticuerpo (Sigma, cabra anti-conejo, peroxidado) a una dilución de 1:6000 en TBS-Tween 0.1%, a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavaron nuevamente 5 veces en TBS-Tween 0.1% por 7 minutos y 3 veces más solo con TBS por 5 minutos. La señal fue detectada por quimioluminiscencia (Gallager et al., 2008; Mejía, 2011).

## 7.6 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Para llevar a cabo la determinación ultraestructural de la maduración de los ovocitos bovinos sometidos a estrés térmico, se utilizaron 6 ovocitos por tratamiento, de los cuales se seleccionaron 3 ovocitos aleatoriamente para llevar a cabo la determinación de la maduración nuclear y citoplasmática por medio de microscopia electrónica. Los ovocitos de los distintos tratamientos fueron lavados con medio de manipulación 3 veces antes de ser procesados, todos los ovocitos



incluidos para esta determinación fueron mantenidos con las células del cumulus intactas, esto con la finalidad de mantener la integridad del ovocito durante el procesamiento de las mismas.

#### 7.6.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Los ovocitos fueron fijados con 3% de glutraldehído y 4% de paraformaldehído durante 1 hora a temperatura ambiente y post-fijación en trióxido de osmio al 1% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez culminado el tiempo de tinción los ovocitos fueron lavados 3 veces con PBS.

La deshidratación de las células se realizó empleando una serie ascendente de alcohol etílico (60%, 70%, 80%, 90%, 96%), 5 minutos en cada uno de ellos y 100% (durante 10 minutos).

Posteriormente los ovocitos fueron colocados en oxido de propileno-alcohol al 100% en una relación 1:1 durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo la impregnación gradual de la resina epoxica, inicialmente los ovocitos fueron mantenidos en oxido de propileno y resina en una relación 1:1 (durante 30 minutos), posteriormente mantenidos en oxido de propileno y resina en una relación 1:2 (durante 30 minutos) y mantenidos finalmente en resina pura toda la noche a temperatura ambiente.

Finalmente las muestras fueron incluídas en resina pura y polimerizadas a 60°C por 36 horas.

Los cortes semifinos (2  $\mu$ m) fueron obtenidos y teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio de luz, mientras que los cortes finos obtenidos (75 nm), fueron contrastados con citrato de Uranilo al 2% y plomo 4% y observados en un microscopio de transmisión electrónica (Zeiss M-900).

#### 7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Pearson con una diferencia significativa de  $p < 0.005$ . Los datos se procesaron con el programa estadístico JMP5.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS

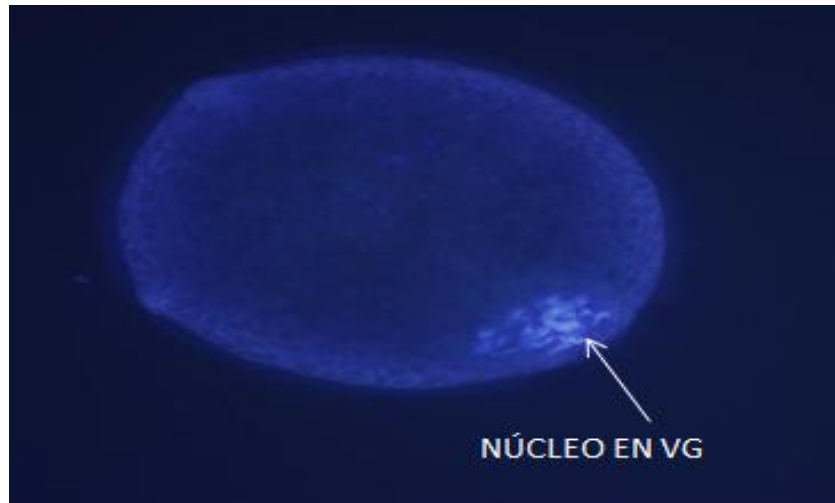
Para la sincronización del proceso de maduración los ovocitos bovinos fueron incubados durante 16 horas con la suplementación de 75µM de IBMX (ver material y métodos); los resultados obtenidos indicaron que la tasa de ovocitos preincubados con el inhibidor mantuvieron un 60% de núcleos en estados de VG, en contraste con el grupo control que mostro un 16.6%, habiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En cuanto al estado en MII los ovocitos con el inhibidor mostraron un 40% de progresión a MII en contraste con un 83.3% del grupo control (Cuadro 2), habiendo también una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Hallazgos morfológicos de los ovocitos de bovino tratados con el inhibidor IBMX.

Tratamiento	Número de ovocitos evaluados	Expansión de CCO (n/%)	Ovocitos con VG (n/%)	Ovocitos en MII (n/%)
Control	30	27/90 <sup>a</sup>	5/16.6 <sup>a</sup>	25/83.3 <sup>a</sup>
IBMX	30	15/50 <sup>b</sup>	18/60 <sup>b</sup>	12/40 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.005$ ).

En la figura 6 se muestra el estado de VG que presentaron los ovocitos preincubados con IBMX, donde se observa el núcleo agrandado y el DNA teñido de azul (tinción de Hoescht 33342). Por otra parte, la evaluación morfológica del CCO, (Figura 7) mostró que 50% de los ovocitos incubados con el inhibidor presentaron baja expansión de las células del *cumulus* (CC), difiriendo de los ovocitos incubados en ausencia del inhibidor en donde la expansión fue del 90% (Cuadro 2).



**Figura 6. Fluorescencia de un ovocito pre-incubado con IBMX y teñido con DAPI mostrando el núcleo en estado de VG característico de la profase I (flecha) (Magnificación 40x).**



**Figura 7. Ovocitos pre-incubados con IBMX mostrando la baja expansión del CCO (las flechas señalan un ovocito con una mínima expansión del CCO).**

## 8.2 LOCALIZACIÓN DEL GRUPO MEDIO DE INMUNOFLOURESCENCIA

Para la determinación de la localización del receptor a glucocorticoides, durante el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos con o sin estrés térmico, los ovocitos pre-incubados con el inhibidor de la meiosis, fueron incluidos aleatoriamente en los tratamientos previamente descritos. Aunado a la inclusión

de los tratamientos con la presencia o sin la presencia de estrés térmico, se incluyó la evaluación de un grupo de ovocitos en estado inmaduro, esto con la finalidad de establecer un patrón de diferencia entre el estado de maduración de los ovocitos incluidos en el estudio. Para ello se realizaron 3 repeticiones que incluyeron 30 ovocitos totales por tratamiento, en donde se evaluó la localización del receptor a glucocorticoides por medio de fluorescencia.

Los resultados obtenidos en los distintos tratamientos presentaron un patrón variable en la localización del receptor a glucocorticoides. (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Localización del receptor a glucocorticoides (GR) en los ovocitos bovinos sometidos o no a estrés térmico.

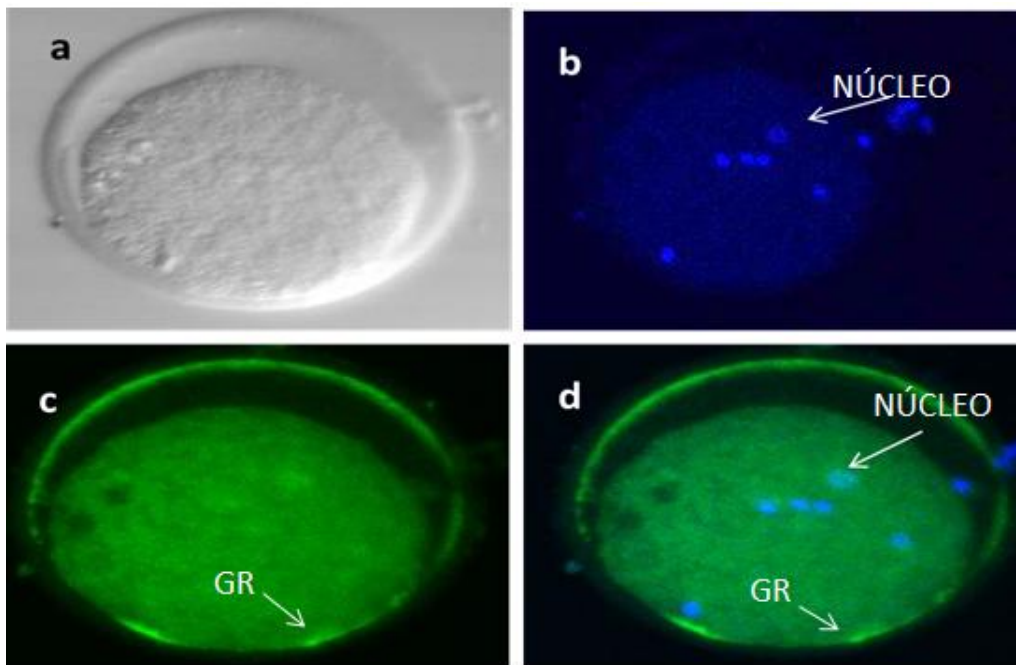
Tratamiento	Número de ovocitos evaluados	Localización del GR (n/%)		
		Citoplasmática	Periferia	Citoplasmática-Periferia
<b>Inmaduros Sin estrés*</b>	30	5/ 16.7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	25/ 83.3 <sup>a</sup>
<b>Control DMSO</b>	30	24/ 80 <sup>b</sup>	1/ 3.3 <sup>b</sup>	5/ 16.7 <sup>b</sup>
<b>DEX</b>	30	29/ 96.7 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	1/ 3.3 <sup>b</sup>
<b>Con estrés**</b>	30	24/ 80 <sup>b</sup>	3/ 10 <sup>b</sup>	3/ 10 <sup>b</sup>
<b>Control DMSO</b>	30	27/ 90 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	3/ 10 <sup>b</sup>
<b>DEX</b>	30	26/ 86.7 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	4/ 13.3 <sup>b</sup>
	30	28/ 93.3 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	2/ 6.7 <sup>b</sup>

\*ovocitos incubados a 38.5°C (sin estrés). \*\* ovocitos incubados a 41°C (con estrés).

