



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIA



“EVALUACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE  
CULTIVO CON PIRUVATO SOBRE LA MADURACIÓN *IN*  
*VITRO* DE OVOCITOS CANINOS”

**Claudia Gutiérrez Serrano**

**Financiada por el Proyecto FONDECYT 1030380**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal.

**Profesora Guía: Dra. Mónica De los Reyes S.**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2006**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EVALUACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE  
 CULTIVO CON PIRUVATO SOBRE LA MADURACIÓN *IN*  
*VITRO* DE OVOCITOS CANINOS”

**Claudia Gutiérrez Serrano**

Memoria para optar al Título  
 Profesional de Médico veterinario  
 Departamento de Fomento de la  
 Producción Animal.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. JOSÉ POKNIAK R.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DRA. MARÍA S. FERNÁNDEZ	.....	.....

**SANTIAGO – CHILE**  
 2006

**Esta memoria de Título fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1030380.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer de manera muy especial a mi profesora guía Dra. Mónica de los Reyes por la disposición, experiencia, apoyo y orientación que me brindó durante la elaboración de esta memoria, a Jaime Palomino y Johanna de Lange por su valiosa colaboración, a todos los Médicos Veterinarios que trabajan en el pabellón de esterilización de la Municipalidad de La Pintana por su ayuda desinteresada y a los profesores Dr. José Pokniak y Dra. María Soledad Fernández por su disposición y tiempo dedicado a la corrección de esta memoria.

## ÍNDICE

Introducción	1
Revisión bibliográfica	3
1. Maduración de los ovocitos <i>in vivo</i>	3
2. Maduración de los ovocitos <i>in vitro</i>	4
3. Tiempo de cultivo	6
4. Suplementación a los medios de cultivo	7
5. Piruvato en los medios de maduración <i>in vitro</i>	8
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Material y método	12
a) Obtención de los ovocitos	12
b) Protocolo de maduración	12
c) Evaluación de la maduración	13
d) Análisis estadístico	13
Resultados	14
Discusión	21
Conclusiones	28
Bibliografía	29

## RESUMEN

En el presente trabajo, se estudiaron los efectos de la suplementación con piruvato al medio de cultivo y del tiempo de incubación (72-96 h) sobre el desarrollo meiótico de ovocitos caninos.

Los ovocitos utilizados se obtuvieron de ovarios de perras ovariectomizadas, los que fueron liberados mediante cortes finos con hojas de disección, recolectándose bajo lupa estereoscópica. Se seleccionaron aquellos ovocitos de mayor tamaño, que presentaban citoplasma homogéneo y al menos dos capas de células del cúmulo, lavándose dos veces en medio PBS para posteriormente incubarlos en grupos de 8 a 10 ovocitos en gotas de 100  $\mu$ L, bajo aceite mineral estéril. Se utilizó un medio de maduración A (control), preparado en base a TCM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10 UI/mL de gonadotropina coriónica humana, 12 mg/mL de penicilina y 20 mg/mL de estreptomina; y el medio de maduración B, que correspondió al medio control más la suplementación de 11,2 mg/mL de ácido pirúvico.

Los ovocitos incubados en ambos medios se cultivaron por periodos de 72 y 96 horas a 38,5 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad.

Luego de cada periodo de incubación, los ovocitos se fijaron en una solución de ácido acético, metanol y cloroformo (3:6:2 v/v) por tres minutos, y posteriormente en ácido acético y metanol (1:3 v/v) por 72 horas a 4° C. Los ovocitos fijados se tiñeron con 0,1% de yoduro de propídeo (PI) y se evaluaron bajo microscopia de epifluorecencia. Los distintos estados de desarrollo meiótico fueron clasificados como: estado de vesícula germinativa (GV), reinicio meiótico (GVBD), primera metafase (MI) y segunda metafase (MII). Se realizaron 9 réplicas experimentales.

Para el análisis de los resultados los porcentajes fueron transformados:  $\arcsen \sqrt{\%}$  y evaluados por ANDEVA. Los promedios fueron comparados a través de la prueba de Tukey.

Diferencias de  $p \leq 0,05$  fueron consideradas significativas.

Tanto a las 72 como a las 96 horas de cultivo el porcentaje de ovocitos que se mantuvieron arrestados al estado de vesícula germinativa, sin progresar en la meiosis, fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) en el medio control, que en el medio suplementado con piruvato. Por otra parte, la proporción de gametos en reinicio meiótico y primera metafase no varió en los distintos sistemas de cultivo, mientras que la maduración nuclear completa alcanzando el estado de segunda metafase (MII) fue favorecida por la presencia de ácido pirúvico en el medio ( $P \leq 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas asociadas al efecto del tiempo de incubación (72 y 96 horas) sobre los distintos estados de maduración nuclear en ninguno de los medios de cultivo.

Los resultados muestran que la suplementación con piruvato mejora las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de perra y que la prolongación del tiempo de incubación no influye significativamente en el efecto que tiene el piruvato sobre el desarrollo nuclear de los ovocitos caninos madurados en cultivo.

## SUMMARY

In this study, the effects of pyruvate supplementation to the culture medium and of the incubation period (72-96 h) on the meiotic development of bitch oocytes were evaluated.

Oocytes were collected from ovaries following ovary hysterectomy. The oocytes were released by slicing the ovary with a scalpel blade and recovered under a stereoscopic microscope. Only the biggest oocytes, with homogeneous cytoplasm and at least two layers of cumulus cells were selected, washing them two times in PBS medium and incubated in groups of 8 to 10 oocytes in 100  $\mu$ L culture medium drops under sterile mineral oil. For *in vitro* maturation a medium A (control) was used, it was prepared with TCM 199, supplemented with 10% of fetal calf serum, 10 UI/mL of human chorionic gonadotrophin, 12mg/mL of penicillin and 20 mg/mL of streptomycin. Medium B, was the control medium with the addition of 11,2 mg/ml of pyruvic acid.

In both media, the oocytes were incubated for 72 and 96 hours at 38,5 °C, in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> and 98% humidity.

