

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ENFERMERÍA, MEXICALI**



**EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE EL PROCESO DE
MADURACIÓN DE OVOCITOS OVINOS *IN VITRO*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

SUSTENTA

BIOL. ARIEL RODRIGO VILLASEÑOR GARCÍA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. RAÚL DÍAZ MOLINA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS
DR. ULISES MACÍAS RUIZ**

MEXICALI, B.C. NOVIEMBRE 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ENFERMERÍA, MEXICALI

CARTA DE DICTAMEN DE VOTOS APROBATORIOS PARA SUSTENTAR EL
EXAMEN DE GRADO

Mexicali, B.C. a 9 de diciembre de 2015.

Los abajo firmantes miembros del Comité de Titulación nombrado por el Comité de Estudios de Posgrado de la Facultad de Enfermería, en respuesta a su solicitud para revisar la tesis:

**“EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE EL PROCESO DE
MADURACIÓN DE OVOCITOS OVINOS IN VITRO.”**

Presentado por **ARIEL RODRIGO VILLASEÑOR GARCÍA** para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud, le comunicamos que el trabajo cumple con los requisitos de contenido y presentación establecidos por este Comité, por lo tanto el dictamen que emitimos es de:

APROBADO

Por lo que puede proceder a la etapa de presentación y defensa del mismo.

Atentamente

Comité de Titulación

Dr. Raúl Díaz Molina

Director de Tesis

Dr. Ulises Macías Cruz

Secretario

M.C. Gisela Ponce y Ponce de León

Sinodal

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	v
Dedicatorias	vi
Abreviaturas	vii
Índice de figuras y tablas	viii
Resumen	x
Introducción	xi
CAPÍTULO I	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Planteamiento del problema.	5
1.3 Justificación del estudio	7
1.4 Objetivos	9
1.5 Hipótesis	9
1.6 Operacionalización de las variables.....	10
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Maduración de ovocitos	12
2.1.1 Expansión de las células del cúmulo.	13
2.1.2 Redistribución de los gránulos corticales.....	15
2.1.3 Apoptosis.	15
2.2 Estrés calórico.	16
2.3 Ovis aries.....	17
2.3.1 Hábitat y alimentación.....	17
2.3.2 Reproducción.....	18
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	19
3.1 Tipo de estudio	20
3.2 Características de la población de ovejas.....	20
3.3 Criterios de selección de ovocitos.....	20

3.3.1 Unidad de análisis.....	20
3.3.2 Criterios de inclusión.....	20
3.3.3 Criterios de exclusión.....	20
3.3.4 Criterios de eliminación.....	20
3.4 Instrumentos	21
3.5 Procedimientos de laboratorio.	21
3.5.1 Manejo de las ovejas y extracción de ovarios.....	21
3.5.2 Obtención de COC	22
3.5.3 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	24
3.5.4 Evaluación del núcleo y cuerpo polar	24
3.5.5 Evaluación de la expansión de las células del cúmulo	25
3.6 Datos climáticos.....	26
3.7 Análisis estadístico	26
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	27
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
5.1 Discusión de resultados.....	34
5.2 Conclusiones	38
5.3 Recomendaciones	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS.....	48
Anexo 1. Formato de organización para la incubadora.....	49
Anexo 2.Hoja de registro de maduración de ovocitos.....	50

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a los doctores Raúl Díaz y Ulises Macías por su guía y apertura, siempre dispuestos a tomar tiempo de sus ocupadas agendas para atender mis dudas y preocupaciones. Además agradezco de forma especial a Ricardo Vicente y Teresa Sánchez quienes fueron mi apoyo principal en el trabajo experimental.

A mis docentes, particularmente a Gisela Ponce por todo el tiempo que invirtió en escuchar mis avances, problemas y satisfacciones durante la elaboración de este documento. Y por todos esos pacientes y discretos jalones de oreja por email, recordándome mis pendientes. También de forma especial agradezco a Sawako Oshima quien desde el principio mostró confianza en mi trabajo y me contagió con su pasión por la ciencia; además de haber contribuido sin saberlo a mi desarrollo profesional actual en el área de la reproducción asistida.

A la doctora Alejandra Soberano, cuya ayuda incondicional me ayudó a lanzar la primera parte del proyecto además de recibirme en su laboratorio para iniciar mi práctica en el área de la reproducción animal.

A mis jefes Ulises Rieke y Leonardo Garza por su comprensión y apoyo durante el tiempo que fue requerido para escribir este documento.

Por ultimo a CONACyT por otorgarme una beca de manutención durante el tiempo que estuve asistiendo a clases y permitirme la experiencia de estudiar el posgrado.

DEDICATORIAS

Aunque me es imposible enlistar y mucho menos ordenar a todos los que tuvieron algo que ver con la elaboración de esta tesis, definitivamente mis padres con su cariño, ejemplo y el apoyo que me dieron desde que tengo memoria fueron las bases de todos mis logros y por eso les estaré siempre agradecido, esta tesis va dedicada para ellos con mucho amor. Para mis hermanos (de sangre y postizo), quienes muchas veces sin darse cuenta fueron mis islas de descanso en días que parecían no terminar.

Además de mi familia, mis amigos quienes ayudaron con un mensaje de apoyo, bromas, juegos de mesa y hasta un refrigerador también son parte de este trabajo.

Sin embargo la única persona que sin duda fue mi principal apoyo fue Karla, mi esposa, mi amiga, mi compañera de vida. A mi lado cuando recibí la noticia de mi ingreso, a mi lado en las desveladas, junto a mí en los viajes, aguantando mis desplantes y siempre cuidando mi bienestar emocional; esta tesis es tan mía como es tuya. Te amo.

ABREVIATURAS.

AREG:	Anfiregulina.
COC:	Complejo cúmulo-ovocito.
EM:	Energía metabolizante.
EPR:	Epiregulina.
FSH:	Hormona foliculoestimulante por sus siglas en inglés (Follicle-Stimulating Hormone).
GC:	Gránulos corticales.
GVBD:	Rompimiento de la vesícula germinal, por sus siglas en inglés (Germinal Vesicle Break Down).
HEPES:	Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico.
HSP:	Proteína del shock térmico por sus siglas en inglés (Heat-shock protein).
ITH:	Índice de temperatura-humedad.
LH:	Hormona luteinizante por sus siglas en inglés (Lutheizing Hormone).
PBS:	Solución de tampón de fosfatos por sus siglas en inglés (Phosphate-Base Solution).
PEGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
PVA:	Alcohol polivinílico por sus siglas en inglés (Polivynil Alcohol).
TCM:	Medio de cultivo para tejidos por sus siglas en inglés (Tissue Culture Media).
ZTN:	Zona termoneutral.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 2.1 La división meiótica y sus fases.	12
Figura 2.2 Ovocitos antes y después de la ruptura de la vesícula germinal.	13
Figura 2.3 Proceso de Ovogénesis y desarrollo folicular.	14
Figura 2.4 Migración de los gránulos corticales durante la maduración ovocitaria	15
Figura 3.1 Obtención de Complejos Cúmulo-Ovocito mediante técnica de corte.	23
Figura 3.2 Instrumento de aspiración de COC.	23
Figura 3.3 Apariencia de un ovocito maduro.	25
Figura 3.4 Clasificación de la expansión de las células del cúmulo.	26

TABLAS

Tabla 2.1 Severidad del estrés calórico de acuerdo con el ITH.	15
Tabla 4.1 Condiciones climáticas en los periodos experimentales.	29
Tabla 4.2 Conteos y porcentajes de ovocitos totales colectados en las épocas de estudio.	29
Tabla 4.3 Ovocitos colectados en las épocas de estudio.	30
Tabla 4.4 Efecto de la temperatura sobre la maduración in vitro de ovocitos de ovinos durante la época de invierno.	31
Tabla 4.5 Efecto de la temperatura sobre la maduración in vitro de ovocitos de ovinos durante la época de verano.	32

RESUMEN

Introducción: se comparó la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos madurados en condiciones normotérmicas contra ovocitos madurados en condiciones hipertérmicas. **Objetivo:** determinar si el estrés calórico afecta el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos como modelo animal. **Metodología:** durante dos etapas experimentales (invierno y verano) se colectaron ovarios ovinos en la Unidad Experimental Ovina, UABC. Después de seleccionados los complejos cúmulo-ovocito, en grupos de 20 o menos fueron madurados *in vitro* por 24 horas. La mitad de los grupos fueron madurados en normotermia (37.5°C) y la otra mitad en hipertermia (41.5°C). Después de la maduración *in vitro*, se evaluó la maduración observando la expansión de las células del cúmulo y después de denudar los complejos cúmulo-ovocito se evaluó la presencia de cuerpo polar. **Resultados:** la proporción de ovocitos de buena calidad con respecto al total fue menor en verano (53.75%) que en invierno (67.80%). En verano, las condiciones de hipertermia *in vitro* disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) la tasa de maduración por presencia de cuerpo polar así como la tasa de cúmulo parcialmente expandidos. En invierno, las condiciones de hipertermia disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) la tasa de presencia de cuerpo polar y aumentaron la expansión total del cúmulo. **Conclusión:** La temperatura afecta negativamente la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos de pelo.

Introducción

La presente tesis fue elaborada como culminación de los estudios de Maestría en Ciencias de la Salud con la intención de reunir en un solo documento el resultado del trabajo de investigación realizado durante el posgrado.

El documento consta de cinco capítulos. El primero, presenta una descripción del problema a tratar, la justificación del problema así como la declaración de los objetivos e hipótesis. En el segundo capítulo, se recopila la información conocida de los temas a desarrollar en el trabajo previo a la etapa experimental además se definen los conceptos más utilizados en el resto del escrito. El siguiente capítulo describe los procesos, herramientas y protocolos utilizados para obtener los datos que fueron analizados. Posteriormente se encuentra un capítulo en que se detallan los resultados obtenidos en la etapa experimental. Por último, el capítulo cinco incluye el análisis de la información obtenida en los capítulos anteriores así como las conclusiones finales y recomendaciones realizadas a partir del análisis.

CAPÍTULO I

1.1 Antecedentes

En humanos, el estudio del efecto de la temperatura sobre la reproducción y fertilidad se ha limitado al factor masculino. Se conoce, por ejemplo, que el incremento de temperatura escrotal afecta negativamente la espermatogénesis, provocando un conteo espermático disminuido.¹ La fisiología reproductiva femenina no ha sido explorada en términos de estrés térmico, en particular el proceso de ovulación, sin embargo se ha especulado que conforme nuestros antepasados cazadores-recolectores migraban a diferentes regiones climáticas, el número de embarazos que éstos tenían cambiaba.² En la actualidad, poco se conoce sobre el proceso de la ovulación en humanos a nivel celular, ya que no existen estudios que puedan monitorear el proceso *in vivo*, de tal forma que nuestro conocimiento del mismo se ha limitado a lo observado en la reproducción asistida.