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes entre sí (p < 0.005)

### 8.2.1 LOCALIZACIÓN DEL GR OVOCITOS INMADUROS

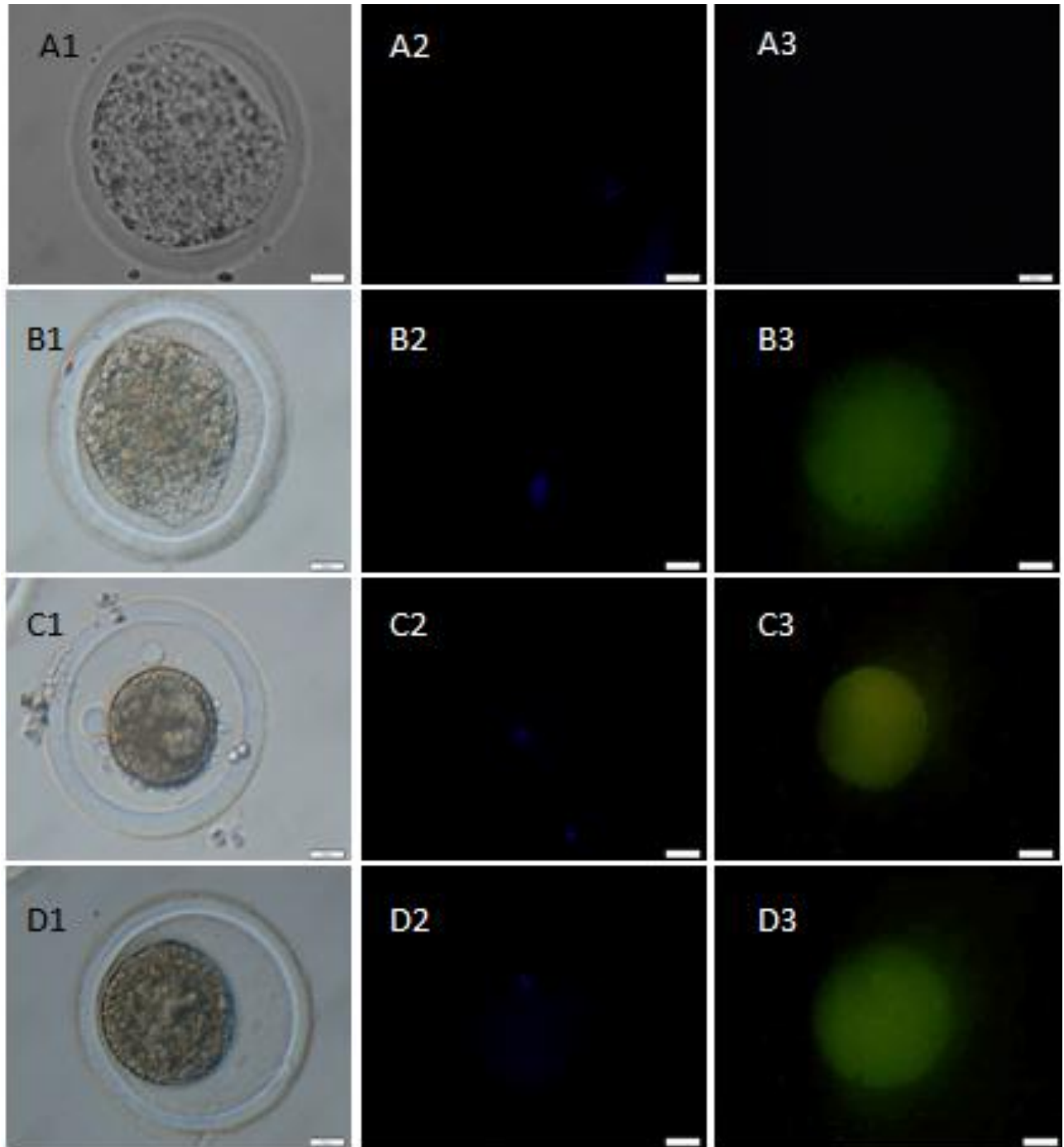
La localización del receptor en los ovocitos inmaduros se presentó a nivel citoplasmático y en la periferia muy cerca de la membrana plasmática (Figura 8); en el 83.3% de los ovocitos evaluados este patrón se presentó combinado, mientras que en el resto, es decir el 16.7 % de los ovocitos, solo mostraron fluorescencia en el citoplasma.



**Figura 8. Localización del GR en ovocito inmaduro.** a) Ovocito en campo claro, b) Ovocito con núcleo teñido con DAPI, c) Localización del GR a nivel citoplasmático y periferia del ovocito, (flecha) d) Merge de b y c. (Magnificación 40x).

### 8.2.2 LOCALIZACIÓN DEL GR EN OVOCITOS MADURADOS SIN ESTRÉS TÉRMICO (38.5°C)

En lo que corresponde a los tratamientos bajo condiciones de maduración a una temperatura de 38.5°C los ovocitos mostraron una localización del receptor mayoritariamente a nivel citoplasmático (80%), solo un 3.3% de los ovocitos mostraron una localización del GR en la periferia y un 16.7% de ellos mostraron el GR tanto en el citoplasma como en la periferia (cuadro 3). En lo que corresponde al tratamiento que incluyó como vehículo al DMSO, se presentó una distribución del mismo a nivel citoplasmático (96.7%) y un 3.3% tanto en el citoplasma como en la periferia. En cuanto al tratamiento en presencia de Dexametasona se presentó una distribución del 80% en el citoplasmática del total de ovocitos analizados, un 10% de los ovocitos mostraron al GR en la periferia, siendo el mismo porcentaje para el GR en citoplasma y periferia (Figura 9). Cabe señalar que los resultados en este grupo difieren con los observados en los ovocitos inmaduros ( $p < 0.005$ ).



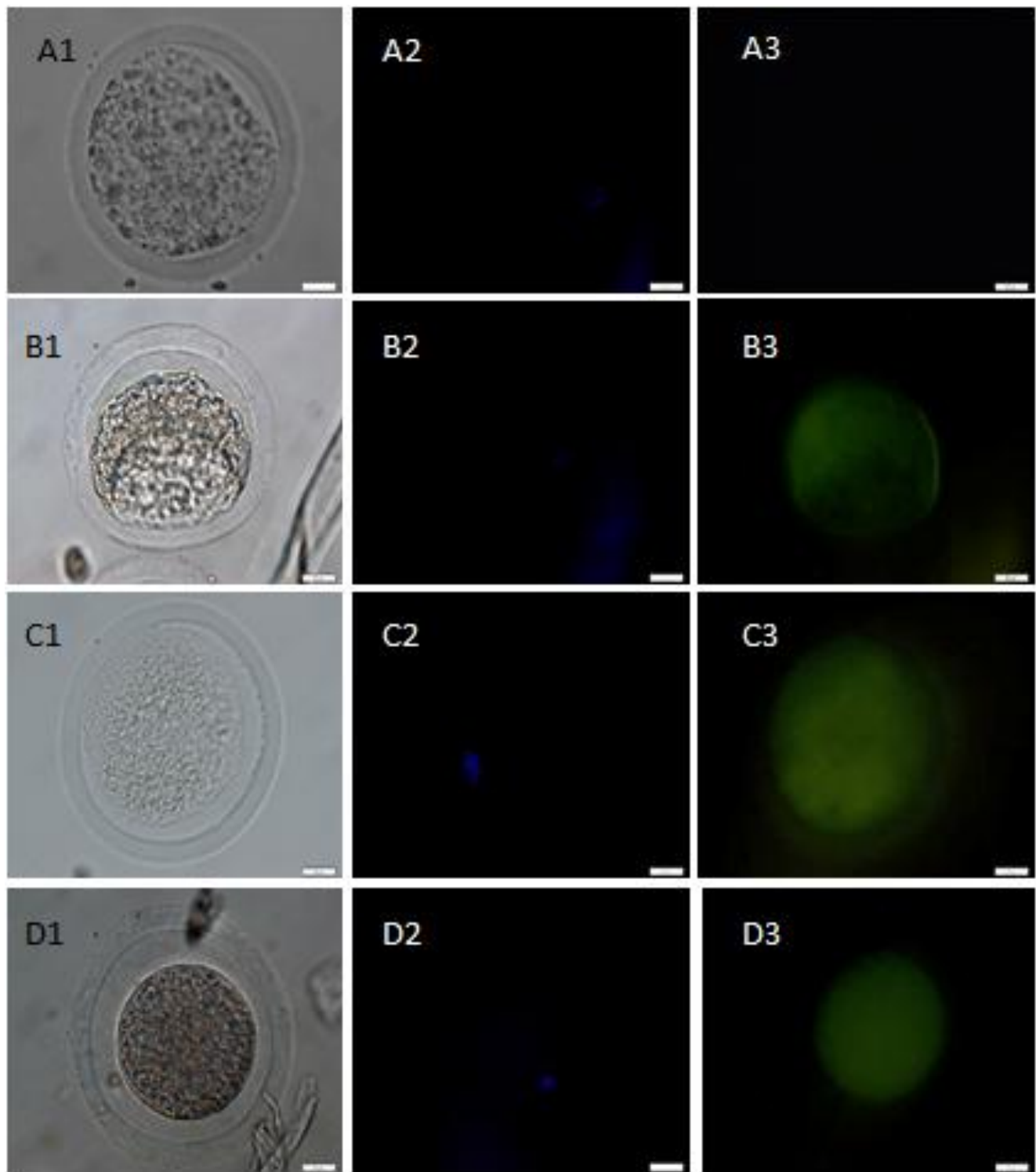
**Figura 9. Localización del GR** en ovocitos madurados a 38.5°C (sin estrés térmico). A1- A3 Control Negativo. B1; Ovocito control, C1; ovocito madurado con DMSO y D1; ovocito madurado con Dexametasona. B2, C2, D2; tinción con DAPI. B3, C3, D3; localización del GR. Magnificación= 40x. Barra de escala 25µm.

### 8.2.3 LOCALIZACIÓN DEL GR EN OVOCITOS MADURADOS CON ESTRÉS TÉRMICO (41°C)

La evaluación de los ovocitos sometidos a maduración bajo condiciones de estrés térmico sin la adición de DEX, también mostro una fluorescencia a nivel citoplasmático (90%) con un 10% de ovocitos que presentaron al GR tanto en el citoplasma como en la periferia, mientras que en las células tratadas con DMSO fue del 86.7% a nivel citoplasmático, con un 13.3% de los ovocitos que presentaron al GR a nivel citoplasmático y periférico. Finalmente en lo que correspondió a las células tratadas con DEX fue del 93.3% a nivel citoplasmático, con un 6.7% del GR a nivel citoplasmático y periférico (Figura 10). Estos resultados también difirieron con los observados en los ovocitos inmaduros, pero no con los ovocitos observados en el grupo sin estrés térmico ( $p < 0.005$ )

### 8.3 EVALUACIÓN MORFOLOGICA DE OVOCITOS MADURADOS BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS

A la evaluación morfológica de los ovocitos incluidos en los distintos tratamientos se observó que las células del cumulus mostraron cambios importantes en su patrón de expansión, observandose que el grupo madurado a 38.5°C (control) exhibieron un porcentaje mayor de expansión del CCO del (93.3%) con respecto a los grupos madurados bajo estrés térmico donde se incluyó DMSO y Dexametasona (56.6%), ( $p < 0.005$ ), además esta diferencia también se presentó entre el grupo control y Dexametasona sin estrés térmico (66.6%).



**Figura 10. Localización del GR en ovocitos madurados a 41°C (con estrés térmico).** A1- A3 Control Negativo. B1; Ovocito control, C1; ovocito madurado con DMSO y D1; ovocito madurado con Dexametasona. B2, C2, D2; tinción con DAPI. B3, C3, D3; localización del GR. Magnificación= 40x. Barra de escala 25µm.



**Cuadro 4.** Evaluación morfológica después del proceso de maduración de los distintos tratamientos

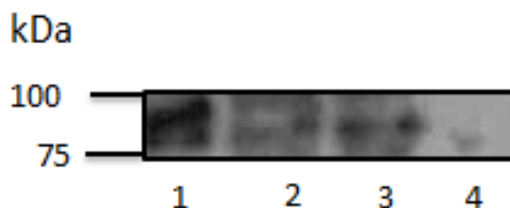
Tratamiento	Numero de ovocitos evaluados	Presencia de cuerpo polar (n/%)	Expansión del CCO (n/%)	Ovocitos en MII (n/%)
<b>Sin estrés*</b>				
Control	30	24/ 80	28/ 93.3 <sup>a</sup>	27/ 90
DMSO	30	18/ 60	26/ 86.6 <sup>ab</sup>	26/ 86.6
DEX	30	17/ 56.6	20/ 66.6 <sup>bc</sup>	26/ 86.6
<b>Con estrés**</b>				
Control	30	16/ 53.3	25/ 83.3 <sup>ab</sup>	27/ 90
DMSO	30	19/ 63.3	18/ 60 <sup>c</sup>	27/ 90
DEX	30	16/ 63.3	17/ 56.6 <sup>c</sup>	25/ 83.3

\*ovocitos incubados a 38.5°C (sin estrés). \*\* ovocitos incubados a 41°C (con estrés).