After each culture period, the oocytes were fixed in acetic acid, methanol and chlorophorm (3:6:2 v/v) solution for 3 minutes and then in acetic acid and methanol (1:3 v/v) for 72 h at 4°C. The fixed oocytes were stained with 0,1 % of propidium iodide (PI) and the nuclear development was assessed with an epifluorescence microscope. Nuclear stages were classified as: germinal vesicle state (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), first metaphase (MI) and second metaphase (MII).

Results were evaluated by ANOVA, the percentages were arc-sine $\sqrt{\%}$  transformed, and means were compared through Tukey test. Differences  $P \leq 0,05$  were considered significant.

At 72 and 96 h of incubation the percentage of oocytes arrested at GV stage, without meiotic progression, was significantly higher ( $P \leq 0,05$ ) in medium A than in B. On the

other hand, there were no differences in the proportion of oocytes at germinal vesicle breakdown (GVBD) and metaphase I (MI) in the different culture systems, whereas the complete nuclear maturation reaching the second metaphase stage (MII) was enhanced when pyruvate was present in the medium ( $P \leq 0,05$ ).

No significant differences were observed in the length of culture (72 and 96 h) regarding on the meiotic development in both culture media.

These results provide evidence that pyruvate supplementation enhances *in vitro* maturation rates of bitch oocytes and the extension of culture period would not influence the pyruvate effect on nuclear development.

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas utilizadas para la obtención de información a partir de la manipulación de los gametos en forma extracorpórea (técnicas *in vitro*) constituyen una herramienta importante para el desarrollo de investigaciones básicas sobre la fecundación, para mejorar el rendimiento reproductivo de las especies y para la preservación de la biodiversidad. Entre estas técnicas de biotecnologías reproductivas, se encuentran la criopreservación e inseminación artificial (IA), la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo y manipulación embrionaria *in vitro*.

Las biotecnologías reproductivas en caninos han tenido un desarrollo lento en comparación con otros mamíferos, pero el hecho de que muchos caninos no domésticos estén actualmente en peligro de extinción, ha impulsado a la comunidad científica a progresar en este campo de estudio el cual, en los últimos años y utilizando al perro como modelo comparativo, ha evolucionado de forma sustancial (Luvoni, 2000).

A pesar de los avances biotecnológicos obtenidos en esta área en el último tiempo, los resultados de fecundación *in vitro* en caninos y el consiguiente desarrollo posterior, son pobres. Si bien, en pocos estudios se ha logrado fecundación e incipiente desarrollo embrionario, las tasas de éxito son muy inferiores a lo logrado en otras especies (Yamada *et al.*, 1992; Otoi *et al.*, 2000<sup>b</sup>). A la fecha aun no existen publicaciones que reporten el nacimiento de cachorros a partir de FIV.

Los resultados deficientes obtenidos hasta el momento se deben, entre otras cosas, a que en promedio sólo el 20% de los ovocitos madurados *in vitro* logran progresar meióticamente hasta la metafase II (Farstad, 2000). Un factor determinante en esta baja tasa de maduración ha sido el desconocimiento de las condiciones de cultivo óptimas para la maduración de los ovocitos caninos, lo que ha implicado que los ambientes de cultivo utilizados no han sido siempre adecuados.

En los últimos años, los estudios se han orientado hacia el perfeccionamiento de los diferentes medios de cultivo, evaluando la suplementación hormonal, fuentes proteicas, co-cultivo con células epiteliales oviductales, etc. (Farstad, 2000; Luvoni, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005); sin embargo, a pesar de los progresos logrados, la eficiencia de MIV obtenida permanece inferior a la de otros animales (Bogliolo *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que ocurre con otros mamíferos, el uso de piruvato generalmente no es contemplado en los sistemas de maduración de ovocitos caninos. Investigaciones desarrolladas en ovocitos de especies de laboratorio, de producción o en humanos, han evidenciado que este sustrato es la fuente energética más importante utilizada directamente por los ovocitos, durante el proceso de maduración (Biggers *et al.*, 1967.; Geshi *et al.*, 2000). Estudios recientes de ovocitos de perra, utilizando piruvato entre otros compuestos en la suplementación de los cultivos, han logrado superar las tasas de desarrollo meiótico (De los Reyes *et al.*, 2005). De lo expuesto, se hace necesaria la evaluación del efecto del ácido pirúvico sobre la maduración nuclear de los ovocitos caninos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.-Maduración de los ovocitos *in vivo*

Durante el desarrollo fetal de los mamíferos, los ovocitos quedan detenidos en el dictiateno de la primera división meiótica (“arresto meiótico”), estado en que permanecen hasta poco antes de cada ovulación, luego de la pubertad. Los ovocitos así detenidos corresponden a los ovocitos primarios y se caracterizan por poseer un núcleo grande denominado vesícula germinativa, que contiene la cromatina descondensada (VG) (Downs, 1993).

El proceso de maduración de los ovocitos consiste en la reanudación de la meiosis con la progresión nuclear hasta la segunda metafase (MII) y los cambios citoplasmáticos asociados (maduración citoplasmática), lo que permitirá la fecundación y desarrollo embrionario posterior (Eppig, 1989; Downs, 1993; Nickson *et al.*, 1993; Luvoni, 2000; Eppig, 2001). La capacidad del ovocito para completar la meiosis o competencia meiótica se adquiere gradualmente durante el crecimiento folicular, el cual es estimulado por la acción de factores intrafoliculares y por las gonadotropinas: folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Eppig, 1989). Una vez que un folículo es reclutado, las células de la granulosa comienzan a proliferar, cambia el ambiente folicular y comienza a aumentar de tamaño el ovocito, que en una primera etapa es paralelo al aumento del tamaño del folículo (Eppig, 2001; Senbon *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2004). Durante el periodo de crecimiento folicular, los ovocitos desarrollan la capacidad de reiniciar la meiosis pero aún así se mantienen arrestados en la etapa de dictiateno de la primera división meiótica (Downs, 1993; Eppig, 2001).