En bovinos el estrés calórico tiene un efecto negativo, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la calidad de los ovocitos y su fertilización. Se sabe que el proceso de maduración en ovocitos muestra una cinética más rápida si dicho proceso se realiza en condiciones de estrés calórico, y que la fertilización *in vitro* tiene más posibilidades de éxito si dichos ovocitos se inseminan unas horas antes de lo esperado en condiciones de normotermia.³ Esto puede indicar que los ovocitos bajo estrés calórico no sólo maduran prematuramente sino que tienen una vida útil más corta.

También se sabe que la calidad de los ovocitos disminuye si estos se encuentran bajo estrés calórico y que el proceso de maduración puede perturbarse de distintas formas.⁴ Sin embargo, no se conoce con precisión qué factores se encuentran alterados por el estrés calórico y cuál es su participación en la aceleración del proceso de maduración y envejecimiento de los ovocitos.

En experimentos *in vitro* realizados en bovinos se ha encontrado que el estrés calórico (41°C) acelera el proceso de maduración del ovocito de 4 a 6 horas en relación a ovocitos madurados a temperaturas fisiológicas (38.5 °C).⁵

Así mismo, en ovocitos de esta especie se ha observado una migración prematura de los gránulos corticales y una disminución de la competencia meiótica, como consecuencia del estrés calórico.⁶ También se ha observado una disminución en la calidad de los ovocitos, evaluada como la capacidad de ser fertilizado y de permitir un adecuado desarrollo embrionario temprano.^{7,8} Este daño también se presenta en ovocitos *in vivo*.^{9,10} Igualmente hay indicios de que el daño al ovocito puede ser causado previo a la maduración, dado que la baja calidad de los ovocitos en bovino persiste hasta tres ciclos estrales después de haberse presentado el estrés calórico.⁸

El estrés calórico también se ha relacionado con la apoptosis del ovocito en bovino.¹¹ Dado que los ovocitos pueden sufrir apoptosis en etapas tempranas del desarrollo folicular, Roth y Hansen¹¹ han sugerido que la apoptosis puede ser la causa de la persistencia del efecto negativo del estrés calórico sobre los ovocitos. Al igual que el ovocito, las células del cúmulo pueden sufrir apoptosis en respuesta a estrés calórico de corta duración.¹² El daño a las células del cúmulo podría provocar que la señalización de la que depende el proceso de maduración, y la prevención del envejecimiento prematuro en los ovocitos, se viera afectada por lo que pudiera relacionarse con una maduración precoz y una vida útil corta.

Las ovejas, de forma similar a otros mamíferos presentan cambios en su fisiología y en su capacidad de producción al encontrarse en ambientes áridos. Entre otros cambios, sus actividades de termorregulación aumentan para compensar las altas temperaturas, además de haberse reportado cambios de comportamiento en las ovejas incluyendo el aumento en el consumo de agua, la disminución de su ingesta, perturbaciones en el metabolismo de proteínas, secreciones hormonales y reacciones enzimáticas.¹³

La capacidad reproductiva también se ha reportado cómo comprometida debido a los cambios metabólicos asociados con una deficiente utilización e ingesta de alimentos. En ovejas estresadas por calor artificialmente durante la preñez, se encontró que los productos presentaban un peso disminuido, al igual que una talla significativamente menor que en ovejas no estresadas.¹⁴

Estas diferencias en peso y talla son también observadas en ovejas adultas,¹³ lo cual es de particular interés para la industria de la producción de carne de ovinos. Además de la carne, la producción de leche también se ve afectada directamente por la exposición de las ovejas a temperaturas elevadas.¹⁵

1.2 Planteamiento del problema.

Una de las necesidades que con más fuerza están grabadas en los seres vivos es la de la reproducción. En el caso de los humanos, el tema se vuelve especialmente fascinante por las connotaciones emocionales, evolutivas y hasta religiosas que posee, por lo que el estudio del proceso de reproducción ha sido un tema recurrente en la vida científica. Sin embargo, para estudiar estos procesos a nivel celular, existen limitantes tanto técnicas como éticas por lo que muchos de los detalles de la vida cotidiana de las células involucradas se desconocen, entre ellos el proceso de maduración de los ovocitos.

Aunado a esto, el humano, como la mayoría de las especies, está sujeto a las condiciones ambientales y por tanto el medio tiene influencia en la biología de las personas. Las ciudades de clima árido son particularmente afectadas por el factor temperatura, el cual evidentemente provoca que los organismos actúen diferente, para ajustarse a las extremas condiciones que se les presentan. Existe evidencia que indica que una de las funciones que se puede ver alterada en mamíferos por efecto de la temperatura es la reproducción.¹⁶⁻¹⁹

Estudios recientes realizados en bovinos han encontrado que el estrés calórico acelera el proceso de maduración,⁵ disminuye la competencia meiótica⁶ y afecta negativamente la capacidad del ovocito de ser fertilizado.

El estudio de estos temas se ha visto afectado negativamente debido a las limitaciones que se presentan al trabajar con humanos. Utilizando un modelo animal es posible reproducir, en laboratorio, las condiciones necesarias para observar las consecuencias que genera el cambio de temperatura en células germinales. Analizar estos factores proveerá una panorámica muy completa del proceso de maduración bajo estrés calórico, lo que en regiones áridas tiene una amplia gama de posibles aplicaciones que van desde el mejoramiento en la reproducción del ganado, hasta la aplicación en medicina para optimizar procedimientos de manipulación de gametos y embriones *in vitro*.

Está bien documentado que las condiciones ambientales en zonas áridas representan un aspecto poco favorable para la reproducción de los animales domésticos. Entre estas condiciones ambientales podemos mencionar la temperatura ambiental, humedad relativa, radiación solar, flujo del aire, y presión atmosférica. De estos, la temperatura ambiental es el factor climático más importante. El impacto de los efectos no deseados del estrés calórico sobre la reproducción se ha demostrado en todas las especies de animales domésticos. Particularmente en el caso de ovinos, resultan un buen modelo para el estudio de los cambios fisiológicos inducidos por su exposición a temperaturas elevadas, y su relación con el deterioro del desarrollo productivo y reproductivo de las ovejas.

Por lo anterior, es importante establecer con mayor precisión el origen de las alteraciones fisiológicas a través de las cuales el estrés calórico disminuye la fertilidad en los distintos tipos de ganado, así como mejorar las prácticas de manejo zootécnico enfocadas en la mejora de la reproducción del ganado en zonas áridas.

En la bibliografía existente se pueden encontrar una variedad de criterios morfológicos como indicadores del estado de los ovocitos. Sin embargo, muchos marcadores moleculares aún no demuestran suficiente efectividad. Por lo tanto, es importante estandarizar los procesos de maduración *in vitro* utilizados para ovocitos ovinos y establecer criterios de evaluación del estado de maduración del ovocito que sean claros y contundentes.

En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto del estrés calórico en el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos, para lo cual se utilizaron como marcadores de maduración la expansión de las células del cúmulo y la aparición del cuerpo polar.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto del estrés calórico sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos?

1.3 Justificación del estudio.

El estudio que se presenta es parte de un proyecto que tiene como finalidad comprender la dinámica intracelular del proceso de maduración de ovocitos por efecto de elevadas temperaturas. Por cuestiones éticas y de diseño experimental, este trabajo utilizó ovejas domésticas *Ovis aries* de la craza Dorper x Pelibuey como modelo experimental. Esta especie fue seleccionada debido a que las condiciones de embarazo son similares, en ciertos aspectos, a las del humano. Además, estudios previos relacionados con la fisiología de la reproducción de los humanos, han usado a esta especie como modelo animal. El número de fetos que concluyen su desarrollo satisfactoriamente son de uno a dos, la proporción de masa corporal del producto y la madre es similar en ambas especies y la respuesta ante el estrés calórico se considera muy cercana entre ambas especies.²⁰ Por otro lado, el acceso a organismos de esta especie y su periodo de gestación de alrededor de 21 semanas hacen que el ovino sea un modelo animal ideal para este tipo de estudios.

Esta investigación resulta relevante debido a que no se cuenta con estudios que expliquen los factores del proceso de maduración que son alterados por el estrés calórico en ovinos. El estudio de estos factores proporcionará una visión muy completa y novedosa sobre el proceso de la maduración de ovocitos bajo estrés calórico, lo cual tiene posibles aplicaciones en el mejoramiento de la reproducción de ganado y en la optimización de técnicas de reproducción asistida en humanos. Por lo anterior, este trabajo puede contribuir con información valiosa al sector ganadero para potencialmente prevenir una pérdida económica debido a la disminución de la calidad y cantidad de productos lácteos o cárnicos.²¹⁻²³ Además, con el incremento en el uso de las técnicas de maduración *in vitro* en humanos por especialistas de fertilidad, pudiera abrirse una ventana para la mejora del proceso de reproducción asistida, obteniendo mejores resultados con menos intentos.

Para estudiar la dinámica molecular de los cambios producidos en ovocitos sometidos a condiciones de estrés calórico, es esencial que las observaciones morfológicas realizadas sean fidedignas y reproducibles, además de que sean congruentes con lo reportado en la bibliografía existente. En este proyecto se propuso estandarizar los procesos de cultivo y maduración *in vitro* utilizados para ovocitos ovinos, así como establecer los criterios morfológicos de maduración, para su utilización en proyectos futuros orientados a descifrar la dinámica génica y molecular que produce los cambios en el proceso de maduración.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos obtenidos en verano e invierno.

1.4.2 Objetivos particulares.

- a) Evaluar el efecto de la temporada sobre la colección y calidad de los ovocitos de ovino.
- b) Determinar la tasa de maduración *in vitro* bajo condiciones de hipertermia y normotermia, de ovocitos ovinos colectados en invierno.
- c) Determinar la tasa de maduración *in vitro* bajo condiciones de hipertermia y normotermia, de ovocitos ovinos colectados en verano.
- d) Comparar las tasas de maduración *in vitro* bajo condiciones de hipertermia contra condiciones de normotermia, de ovocitos colectados en invierno.
- e) Comparar las tasas de maduración *in vitro* bajo condiciones de hipertermia contra condiciones de normotermia, de ovocitos colectados en verano.

1.5 Hipótesis.

H₁: La tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos es afectada negativamente por condiciones de hipertermia.

H₀: La tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos no es afectada por condiciones de hipertermia.