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes entre sí (p < 0.005).

#### 8.4 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR WESTERN BLOT

Los resultados para la determinación del GR, por medio de western blot en los ovocitos inmaduros y maduros a 38.5°C indicaron la presencia de esta proteína tanto en el lisado de los ovocitos inmaduros como en los maduros (Figura 11), en donde al parecer hay una mayor cantidad del receptor a glucocorticoides en los ovocitos maduros, ello debido a que la banda revelada fue más aparente (carril 3).



**Figura 11. Inmunodetección de GR por western blot** usando un anticuerpo específico para GR. Carril: 1 a precipitado de músculo, 2 ovocitos inmaduros, 3 ovocitos maduros, 4 suero fetal bovino.

## 8.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Por medio de la microscopia de luz y electrónica se visualizaron las características morfológicas presentes en los ovocitos sometidos a los diferentes tratamientos de este estudio.

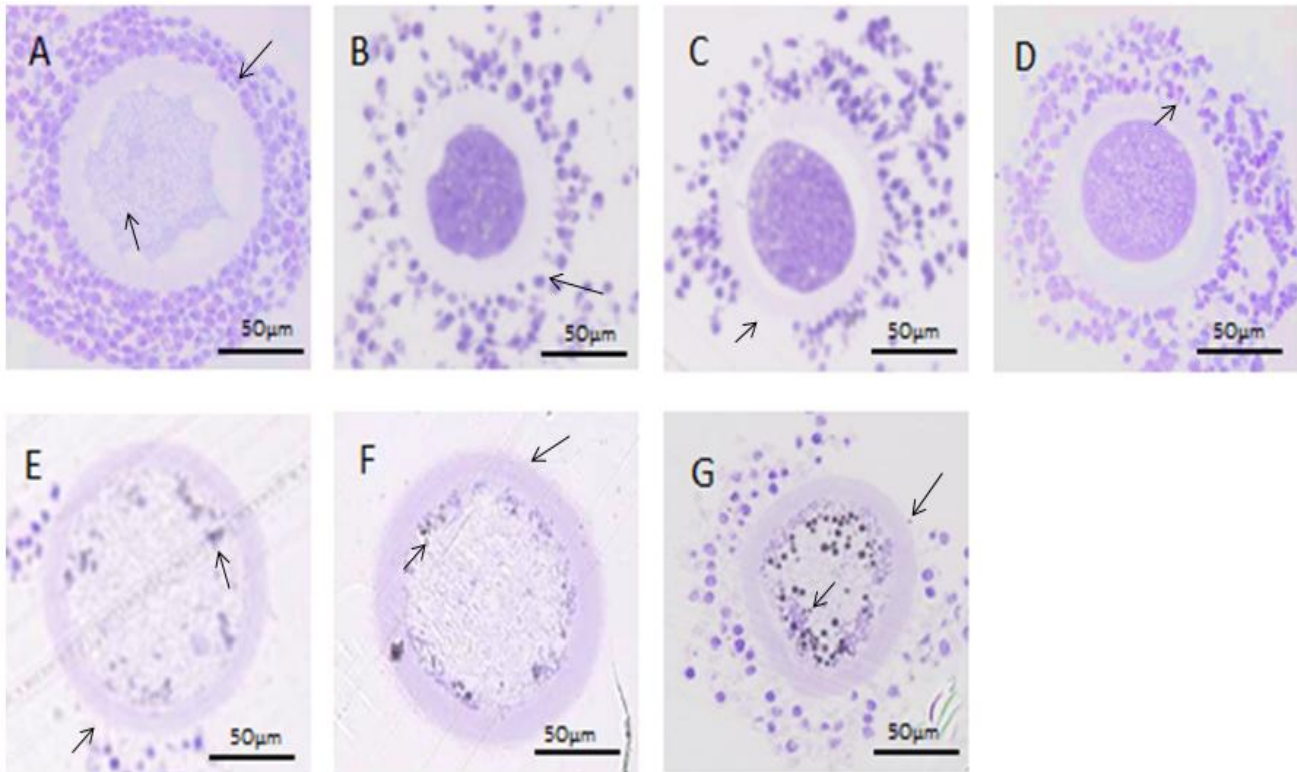
### 8.5.1 OVOCITOS INMADUROS

La observación de los cortes semifinos mostró que los ovocitos inmaduros (no tratados) se caracterizaron por tener varias capas de células del *cumulus* (CC) compactas sin expandir (Figura 12-A), las cuales se encontraban en estrecha relación con la zona pelucida (ZP) del ovocito, formando uniones comunicantes (tipo Gap) entre las membranas del CC y la membrana plasmática del ovocito (Figura 13-A). En lo que respecta a la integridad del CC, las células de la granulosa (CG) presentaron una morfología normal y sus núcleos bien definidos (Figura 13-A).

Los gránulos corticales se encontraron dispersos en el citoplasma sin formar conglomeraciones importantes entre ellos (Figura 14-A).

Las mitocondrias mostraron una morfología pleomorfica o de capuchón con las crestas arregladas en paralelo, presentando una distribución a nivel citoplasmático (Figura 15-A).

De manera general se observó que el citoplasma mantenía una condición íntegra, con una gran cantidad de gotas lipídicas (GL) (Figuras 14-A, 15-A, 16-A).



**Figura 12. Microscopia de luz, de ovocitos de bovino.** A: ovocito inmaduro (no tratado) una de las flechas indican las múltiples capas del CCO y la otra el citoplasma del ovocito. B: ovocito madurado a 38.5°C (control) la flecha señala la separación del CC. C: ovocito madurado con DMSO a 38.5°C la flecha señala una zona donde se desprendieron las células del CC. D: ovocito madurado con Dexametasona a 38.5°C la flecha indica la continuidad del CC. E: ovocito madurado a 41°C (control) una de las flechas indica la pérdida de las células del CC y la otra material densamente teñido en el citoplasma. F: ovocito madurado con DMSO a 41°C una de las flechas indica la pérdida del CC, la otra acumulación de material densamente teñido en la periferia. G: ovocito madurado con Dexametasona a 41°C las flechas indican zonas con pérdida de las células del CC y la presencia de acúmulos de vesículas.

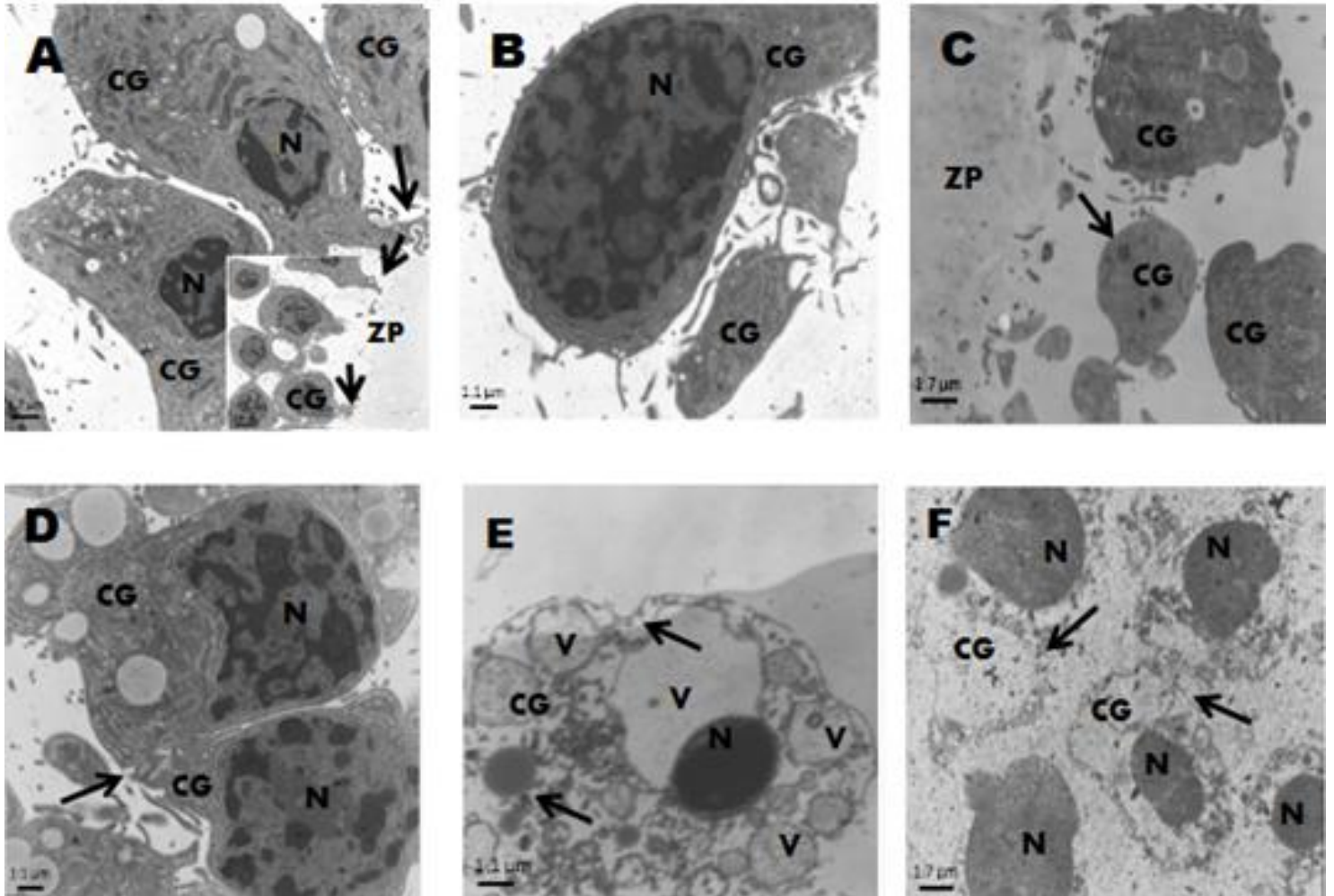
### 8.5.2 OVOCITOS MADURADOS SIN ESTRÉS TÉRMICO (38.5°C)

#### Ovocitos maduros (control)

En lo que corresponde a los ovocitos madurados bajo condiciones control (38.5°C), la microscopia de luz mostro una disminución en la cobertura y continuidad de las capas del CC (Figura 12-B), las cuales perdieron las uniones comunicantes establecidas a través de las membranas del CC y la membrana plasmática del ovocito (Figura 13-B). La integridad del CC observada a través de microscopia electrónica mostro que la morfología de las células de la granulosa fue normal con núcleos bien definidos (Figura 13-B).

Los gránulos corticales se mostraron en conglomeraciones justo debajo de la membrana plasmática del ovocito, y dispersos de manera individual algunos de ellos se mostraron por debajo de la membrana plasmática (Figura 14-B).

Las mitocondrias se presentaron en congregados en la periferia del ovocito o en el citoplasma asociados a vesículas (Figura 15-B).