En la mayoría de los mamíferos, la inducción de la maduración ocurre en el interior del folículo de graaf en respuesta al alza preovulatoria de la LH; sin embargo, el mecanismo de acción mediante el cual esta gonadotropina promueve la maduración aún no es completamente conocido (Eppig, 2001; Webb *et al.*, 2002). Las observaciones de Pincus y Enzmann (1935) de que los ovocitos que han completado su crecimiento al ser liberados de los folículos reanudan la meiosis aún en ausencia de gonadotropinas, hace pensar que las

células foliculares ejercerían una acción inhibitoria de la meiosis la cual cesaría por efecto de estas hormonas (Eppig, 2001). Lo anterior se ve reforzado al considerar que los ovocitos, arrestados en la profase de la primera división meiótica, desarrollan una asociación muy cercana con las células de la granulosa mediante uniones especializadas, “*gap junctions*” (uniones comunicativas), las cuales permiten el intercambio con el ovocito de nutrientes y sustancias reguladoras de bajo peso molecular (Anderson y Albertini, 1976; Webb *et al.*, 2002; Senbon, *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2004). Estas sustancias participarían en la mantención del arresto meiótico, en la inducción de la maduración o en ambos eventos (Downs, 1993; Eppig, 1989; Eppig, 2001; Webb *et al.*, 2002).

Luego de la inducción de la maduración, los ovocitos son capaces de llevar a cabo la ruptura de la envoltura nuclear y se vuelven progresivamente aptos de completar la maduración meiótica hasta alcanzar la MII, estado en que son ovulados (Downs, 1993; Eppig, 2001). Durante este proceso, los estrógenos dominan el ambiente folicular (Luvoni, 2000). En los caninos sin embargo, la maduración de los ovocitos presenta características que la hacen única. Dentro de estas particularidades, los folículos ováricos son luteinizados previo a la ovulación, exponiendo al ovocito inmaduro a altas concentraciones de progesterona (Concannon, 1989), y luego del pico de LH los ovocitos son ovulados en estado de ovocitos primarios, con su núcleo en vesícula germinativa (VG), alcanzando la metafase II en el oviducto (Farstad, 2000; Luvoni, 2000). El reinicio de la meiosis ocurre poco después de la ovulación y los siguientes estados de maduración meiótica demoran de 2 a 5 días en completarse (Holst y Phemister, 1971; Farstad, 2000), permaneciendo las células del cúmulo rodeando al ovocito durante todo este proceso (Luvoni, 2000).

## **2.- Maduración de los ovocitos *in vitro***

La maduración *in vitro* es un proceso complejo que consiste en cultivar y madurar los ovocitos recolectados en estado de vesícula germinativa (VG). Esta biotecnología reproductiva permite obtener, potencialmente, gametos para lograr posteriormente fecundar *in vitro*, muchos de los cuales difícilmente serían liberados del ovario de forma

natural. La maduración en cultivo constituye, además, una herramienta fundamental en el estudio de la fisiología de los ovocitos y de los distintos factores que participan en el control y desarrollo de la meiosis.

La adecuada maduración nuclear, cuando se alcanza el estado de metafase II, y la maduración citoplasmática de los ovocitos cultivados requiere de la creación de un ambiente *in vitro* capaz de sustentar su desarrollo y mantener su viabilidad (Luvoni, 2000; De los Reyes *et al.*, 2006). El uso de un sistema de cultivo inapropiado produce ovocitos incapaces de promover la decondensación del núcleo del espermatozoide, y por tanto la formación del pronúcleo masculino y de sobrellevar el desarrollo embrionario (Eppig, 1989; Yoshida *et al.*, 1992; Ali y Sirard, 2002; Senbon *et al.*, 2004).

Para el éxito de los resultados, se hace necesario conocer la fisiología reproductiva de la especie, ya que la creación de un sistema *in vitro* eficiente va a depender de la adecuada imitación de las condiciones *in vivo*, característico de la especie. En el caso de los caninos, se debieran reproducir los cambios dinámicos que ocurren en el interior del folículo preovulatorio y en el oviducto (Luvoni, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005). Las diferencias que presenta la fisiología reproductiva de la perra en relación con la de otras especies y la falta de información más precisa sobre el ambiente del oviducto, hace que los sistemas de maduración *in vitro* utilizados habitualmente en otros animales domésticos no sean del todo aplicables a los ovocitos caninos. Hasta ahora se ha obtenido un éxito limitado con tasas de maduración que en promedio ha sido del 20% (Farstad, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Se ha descrito que un factor que incidiría en el bajo éxito de maduración *in vitro* es el cultivo de ovocitos meióticamente incompetentes (Fastard, 2000). Los gametos recolectados del tejido ovárico difieren en su capacidad de desarrollo meiótico (Fujii *et al.*, 2000; Otoi *et al.*, 2002), ya que una cantidad variable de éstos se encuentra en etapa de crecimiento o en estado de degeneración (Fastard, 2000). La apariencia morfológica de los ovocitos y células del cúmulo y el diámetro del ovocito han sido identificados como parámetros indicadores de competencia meiótica (Nickson *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 2000; Otoi *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Fastard, 2000; Luvoni, 2000). Un ovocito canino inmaduro

potencialmente apto para un adecuado desarrollo meiótico presenta un citoplasma homogéneo y oscuro (debido a las altas concentraciones de lípidos) (Hewitt y England, 1998) y se encuentra rodeado por una masa de células del cúmulo muy compactas, la cual se expandirá (proceso de mucificación) durante el proceso de maduración (Luvoni, 2000; Farstad, 2000). Un ovocito con una pigmentación poco intensa, suele tener algún grado de degeneración (Hewitt e England, 1998; Otoi *et al.*, 2000<sup>b</sup>). El diámetro o tamaño que tengan los ovocitos, también ha demostrado influir en su competencia meiótica (Otoi *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Otoi *et al.*, 2002). Así, los ovocitos caninos con un diámetro superior a 110  $\mu\text{m}$  (Otoi *et al.*, 2002), que presentan un citoplasma oscuro y homogéneo y están completamente rodeado por al menos dos capas compactas de células del cúmulo tendrían mayores posibilidades de completar la meiosis en cultivo (Nickson *et al.*, 1993).

Si bien, durante el proestro y estro, es posible obtener un mayor número de ovocitos recolectados desde los ovarios en comparación a otras etapas del ciclo reproductivo en caninos, no se ha demostrado asociación alguna del periodo del ciclo estral de la perra al momento de recolectar los ovocitos sobre las tasas de maduración *in vitro* (Nickson *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1999; Rodrigues y Rodrigues, 2003; Fastard, 2000).