1.6 Operacionalización de las variables.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL		ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES
		DIMENSIONES	INDICADORES		
Estrés calórico	Estado fisiológico en que se encuentra un organismo cuando la temperatura del ambiente es mayor al valor máximo de su zona termoneutral (ZTN).	Normotermia e hipertermia.	Normotermia: 38.5 grados Celsius Hipertermia: 41.5 grados Celsius.	Cuantitativa discreta.	Temperatura

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL		ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES
		DIMENSIONES	INDICADORES		
Proceso de maduración de ovocitos ovinos.	En meiosis se le llama maduración a la transición de profase I a metafase II, junto con los cambios citoplásmicos que la acompañan.	Expulsión del cuerpo polar	Presente o ausente.	Cualitativa nominal	Presencia de cuerpo polar.
		Expansión de las células del cúmulo	Totalmente expandidas Parcialmente expandidas Parcialmente desnudo	Cualitativa ordinal	Nivel de compactación y espesor de las capas de células del cúmulo

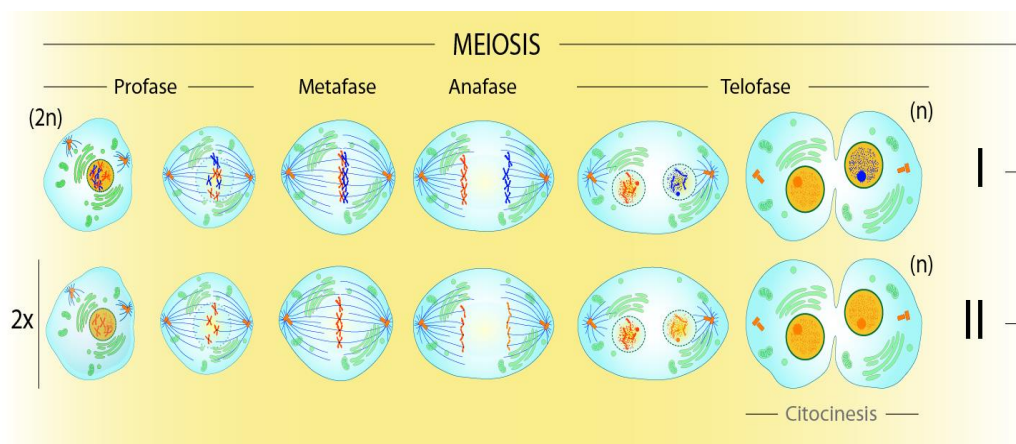
CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Maduración de ovocitos.

Para la fertilización sexual es indispensable que cada uno de los gametos contribuya con la mitad de los cromosomas que finalmente tendrá el individuo generado por su unión. La división celular que permite que los gametos maduros posean la mitad de la carga genética se denomina meiosis. Durante el proceso completo de la meiosis, el ovocito pasa por dos divisiones celulares (meiosis I y II) y en cada una de ellas se forma un ovocito secundario y un cuerpo polar, que es una célula prácticamente carente de citoplasma que migra del centro hacia la periferia celular y que posteriormente se degenera. Esto permite que de cada célula primaria sólo se produzca una célula madura, con la mitad de la carga genética inicial ($1n$).²⁴

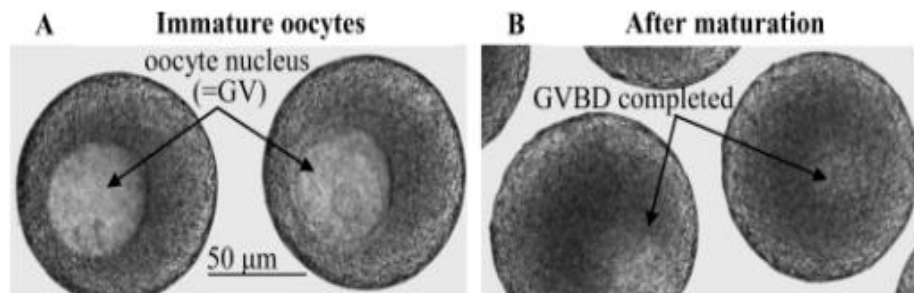
Figura 2.1 La división meiótica y sus fases. La meiosis I reduce la carga genética de las células resultantes.²⁵



El gameto femenino proviene de una fuente finita de ovocitos primarios que se encuentran en los ovarios. Dichos ovocitos comienzan el proceso de meiosis previo al nacimiento y se detienen en meiosis I, en la fase de diploteno de la profase I,²⁵ que se caracteriza porque el núcleo (llamado vesícula germinal) es de gran tamaño. Previo a la ovulación, la vesícula germinal migra a la periferia y se “rompe” permitiendo que termine la meiosis I, con lo que se crea y expulsa un cuerpo polar (Fig. 2.2). Este proceso se conoce como

rompimiento de la vesícula germinal (GVBD por sus siglas en inglés). Con esto da inicio la meiosis II, la cual se detiene en la etapa llamada metafase II, justo antes de la división celular con la subsecuente creación del segundo cuerpo polar ⁽²⁶⁾. A la transición de profase I a metafase II, junto con los cambios citoplásmicos que lo acompañan, se le denomina maduración.²⁴

Figura 2.2 Ovocitos antes y después de la ruptura de la vesícula germinal.²⁸

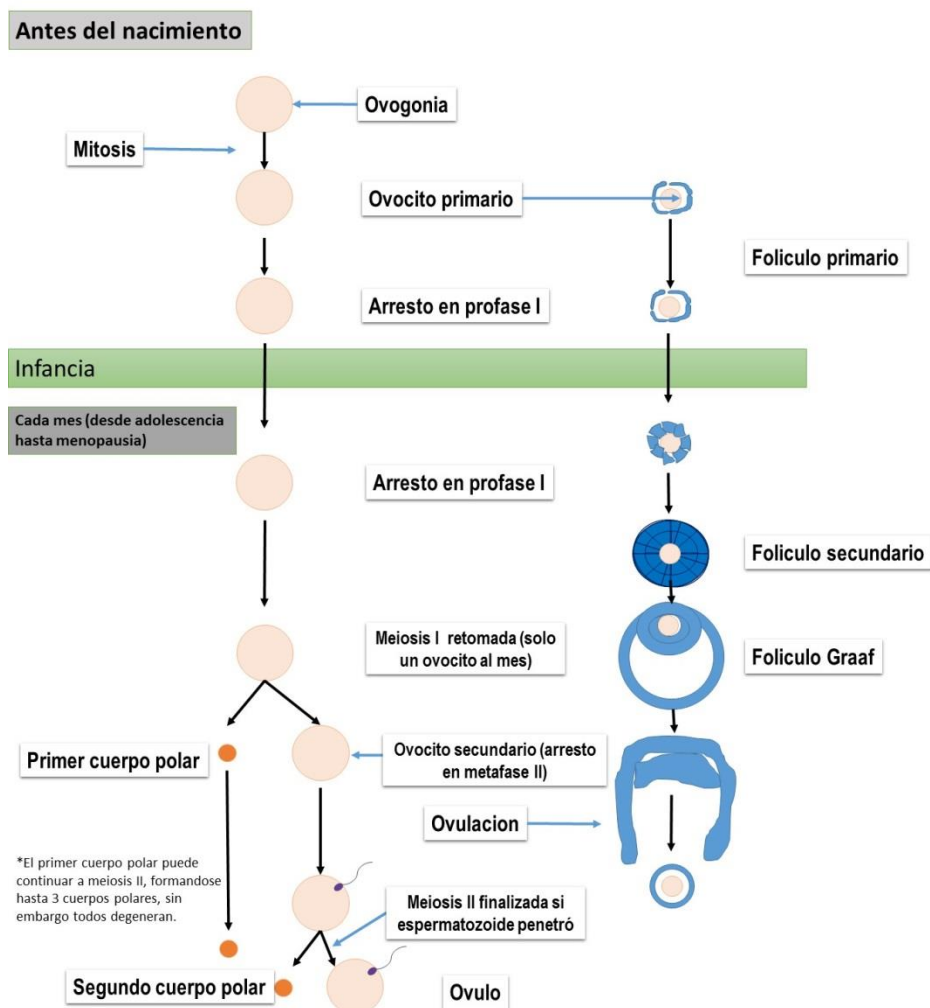


La maduración del ovocito se puede dividir en meiótica y citoplásmica. La maduración meiótica se refiere básicamente a que el ovocito terminará la meiosis I, con lo que se expulsará el primer cuerpo polar; de profase I pasará a metafase II donde volverá a detenerse.²⁷ Dentro de la maduración citoplásmica se consideran cambios tales como la expansión de las células del cúmulo, que se ha visto que tiene relación con la calidad del ovocito,²⁸ así como con la redistribución de organelos, especialmente los gránulos corticales.⁵

2.1.1 Expansión de células del cúmulo.

Durante el proceso que da lugar a un ovocito maduro, éste es acompañado en su periferia por células secretoras de esteroides que son parte del folículo, las llamadas células de la granulosa. Al inicio de la meiosis II, las células de la granulosa que están en contacto directo con el ovocito se asocian con el mismo e inician la secreción de ácido hialurónico. Como estas células permanecen unidas al ovocito y no al folículo, se les denomina células del cúmulo²⁹ (Fig. 2.3).

Figura 2.3 Proceso de ovogénesis y desarrollo folicular. Se aprecia la formación de los cuerpos polares así como los diferentes arrestos meióticos.



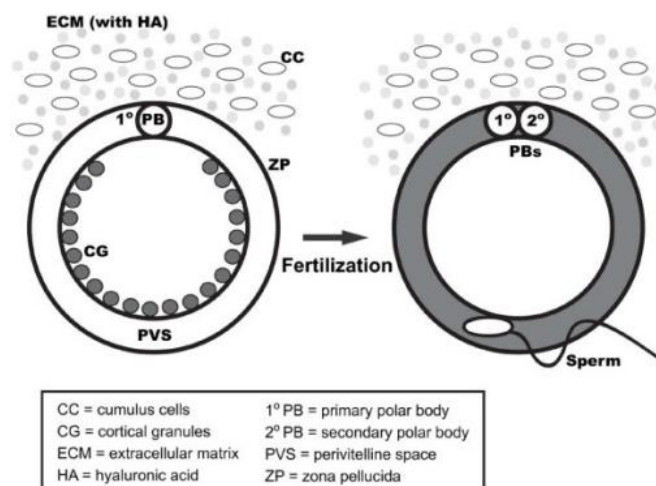
Después del pico pre-ovulatorio de la hormona luteinizante (LH), las células murales del cúmulo secretan proteínas tipo factor de crecimiento epidérmico (PEGF). Las PEGF, especialmente anfiregulina (AREG) y epiregulina (EPR), inducen la maduración del ovocito^{30,31} y juegan un papel importante en el GVBD y la expulsión del primer cuerpo polar³². Se ha visto que *in vitro*, tienen igual efectividad que la LH, aunque la maduración se da de manera más rápida. Este efecto sólo se ha observado en ovocitos con cúmulo o dentro del folículo. El funcionamiento de este mecanismo de señalización aún se desconoce, aunque se cree que es mediado por las uniones comunicantes de las células del cúmulo³⁰. Las células del cúmulo no sólo se consideran importantes en el proceso de maduración; existe evidencia que sugiere que

protegen a los ovocitos contra temperaturas elevadas en porcinos y bovinos.
3,33

2.1.2. Redistribución de los gránulos corticales.

Los gránulos corticales (CG) son organelos secretores especializados que se encuentran inicialmente distribuidos en el citoplasma de los ovocitos. Cuando un ovocito madura, los CG migran hacia la membrana celular (Fig. 2.4). Si un espermatozoide penetra al ovocito, se produce la exocitosis del contenido de los CG, modificando la zona pelúcida e impidiendo la penetración de otro espermatozoide. Esto es llamado bloqueo a la polispermia y es indispensable para lograr una fertilización normal en los mamíferos.³⁴