**Figura 13. Microscopía electrónica de las células de la granulosa.** A: Células de la granulosa (CG) de ovocito inmaduro: núcleos (N), uniones comunicantes entre CG (flechas), el recuadro muestra: uniones comunicantes entre las CG y la zona pelucida del ovocito (ZP) (flechas). B: Células de la granulosa de ovocito madurado a 38.5°C (control). C: Células de la granulosa de ovocito madurado con DMSO a 38.5°C la flecha indica degeneración de las uniones comunicantes entre el ovocito y CG. D: Células de la granulosa de ovocito maduro con Dexametasona a 38.5°C la flecha señala las uniones comunicantes entre las CG. E: Células de la granulosa de ovocito madurado a 41°C (control) las flechas indican degradación de la CG, material electrodenso y vesículas (V). F: Células de la granulosa de ovocito madurado con Dexametasona a 41°C las flechas señalan degradación de la estructura de las CG.

El citoplasma del ovocito se mostró íntegro con una cantidad reducida de gotas lipídicas en comparación de los ovocitos inmaduros (Figura 16-B)

#### Ovocitos maduros con DMSO

Los ovocitos madurados con DMSO mostraron una reducción de la cobertura y continuidad de las capas del CC. Esto fue confirmado a través de la microscopía electrónica en donde se observa ausencia de las proyecciones de dichas células hacia la ZP, el citoplasma de dichas células presentó una ultraestructura normal (Figura 13-C).

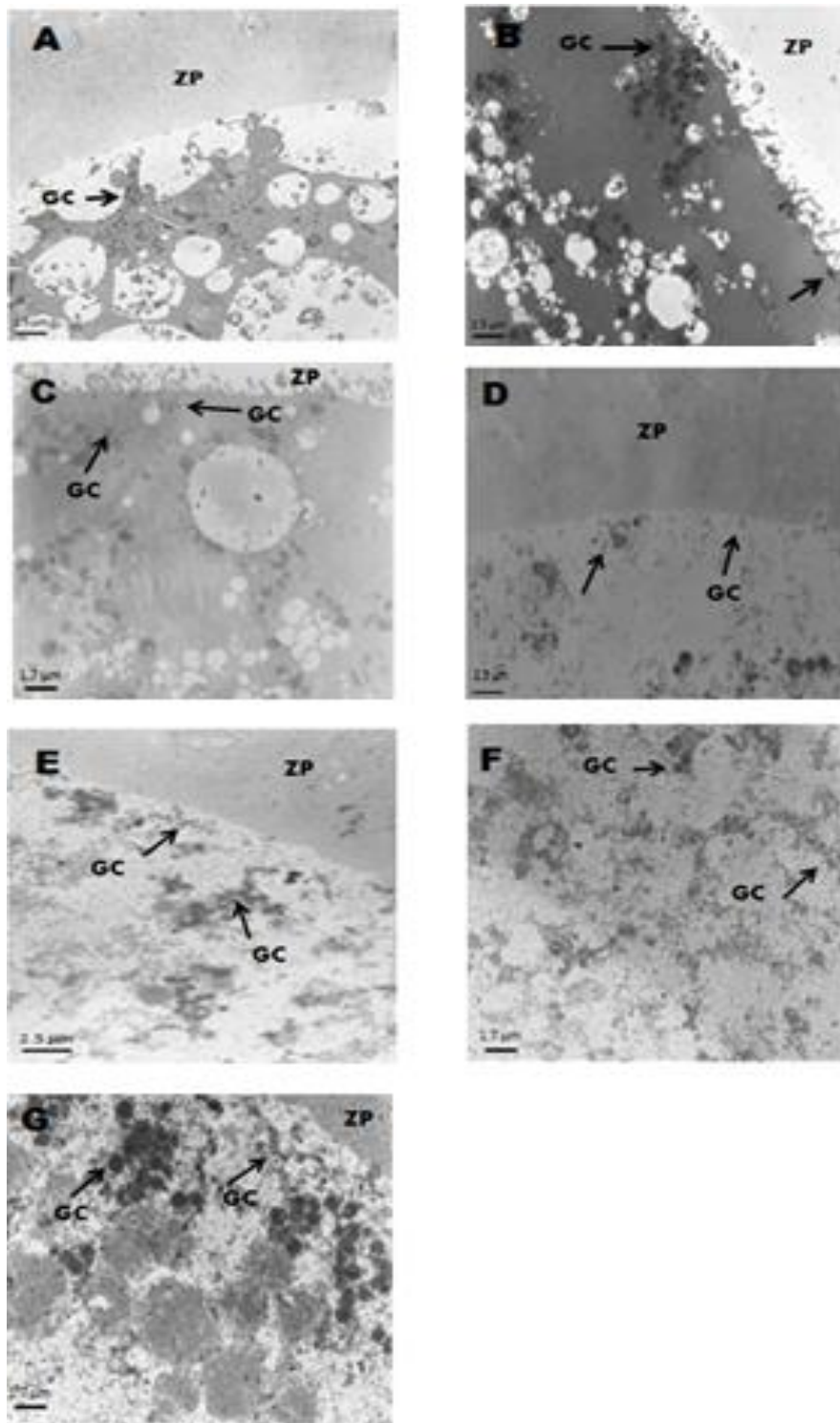
Los gránulos corticales se presentaron alineados de manera individual muy cerca de la membrana plasmática y en algunas regiones del citoplasma fue visible la presencia de gránulos corticales (Figura 14-C).

Las mitocondrias mostraron una morfología pleomorfa, presentándose distribuidas principalmente a nivel citoplasmático (Figura 15-C).

El citoplasma de los ovocitos se visualiza íntegro con algunas zonas de gotas lipídicas (Figuras 12-C y 16-C).

#### Ovocitos maduros con Dexametasona

Los ovocitos madurados con dexametasona a 38.5°C mostraron que las células de las capas del CC más estrechamente relacionadas (Figura 12-D). A la microscopía electrónica se observó una morfología íntegra del CC con los núcleos de sus células bien definidos y manteniendo puntos de contacto entre ellas (Figura 13-D).



**Figura 14. Microscopía electrónica de la zona cortical de los ovocitos de bovino.** A: ovocito inmaduro donde se observa la Zona elucida (ZP), la flecha señala acúmulos de Gránulos corticales (GC) y mitocondrias. B: ovocito madurado a 38.5 °C (control) las flechas señalan los GC congregados y solos alineados por debajo de la membrana plasmática. C: ovocito madurado con DMSO a 38.5°C las flechas indican GC. D: ovocito madurado con Dexametasona a 38.5°C las flechas indican GC con apariencia ligeramente electrodensa. E: ovocito madurado a 41°C las flechas indican GC con apariencia electrodensa. F: ovocito madurado con DMSO A 41°C las flechas indican GC con apariencia electrodensa distribuidos en el citoplasma. G: ovocito madurado con Dexametasona a 41°C las flechas indican GC con apariencia electrodensa cerca de la membrana plasmática del ovocito.

Los gránulos corticales de los ovocitos madurados bajo estas condiciones se presentaron de manera individual por debajo de la membrana plasmática y de manera escasa a nivel de citoplasma (Figura 14-D).

Las mitocondrias se mostraron con características pleomorficas, distribuidas en forma agrupada en el interior del citoplasma (Figura 15-D).

A nivel citoplasmático, los ovocitos presentaron pequeñas gotas lipídicas (Figuras 12-D y Figura 16-D).

### 8.5.3 OVOCITOS MADURADOS CON ESTRÉS TÉRMICO (41°C)

Ovocitos maduros a 41°C

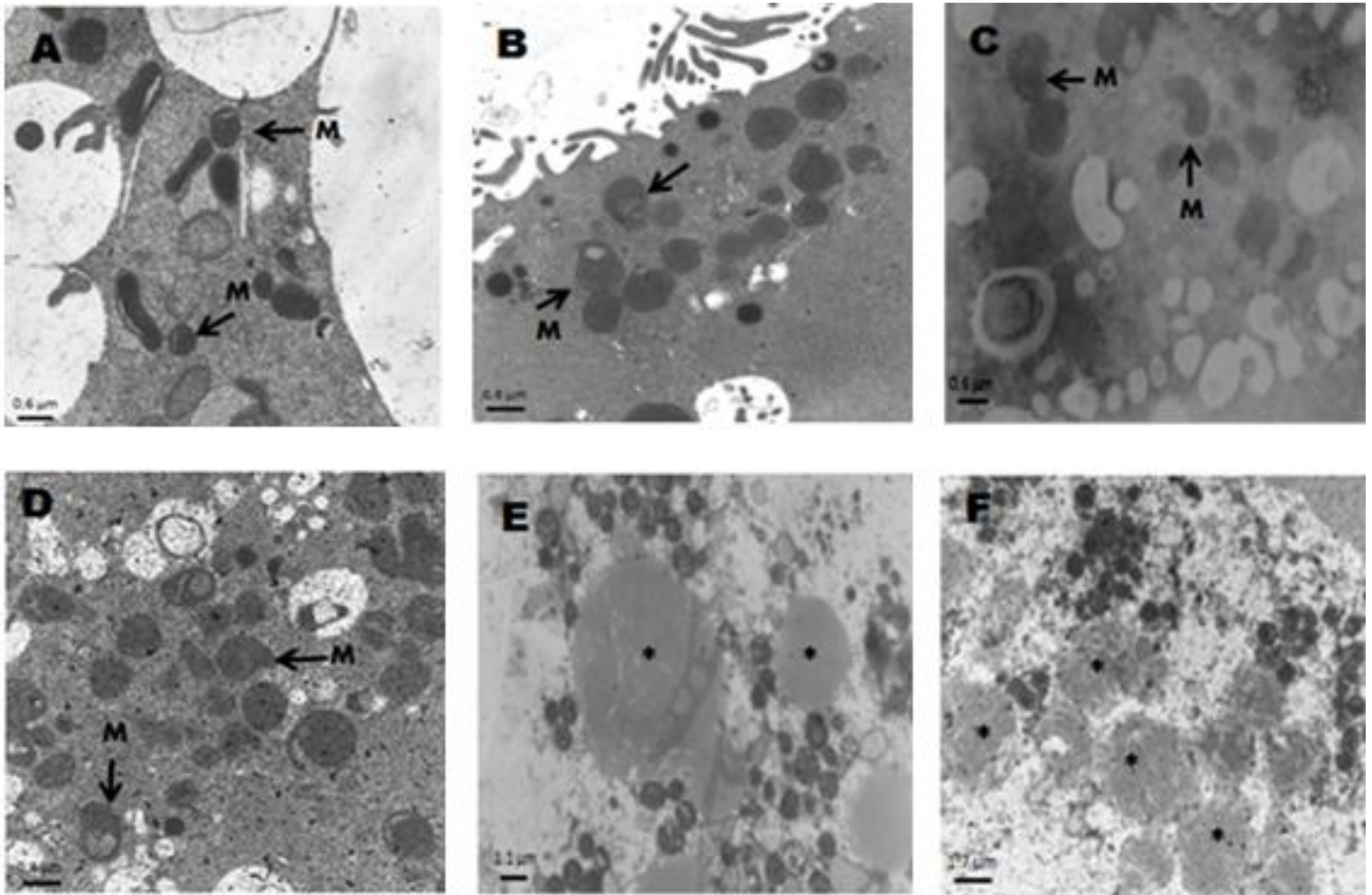
La microscopia de luz mostró una marcada reducción en la integridad y continuidad de las células de la corona radiada del ovocito, solo se observaron pocas células de la granulosa en algunas zonas del CCO (12-E). Lo cual se confirmó a la microscopia electrónica que mostro que las células de la granulosa presentaban procesos apoptoticos caracterizados por condensación de los núcleos de las células, vacuolización y pérdida de la integridad del citoplasma de dichas células (Figura 13-E).