### **3.- Tiempo de Cultivo**

El tiempo de cultivo que requieren los ovocitos caninos para progresar meióticamente hasta la segunda metafase, ha sido discutido. Si bien se ha evidenciado que la duración del cultivo tiene un efecto significativo sobre las tasas de maduración nuclear (Hewitt y England, 1999; Fujji *et al.*, 2000; Luvoni *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005), aún no existe acuerdo sobre el tiempo necesario para que el mayor porcentaje de los ovocitos incubados alcance la segunda metafase con la eliminación del primer corpúsculo polar. Diferentes reportes han postulado tiempos óptimos de maduración *in vitro* que van desde las 48 hasta las 96 horas (Nickson *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1999; Bogliolo *et al.* 2002; De los Reyes *et al.*, 2005).

Fisiológicamente se ha observado en la perra (Tsutsui, 1989; Saint-Diezer *et al.*, 2001) y en hembras de zorro azul (Hyttel *et al.*, 1990) que los ovocitos requieren de un período de tiempo relativamente prolongado (48-72 horas desde la ovulación) en el interior del oviducto para alcanzar el estado de segunda metafase y pueden demorarse hasta 5 días en completar la maduración (Holst y Phemister, 1971). Es más, en un reporte recientemente realizado en perras se observaron VG hasta 44 horas posterior a la ovulación y la primera metafase II se obtuvo recién a las 54 horas (Reynaud *et al.*, 2005).

Algunos experimentos *in vitro* han mostrado que la completa maduración nuclear puede ocurrir luego de 24-48 horas de cultivo (Nickson *et al.*, 1993; Bogliolo *et al.* 2002). Otros en cambio, han obtenido tasas de maduración significativamente superiores en aquellos ovocitos de perra cultivados por largos periodos de tiempo (96 horas) (Hewitt y England, 1999; De los Reyes *et al.*, 2005). Además, diversos trabajos han señalado que el tiempo de progresión meiótica *in vitro* puede ser más lento que *in vivo* (Bolamba *et al.*, 1998; Fujii *et al.*, 2000; Bolamba *et al.*, 2002).

Se ha indicado que tiempos mayores de incubación aumentarían la degeneración de los ovocitos sin que mejore la eficiencia de maduración (Luvoni *et al.*, 2003). Contrario a esto, De los Reyes *et al.*, (2005) describieron una sobrevida superior al 90% de ovocitos incubados por hasta 96 horas de cultivo.

#### **4.- Suplementación a los medios de cultivo**

La suplementación a los medios de cultivo está orientada a cubrir los requerimientos del desarrollo de los ovocitos y mejorar las tasas de maduración *in vitro* (Fastard, 2000; Luvoni, 2000). Ésta se puede realizar con distintas fuentes y concentraciones de proteínas, hormonas esteroidales, gonadotrofinas, sustratos energéticos, etc. (Nickson *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Fujii *et al.*, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005)

Pequeñas variaciones en la composición del medio de maduración son capaces de modificar el porcentaje de ovocitos que alcanza la segunda metafase (Downs y Mastropolo, 1994; Downs y Hudson., 2000). Se ha observado en roedores, que cualquier cambio en la concentración de sustratos energéticos o gonadotrofinas puede afectar de forma importante la progresión meiótica (Downs y Mastropolo, 1994). Estudios en humanos explican que estas diferencias en las tasas de maduración *in vitro* (MIV) son provocadas en parte por una alteración en el metabolismo de los ovocitos (Roberts *et al.*, 2002). Además, los ovocitos de cada especie presentan requerimientos particulares lo que provoca que frente a similares condiciones de cultivo puedan reaccionar de manera diferente (Downs y Mastropolo, 1997).

*In vivo*, el ovocito canino madura en el interior del oviducto a diferencia de las otras especies mamíferas (Holst y Phemister, 1971) obteniendo del fluido oviductual importantes beneficios nutritivos (Elliott, 1974 citado por Hewitt y England, 1999). En los mamíferos este fluido esta compuesto, entre otras cosas, por iones bicarbonato (mantiene un pH óptimo) (Dukelow y Riegle, 1974 citado por Hewitt y England, 1999), carbohidratos (aporte energético) y proteínas, que es la principal macromolécula identificada en él (Elliott, 1974 citado por Hewitt y England, 1999). La proporción en que se encuentran estos constituyentes varía en las distintas especies (Hewitt y England, 1999). Esta información todavía no se encuentra disponible para el caso de la perra y, en consecuencia, los requerimientos de cultivo en esta especie aun no han sido del todo dilucidados. Hasta ahora se ha descrito que la adecuada suplementación de proteínas (Hewitt y England, 1999), gonadotrofina coriónica humana (De los Reyes *et al.*, 2005) y hormonas esteroidales (Kim *et al.*, 2005) influirían en el éxito de la maduración *in vitro*.

##### **5.- Piruvato en los medios de maduración *in vitro***

El piruvato se ha estudiado en los medios de maduración *in vitro* de ovocitos de humanos, especies de laboratorio y producción; este sustrato energético modularía la progresión meiótica y ayudaría en la mantención de la viabilidad de ovocitos desprovistos de células

del cúmulo, principal fuente de piruvato *in vivo* (Downs y Mastropolo, 1994; Cetica *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2002). Su mecanismo de acción aún no es del todo conocido pero, gran parte de los estudios postulan que actuaría como fuente energética para la respiración celular (Biggers *et al.*, 1967; Geshi *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2004).

Experimentos iniciales han mostrado que los ovocitos de ratones cultivados en ausencia de glucosa utilizan el piruvato como principal fuente energética y que en medios de cultivo carentes de sustratos energéticos los ovocitos no son capaces de madurar (Biggers *et al.*, 1967). Diversos autores han descrito que la suplementación de piruvato en los medios de cultivo resulta en un aumento significativo en las tasas de maduración, lo que sugiere que este ácido orgánico cumple un rol fisiológicamente importante en la progresión del ovocito hacia la MII (In-Ha Bae y Soon-O Chung, 1975 ; Kim y Schuetz, 1991; Cetica *et al.*, 1999; Geshi *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2006; Gonzáles-Figueroa y Gonzáles- Molfino, 2005).