Figura 2.4 Migración de los gránulos corticales durante la maduración ovocitaria.³⁵



2.1.3. Apoptosis

Todas las células tienen la capacidad de reproducirse por medio de una división mitótica, sin embargo, ese proceso puede fallar cuando el ADN u otros elementos críticos son dañados de forma que la replicación del ADN se detenga. Si el daño es particularmente severo la célula se hincha y ocurre lisis liberando su contenido al ambiente, esto se conoce como necrosis. En algunos casos la célula dañada puede iniciar un mecanismo genético y bioquímico para

controlar su propia muerte, produciendo un encogimiento de la célula y su posterior fragmentación. Estos fragmentos pueden ser digeridos por otras células. A este proceso de "suicidio celular" se le llama apoptosis.³⁶

En cada ciclo estral *in vivo*, unos cuantos ovocitos comienzan el proceso de crecimiento preparándose para una posible ovulación, lo que se llama foliculogénesis y se presenta en ondas de crecimiento folicular (3 a 4 ondas por ciclo en ovejas).³⁷ De estos ovocitos sólo uno o unos pocos, dependiendo de la especie, serán ovulados y tendrán la oportunidad de participar en el proceso de fertilización. El resto de los ovocitos presentes en la onda de crecimiento son desechados mediante apoptosis.³⁸

2.2 Estrés calórico.

Todos los organismos utilizan estrategias para adaptarse a los factores que definen el ambiente en el que viven. En el caso de la temperatura los seres vivos siguen dos planes biológicos. Por un lado existen organismos cuya temperatura depende de la temperatura ambiente en el que se desenvuelven, por lo cual se considera que su temperatura corporal es variable. Aunque sus procesos metabólicos producen calor, no les es posible retenerlo o no es suficiente para que los tejidos se calienten. Estos organismos se conocen como ectotermos.³⁹ Por otro lado, los organismos homeotermos son los que pueden regular su temperatura corporal de forma que se mantenga constante independientemente de la temperatura ambiental. Otra forma de decirlo es que la temperatura interna del organismo no depende de la temperatura del ambiente.⁴⁰

La zona termoneutral (ZTN) es el rango de temperatura dentro del cual la temperatura interna de un organismo homeotermo se mantiene, sin necesidad de estimular mecanismos de enfriamiento o de calentamiento como reflejo. Cuando un organismo se encuentra en una temperatura ambiental por encima del límite máximo de la ZTN, se considera que se encuentra en un estado de estrés calórico.⁴¹ La severidad del estrés calórico es determinada

con el índice de temperatura-humedad (ITH) el cual se obtiene con la siguiente fórmula:⁴²

$$\text{ITH} = \text{db } ^\circ\text{C} - \{(0.31 - 0.31 \text{ HR})(\text{db } ^\circ\text{C} - 14.4)\}$$

donde db es la temperatura seca en °C y HR es la humedad relativa.

De acuerdo con el valor de ITH, se consideran 4 niveles de severidad del estrés calórico, los cuales se presentan en la tabla 2.1:

Tabla 2.1 Severidad del estrés calórico de acuerdo con el ITH.³⁹

ITH	Severidad
<22.2	Ausencia de estrés calórico
22.2 - <23.3	Estrés calórico moderado
23.3 - <25.6	Estrés calórico severo
>25.6	Estrés calórico extremo

2.3 *Ovis aries*

La oveja *Ovis aries* es un mamífero, cuadrúpedo, ungulado, rumiante doméstico, usado como ganado principalmente para la obtención de lana, carne y leche. Esta especie es el resultado de la domesticación de *Ovis orientalis musimon*. El término oveja es ampliamente utilizado para referirse a los miembros de esta especie, sin embargo, aplica sólo para hembras adultos; al macho adulto se le llama carnero y a los organismos de menos de un año se les conoce como corderos.⁴³

2.3.1 Hábitat y alimentación.

Ovis aries es una especie extremadamente versátil y por lo tanto puede existir en una amplia variedad de hábitats, incluyendo las montañas templadas, bosques e incluso condiciones desérticas;⁴⁴ puede sobrevivir con una dieta que

incluya celulosa, almidón o azúcar como su única fuente de energía y una fuente de nitrógeno que no necesariamente sea proteína. En general se alimentan de pastos y se les puede alimentar con una variedad de heno y avena.

Durante el pastoreo las ovejas ingieren una gran cantidad de alimento en un periodo corto de tiempo y después se retiran a descansar y mastican de nuevo la materia ingerida. El estómago de *Ovis aries* es grande y complejo, capaz de digerir alimentos fibrosos que otras especies no pueden.⁴⁴

2.3.2 Reproducción.

El borrego se reproduce por temporadas. Las ovejas son fértiles durante el otoño y el invierno, con ciclos estrales de entre 14 y 20 días. Las hembras permanecen en celo por aproximadamente 30 horas. Los carneros son fértiles todo el año y en promedio se utiliza un carnero para fertilizar 25 a 35 hembras en los criaderos. La gestación es de aproximadamente 148 días, finalizando en primavera. Se producen entre una y dos crías, capaces de mantenerse en pie en cuestión de minutos. Tanto las hembras como los machos alcanzan la madurez sexual al año de vida.⁴⁵

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio.

Cuantitativo, transversal, experimental y correlacional.

3.2. Características de la población de ovejas.

Ovejas de la especie *Ovis aries* cruce de razas Dorper y Pelibuey, aparentemente sanas, primaras con un peso promedio de 35 kg y 8 meses de edad. Todos los animales fueron obtenidos de la Unidad Experimental Ovina del Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

3.3 Criterios de selección de ovocitos.

3.3.1 Unidad de análisis:

Ovocitos ovinos.

3.3.2. Criterios de inclusión:

Complejos cúmulo-ovocito (COC) provenientes de folículos antrales, con un diámetro de 3 a 5 mm, con por lo menos tres capas compactas de células de cúmulo distribuidas homogéneamente, así como un ooplasma que muestre granulación uniforme.

3.3.3 Criterios de exclusión.

Complejos cúmulo-ovocito provenientes de ovarios con patologías visibles.

3.3.4 Criterios de eliminación.

Complejos cúmulo-ovocito dañados por manipulación.

3.4 Instrumentos.

Para el control del manejo de los COC dentro del laboratorio y con el fin de tener un uso más organizado del mismo, se diseñaron formatos para organizar el uso de la incubadora (Anexo 1) con la finalidad de reducir la probabilidad de error por confusión en el área de trabajo.

Además se diseñó una hoja para registrar los resultados obtenidos en el momento (anexo 2), donde se incluye también un resumen de las características citoplasmáticas de los ovocitos para consulta rápida.

3.5 Procedimientos de laboratorio.

3.5.1 Manejo de las ovejas y extracción de ovarios.

Se obtuvieron ovarios ovinos en el rastro experimental del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC, durante dos periodos: el primero (considerado como invierno) corresponde a los días del 18 al 27 de febrero y el segundo (considerado como verano) del 16 al 27 de octubre del año 2014.

Las corderas utilizadas se manejaron siguiendo las normas aprobadas en México para el cuidado (NOM-051-ZOO-1995) y el sacrificio humanitario de los animales (NOM-033-ZOO-1995). Se utilizaron ovejas primíparas cruzadas de Dorper x Pelibuey, con un peso de 35 kg y 8 meses de edad. En general, e independientemente del periodo del año, el manejo de las ovejas, su alimentación y el procedimiento para extraer los ovarios fueron similares. Las ovejas se mantuvieron estabuladas en corral, equipados con comederos, bebederos y sombra. Diariamente se les ofreció agua *ad libitum*, al igual que el alimento, el cual consistió de una dieta de engorda (2.8 Mcal de EM/kg de materia seca y 13.0 % de proteína cruda; de acuerdo con las recomendaciones del National Research Council en 2007), formulada con 11.5% de paja de trigo,

12% de heno de alfalfa, 71% de grano de trigo molido, 3% de semilla de algodón, 1% de piedra caliza, 1% de ortofosfatos y 0.5% de sal común.

Para extraer los ovarios, todas las corderas fueron sacrificadas usando el método de degüelle en el Taller de Carne del ICA-UABC. Posteriormente, un corte transversal en el vientre bajo fue realizado para exponer el tracto reproductor, el cual se cortó a la altura del cérvix para extraerlo. Se identificaron los ovarios y con la ayuda de una tijera fueron separadas del tracto e inmediatamente colocados en un termo con solución salina (Cloruro de sodio al 0.9%; solución CS Pisa®) a una temperatura de 37.5°C, para ser trasladados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Mexicali de la UABC, donde se obtuvieron los complejos cúmulo-ovocito (COC). El tiempo transcurrido entre la obtención de los ovarios y la obtención de los COC en el laboratorio no excedió de una hora.

3.5.2 Obtención de COC.

Los COC fueron obtenidos mediante la técnica de corte de folículos (Fig. .1) de acuerdo con lo descrito por Shirazi et. Al ⁽⁴⁶⁾. Solamente fueron extraídos los COC provenientes de folículos antrales, con un diámetro de 3 a 5 mm. Los COC se mantuvieron a 37°C en medio TCM199 adicionado con HEPES al 25 mM, alcohol polivinílico (PVA) al 0.1% m/v y heparina 10 mM a (medio de colección). Se evaluó la morfología de los COC mediante un estereomicroscopio, eligiéndose para experimentación aquéllos que presentaron por lo menos tres capas compactas de células de cúmulo distribuidas homogéneamente, así como un ooplasma con granulación uniforme.

Figura 3.1 Obtención de Complejos Cúmulo-Ovocito mediante técnica de corte.



A partir de este paso, los COC fueron manipulados utilizando un microdispensador o un instrumento de aspiración (Fig. 3.2), que consiste en una vía para venoclisis a la cual se le adaptó un filtro millipore y una punta para micropipeta en cada extremo. Una de las puntas se utilizó como boquilla para aspirar utilizando la boca, y la otra punta se utilizó para sostener una pipeta Pasteur, la cual fue modificada utilizando fuego para alargar su punta y hacerla más delgada.