Los gránulos corticales se mostraron de manera individual con apariencia electrodensa, esta apariencia también se mostró a nivel citoplasmático (Figura 14-E).

Las mitocondrias no se observaron de manera definida a través de la microscopia electrónica, aparentemente estas se mostraron agrandadas como material electrodense a nivel citoplasmático, a su vez se visualizaron características de las membranas mitocondriales en este material electrodense (Figura 15-E).

Con respecto a la integridad del citoplasma este se mostró con alteraciones como vacuolas y algunos espacios vacíos (Figura 12-E), a la constatación por la microscopia electrónica se visualizó una cantidad reducida de gotas lipídicas con algunas regiones vacías y una gran cantidad de material electrodense (Figura 16-E).





**Figura 15. Microscopia electrónica de las mitocondrias.** A: ovocito inmaduro las flechas indican mitocondrias (M). B: ovocito madurado a 38.5°C (control) flechas indican a mitocondrias cerca de la membrana plasmática del ovocito. C: ovocito madurado con DMSO a 38.5°C las flechas indican mitocondrias pleomorficas. D: ovocito madurado con Dexametasona a 38.5°C las flechas indican mitocondrias pleomorficas con membranas mitocondriales indefinidas. E: ovocito madurado a 41°C los asteriscos marcan material electrodenso en citoplasma con algunas membranas presentes. F: ovocito madurado con Dexametasona a 41°C los asteriscos muestran material electrodenso muy cerca de la membrana del ovocito con algunas membranas presentes.

#### Ovocitos maduros con DMSO

Los ovocitos bajo maduración con estrés térmico y la inclusión de DMSO mostraron una pérdida de la integridad de las células del CCO (12-F), lo cual no permitió caracterizar la morfología de dichas células.

Los gránulos corticales me mostraron dispersos a nivel del citoplasma con una apariencia electrodensa, y signos degenerativos, estos no presentaron conglomeraciones por debajo de la membrana plasmática (Figura 14-F).



Las mitocondrias no fueron visualizadas a ningún nivel citoplasmático.

En este caso la integridad del citoplasma no se mantuvo, visualizándose algunas vacuolas y zonas vacías (Figuras 12-F Y 16-F).

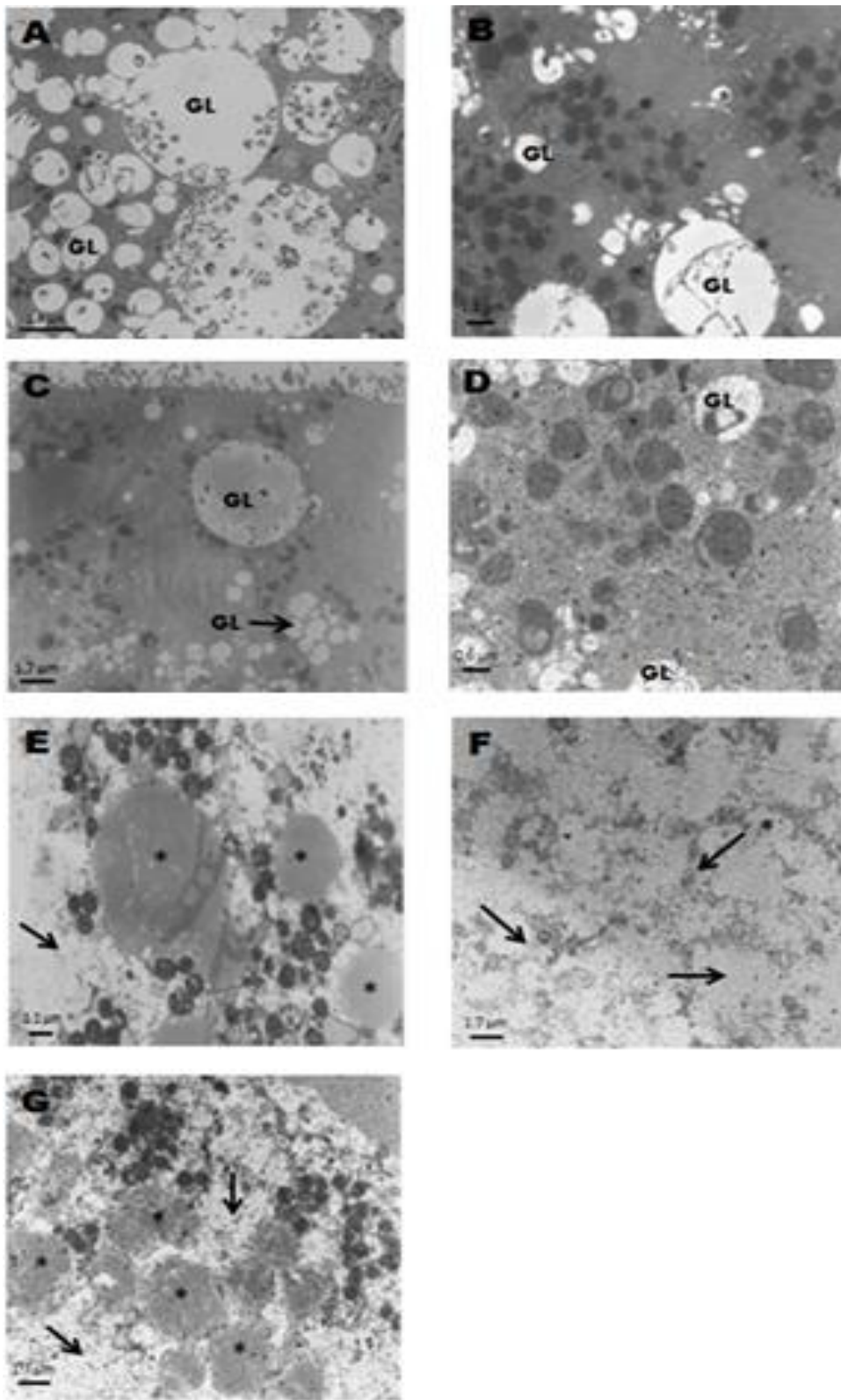
#### Ovocitos maduros con Dexametasona

La microscopia de luz (12-G) en los ovocitos maduros bajo estrés térmico y la adición del glucocorticoide sintético, mostró pocas capas del CC, las cuales se extendían de manera discontinua hacia la ZP, presentando algunas regiones sin presencia de células. Esto fue confirmado a través de la microscopia electrónica en donde se observó que las CG presentaban núcleos altamente condensados con destrucción total de su citoplasma (Figura 13-F).

Los gránulos corticales se mostraron muy cerca de la membrana plasmática con una marcada apariencia electrodensa, mostraron algunas conglomeraciones con características degenerativas (Figura 14-G).

Las mitocondrias no fueron visualizadas claramente a través de la microscopia electrónica, aunque aparentemente se mostraron agrandadas como material electrodense a nivel citoplasmático y por debajo de la membrana plasmática, a su vez se visualizaron características de las membranas mitocondriales en este material electrodense (Figura 15-F).

En cuanto a la integridad del citoplasma este presento vacuolas y una gran cantidad de espacios vacíos a nivel citoplasmático (Figura 12-G), lo cual se corrobora a la microscopia electrónica en donde a su vez se visualizó la presencia de grandes cantidades de material electrodense (Figura 16-G).



**Figura 16. Microscopía electrónica del citoplasma de ovocitos de bovino.** A: ovocito inmaduro se observan grandes cantidades de gotas lipídicas (GL). B: ovocito madurado a 38.5°C (control) se observan gotas lipídicas en citoplasma rodeadas de mitocondrias. C: ovocito madurado con DMSO a 38.5°C se observan GL de menor tamaño. D: ovocito madurado con Dexametasona se observan pocas GL. E: ovocito madurado a 41°C las flechas indican espacios vacíos en citoplasma con material electrodenso. F: ovocito madurado con DMSO a 41°C las flechas indican un citoplasma carente de GL con muchos espacios vacíos. G: ovocito maduro con Dexametasona a 41°C las flechas indican espacios vacíos en citoplasma y los asteriscos material electrodenso.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 SINCRONIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es una técnica importante que permite el estudio básico de los eventos biológicos que ocurren durante la maduración (Sagirkaya *et al.*, 2007). La recolección de ovocitos bovinos por la técnica de aspiración de los folículos es el método más comúnmente empleado (Katska, 1984; Sirad *et al.*, 1985; Epigg and Schroeder, 1986; Savio *et al.*, 1988; Gordon y Lu, 1990; Carolan *et al.*, 1992; Revel *et al.*, 1995;). Sin embargo se ha descrito que la remoción de los ovocitos del ambiente folicular propicia que este pueda reanudar de forma espontánea el progreso meiotico (Pincus y Enzmann, 1935). Mediante este fundamento múltiples investigaciones han demostrado que aparentemente la reanudación espontanea de la meiosis incide en la generación de una reducida tasa de embriones obtenidos mediante procedimientos *in vitro*, surgiendo que los ovocitos madurados bajo estas condiciones presentan una reducida competencia para llevar a cabo una correcta maduración (Mermillod y Marchal, 1999; Gendelman y Roth, 2012a). Por consiguiente, en este estudio establecimos dentro de la metodología, la inclusión de un inhibidor de la meiosis, 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX), el cual ha mostrado que mantiene el arresto meiotico por elevar los niveles de AMPc intracelular del ovocito (Goren y Dekel, 1994; Aktas *et al.*, 1995; Lonergan *et al.*, 2000; Mermillod *et al.*, 2000; Ponderato *et al.*, 2001; Coy *et al.*, 2005; Gendelman y Roth, 2012a), y con ello homogenizar el proceso de maduración de los ovocitos bovinos.

Los resultados obtenidos en la pre-incubación de los ovocitos bovinos para mantenerlos arrestados en el estado de VG permitieron mantener una tasa de ovocitos arrestados en la profase I del 60% ( $p < 0.005$ ). En los grupos madurados con IBMX a expansión de las células del cumulus fue reducida, esto coincide con lo reportado por Gendelman y Roth, 2012a, quienes indican que ovocitos de bovino sometidos a una pre-incubación con IBMX presentan una mínima expansión de dichas células. Sin embargo, es bien sabido que el grado de expansión de las células del *cumulus* no es un indicativo directo de la capacidad

de desarrollo del ovocito (Ali y Sirard, 2002 y Luciano *et al* 2004), por lo que la constatación de la presencia del núcleo en estado de VG es indispensable para establecer la eficiencia del inhibidor en el mantenimiento del arresto meiotico. Aunque aparentemente en nuestro estudio existió una estrecha relación entre el estado de las células del *cumulus* y el desarrollo del ovocito.

Por otra parte, la tasa de ovocitos que se mantuvieron en arresto meiotico resulto ser baja en comparación con resultados obtenidos por Lodde *et al.*, 2003, quienes reportaron que ovocitos de bovino incubados bajo la presencia de IBMX mantuvieron una tasa del 98% de ovocitos con presencia de VG, una tasa mayor que la obtenida en esta investigación.