Además, existe una correlación entre la utilización de este sustrato y el estado de maduración nuclear (Roberts *et al.*, 2002). Se ha observado que el reinicio de la meiosis coincide con un aumento en el consumo de este producto de la glicólisis (Downs *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 2002).

Si bien se podría cuestionar la necesidad de suplementar los medios de MIV con ácido pirúvico, considerando que las células del cúmulo son capaces de producirlo a partir de la metabolización de la glucosa (Downs y Mastropolo, 1994; Roberts *et al.*, 2004), se ha demostrado en roedores que para lograr una maduración óptima es necesaria una provisión balanceada de ambos suplementos (Downs y Hudson, 2000).

También está comprobado que su procesamiento por la células del cúmulo resulta en el cese de la influencia inhibitoria de éstas sobre la maduración y en la generación de un estímulo positivo para el reinicio meiótico (Downs y Mastropolo, 1994).

Se ha planteado, aunque no de forma concluyente, que la influencia positiva del piruvato sobre la maduración ovocitaria no sería mediada por la producción de cofactores reducidos en el Ciclo de Krebs, sino que intervendría por medio de otros mecanismos (Downs y Mastropolo, 1994). Estos autores postulan que el piruvato podría actuar como un antioxidante, removiendo al oxígeno reactivo que estaría participando en la mantención del “arresto meiótico”, o que su efecto promotor de la maduración sería indirecto a través de su influencia positiva sobre la viabilidad del ovocito.

La acción del piruvato como antioxidante se ha sugerido para células somáticas (O'Donnell-Tormey *et al.*, 1987), espermatozoides de potros (Bruemmer *et al.*, 2002) y carneros (Upreti *et al.*, 1998 citado por Bruemmer *et al.*, 2002), y embriones preimplantacionales (Leese, 1990 citado por Downs y Mastropolo, 1994). Las células mamíferas en cultivo producen y secretan piruvato al medio, cuya función extracelular sería actuar como antioxidante, pero bajo condiciones de cultivo en baja densidad la concentración obtenida no es suficiente, siendo necesaria la suplementación exógena (O'Donnell-Tormey *et al.*, 1987). Sin embargo, es difícil sostener que los distintos efectos de este sustrato sobre la maduración nuclear del ovocito se deban simplemente a una neutralización extracelular del oxígeno reactivo (Downs y Hudson, 2000). Por otra parte, aunque la viabilidad del ovocito es claramente un requisito para la completa maduración meiótica es probable que el piruvato tenga un efecto adicional. Downs y Mastropolo (1994), demostraron que el efecto positivo del ácido pirúvico sobre la competencia meiótica se manifestaba aún después de alcanzada la máxima viabilidad de los gametos.

A pesar de la evidencia que señala al piruvato como un importante modulador de la progresión meiótica, este ácido orgánico normalmente no es utilizado en los medios de maduración de ovocitos en caninos, y hasta la fecha no existen estudios que describan su efecto sobre las tasas de desarrollo meiótico de los ovocitos de perra en cultivo.

## **HIPÓTESIS**

La adición de piruvato a los medios de cultivo para maduración *in vitro* de ovocitos de perra, mejorará los porcentajes de desarrollo meiótico de estos gametos, especialmente en cultivos prolongados en el tiempo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la suplementación con piruvato, a los medios de cultivo para maduración de ovocitos de perra, sobre los porcentajes de desarrollo meiótico en el tiempo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar el efecto del piruvato sobre los porcentajes de maduración nuclear *in vitro* en ovocitos de perras.
  
- Comparar la influencia del tiempo de cultivo (72 vs 96 horas) sobre el efecto de la suplementación con piruvato en la maduración meiótica de ovocitos de perras.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **a) Obtención de los ovocitos**

Los ovarios se obtuvieron de perras sanas ovariectomizadas en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de La Pintana, y fueron transportados al laboratorio en solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI/mL de Penicilina y 50 µg/mL de Estreptomicina (Sigma), a 37° C.

En el laboratorio, los ovarios se maceraron a través de cortes finos con hojas de bisturí en medio PBS, con el objetivo de liberar a los ovocitos, los cuales fueron recolectados bajo lupa estereoscópica. Sólo se seleccionaron aquellos ovocitos, de mayor tamaño, que presentaban el citoplasma homogéneo y estaban completamente rodeados por al menos tres capas de células del cúmulo.

### **b) Protocolo de maduración**

En cada replica experimental, los ovocitos seleccionados fueron repartidos al azar en dos grupos para ser incubados en dos medios de maduración distintos: el medio A, preparado con Tissue Culture Medium 199 (TCM 199; Earle's salts tamponada con 25 mM de Hefe; In Vitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, In Vitrogen), 10 UI/mL de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Sigma) y 5 µL/mL solución antibiótica (Penicilina-Estreptomicina, Sigma) (grupo control) y el medio B, que correspondió al medio A más la suplementación de 2,5 µL/mL de solución piruvato, preparada en base a 11,2 mg/mL de ácido pirúvico (grupo experimental). Todos los medios preparados se filtraron utilizando una membrana de filtro 0,22µm (Millipore).

Ambos grupos de tratamiento fueron divididos en dos subgrupos, los cuales se maduraron por periodos de 72 y 96 horas, respectivamente.

Los ovocitos de cada experimento, se cultivaron en gotas de 100  $\mu\text{L}$  del medio de maduración que correspondía, en una cantidad de 8-10 ovocitos por gota, bajo aceite mineral estéril (Sigma) y a una temperatura de 38,5 °C. Se utilizó una estufa de cultivo Forma Scientific con una atmósfera de un 5%  $\text{CO}_2$  y 98 % de humedad.

El manejo de los ovocitos se realizó en una sala de cultivo bajo una campana de flujo laminar.

### **c) Evaluación de la maduración**

Se realizaron 9 réplicas experimentales y se evaluó un total de 463 ovocitos. Luego de cada periodo de incubación (72 y 96 horas), las células del cúmulo fueron removidas mediante desplazamiento mecánico utilizando una pipeta de pequeño calibre y los ovocitos se fijaron mediante una solución en base a ácido acético, metanol y cloroformo (3:6:2) por tres minutos, y luego en ácido acético y metanol (1:3) por 72 horas a 4° C. Posteriormente, los ovocitos fijados se tiñeron con 0,1% de yoduro de propídeo (PI; Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) de acuerdo a las técnicas establecidas por De los Reyes *et al.* (2005).