Figura 3.2 Instrumento de aspiración de COC.



3.5.3 Maduración de ovocitos *in vitro*.

Los COC elegidos fueron obtenidos, capturados y lavados 2 veces en medio TCM199 adicionado con heparina 10 mM y PVA al 0.1% m/v (medio de manipulación). El lavado consistió en colocar 3 gotas de 100 μ L de medio de manipulación en una caja Petri de 60 mm y transferir los COC de una gota a otra. Una vez lavados, los COC fueron trasladados, a cajas de cultivo NUNC de 4 pozos, colocando un máximo de 20 COC en cada pozo conteniendo 450 μ L de medio TCM199, el cual incluyó PVA 0.1% m/v, D-glucosa 3.05 mM, pirúvato 100 mM, L-cisteína 157 mM, penicilina/estreptomicina, FSH, EGF y LH (medio de maduración). Una vez que los COC fueron colocados en el medio de maduración en las cajas de cultivo, se adicionaron 450 μ L de aceite mineral en cada pozo para prevenir su deshidratación. Para evaluar la maduración de los ovocitos, las cajas de cultivo NUNC conteniendo los COC seleccionados fueron incubadas durante 24 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂^{47,48} ya sea en condiciones normotérmicas (37°C) o condiciones hipertérmicas (41.5°) dependiendo el experimento a realizar.

3.5.4. Evaluación del núcleo y cuerpo polar

Con base en lo reportado por Ebeling *et al.*⁴⁷ y Chen *et al.*⁴⁸, los COC seleccionados se cultivaron por 24 horas, para evaluar su proceso de su maduración.

Después de cada periodo de cultivo, los ovocitos contenidos en un mismo pozo de la caja NUNC, se desnudaron mediante su transferencia a 200 μ L de hialuronidasa y la aplicación de agitación con vórtex. Los ovocitos desnudados fueron lavados dos veces en una solución tampón de fosfatos (PBS), y posteriormente transferidos a portaobjetos cóncavos para su observación al microscopio.

Figura 3.3. Apariencia de un ovocito maduro. La flecha indica la presencia de un cuerpo polar (CP).



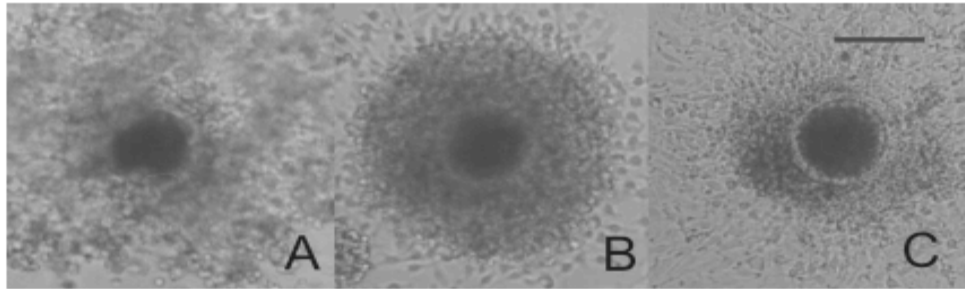
3.5.5 Evaluación de la expansión de las células del cúmulo

La expansión de las células del cúmulo se evaluó en ovocitos cultivados por 24 horas, y mediante un microscopio de contraste de fases a una magnificación de 200X y 400X. Se calificaron utilizando la clasificación de Álvarez *et al.*:⁴⁹

- Completamente expandidos: células del cúmulo ampliamente expandidas con gran cantidad de matriz extracelular elástica, con citoplasma granular homogéneo, y con 4 o más capas de células del cúmulo.
- Parcialmente expandidos: células del cúmulo ligeramente expandidas con escasa matriz extracelular, con citoplasma granular homogéneo, y con dos o tres capas de células del cúmulo.
- Parcialmente denudados: sólo algunas células del cúmulo permanecieron adheridas al ovocito, ovocitos parcial o totalmente

denudados, o con las células del cúmulo expandidas y con el citoplasma no homogéneo y oscurecido.

Figura 3.4. Clasificación de la expansión de las células del cúmulo. (A) células del cúmulo totalmente expandidas, (B) células del cúmulo parcialmente expandidas y (C) ovocitos parcialmente denudados.⁴⁹



3.6. Datos climáticos

El ICA cuenta con una estación meteorológica a través de la cual se registró, cada hora y todos los días durante el desarrollo del presente proyecto, la velocidad del viento, radiación solar, temperatura ambiental y humedad relativa.

3.7 Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron con el programa de cómputo SAS (Statistical Analysis Systems Institute) y se utilizó χ^2 como procedimiento de análisis estadístico. Las diferencias encontradas se consideraron como significativas si p fue menor a 0.05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Para poder iniciar los experimentos, se estandarizaron las técnicas de colecta y maduración por lo que inicialmente se programó una serie de experimentos utilizando ovarios y ovocitos bovinos. Durante las fechas de mayo a octubre del 2013 se hicieron ajustes en las concentraciones de gases en la incubadora, optimización de la preparación de medios y se ajustaron algunos procedimientos que estaban generando enlentecimiento en el manejo de los complejos cumulo-ovocito. Contamos con la asesoría de la Dra. Alejandra Soberano, de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, para la estandarización e inicio de los experimentos con bovinos.

El presente estudio incluyó el análisis de un total de 371 ovocitos ovinos recuperados de corderas provenientes del rastro experimental del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC. Se utilizaron un total de 62 ovejas primaras cruzadas de la craza Dorper x Pelibuey, 24 en febrero y 38 en octubre, las cuales presentaron un peso de 35 kg y 8 meses de edad (tabla 4.2). En general, en ambos periodos del año, el manejo, la alimentación y el procedimiento para extraer los ovarios fueron similares.

Las condiciones climáticas registradas en el periodo experimental de invierno y verano se presentan en la tabla 4.1. Los promedios de temperatura, humedad relativa, radiación y velocidad del viento para invierno fueron 18.04°C, 30.21%, 163.12 W/m² y 1.34 m/s respectivamente; mientras que para verano fueron 31.70°C, 47.70%, 157.10 W/m² y 1.90 m/s respectivamente. La combinación de temperatura y humedad relativa llevó a que el ITH fuera de 17 y 28 unidades para invierno y verano, respectivamente. En general, la temperatura ambiental fue mayor en verano que en invierno, lo cual se reflejó en un mayor ITH para verano (~11.4 unidades más). Por lo tanto, se podría considerar que las condiciones ambientales de verano fueron suficientes para provocar un estrés térmico a los ovinos estudiados.

Tabla 4.1 Condiciones climáticas en los periodos experimentales.

	Invierno				Verano			
	Prom	DE	Máx	Mín	Prom	DE	Máx	Mín
Temperatura (°C)	18.04	4.90	27.89	5.89	31.70	5.60	44.30	12.90
Humedad Relativa (%)	30.21	15.91	87.10	8.14	47.70	25.70	100.00	5.30
Radiación (W/m²)	163.12	235.10	825.00	0.00	157.10	288.90	1019.00	0.00
Vel. del viento (m/s)	1.34	0.84	6.98	0.00	2.20	1.90	10.40	0.00
ITH (unidades)	17.51	--	--	--	28.90	--	--	--

ITH= Índice de temperatura y humedad. DE= Desviación estándar

En la tabla 4.2 se muestran resultados del material colectado para el experimento durante las épocas de invierno y verano. En invierno se colectaron 48 ovarios provenientes de 24 ovejas, mientras que en verano fueron 76 ovarios obtenidos de 38 ovejas. En general, se colectaron 118 ovocitos en invierno y prácticamente el doble (253) en verano.

Tabla 4.2 Conteos y porcentajes de ovocitos totales colectados en las épocas de estudio.

	Época del año	
	Invierno	Verano
Ovejas (n)	24	38
Ovarios colectados (n)	48	76
Ovocitos colectados (n)	118	253
Ovocitos/oveja (n)	4.91	6.66
Ovocitos/ovario (n)	2.45	3.33

En la tabla 4.3 se muestran los resultados de los tipos de ovocitos colectados en invierno y verano. En verano se colectaron 70% más de ovocitos clasificados como buenos, comparado con invierno. Aunque del total de

ovocitos colectados en cada época, se encontró que en invierno (80/118 ovocitos) la proporción de ovocitos clasificados como bueno fue 14% más que en verano (136/253 ovocitos). Esto llevó a que en invierno también se obtuviera mayor número de ovocitos de buena calidad por oveja y por ovario. En el caso de ovocitos clasificados como malos, se encontró que el número fue mayor en verano que en invierno. Cuando se calculó la proporción de estos ovocitos basado en el número colectado por época, así como el número de estos ovocitos por oveja y ovario, se observó que fue ligeramente más elevado en verano que en invierno.

Tabla 4.3 Ovocitos colectados en las épocas de estudio.

	Época del año	
	Invierno	Verano
Ovocitos colectados (n)	118	253
Ovocitos buenos		
Conteo (n)	80	136
Porcentaje del total (%)	67.80	53.75
Ovocitos/oveja (n)	3.33	2.19
Ovocitos/ovario (n)	1.66	1.09
Ovocitos malos		
Conteo (n)	38	117
Porcentaje del total (%)	32.20	46.24
Ovocitos/oveja (n)	1.58	1.88
Ovocitos/ovario (n)	0.79	0.94

Ovocito bueno= Ovocitos con por lo menos 3 capas del cúmulo distribuidas homogéneamente.

Ovocito malo= Ovocitos con menos de 3 capas del cúmulo.

En la tabla 4.4 se muestran los resultados del efecto de la temperatura sobre la maduración *in vitro* de COC de ovinos colectados en invierno. La tasa de ovocitos expandidos totalmente (0 vs. 52.2%) o desnudos (20.6 vs. 47.8%) fue mayor en el proceso de maduración bajo condiciones de hipertermia que en normotermia ($P < 0.05$). La temperatura de normotermia incrementó significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de ovocitos con expansión parcial de

las células del cúmulo. En el caso de presencia de cuerpo polar como criterio de maduración del ovocito, se observó un incremento de un 27.3% en la maduración de ovocitos en condiciones de normotermia que en hipertermia ($P < 0.05$).

Tabla 4.4 Efecto de la temperatura sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos durante la época de invierno (n= 70).