Bajo estas consideraciones inferimos que probablemente la composición del medio o la concentración del inhibidor empleada pudieron haber influido en los resultados obtenidos. A este respecto se sabe que algunas sustancias adicionadas al medio de maduración como el suero, hormonas y factores de crecimiento actúan por la vía de adenilato ciclasa por lo cual la elección de los medios para suplementar resulta importante para retrasar el reinicio de la meiosis por IBMX (Barretto *et al.*, 2007). Lodde *et al.*, 2003, indican que la utilización de FSH a una baja concentración produce un incremento en la tasa de ovocitos en estado de VG, así como un retraso en la reanudación de la meiosis de ovocitos bovinos, cuando se suplementa con IBMX. Consideración que podría representar un importante factor sobre la tasa de los ovocitos bovinos que presentaron VG en esta investigación. Sin embargo, en nuestra investigación la progresión de ovocitos pre-incubados con IBMX a MII mostro una tasa del 40% a comparación del grupo control los cuales tuvieron una progresión meiotica a metafase II del 83.3% ( $p < 0.005$ ).

## 9.2 LOCALIZACIÓN DEL GR EN EL OVOCITO BOVINO

Investigaciones previas en diferentes tipos celulares han establecido que el receptor a glucocorticoides se localiza a nivel citoplasmático y que bajo la unión al glucocorticoide este experimenta una localización a nivel nuclear (Revollo y Cidlowski, 2009), de acuerdo a este “dogma” el mecanismo de acción del GR,

depende de la presentación del estresor (Nishi y Kawata, 2006; Adzic *et al.*, 2009). Por lo cual esta investigación se centró en la determinación de la localización del receptor a glucocorticoides bajo la presentación de estrés térmico durante el proceso de maduración *in vitro* del ovocito bovino.

Los resultados obtenidos por medio de inmunofluorescencia, mostraron que bajo nuestras condiciones en el ovocito bovino el GR se localizó principalmente a nivel citoplasmático en todos los grupos experimentales, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura cuando no existe el ligando que cause su translocación al núcleo. Es decir, aún con la presencia de Dexametasona y del estrés térmico (41°C), no se observó un cambio en el patrón de localización del GR, lo que posiblemente se deba a la concentración utilizada de Dexametasona en este estudio, pues se sabe que a nivel celular esto es un importante factor para que el GR cambie su localización (Li *et al.*, 2012). La concentración de Dexametasona incluida en el medio de maduración fue de  $10^{-7}$ M, la cual es utilizada en muchas investigaciones como agente potencializador de efectos deteriorantes sobre los ovocitos (Li *et al.*, 2012), pero también se reportan resultados variables cuando se emplean ovocitos de cerdo (Yang *et al.*, 1999), ratón (González *et al.*, 2010) y trucha arcoíris (Li *et al.*, 2012). Además, en diversos estudios, donde emplean otros tipos celulares, como en el caso del cerebro, han mostrado que la inducción de estrés crónico no compromete la habilidad del GR para experimentar la translocación nuclear, esto incluso con niveles altos de glucocorticoides (Adzic *et al.*, 2009). Por lo que probablemente los resultados obtenidos en el presente trabajo se deban a otros factores no considerados para su evaluación, ya que diversos estudios enfocados en el seguimiento de la dinámica de acción del GR, como en el caso de ovocitos de *Xenopus Laevis*, han mostrado que la translocación del GR no solo depende de la inducción hormonal, sino también del tiempo en el que se da su activación (Alberman *et al.*, 2004), de esta forma otro factor a tomar en consideración es el tiempo en el que este receptor experimenta la translocación nuclear. En este estudio la localización del receptor se realizó al finalizar el proceso de maduración *in vitro*, es decir 24 horas después de iniciado el periodo de incubación, lo cual muy probablemente repercutió en la

determinación a tiempo de la localización del GR. Esto lo constatan recientes investigaciones en diferentes líneas celulares de mamíferos, las cuales indican que el GR lleva a cabo un mecanismo de acción rápido una vez que se forma el complejo hormona-receptor teniendo un tiempo medio aproximado de 5 minutos (Alberman *et al.*, 2004). Por otra parte Oppong y colaboradores en el 2004, los cuales siguieron la dinámica de relocalización del GR en tiempo real, indicaron que en mastocitos la translocación nuclear del GR se llevó a cabo en un tiempo que va de 1 a 20 minutos.

En base a lo anterior es probable que el que no se hayan encontrado una relocalización nuclear en los tratamientos que incluyeron la presencia de glucocorticoides y estrés térmico, con respecto a los tratamientos controles, se deba a que el tiempo en el que probablemente se presentó este cambio en la localización del GR en los ovocitos bovinos, haya finalizado mucho antes de terminar el proceso de maduración de las células.

En este sentido, en futuras investigaciones se deberá considerar que para evaluar la translocación del GR al núcleo, será necesario estudiar a las células a los pocos minutos del tratamiento con el ligando y el estresor, sin dejar de tomar en consideración que posiblemente puedan existir diferencias entre los diferentes tipos celulares, los cuales comúnmente reflejan diferencias en la sensibilidad y respuesta en base a la inducción del estrés (O'Connor *et al.*, 2013), situación que demuestra una amplia capacidad de respuesta del GR la cual es heterogénea de acuerdo al tipo celular (Blind *et al.*, 2008).

### 9.3 IDENTIFICACIÓN DEL GR POR MEDIO DE WESTERN BLOT

En este estudio se constató la presencia del GR en el ovocito bovino no solo a través de su localización por medio del análisis de inmunofluorescencias, sino también a través de la identificación del mismo por medio de Western Blot, lo cual reitero la especificidad del anticuerpo en la identificación del GR. Previamente Mejía en el 2011, reporto que los ovocitos bovinos tanto en estado inmaduro como en los madurados bajo condiciones *in vitro* a una temperatura de 38.5°C, mostraban la presencia del receptor a glucocorticoides.

A diferencia de Mejía (2011) quien reportó que aparentemente los ovocitos inmaduros presentaron una mayor cantidad del receptor a glucocorticoides, nuestros resultados mostraron lo contrario, esto pudo deberse a que en nuestro estudio se incluyó una mayor cantidad de proteína en los ovocitos maduros (36.7 µg), con respecto a la cantidad de proteína incluida de los ovocitos inmaduros (32.6µg). Lo cual probablemente generó diferencias en la identificación del GR en los diferentes estados de maduración del ovocito bovino.

No obstante se reiteró que el ovocito bovino expresa de manera constitutiva al GR, lo cual coincide con lo reportado previamente por otros investigadores que han descrito la presencia del mismo en ovocitos; *Xenopus laevis* (Gao *et al.*, 1994, Alberman *et al.*, 2004) y Trucha Arcoíris (Li *et al.*, 2012).

Por consiguiente el patrón de concentración del GR en los ovocitos maduros analizados en esta investigación, indica que el ovocito bovino incrementa la concentración del GR durante el progreso de la meiosis a metafase II. Lo cual podría repercutir en el completo desarrollo del ovocito ya que se ha descrito que el GR es capaz de actuar reduciendo la estabilidad de enzimas relacionadas con la expresión genética y proliferación celular, como las MAPK, a través de mecanismos de represión (Cosio *et al.*, 2005). La activación de las MAPK es importante para el control del ciclo celular meiotico (Abrieu *et al.*, 2001; Fan y Sun, 2004; Liang *et al.*, 2007; Motlik *et al.*, 1998).

Si bien es cierto que no se ha descrito por completo el papel del GR en el proceso de maduración de ovocitos, algunas investigaciones han establecido que los glucocorticoides podrían estar impidiendo el completo desarrollo de los ovocitos. En el caso del ratón González y colaboradores en el 2011, mencionan que los glucocorticoides influyen de manera negativa en el progreso de maduración de los mismos, coincidiendo con lo reportado en ovocitos de cerdo expuestos a Dexametasona los cuales mostraron una reducción de la tasa de ovocitos madurados bajo condiciones *in vitro* (Yang *et al* 1999). Estos datos proporcionan evidencia de que el GR podría generar un efecto fisiológico negativo en el desarrollo del ovocito en el bovino (Edwards *et al.*, 2005).

#### 9.4 EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE LOS OVOCITOS BOVINOS

El presente estudio mostro marcadas alteraciones a nivel ultraestructural en los ovocitos madurados bajo condiciones de estrés térmico.

Ultraestructuralmente los ovocitos inmaduros se caracterizaron por presentar una morfología del CCO integra, con varias capas de células de la granulosa compactas que se extendían hasta la zona pelúcida del ovocito. La comunicación entre el CC y el ovocito ocurre a través de las uniones tipo gap, las cual facilitan el transporte de nutrientes y el intercambio de factores paracrinos (Levesque *et al.*, 1995), de manera que las interacciones entre el CC y el ovocito son cruciales para el desarrollo del mismo (Byung *et al.*, 2013). Dicha condición morfológica coincide con lo encontrado en el presente estudio en donde fue posible observar que los ovocitos inmaduros mantenían estructuralmente estas células con una morfología bien definida si presentar cambios o daños en su estructura. Por otra parte dichos ovocitos mostraron características propias de un ovocito inmaduro, en donde no hay redistribución de organelos tales como gránulos corticales y mitocondrias.

En contraste los ovocitos madurados bajo condiciones control (38.5°C) mostraron una morfología del CCO más laxa, indicativo de que el proceso de maduración *in vitro* modifico las uniones que mantienen estas células y su proyección hacia el ovocito. Fisiológicamente este tipo de uniones (tipo gap) que van de las células de la granulosa al oolema (Hyttel *et al.*, 1997), permiten el desarrollo adecuado del ovocito durante el proceso de maduración, pero también tienen que inactivarse para que el ovocito progrese hasta la metafase II (Byung *et al.*, 2013).

En lo que corresponde a los gránulos corticales estos mostraron una migración cerca de la membrana plasmática del ovocito, lo cual coincide con lo establecido en la literatura, donde se señala que ello es indicativo de una adecuada maduración citoplasmática (Szollosi, 1967; Vázquez *et al.*, 2010), ya que durante la reanudación de la meiosis migran del interior del citoplasma hasta asumir una posición de 0.4-0.6  $\mu\text{m}$  por debajo de la membrana plasmática (Ducibella y Buetow, 1994; Vázquez *et al.*, 2010).



En cuanto a las mitocondrias estas se caracterizaron por presentarse en la porción central de los ovocitos, aunque también se observaron en la periferia del mismo, lo cual resulta ser importante ya que dicha localización también está altamente relacionada con la maduración de la célula (Shan Liu *et al.*, 2009). Esto coincide con lo reportado por Stojkovic *et al.*, 2009 quienes indicaron que existen conglomerados mitocondriales en la periferia del citoplasma de los ovocitos bovinos madurados bajo condiciones *in vitro*. Adicionalmente, se ha reportado que durante la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos existe una mayor relocalización de las mitocondrias (Bavister, 2000).

En cuanto a la disposición de la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma del ovocito, esta disminuyó a comparación de los ovocitos inmaduros, esto probablemente pueda ser relacionado a que durante el proceso de maduración del ovocito los lípidos intracelulares fungen como materia energética para experimentar dicho proceso (Lehninger, 1972; Isachenko *et al.*, 2001). Sin embargo investigadores como Dvorak 1989, sugieren que el volumen de vesículas lipídicas se incrementa conforme el ovocito progresa a MII.

La maduración nuclear del ovocito evaluada por fluorescencia mostro que los ovocitos del grupo control progresaron hasta MII con una tasa del 90%.