El estado de maduración nuclear se evaluó bajo un microscopio de Epifluorecencia (Nikon Optiphot 2). Los ovocitos fueron clasificados como: a) ovocitos inmaduros al estado de vesícula germinativa (GV), b) reinicio meiótico con la ruptura de la envoltura de la vesícula germinativa (GVBD), c) primera metafase (MI) y d) ovocitos maduros al estado de segunda metafase, con la eliminación del primer corpúsculo polar (MII).

### **d) Análisis estadístico**

La proporción de ovocitos que alcanzaron cada estado de desarrollo meiótico en cada grupo de tratamiento y durante cada período de cultivo, fueron transformados de acuerdo a la fórmula de Bliss:  $\text{arc-sen } \sqrt{\%}$  y evaluados por ANDEVA (SAS Institute, 1985). Los promedios fueron comparados a través de la prueba de Tukey. Las diferencias de  $P \leq 0,05$  se consideraron significativas.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + T_j + (MT)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable a estudiar (Estado de maduración nuclear)

$\mu$  = Media poblacional.

$M_i$  = Medio de maduración.

$T_j$  = Tiempo de incubación.

$(MT)_{ij}$  = Interacción Medio-Tiempo

$\epsilon_{ijk}$  = Error.

## RESULTADOS

Se evaluó el estado de maduración nuclear de 463 ovocitos, los que fueron procesados según la metodología descrita en material y método. Las imágenes de ovocitos en estado de vesícula germinativa, ruptura de vesícula germinativa, primera metafase y segunda metafase, que se obtuvieron en este estudio, se presentan en la Figura 1.

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos de la evaluación nuclear de los ovocitos incubados en los dos medios de maduración a las 72 horas de cultivo.

**Tabla 1.**

**Número y porcentaje de ovocitos de perra en diferentes estados de maduración nuclear a las 72 horas de cultivo, utilizando dos medios de cultivo.**

Medio de maduración	GV	GVBD	MI	MII
<b>A</b>	23/121 <sup>a</sup> (19,01%)	36/121 (29,75%)	49/121 (40,50%)	13/121 <sup>a</sup> (10,74%)
<b>B</b>	9/106 <sup>b</sup> (8,49%)	34/106 (32,08%)	41/106 (38,68%)	22/106 <sup>b</sup> (20,75%)

a, b: superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Medio A: medio de maduración CONTROL (base); Medio B: medio base suplementado con solución piruvato.

GV: vesícula germinativa; GVBD: ruptura de la vesícula germinativa; MI: primera metafase; MII: segunda metafase.

Luego de 72 horas de cultivo cerca del 20% de los ovocitos incubados en el medio de maduración base fueron incapaces de reanudar la meiosis, evaluándose en estado de vesícula germinativa (GV), vale decir, inmaduros sin signos de reinicio meiótico. Este porcentaje fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) que en el grupo experimental, incubado en el medio suplementado con piruvato.

Los porcentajes de gametos evaluados en los que se evidenció el primer signo de reinicio meiótico, ruptura de la envoltura nuclear (GVBD), fue similar en ambos medios de maduración ( $P > 0,05$ ), al igual que la proporción de ovocitos en primera metafase meiótica (MI) ( $P > 0,05$ ).

Los ovocitos incubados en presencia de ácido pirúvico en el medio de maduración *in vitro* mostraron una mayor ( $P \leq 0,05$ ) proporción de maduración nuclear al estado de segunda metafase (MII) siendo prácticamente el doble del porcentaje de ovocitos maduros en MII que fueron incubados en el medio A.

Los resultados de la evaluación del estado nuclear de los ovocitos incubados en los distintos medios de maduración a las 96 horas de cultivo se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2.**  
**Número y porcentaje de ovocitos de perra en diferentes estados de maduración nuclear a las 96 horas de cultivo, utilizando dos medios de cultivo.**

Medio de maduración	GV	GVBD	MI	MII
<b>A</b>	21/121 <sup>a</sup> (17,36%)	41/121 (33,88%)	43/121 (35,54%)	16/121 <sup>a</sup> (13,22%)
<b>B</b>	10/115 <sup>b</sup> (8,70%)	36/115 (31,30%)	42/115 (36,52%)	27/115 <sup>b</sup> (23,48%)

a, b: superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Medio A: medio de maduración base; Medio B: medio suplementado con solución piruvato.

VG: vesícula germinativa; GVBD: ruptura de la vesícula germinativa; MI: primera metafase; MII: segunda metafase.

A las 96 horas de cultivo el porcentaje de ovocitos con su núcleo en estado inmaduro o GV, en el grupo control fue significativamente superior ( $P \leq 0,05$ ) al grupo experimental.

En relación al porcentaje de ovocitos en reinicio meiótico (GVBD) y en primera metafase (MI), no hubo diferencias estadísticamente importantes entre los distintos sistemas de cultivo ( $P > 0,05$ ).

La presencia de ovocitos al estado de segunda metafase (MII) fue diferente en los distintos sistemas de cultivo ( $P \leq 0,05$ ), registrándose un mayor porcentaje de ovocitos maduros en el medio suplementado con piruvato (23,48%) que el medio de maduración base (13,22%).

Para evidenciar el efecto del tiempo de cultivo sobre la progresión meiótica de los ovocitos incubados en los distintos medios de maduración., en la Tabla 3 se resumen los porcentajes de ovocitos en cada estado de maduración nuclear a las 72 y 96 horas de cultivo.

**Tabla 3.**

**Número y porcentaje ovocitos de perra en diferentes estados de maduración nuclear a las 72 y 96 horas de cultivo, utilizando dos medios de cultivo.**

	GV		GVBD		MI		MII	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<b>72 h</b>	23/121 (19,01%)	9/106 (8,49%)	36/121 (29,75%)	34/106 (32,08%)	49/121 (40,50%)	41/106 (38,68%)	13/121 (10,74%)	22/106 (20,75%)
<b>96 h</b>	21/121 (17,36%)	10/115 (8,70%)	41/121 (33,88%)	36/115 (31,30%)	43/121 (35,54%)	42/115 (36,52%)	16/121 (13,22%)	27/115 (23,48%)

a, b: superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ).