	Normo termia	Hipertermia
Nivel de expansión		
Ovocitos (n)	34	46
Totalmente expandido (%)	0.0 (0/34)a	52.17 (24/46)b
Parcialmente expandido (%)	79.41 (27/34)a	0.0 (0/46)b
Parcialmente desnudo (%)	20.59 (7/34)a	47.82 (22/46)b
Cuerpo polar		
Ovocitos (n)	29	41
Cuerpo polar (%)	51.72 (15/29)a	24.40 (10/41)b

Normotermia= 38.5°C. Hipertermia= 41.5 °C
 Diferentes letras (a y b) en la misma fila = hay diferencia significativa ($p < 0.05$)

En la tabla 4.5 se muestran los resultados del efecto de la temperatura sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos colectados en verano. Independientemente de la temperatura de maduración, no se encontraron ovocitos que expandieran totalmente sus células del cumulo ($P > 0.05$). No obstante, el porcentaje de ovocitos expandidos parcialmente fue mayor bajo condiciones de hipertermia que de normotermia (40.5 vs. 90.4%, $P < 0.05$). En el caso del porcentaje de ovocitos desnudos fue mayor en condiciones de maduración de normotermia que de hipertermia (9.6 vs. 59.5%, $P < 0.05$). El porcentaje de ovocitos con cuerpo polar no resultó significativamente diferente por efecto de la temperatura de maduración ($P > 0.05$).

Tabla 4.5. Efecto de la temperatura sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos durante la época de verano (n= 112).

	Normo termia	Hipertermia
Nivel de expansión		
Ovocitos (n)	84	52
Totalmente expandido (%)	0.0 (0/84)a	0.0 (0/52)a
Parcialmente expandido (%)	40.48 (34/84)a	90.38 (47/52)b
Parcialmente desnudo (%)	59.52 (50/84)a	9.62 (5/52)b
Cuerpo polar		
Ovocitos (n)	64	48
Cuerpo polar (%)	40.63 (26/64)a	31.25 (15/48)b

Normotermia= 38.5°C. Hipertermia= 41.5 °C

Diferentes letras (a y b) en la misma fila = hay diferencia significativa (p<.05)

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Discusión de resultados

De forma sintética, podemos considerar tanto la presencia del cuerpo polar como el tipo de expansión de las células del cúmulo como indicadores de maduración en un ovocito; sin embargo la información arrojada por uno no tiene el mismo significado que el otro. El tipo de expansión de las células del cúmulo nos brinda información sobre el progreso de la maduración, el cual se encuentra mediado en parte por células del cúmulo, por medio de comunicación a través de uniones comunicantes. Por otro lado la expulsión del cuerpo polar es un resultado directo de la finalización de la primera división meiótica, lo cual significa que la maduración nuclear ha concluido exitosamente. En este estudio se consideraron ambas variables para determinar una tasa de maduración individual para cada variable, aunque finalmente se considera a un ovocito como maduro si se confirma la presencia de cuerpo polar siguiendo el ejemplo de los criterios utilizados en reproducción asistida en humanos.⁵⁰

Antes incluso de analizar los resultados de maduración, se pudo observar una diferencia entre las proporciones de ovocitos de buena calidad colectados en invierno con respecto al verano. Si bien en verano la cantidad de ovocitos obtenidos fue mayor, al comparar los porcentajes de ovocitos de buena calidad con invierno se observa que en invierno es mayor, estos resultados coinciden además con el hecho de que la proporción de ovocitos que se consideran de mala calidad fue mayor en verano que en invierno. En estudios previos se ha reportado que a mayor número de ovocitos de buena calidad, mejor tasa de maduración.⁵¹

En el caso de la expulsión del cuerpo polar, se encontró en los resultados que tanto en invierno como en verano la tasa de maduración fue significativamente afectada por la temperatura de maduración *in vitro*, apoyando la aceptación de la hipótesis. Lo anterior coincide con lo reportado en experimentos con ovinos⁵² y con otros animales como los bovinos, en quienes

la eficiencia reproductiva de las hembras se ve comprometida al alterarse la secreción de progesterona, LH y FSH obstaculizando el crecimiento folicular.⁵³ Además se ha reportado que la secreción de estradiol a partir del folículo pre-ovulatorio se ve disminuida, por lo que la fertilidad de las hembras durante verano disminuye drásticamente.⁵⁴ En estudios realizados sobre la integridad de la membrana celular de ovocitos porcinos, a través de inmunomarcaje, se pudo concluir que los ovocitos madurados en condiciones hipertérmicas muestran un reducido inmunomarcaje el cual lleva a una capacidad de fertilización reducida.⁴ Estos cambios en la morfología ovocitaria y en su señalización hormonal influyen en la calidad de los ovocitos inmaduros, por lo que la disminución de la tasa de maduración evaluada a través del cuerpo polar pudiera ser una posible consecuencia de los cambios.

Si bien es cierto que los ovocitos pueden transcribir genes para protección contra el estrés calórico (principalmente HSP70), tanto en bovinos como en ovinos la actividad transcripcional de los ovocitos se inactiva cuando su folículo alcanza ~3 mm de diámetro, por lo que todas las respuestas celulares que el ovocito puede producir bajo temperaturas elevadas se limitan a los que no involucran transcripción; por lo que no pueden, por ejemplo, incrementar la síntesis de HSP70.⁹ Esta restricción transcripcional es inhibida hasta que un ovocito maduro es fecundado y llega a un estado de embrión bicelular, momento en el cual además de HSP70, se produce HSP71 y pequeñas cantidades de HSP68.³

Por otro lado, aunque el ovocito se encuentra transcripcionalmente inactivo, las células del cúmulo no parecen verse afectadas de la misma manera. Los COC porcinos sometidos a condiciones hipertérmicas no se ven afectados significativamente al evaluar la segmentación embrionaria y blastulación de los embriones producidos a partir de su fertilización; además, al retirar las células del cúmulo los ovocitos disminuyen la síntesis proteica, siendo este efecto mayor en condiciones hipertérmicas.³ Asimismo, el desarrollo y síntesis proteica de las células del cúmulo no son afectados por los niveles de progesterona ni FSH, y si bien sí presentan receptores de membrana para LH, el cúmulo inicia su diferenciación antes del pico de LH que

dispara la ovulación.⁵⁵ Por lo tanto, la respuesta hacia condiciones de hipertermia de un COC en proceso de maduración se sugiere dependiente de las células del cúmulo.

En el caso de la evaluación del tipo de expansión de las células del cúmulo, en el presente estudio se encontraron discrepancias en los resultados obtenidos. En invierno la tasa de COC desnudos fue significativamente mayor en condiciones hipertérmicas como se anticipaba de acuerdo con estudios realizados en porcinos.³ Sin embargo el aumento de temperatura *in vitro* no pareció tener un efecto negativo en la expansión total de las células del cúmulo, encontrándose una tasa significativamente mayor en condiciones hipertérmicas con respecto a condiciones normotérmicas. Contrariamente, la maduración de ovocitos en condiciones de normotermia fue favorecida. Esto pudiera deberse a la independencia hormonal de la respuesta hacia hipertermia en las células del cúmulo con respecto al ovocito, pues las condiciones hipertérmicas pudieron haber intervenido en el ovocito de una manera más deletérea que en las células del cúmulo, las cuales estarían funcionando como un termoprotector. Las células del cúmulo pudieran manejar el exceso de temperatura y expandirse mientras el ovocito suprimía la síntesis proteica, entre otras la del ácido hialurónico, esencial para mantener a las células del cúmulo unidas al ovocito,⁵⁶ y la de la HSP70 que funciona como termoprotector intracelular. La falta de ácido hialurónico explicaría la diferencia de COC desnudos entre las condiciones experimentales normotérmicas e hipertérmicas. Es importante recordar que si bien el estrés calórico produce cambios en los niveles hormonales, las células del cúmulo son capaces de funcionar adecuadamente con un nivel de LH disminuido.

Si bien ninguno de los COC colectados en verano presentó un cúmulo totalmente expandido, las condiciones hipertérmicas parecieron favorecer la tasa de COC con cúmulo parcialmente expandido con respecto a las condiciones de normotermia *in vitro* no así con la tasa de COC desnudos. En ovejas sometidas a estrés calórico entonces, las células del cúmulo aunque no expandieron totalmente como en invierno, presentaron una expansión significativamente mayor al aumentar la temperatura de maduración *in vitro*. Si

bien esto no coincide con lo encontrado en los experimentos que evaluaron la expulsión de cuerpo polar, existe evidencia de adaptación a climas áridos en ovejas de pelo. Se ha propuesto que las ovejas de pelo al haber sido trasladadas desde lugares mediterráneos hacia regiones áridas se han aclimatado a condiciones de estrés calórico,^{57,58} y aunque no se han deducido completamente los mecanismos utilizados para lograrlo, se ha sugerido que tanto el incremento en la tasa respiratoria⁵⁹ como el fotoperiodo⁶⁰ juegan un papel importante en su estrategia de manejo y disipación de calor.

Endocrinológicamente se ha reportado que ovejas Pelibuey en regiones áridas presentan estros y ovulación en proporciones similares durante el verano y el otoño,⁵⁹ aunque la funcionalidad del cuerpo lúteo disminuyó en ovinos a temperaturas elevadas⁶⁰ corroborando los datos que indicaban la disminución en la producción de LH. En el caso de ovejas aclimatadas se ha encontrado que aunque los individuos sintetizan HSP70,⁵⁸ el desarrollo folicular se puede ver obstaculizado por el estrés calórico;⁶¹ aunque la reproducción de estas ovejas no se ve comprometida por las temperaturas elevadas durante el verano.⁵⁹

En las ovejas entonces, las células del cúmulo se encuentran activas produciendo proteínas, entre ellas la HSP70, aun con los niveles de LH disminuidos por lo que el cúmulo puede comenzar su diferenciación y expansión; además de fungir como termoprotector. Al mismo tiempo, el ovocito se encuentra en un arresto transcripcional, por lo que no sintetiza HSP70 para protegerse de las altas temperaturas ni ácido hialurónico para mantenerse unido al cúmulo. Esto explicaría porque hubo expansión de células del cúmulo pero no en la misma escala que durante el invierno.

5.2 Conclusiones

La temperatura afecta negativamente la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos de pelo. En este trabajo se pudieron cumplir con los objetivos tanto generales como los particulares, determinando y comparando las tasas de maduración para ovocitos madurados en condiciones normotérmicas e hipertérmicas tanto en invierno como en verano. Estas a su vez pudieron ser comparadas y analizadas, arrojando como conclusión que siguiendo como criterio la expansión de las células del cúmulo no existe un efecto de la temperatura sobre la maduración. Se sugiere que la causa es un proceso de aclimatación de especies de ovinos de raza Pelibuey.

Aunado a la disminución de la proporción de ovocitos de buena calidad obtenidos en verano, se concluye además que el impacto de la temperatura de maduración sobre el proceso de maduración de los ovocitos es mayor en verano que en invierno; evidenciado también por los resultados de expansión de células del cúmulo.

Por último, considerando la presencia de cuerpo polar como confirmación de maduración ovocitaria, el cual es el criterio más importante, se encuentra que la hipótesis se acepta, pues la expulsión del cuerpo polar se ve afectada por la temperatura de maduración.