En lo que respecta a la marcada diferencia en la migración y estructura de los gránulos corticales entre los ovocitos madurados a 38.5°C en presencia de DMSO y Dexametasona con respecto al grupo control, la menor cantidad en los dos primeros grupos muy probablemente pudieran deberse al tratamiento al que fueron sometidos los ovocitos. Previos estudios han reportado que la reducción de la población de gránulos corticales, así como su apariencia electrodensa, puede deberse a degeneración de los mismos (Lonegard *et al.*, 2003). Sin embargo investigadores como Maya y colaboradores en el 2013 han establecido que la pérdida de gránulos corticales en el ovocito bien pudiera estar relacionada con un proceso de maduración temprana.

La inclusión de Dexametasona y DMSO durante la maduración a 38.5°C aparentemente no influyó en la población de mitocondrias presentes en los ovocitos, ya que si bien estas se caracterizaron por tener una morfología

pleomorfica, esto es normal en el caso del ovocito de bovino (Paulini *et al.*, 2014), En cuanto a que no presentará un efecto negativo en el desarrollo de este mismo tipo de células hasta MII (86.6%), esto coincide con lo reportado por Yding en el 2003, quienes reportaron que en ovocitos de ratón la inclusión de Dexametasona y cortisol durante la maduración de los mismos no afectó la tasa de ovocitos que cursaron por la meiosis pues estos experimentaron la ruptura de la vesícula germinal. Por otra parte González y colaboradores en el 2010 indicaron que la exposición de ovocitos de ratón a Dexametasona y cortisol no repercutió en la maduración de los mismos hasta MII, sino hasta que estos experimentaron la fertilización y desarrollo embrionario.

De manera particular los ovocitos madurados bajo condiciones de estrés térmico (41°C) tanto el grupo control como los madurados bajo la adición de DMSO y Dexametasona mostraron una reducida continuidad de las capas del CC que rodean al ovocito. Estas células mostraron marcados daños ultraestructurales, caracterizados por condensación nuclear, vacuolización y pérdida de la integridad del citoplasma, características que posiblemente estén relacionadas con una apoptosis inducida por el efecto del estrés térmico al que fueron sometidas durante la maduración *in vitro*. Lo cual coincide con lo reportado por Edwards *et al.*, 2005, quienes reportaron alteraciones en la función de las células del cumulus de ovocitos de bovino madurados bajo una temperatura de 41°C. Otros investigadores como Lenz *et al.*, 1983 señalan que el estrés térmico puede reducir el desarrollo de los ovocitos bovinos a través de alteraciones en la función de las células del *cumulus*, esto bajo una temperatura de 41°C durante un periodo de maduración de 24 horas.

Se menciona que una vez que el ovocito ha sido removido del ambiente folicular las proyecciones que establecen las células del cumulus que lo rodean y el oolema sirven para generar un microambiente que le ayuda a su mantenimiento, debido a que establecen una comunicación bidireccional (Kruip *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 2005). Por lo que resulta de relevancia el hecho de que si la función de las células del *cumulus* fue afectada durante el proceso de maduración

por el estrés térmico, esto pudo haber repercutido de manera importante en el desarrollo del ovocito (Levesque *et al.*, 1995)

En cuanto a la falta de conglomeración de los gránulos corticales en los grupos de ovocitos sometidos a estrés térmico y la presencia de gránulos eletrodensos, lo primero coincide con lo reportado por Vázquez *et al.*, 2010 quienes también mencionan una pérdida en la conglomeración de gránulos corticales en ovocitos madurados bajo condiciones de estrés térmico (41.5°C), dicho hallazgo fue atribuible a la inducción de estrés térmico. Por otra parte Maya y colaboradores en el 2013, señalaron que la exposición de ovocitos bovinos a una temperatura de 41.5°C por las últimas 3 horas de maduración se relaciona con un envejecimiento prematuro del ovocito, lo cual se manifestó a través de una temprana exocitosis de los gránulos corticales. En base a estos hallazgos resulta evidente que el estrés térmico induce una marcada degeneración de los gránulos corticales, presencia de vacuolas y una gran cantidad de espacios vacíos con regiones de material electrodenso a nivel citoplasmático, aunque este patrón hasta nuestro conocimiento aún no ha sido descrito en las investigaciones en donde se incluye la presencia de estrés térmico en la maduración del ovocito (Vázquez *et al.*, 2010). Aunque evidentemente estas condiciones morfológicas pueden repercutir de manera importante en la capacidad del ovocito para experimentar una adecuada maduración. De hecho *in vitro* el incremento en la temperatura (40-42°C), durante la maduración de ovocitos, ha sido relacionado con daños o cambios que afectan la maduración citoplasmática (Ju *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1998).

En lo que corresponde a la gran cantidad de material electrodenso encontrado en este último tipo de ovocitos, ya que presentaron características similares a la morfología mitocondrial, en base a este supuesto inferimos que estos organelos se encontraban degenerados por los tratamientos a los que fueron sometidos. Estas características también han sido reportadas por otros investigadores durante la maduración de ovocitos bovinos, en donde la morfología de las mitocondrias se describe como significativamente afectadas con material electrodenso e hinchadas (Lonegard *et al.*, 2003). De tal manera que una mala condición de este organelo puede influir de manera negativa en su función. Siendo importantes en el proceso

de maduración del ovocito ya que la organización y actividad metabólica de la mitocondria es necesaria para la reanudación de la meiosis (Van Blerkom y Runner, 1984; Hyttel *et al.*, 1986b, 1989; de Loos *et al.*, 1989; Van Blerkom *et al.*, 1995; Cummins, 1998; Lonegard *et al* 2003).

Respecto a la maduración nuclear (evaluada por fluorescencia), en este mismo tipo de células no se mostró un efecto directo en la progresión a MII (estrés térmico control, DMSO y Dexametasona). Lo cual coincide con lo reportado por Edwards y colaboradores en el 2005 quienes reportaron que el estrés térmico no influye en la progresión a MII de ovocitos bovinos madurados bajo 41°C. De manera similar a lo que reportó Yang y colaboradores en 1999, quienes señalaron que en el caso del cerdo la inclusión de Dexametasona no tuvo un efecto negativo en la progresión del ovocito a través de MII.

Sin embargo considerando que en el presente estudio se muestran claras evidencias de los efectos deteriorantes del estrés térmico sobre las condiciones ultraestructurales de los ovocitos, inferimos que el que no se hayan encontrado marcadas diferencias en la maduración *in vitro* de ovocitos sometidos a estrés térmico, pudiera deberse a que su valoración se realizó a través de microscopia de luz, la cual no establece una descripción morfológica tan detallada como la microscopia electrónica, en donde fue posible observar marcados cambios y daños en los ovocitos maduros bajo estrés térmico, característica que en nuestro estudio son atribuibles únicamente al estrés térmico. Por lo que nuestros resultados aportan una caracterización más exacta de los efectos del estrés térmico durante la maduración del ovocito

Por consiguiente el presente estudio mostramos cambios morfológicos ultraestructurales importantes en los ovocitos bovinos madurados bajo estrés térmico, las cuales pueden influenciar de manera negativa el desarrollo competente del ovocito para experimentar procesos de desarrollo subsecuentes.

## **10. CONCLUSIÓN**

Los glucocorticoides vía su receptor no afectan la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos, sin embargo el estrés térmico si induce cambios y alteraciones ultraestructurales que puede repercutir en el óptimo desarrollo de los mismos.

## 11.PERSPECTIVAS

En nuestro estudio la inclusión de Dexametasona durante el proceso de maduración *in vitro* bajo condiciones de estrés térmico no mostro una participación directa en la relocalización nuclear del receptor a glucocorticoides. Sin embargo se requieren más estudios que contemplen el tiempo en el que este responde a la presencia de su ligando.

La presencia del GR es mayor en los ovocitos maduros que en los ovocitos inmaduros, aunque debe determinarse si su presencia se acentúa bajo la inclusión de su ligando y condiciones de estrés térmico.

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos bajo condiciones de estrés térmico induce marcados cambios y daños ultraestructurales que repercutirá en el potencial de desarrollo del ovocito bovino, dichos eventos aparentemente no dependen de la adición de Dexametasona, sin embargo esto podría determinarse a través de la inclusión de un antagonista como RU486 (Mifepristona).

## 12. LITERATURA CITADA

1. ADCOCK IM, ITO K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55:256-66.
2. ADONAA, PAULO ROBERTO., LISBOA PIRES, PEDRO RATTO., QUETGLAS, MARIA DANIELA., SCHWARZ, K.R.L., VERDE LEAL CLAUDIA LIMA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development *Animal Reproduction Science*. 2008; 108: 49–65.
3. ADZIC M, DJORDJEVIC, NICIFOROVIC A, DEMONACOS C, RADOJCIC M. Acute or chronic stress induce cell compartment specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alters its transcriptional activity in Windstar rat brain. *J.Endocrinol* 2009; 202: 87-97.
4. ALBERMAN LARS., SHAHIN VICTOR., LUDWIG YVONNE., SCHAFER CLAUDIA., SCHILLERS HERMANN Y OBERLEITHNER HANS. Evidence for importin  $\alpha$  independent nuclear translocation of glucocorticoid receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2004; 14: 343-350.
5. ANDERSEN CY. Effect of glucocorticoids on spontaneous and follicle stimulating hormone induced oocyte maturation in mouse oocytes during culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 85:423-427.
6. ARÉCHIGA FLORES, CARLOS FERNANDO Y HANSEN J. PETER. Efectos adversos del estrés calórico en la reproducción del ganado bovino. simposio de estrés calórico en el ganado lechero. unam, fmvz, División de Educación Continua, Depto. de reproducción. 2005.

7. BARATI, B. F., AGUNG B., WONGSRIKEAO , P. TANIGUCHI M., NAGAI T., OTOI T. Meiotic competence and DNA damage of porcine oocytes exposed to an elevated temperature. *Theriogenology*. 2008; 69: 767–772
8. BARRETTO, L. S.S., CAIADO CASTRO, V. S. D., GARCÍA J. M., MINGOTI G. Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2007; 99: 202–207.
9. BARTIS DOMOKOS, FERENC BOLDIZSAR, KRISZTIA'N KVELL, MARIANN SZABO, LASZLO PALINKAS, PETER NEMETH, EVA MONOSTORI, TIMEA BERKI. Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 354 253–258.
10. BAVISTER BD. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53:619–626.
11. BLIND,, RAYMOND D Y GARABEDIAN MICHAEL J. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2008.
12. BRANN W. DARRELL Y MARESH B. VIRENDRA. Role of corticosteroids in female reproduction. *The FASEB Journal* 1991;Vol. 5 September.
13. BRAW-TAL R, YOSSEFI S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 1997; 109:165-231.
14. BYUNG-HYUN CHOI A, JAE-IL BANG A, JONG-IN JIN A, SEONG-SU KIM A, HYUN-TAE JO A. Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes . *Theriogenology* 2013; 80: 1117–1123



15. COSIO B G., TORREGO A., ADCOCK I M. Mecanismo moleculares de los glucocorticoides. Arch Bronconeumol 2005; 41: 34-41.
16. CHEN, W. Y., YANG, JG., LI, PS. Effect of dexamethasone on the expression of p34 y ciclina B1 in pig oocytes in vitro. Molecular reproduction of development 2000;56, 74-79..
17. CONTI MARCO., HSIEH MINNIE., ZAMAH MUSA Y SU OH, JEONG. Novel signaling mechanism in the ovary during oocyte maturation and ovulation. Molecular and cellular endocrinology. 2012. 356: 65-73.
18. DVORAK, M. Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. Developments in Ultrastructure of Reproduction. 1989: 273-280.
19. EDWARDS JL, HANSEN PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. Mol Reprod Dev 1997;46:138-145.
20. EPPIG JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 2001; 122:829-838.
21. EDWARDS JL, A. M. SAXTON, J. L. LAWRENCE, R. R. PAYTON, AND J. R. DUNLAP. Exposure to a Physiologically Relevant Elevate Temperature Hastens In vitro in Bovine Oocyte. J. Dairy Sci 2005;88:4326–4333.
22. FERREIRA EM, VIREQUE AA, ADONA PR, MEIRELLES FV, FERRIANI RA, NAVARRO PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology 2009; 71:836-848.
23. FORTUNE JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod. 1994; 50:225-232.