Medio A: medio de maduración base; Medio B: medio suplementado con solución piruvato.

VG: vesícula germinativa; GVBD: ruptura de la vesícula germinativa; MI: primera metafase; MII: segunda metafase.

Los porcentajes de GV de los ovocitos en el medio de maduración base no evidenciaron diferencias significativas al aumentar el tiempo de incubación de 72 a 96 horas ( $P > 0,05$ ).

La adición de ácido pirúvico al medio de cultivo tampoco produjo variaciones en la proporción de ovocitos al estado de vesícula germinativa al aumentar el tiempo de cultivo a 96 h ( $P > 0,05$ ).

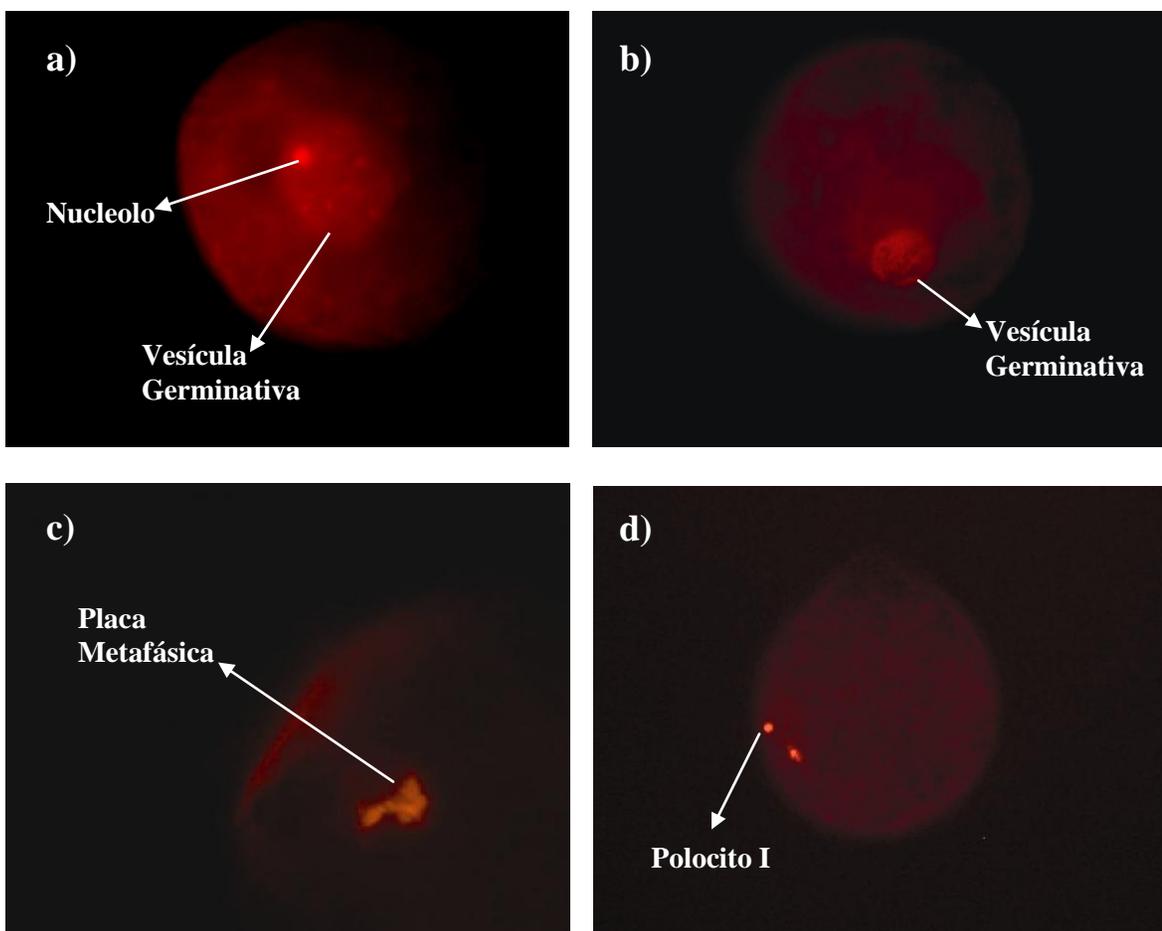
EL porcentaje de ovocitos en reinicio meiótico (GVBD), como en los estados intermedios de maduración (MI) a la 72 h de incubación no fue diferente al observado a las 96 horas de incubación ( $P>0,05$ ) utilizando tanto el medio control, como el suplementado con piruvato ( $P>0,05$ ).

Luego de 96 h de incubación se registró en ambos protocolos de cultivo una tendencia a un aumento de ovocitos en MII en comparación a las 72 h, sin embargo, no significativa.

No se observó una interacción estadística entre las variables: medio de maduración y tiempo de cultivo ( $P>0,05$ ).

**Figura N° 1. Microfotografías de ovocitos de perra madurados *in vitro*, en distintos estados de desarrollo meiótico, teñidos con yoduro de propídeo (IP).**

- a) Ovocito inmaduro al estado de vesícula germinativa (VG) (40X).
- b) Ovocito en reinicio meiótico con ruptura de la envoltura de la vesícula germinativa (GVBD) (40X).
- c) Ovocito al estado de primera metafase (MI) (40X).
- d) Ovocito maduro al estado de segunda metafase, con la eliminación del primer corpúsculo polar (MII) (40X).



## DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que el ácido pirúvico ejerce una influencia positiva sobre el desarrollo meiótico de los ovocitos de perra. Estos resultados son concordantes con trabajos previos realizados en ovocitos de roedores (In-Ha Bae y Soon-O Chung, 1975; Kim y Schuetz, 1991; Downs y Mastropolo, 1994; Downs *et al.*, 1997), bovinos (Cetica *et al.*, 1999; Geshi *et al.*, 2000) y cerdos (González-Figueroa y González-Molfino, 2005), los que han descrito que la adición de este compuesto a los medios de cultivo promovía la maduración de ovocitos *in vitro*. Es importante mencionar que hasta la realización de esta investigación no existían estudios que describieran el efecto del piruvato sobre las tasas de maduración en cultivo de ovocitos caninos.