Ya que los procesos de termorregulación y los mecanismos de maduración de ovocitos son similares en mamíferos, incluyendo borregos y humanos; los resultados obtenidos son un acercamiento a lo que esperaríamos observar en humanos. De forma que este trabajo pudiera reproducirse bajo condiciones de laboratorio aptas para reproducción asistida humana, puesto que los ovocitos inmaduros no son usualmente considerados viables y por tanto son desechados.

5.3 Recomendaciones

Si bien este trabajo provee información con respecto al proceso de maduración bajo condiciones de estrés térmico, existe aún mucha información que no se conoce al respecto. Es recomendable continuar estudiando los mecanismos de termorregulación y su relación con el funcionamiento de las células del cúmulo, pues pudiera ser un factor clave para que una especie se adapte a temperaturas elevadas. De igual forma, sería de un enorme valor el realizar estudios similares en otras regiones áridas geográficamente separadas con la intención de corroborar que los mecanismos de adaptación son los sugeridos aquí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jung A, Schuppe H-C. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia* [Internet]. diciembre de 2007 [citado 16 de septiembre de 2015];39(6):203–15. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076419>
2. SHORT R V. Human Reproduction in an Evolutionary Context. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 17 de febrero de 1994 [citado 16 de septiembre de 2015];709(1):416–25. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1994.tb30427.x>
3. Edwards JL, Hansen P. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol Reprod* [Internet]. Soc Study Reprod; 1996 [citado 19 de noviembre de 2011];55(2):341–6. Recuperado a partir de: <http://www.biolreprod.org/content/55/2/341.short>
4. Berger T, Roberts BM. Reduced immunolabelling of a porcine oocyte membrane protein reflects reduced fertilizability of porcine oocytes following elevated ambient temperature. *Reprod Domest Anim* [Internet]. abril de 2009 [citado 7 de noviembre de 2011];44(2):260–5. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694423>
5. Edwards J, Saxton A, Lawrence J, Payton R, Dunlap J. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 2005 [citado 19 de noviembre de 2011];88(12):4326–33. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030205731192>
6. Payton R, Romar R, Coy P, Saxton A. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol Reprod* [Internet]. 2004 [citado 19 de noviembre de 2011];71(4):1303–8. Recuperado a partir de: <http://www.biolreprod.org/content/71/4/1303.short>
7. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* [Internet]. Wiley Online Library; 2002 [citado 19 de noviembre de 2011];61(2):234–48. Recuperado a partir de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1153/abstract>
8. Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* [Internet]. Soc Reprod Fertility; 2001 [citado 19 de noviembre de 2011];122(5):737. Recuperado a partir de: <http://www.reproduction-online.org/content/122/5/737.short>

9. Hansen P, Drost M, Rivera R, Paula-Lopes F, Al-Katanani Y, Kringer CE, et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2001 [citado 19 de noviembre de 2011];55(1):91–103. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004489>
10. Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Nogareda C, López-Béjar M. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 19 de noviembre de 2011];67(3):632–8. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06005243>
11. Roth Z, Hansen P. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod* [Internet]. Soc Study Reprod; 2004 [citado 19 de noviembre de 2011];71(6):1898–906. Recuperado a partir de: <http://www.biolreprod.org/content/71/6/1898.short>
12. Yuan Y, Hao Z, Liu J, Wu Y, Yang L, Liu G, et al. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2008 [citado 19 de noviembre de 2011];70(2):168–78. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08001404>
13. Marai IFMFM, El-Darawany a. a. A, Fadiel A, Abdel-Hafez MAMAM. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Rumin Res* [Internet]. 2007 [citado 20 de octubre de 2015];71(1-3):1–12. Recuperado a partir de: http://ac.els-cdn.com/S0921448806002823/1-s2.0-S0921448806002823-main.pdf?_tid=c5344a14-76e0-11e5-8015-00000aab0f6c&acdnat=1445314525_286315d2de6dd409411ea8c41f2627f5
14. Alexander G, Williams D. Heat stress and development of the conceptus in domestic sheep. *J Agric Sci* [Internet]. Cambridge University Press; 27 de marzo de 2009 [citado 20 de octubre de 2015];76(01):53. Recuperado a partir de: http://148.231.10.114:2297/abstract_S0021859600015616
15. Finocchiaro R, van Kaam JBCHM, Portolano B, Misztal I. Effect of Heat Stress on Production of Mediterranean Dairy Sheep. *J Dairy Sci* [Internet]. mayo de 2005 [citado 11 de octubre de 2015];88(5):1855–64. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030205728605>
16. Rensis F De, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* [Internet]. octubre de 2003 [citado 31 de mayo de 2013];60(6):1139–51. Recuperado a partir de: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2)
17. Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* [Internet]. 1 de agosto de 1998 [citado 31 de mayo de 2013];13(8):2122–5. Recuperado a partir de:

<http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/8/2122.short>

18. Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. CSIRO PUBLISHING; 22 de junio de 2006 [citado 31 de mayo de 2013];18(6):647. Recuperado a partir de: http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=44&f=RD05022
19. Marín MV, Velásquez LFU. ¿CÓMO AFECTA EL ESTRÉS CALÓRICO LA REPRODUCCIÓN? *Biosalud* [Internet]. 2010 [citado 7 de noviembre de 2011];9(2):83–95. Recuperado a partir de: [http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9\(2\)_9.pdf](http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9(2)_9.pdf)
20. Laburn HP, Faurie A, Goelst K, Mitchell D. Effects on fetal and maternal body temperatures of exposure of pregnant ewes to heat, cold, and exercise. *J Appl Physiol* [Internet]. febrero de 2002 [citado 7 de noviembre de 2011];92(2):802–8. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796695>
21. Mitlöhner FM, Morrow JL, Dailey JW, Wilson SC, Galyean ML, Miller MF, et al. Shade and water misting effects on behavior, physiology, performance, and carcass traits of heat-stressed feedlot cattle. *J Anim Sci* [Internet]. septiembre de 2001 [citado 16 de septiembre de 2015];79(9):2327–35. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583419>
22. West JW. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J Dairy Sci* [Internet]. Elsevier; 6 de junio de 2003 [citado 3 de junio de 2015];86(6):2131–44. Recuperado a partir de: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S002203020373803X/fulltext>
23. Smith TR, Chapa A, Willard S, Herndon C, Williams RJ, Crouch J, et al. Evaporative tunnel cooling of dairy cows in the southeast. I: effect on body temperature and respiration rate. *J Dairy Sci* [Internet]. octubre de 2006 [citado 16 de septiembre de 2015];89(10):3904–14. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960066>
24. Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* [Internet]. ESHRE; 2008 [citado 19 de noviembre de 2011];14(2):143. Recuperado a partir de: <http://humupd.oxfordjournals.org/content/14/2/143.short>
25. Picton H. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2001 [citado 19 de noviembre de 2011];55(6):1193–210. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004782>
26. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* [Internet]. Wiley Online

Library; 1995 [citado 19 de noviembre de 2011];42(4):437–42. Recuperado a partir de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1080420410/abstract>

27. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier; 2006 [citado 19 de noviembre de 2011];65(1):126–36. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05004103>
28. Hosoe M, Shioya Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote* [Internet]. Cambridge Univ Press; 1997 [citado 19 de noviembre de 2011];5:371–6. Recuperado a partir de: <http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=2272424>
29. Kiessling AA, Anderson S. Human embryonic stem cells: an introduction to the science and therapeutic potential [Internet]. Jones & Bartlett Learning; 2003 [citado 27 de marzo de 2012]. 222 p. Recuperado a partir de: <http://books.google.com/books?id=dT6yBSh5S-kC&pgis=1>
30. Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* [Internet]. Soc Reprod Fertility; 2005 [citado 19 de noviembre de 2011];130(6):791. Recuperado a partir de: <http://www.reproduction-online.org/content/130/6/791.short>
31. Richard FJ. Regulation of meiotic maturation. *J Anim Sci* [Internet]. Am Soc Animal Sci; 2007 [citado 19 de noviembre de 2011];85(13 suppl):E4. Recuperado a partir de: http://jas.fass.org/content/85/13_suppl/E4.short
32. Coticchio G, Rossi G, Borini A, Grøndahl C, Macchiarelli G, Flamigni C, et al. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Hum Reprod* [Internet]. ESHRE; 2004 [citado 19 de noviembre de 2011];19(12):2913. Recuperado a partir de: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/19/12/2913.short>
33. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* [Internet]. Soc Study Reprod; 2000 [citado 19 de noviembre de 2011];63(3):805–10. Recuperado a partir de: <http://www.biolreprod.org/content/63/3/805.short>
34. Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* [Internet]. Soc Study Reprod; 1997 [citado 19 de noviembre de 2011];56(6):1376–82. Recuperado a partir de: <http://www.biolreprod.org/content/56/6/1376.short>
35. Liu M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod Biol*

- Endocrinol [Internet]. enero de 2011 [citado 20 de octubre de 2015];9(1):149. Recuperado a partir de: <http://www.rbej.com/content/9/1/149>
36. Potten CS, Wilson JW. Apoptosis: The Life and Death of Cells [Internet]. Cambridge University Press; 2004 [citado 27 de marzo de 2012]. 202 p. Recuperado a partir de: <http://books.google.com/books?id=YZRzeAEhsSsC&pgis=1>
 37. Palma GA. Biotecnología de la reproducción [Internet]. Gustavo Palma; 2001 [citado 27 de marzo de 2012]. 693 p. Recuperado a partir de: http://books.google.com/books?id=zmHbayu_hfIC&pgis=1
 38. Tilly JL, others. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2001 [citado 19 de noviembre de 2011];2(11):838–48. Recuperado a partir de: <http://mrg.gs.washington.edu/pdfs/11715050.pdf>
 39. Hill R. Fisiología Animal [Internet]. Ed. Médica Panamericana; 2006 [citado 29 de marzo de 2012]. 1038 p. Recuperado a partir de: <http://books.google.com/books?id=HZaC45m9IMMC&pgis=1>
 40. Hiriart M. Biología funcional de los animales I/ Functional Biology of Animals I [Internet]. Siglo XXI; 2008 [citado 29 de marzo de 2012]. Recuperado a partir de: <http://books.google.com/books?id=2EMPI8zKvOIC&pgis=1>
 41. Tabarez-Rojas A, Porras-Almeraya A, Vaquera-Huerta H, Hernández-Ignacio J, Valencia J, Rojas-Maya S, et al. Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia* [Internet]. Colegio de Postgraduados; 2009 [citado 7 de noviembre de 2011];43(7):671–80. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952009000700002&script=sci_arttext&tlng=en
 42. Marai IFM, El-Darawany a. a., Fadiel a., Abdel-Hafez M a. M. Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Rumin Res* [Internet]. agosto de 2007 [citado 19 de marzo de 2012];71(1-3):1–12. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448806002823>
 43. Sheep (*Ovis aries*) - Encyclopedia of Life [Internet]. [citado 29 de marzo de 2012]. Recuperado a partir de: <http://eol.org/pages/311906/overview>
 44. *Ovis aries*: INFORMATION [Internet]. [citado 29 de marzo de 2012]. Recuperado a partir de: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_aries.html
 45. Sheep 201: Reproduction in the ewe [Internet]. [citado 29 de marzo de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.sheep101.info/201/ewerepro.html>

46. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Rumin Res* [Internet]. junio de 2005 [citado 21 de mayo de 2014];58(3):283–6. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448804002573>
47. Ebeling S, Schuon C, Meinecke B. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation patterns in pig oocytes and cumulus cells during gonadotrophin-induced resumption of meiosis in vitro. *Zygote* [Internet]. mayo de 2007 [citado 24 de agosto de 2012];15(2):139–47. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462106>
48. Chen X, Zhou B, Yan J, Xu B, Tai P, Li J, et al. Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus-oocyte complexes. *J Endocrinol* [Internet]. mayo de 2008 [citado 24 de agosto de 2012];197(2):409–19. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434371>
49. Alvarez G, Dalvit G, Achi M, Miguez M, Cetica P. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*. 2009;33(3):167–77.
50. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2006 [citado 29 de agosto de 2014]; Recuperado a partir de: [http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)62006-8/pdf](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)62006-8/pdf)
51. Zoheir MA, Amer MKF, Nahass E-. Effects of season on the quality and in vitro maturation rate of Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim Biol*. 2007;1(September):29–33.
52. Santos Junior ER dos, Silva JCF da, Moura MT, Bartolomeu CC, Gonçalves PBD, Lima PF, et al. Avaliação De Embriões Ovinos Provenientes De Oócitos Submetidos a Estresse Calórico Durante a Maturação in Vitro. *Ciência Anim Bras* [Internet]. 2013;14(3):360–5. Recuperado a partir de: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/17170>
53. Ronchi B, Stradaoli G, Verini Supplizi A, Bernabucci U, Lacetera N, Accorsi PA, et al. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17 β , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livest Prod Sci* [Internet]. 1 de marzo de 2001 [citado 29 de octubre de 2015];68(2-3):231–41. Recuperado a partir de: [http://www.researchgate.net/publication/223568391_Influence_of_heat_stress_and_feed_restriction_on_plasma_progesterone_estradiol-17\(LH_FSH_prolactin_and_cortisol_in_Holstein_heifers._Livest_Prod_Sci](http://www.researchgate.net/publication/223568391_Influence_of_heat_stress_and_feed_restriction_on_plasma_progesterone_estradiol-17(LH_FSH_prolactin_and_cortisol_in_Holstein_heifers._Livest_Prod_Sci)
54. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* [Internet]. 2010;4(07):1167–83. Recuperado a partir de: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111000090X

55. Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1 de octubre de 2010 [citado 19 de noviembre de 2015];16(10):715–25. Recuperado a partir de: <http://molehr.oxfordjournals.org/content/16/10/715.full>

56. Fauser BCJM, Diedrich K, Bouchard P, Dominguez F, Matzuk M, Franks S, et al. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update* [Internet]. 6 de septiembre de 2011 [citado 19 de noviembre de 2015];17(6):829–47. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

57. Rodríguez Mendoza M, H. Montaldo H, Balcázar Sánchez JA, Hernández Cerón J. Serum progesterone levels in Pelibuey and Suffolk ewes under thermal stress. *Vet México* [Internet]. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; [citado 12 de noviembre de 2015];40(2):197–202. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922009000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=es

58. Romero RD, Montero Pardo A, Montaldo HH, Rodríguez AD, Hernández Cerón J. Differences in body temperature, cell viability, and HSP-70 concentrations between Pelibuey and Suffolk sheep under heat stress. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2013;45(8):1691–6. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677527>

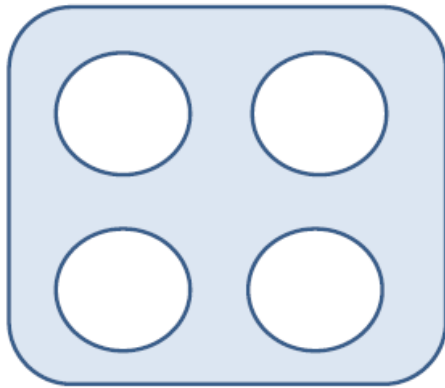
59. Macías-Cruz U, Gastélum MA, Álvarez FD, Correa A, Díaz R, Meza-Herrera CA, et al. Effects of summer heat stress on physiological variables, ovulation and progesterone secretion in Pelibuey ewes under natural outdoor conditions in an arid region. *Anim Sci J* [Internet]. 2015;(November 2014):n/a – n/a. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1111/asj.12430>

60. Macías-Cruz U, Sánchez-Estrada TJ, Gastelum-Delgado M, Avendaño-Reyes L, Correa-Calderón A, Álvarez-Valenzuela F, et al. Actividad reproductiva estacional de ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas de México. *Arch Med Vet*. 2015;

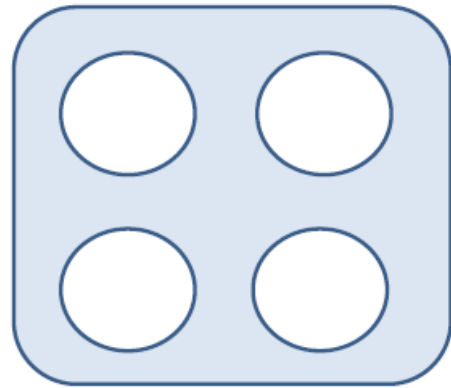
61. Marai IFM, Darawany AAE-, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM. Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Trop Subtrop Agroecosystems* [Internet]. Universidad Autónoma de Yucatán; 2008 [citado 12 de noviembre de 2015];8(3):209–34. Recuperado a partir de: <http://www.rioei.com.redalyc.org/articulo.oa?id=93911235001>

ANEXOS

ANEXO 1
FORMATO DE ORGANIZACIÓN PARA LA INCUBADORA.



Descripción: _____

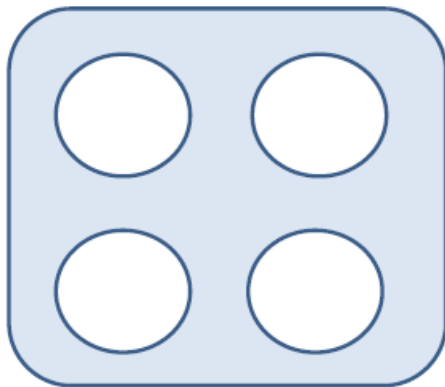


Descripción: _____

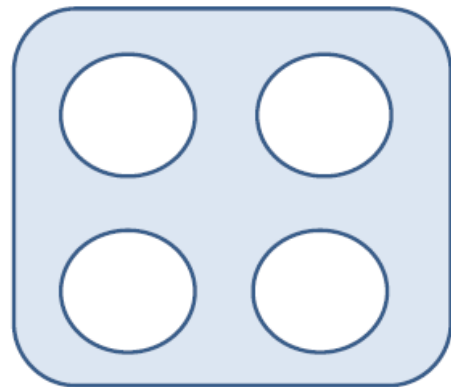
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA. MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PROYECTO OVOCITOS. ORGANIZACIÓN DE LAS CAJAS EN LA INCUBADORA

FECHA: _____



Descripción: _____



Descripción: _____

ANEXO 2

HOJA DE REGISTRO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS.

Universidad Autónoma de Baja California.

Maestría en ciencias de la salud.

Proyecto Ovocitos.

Hoja de registro para evaluar maduración en ovocitos.

	GRUPO 1				NORMOTERMIA			
	6 HORAS		12 HORAS		18 HORAS		24 HORAS	
	MIV	MIV	MIV	ECC	COLOR	MIV	ECC	COLOR
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
	A: compactas y espesas	B: compactas y delgadas	C: ausentes		D: expandidas			

Clasificación de núcleos:

VG0: Núcleo y nucléolo evidentes, cromatina en filamentos localizada en toda el área del núcleo.

VG1: Núcleo y nucléolo evidentes, la cromatina se encuentra formando una herradura alrededor del nucléolo.

VGII: Similar a VG1 pero comienzan a observarse pequeñas agrupaciones de cromatina que se tifen con fluorocromos.

VGIII: El núcleo y nucléolo están intactos y las agrupaciones de cromatina susceptibles de tinción se localizan alrededor del nucléolo.

VGIV: La membrana nuclear se ve difusa, el nucléolo ha desaparecido. La cromatina se observa como una red difusa o tétradas individuales.

Diacinesis: La membrana nuclear ha desaparecido; las tétradas se encuentran en la región donde se encontraba el núcleo.

Metafase I: El núcleo ha desaparecido, los cromosomas se encuentran condensados al máximo, alineados en el plano ecuatorial y formando el huso meiótico.

Anafase I: Las cromátidas homólogas se comienzan a separar.

Telofase I: Las cromátidas homólogas se encuentran en los polos.

Metafase II: Se observa el huso meiótico así como el primer cuerpo polar.

Elaborado por: Ariel Villaseñor. Abril 2013.

Universidad Autónoma de Baja California.

Maestría en ciencias de la salud.

Proyecto Ovocitos.

Hoja de registro para evaluar maduración en ovocitos.

	GRUPO 1				HIPERTERMIA			
	6 HORAS		12 HORAS		18 HORAS		24 HORAS	
	MIV	MIV	MIV	ECC	COLOR	MIV	ECC	COLOR
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
	A: compactas y espesas	B: compactas y delgadas	C: ausentes		D: expandidas			

VGI: Núcleo y nucleolo evidentes, cromatina en filamentos localizada en toda el área del núcleo.

VGI: Núcleo y nucleolo evidentes, la cromatina se encuentra formando una herradura alrededor del nucleolo.

VGI: Similar a VGI pero comienzan a observarse pequeñas agrupaciones de cromatina que se tifen con fluorocromos.

VGI: El núcleo y nucleolo están intactos y las agrupaciones de cromatina susceptibles de tinción se localizan alrededor del nucleolo.

VGI: La membrana nuclear se ve difusa, el nucleolo ha desaparecido. La cromatina se observa como una red difusa o tétradas individuales.

Diacinesis: La membrana nuclear ha desaparecido; las tétradas se encuentran en la región donde se encontraba el núcleo.

Metafase I: El núcleo ha desaparecido, los cromosomas se encuentran condensados al máximo, alineados en el plano ecuatorial y formando el huso meiótico.

Anafase I: Las cromátidas homólogas se comienzan a separar.

Telofase I: Las cromátidas homólogas se encuentran en los polos.

Metafase II: Se observa el huso meiótico así como el primer cuerpo polar.

Elaborado por: Ariel Villaseñor. Abril 2013.