24. FRANKLYN FB, JR. *Molecular Endocrinology*. 3<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press. Sn Diego, California 2004.
25. GAO X., KALKHOVEN E., WINSTON., FULLER S A., HURRELL J G R. Immunoblotting and inmunodetection. In: *Current Protocols of Immunology*. John Wiley y Sons, Inc. 2008, 8.10.1-8.10.28.
26. GENDELMAN, M., AROYO, A., YAVIN, S., ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 2010; 140:73–82.
27. GENDELMAN M. Y ROTH Z. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science* 2012a; 134:125– 134.
28. GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, KOT K. Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. *Biol Reprod* 2001b; 65:345-350.
29. GÓNZALEZ RAQUEL., RUIZ LEON YOLANDA., GOMENDIO MONTSERRAT., ROLDAN, R.S. EDUARDO. The effect of glucocorticoids on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. *Toxicology in Vitro* 2010; 24: 108-115.
30. GORDON I. In. *Laboratory production of cattle embryos* 2nd ed., Cambridge: CAB International, University Press; 2003
31. GUPTA B. B. P. Y LALCHHANDAMA K. Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current Science* 2002; vol. 83, no. 9, 10 November.

32. GUPTA SHAKTI, ASLAKSON ERIC, GURBAXANI BRIAN M AND D VERNON SUZANNE. Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals disability. 2007; 10.1186/1742-4682-4-8.
33. HIRSHFIELD AN. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod.* 1994; 50:421-428.
34. HSIEH M, LEE D, PANIGONE S, HORNER K, CHEN R, THEOLOGIS A, LEE DC, THREADGILL DW, CONTI M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:1914-1924.
35. HOSOE, M. Y SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote.* 1997; 5: 371-6.
36. HSUEH AJW, BILLIG H, TSAFRIRI A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *ER.* 1994; 15: 707-724.
37. HYTTEL P, FAIR T, CALLESEN H, GREVE T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997; 47:23-32.
38. ISACHENKO V., E. ISACHENKO, MICHELMANN H. W., ALABART J. L. VAZQUEZ I., BEZUGLY N y NAWROTH F. Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes. *Anat. Histol. Embryol.* 2001; 30: 333-338.
39. JU, JYH-CHERNG, SHIE JIANG, JUNG-KAI TSENG, JOHN E. PARKS, XIANGZHONG YANG. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes . *Theriogenology* 2005; 64:1677-1689.

40. LATTANZI, MARIANO L. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 2010.
41. LENZ R. W., BALL G. D., LEIBFRIED M. L., AX R. L Y FIRST N. L. In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes are Temperature-Dependent Processes. *Biology of reproduction*. 1983; 29: 173-179.
42. LEUNG PETER C.K. Y ADASHI ELI Y. THE OVARY. Segunda edición. Elsevier. Capítulo 7.
43. LEVESQUE JT, SIRARD MA. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42:114–21.
44. LI, MAO, LEATHERLAND F. JOHN., VIJAYAN M. MATT., KING W. ALLAN Y MADAN PAVNEESH. 2012. Glucocorticoid receptor activation following elevated oocyte cortisol content is associated with zygote activation, early embryo cell division, and IGF system gene responses in rainbow trout. *Journal of Endocrinology* (2012) 215, 137-149.
45. LODDE VALENTINA., FRANCIOSI FEDERICA., TESSARO IRENE., MODINA C. SILVIA Y LUCIANO ALBERTO M. Role of gap junction – mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. *J. Assist Reprod Genet*. 2003; 30: 1219-1226.
46. LONERGAN PATRICK, FAERGE INGER, MADDOX POUL, HYTTEL, BOLAND MAURICE Y TRUDEE FAIR. Ultrastructural Modifications in Bovine Oocytes Maintained in Meiotic Arrest In Vitro Using Roscovitine or Butyrolactone. *Molecular reproduction and development*. 2003; 64:369–378.

47. LOOS F., VAN VLIET C., VAN MAURIK P. AND KRUIP TH. A. M. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 1989; 24:197-204.
48. LUCIANO AM, MODINA S, VASSENA R, MILANESI E, LAURIA A, GANDOLFI F. Role of the intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod* 2004;70:465-472.
49. MARQUEZ C. YSABEL, GUTIERREZ CARLOS; GALINA CARLOS y VALENCIA JAVIER. Reproducción de los animales domésticos. Limusa tercera edición. 2009. pag: 43-54.
50. MARODER MARELLA., FARINA, FT. ANTONIETTA, VACCA, ALESSANDRA., FELLI MARIA PIA., MECO DANIELA., SCREPANTI, ISABELLA., L. FRATI, Y A. GULINO. Cell-Specific Bifunctional Role of Jun Oncogene Family Members on Glucocorticoid Receptor-Dependent Transcription. *Molecular Endocrinology* 1993.
51. MAYA-SORIANO M.J., LÓPEZ-GATIUS F., ANDREU-VÁZQUEZ C., LÓPEZ-BÉJAR M. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology*. 2013; 79: 299–305.
52. MEJÍA FLORES ITZAYANA. Identificación de receptor para glucocorticoides en ovocitos de bovino. Tesis FMVZ-UNAM. 2011.
53. MONNIAUX D, MONGET P, BESNARD N, HUET C, PISSELET C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*. 1997; 47:3-12.

54. MOTLIK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1998; 49: 461–469.
55. O'CONNOR M, CONSTANCE., RODELA M, TAMMY., MIVELA R, VIKTORIA., BALSHINE SIGAL., GILMOUR M, KATLEEN. Corticosteroid receptor gene expression is related to sex and social behavior in a social fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2013; 164: 438–446.
56. ONARD J.L.M. SCHONEVELD, INGRID C. GAEMERS, WOUTER H. LAMERS. Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochemical et Biophysical Acta* 2004; 1680 114– 128
57. OPPONG EMMANUEL., PER NIKLAS HEDDE , SYLWIA SEKULA-NEUNER , LINXIAO YANG , FALKO BRINKMANN , RENÉ M. DÖRLICH , MICHAEL HIRTZ , HARALD FUCHS , GERD ULRICH NIENHAUS , AND ANDREW C. B. CATO.. Localization and Dynamics of Glucocorticoid Receptor at the Plasma Membrane of Activated Mast Cells. *Nano Micro Small*. 2014; 10: 1991–1998.
58. PAULINI FERNANDA, CARVALHO SILVA RENATA, JIVAGO DE PAULA RÔLO JOSÉ LUIZ Y MADEIRA LUCCI CAROLINA. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. 2014; 7:102.
59. PAYTON RR, ROMAR R, COY P, SAXTON AM, LAWRENCE JL & EDWARDS JL. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 1303–1308.
60. PICTON HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. 2001; 55:1193-1210.

61. PINCUS G Y ENZMANN EV. The comparative behavior of mammalian eggs in viva and in vitro. *Nature*, 1935; 208:349.
62. RISPOLI L A., J L LAWRENCE, R R PAYTON, A M SAXTON, G E SCHROCK, F N SCHRICK, B W MIDDLEBROOKS J R DUNLAP, J J PARRISH Y J L EDWARDS. Disparate consequences of heat stress exposure during meiotic maturation: embryo development after chemical activation vs. fertilization of bovine oocytes. (2011) *Society for Reproduction and Fertility*: 10.1530/REP-11-0032.
63. REVEL F, MERMILLO P, PEYNOT N, RENARD JP, HEYMAN Y. Low developmental capacity on in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod Fert* 1995; 103: 115-120.
64. REVOLLO JAVIER R. Y CIDLOWSKI JOHN A. Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. *Glucocorticoids and Mood: Ann. N.Y. Acad. Sci* 2009; 1179: 167–178.
65. ROTH Z & HANSEN PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction* 2004a:71; 1898–1906.
66. ROTH, Z., HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 2005; 129: 235–244.
67. RUSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat.* 1983; 24:77-92.
68. SUZUKI H, JU JC, PARKS JE, YANG X. Surface ultrastructural characteristics of bovine oocytes following heat shock. *J Reprod Dev* 1998; 44: 345-51.

69. SALPOLSKY, M. ROBERT., ROMERO, MICHAEL., MUNCK, U. ALLAN.  
How the glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrine Reviews* 2000;1: 55-89.
70. SAGIRKAYA HAKAN, MISIRLIOGLU MUGE, KAYA ABDULLAH, FIRST NEAL L., PARRISH JOHN J., MEMILI ERDOGAN. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 2007; 101:225–240.
71. SCARAMUZZI R. J., BAIRD D. T., CAMPBELL B. K., DRIANCOURT M. A., DUPONT J., FORTUNE J. E., GILCHRIST R. B., MARTIN G. B., McNATTY K. P., McNEILY A. S., MONGET P., MONNIAUX D., VIÑOLES C Y WEBB R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011; 23: 444–467.
72. SHAN LIU, YUAN LI, XUAN GAO, JUN-HAO YAN Y ZI-JIANG CHEN. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertility and Sterility*. 2009; 93: 1550-1555.
73. STOJKOVIC M, MACHADO SA, STOJKOVIC P, ZAKHARTCHENKO V, HUTZLER P, GONCXALVES PB. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904–9.
74. SUN QY, MIAO YL, AND SCHANTTEN H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle* 2009;8: 2741-2747.



75. THIBAULT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J. Reprod. Fertil.* 1997; 51: 1–15.
76. TILBROOK, A. J., TURNER A. I. Y CLARKE I. J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 2000; 5:105–113.
77. TRIPANTHI A, KUMAR KP, CHAUBE SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 2010; 223:592-600.
78. VAN DEN HURK R, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005; 63:1717-1751.
79. VAN MERRIS, VALERIE., VAN WEMMEL, KELLY., CORTVRINDT, RITA. In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. *Reproductive Toxicology* 2007; 23:32–41.
80. VÁZQUEZ C. ANDREU., LÓPEZ- GATIUS F., GARCÍA-ISPIERTO L., MAYA-SORIANO M.J., HUNTER R.H.F Y LÓPEZ-BÉJAR M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation?. *Zygote*. 2010. 18 (November), pp. 293–299.
81. WANG, JUN-ZUO., HONG-SHU SUI, DE-QIANG MIAO, NA LIU, PING ZHOU, LI GE AND JING-HE TAN. Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Society for Reproduction and Fertility* 2009; 1741–7899.

82. YANG, JYUER-GER, WEI-YI CHEN, AND P. SHIRLEY LI. Effects of Glucocorticoids on Maturation of Pig Oocytes and Their Subsequent Fertilizing Capacity In vitro. *Biology of Reproduction* 1999; 60:929-936.
83. YDING ANDERSEN CLAUS. Effect of glucocorticoids on spontaneous and follicle-stimulating hormone induced oocyte maturation in mouse oocytes during culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 85: 423-427.