La maduración meiótica completa comprende la progresión nuclear desde el dictiateno de la primera profase meiótica hasta la segunda metafase (Eppig, 1989; Sirard *et al.*, 1989; Downs, 1993; Nickson *et al.*, 1993; Luvoni, 2000; Eppig, 2001). En la primera etapa del proceso de maduración el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la meiosis y posteriormente, de forma paulatina, va obteniendo la competencia de completar los siguientes estados de maduración nuclear hasta alcanzar la segunda metafase (Downs, 1993; Sirard, 2001; Eppig, 2001).

El estado de VG, que corresponde a un ovocito inmaduro sin reinicio meiótico, es la forma predominante previo al cultivo y durante las primeras 24 horas de incubación en ovocitos caninos recolectados desde el ovario (De los Reyes *et al.*, 2005). Este estado meiótico se observó en todos los protocolos de cultivo. Tanto a las 72 como a las 96 horas la proporción de ovocitos que se mantuvieron arrestados en el estado de VG, sin reinicio en la meiosis, fue menor al ser incubados en el medio suplementado con piruvato que aquellos incubados en el medio desprovisto de él (control). Esto implicaría que la presencia de ácido pirúvico en el medio de maduración *in vitro* mejoraría la capacidad del ovocito para reiniciar la meiosis, llevando a cabo la ruptura de la envoltura nuclear e iniciar la condensación cromosómica.

Estos resultados concordarían con lo registrado por Downs y Mastropolo (1994), quienes al incubar ovocitos de ratones en concentraciones crecientes de ácido pirúvico observaron que el aumento de este sustrato en los medios de cultivo aumentaba la proporción de ovocitos capaces de reanudar la meiosis. Se ha señalado que en humanos (Roberts *et al.*, 2002) y roedores (Downs *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 2004) existiría una asociación entre el consumo de piruvato y la reanudación de la maduración meiótica *in vitro* estableciéndose que un aumento en el consumo de este sustrato estaría relacionado con la inducción en la disolución de la envoltura nuclear.

Este efecto inductivo del piruvato sobre el reinicio meiótico podría deberse a la generación de un estímulo positivo como consecuencia de su procesamiento en las células de la granulosa (Downs, 1993; Downs y Mastropolo, 1994). *In vivo*, los ovocitos desarrollan la capacidad para reanudar la meiosis durante el crecimiento folicular; sin embargo, se mantienen arrestados en el dictiateno de la primera división meiótica hasta que el alza preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) estimula la ruptura de la vesícula germinativa (GVBD) (Downs, 1993; Eppig, 2001). El mecanismo de acción de esta gonadotropina para promover la maduración aún no es del todo conocido (Eppig, 2001; Webb *et al.*, 2002) y se postula que una forma de acción sería la generación de un factor positivo en las células de la granulosa que induciría el reinicio de la maduración meiótica (Downs, 1993; Eppig, 1989; Eppig, 2001; Webb *et al.*, 2002). Se cree que este factor positivo podría corresponder al piruvato (Zuelke y Brackett, 1992). Estos autores explican que la LH estimula en las células de la granulosa la producción de ácido pirúvico mediante un aumento en los procesos de glicólisis e incrementa su utilización en el ovocito a través del Ciclo de Krebs, lo que redundaría en una mejora en la utilización energética y por lo tanto en una mayor competencia de desarrollo meiótico. Por otra parte, se ha observado *in vitro* que la suplementación de los medios de cultivo con hCG (con acción LH) mejora los resultados de maduración de los ovocitos de perra incubados en presencia de piruvato (De los Reyes *et al.*, 2005).

En el presente estudio, de los ovocitos que reanudaron la meiosis en ambos medios y periodos de cultivo, un alto porcentaje quedó arrestado al estado de primera metafase (MI) y en una proporción un poco menor al estado de ruptura de la vesícula germinativa (GVBD), sin encontrar diferencias sobre las proporciones de estos estados de maduración nuclear al adicionar piruvato. En diversos estudios sobre maduración de ovocitos *in vitro* desarrollados hasta la fecha en caninos, utilizando variados protocolos de incubación, han descrito que en estas especies los ovocitos difícilmente progresan meióticamente más allá de MI, quedando en su mayoría arrestados en estos estados intermedios de desarrollo nuclear (GVBD-MI) (Yamada *et al.*, 1992; Nickson *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Bolamba *et al.*, 1997; Hewitt y England, 1998; Bogliolo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Luvoni *et al.*, 2005).

El estado de desarrollo completo hasta metafase II, que implica un gameto nuclearmente maduro y potencialmente apto para ser fecundado (Eppig, 1989; Downs, 1993; Nickson *et al.*, 1993; Luvoni, 2000; Eppig, 2001), fue favorecido significativamente por la presencia de ácido pirúvico en el medio de incubación, independiente de la duración del cultivo, lo que indicaría que el aporte de piruvato al medio sería más significativo que la extensión del tiempo de cultivo en la promoción del desarrollo nuclear de ovocitos caninos *in vitro*. En roedores, bovinos y cerdos la adición de este ácido orgánico a los medios de incubación también ha demostrado mejorar la maduración ovocitaria completa (ovocitos en MII) en cultivo (In-Ha Bae y Soon-O Cheng, 1975; Kim y Schuetz, 1991; Downs y Mastropolo, 1997; Cetica *et al.*, 1999; Downs y Hudson, 2000; Geshi *et al.*, 2000; González-Figueroa y González-Molfino, 2005).

Esta influencia positiva del piruvato sobre la maduración meiótica se ha atribuido a su participación como sustrato energético en la respiración celular (Biggers *et al.*, 1967; Geshi *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2004). Durante el proceso de maduración nuclear, aumentan los requerimientos energéticos del ovocito (Cetica *et al.*, 1999) y con ello la producción de piruvato en las células de la granulosa como resultado de la acción de la LH (Zuelke y Brackett, 1992). Una vez que el ovocito ha alcanzado el estado de maduración de MII, cae

el consumo de este sustrato por parte de la célula, el cual se había mantenido elevado desde el reinicio meiótico (Roberts *et al.*, 2004).

Es probable, además, que el piruvato contribuya a la sobrevivencia de los ovocitos incubados para maduración (Downs y Mastropolo, 1994; De los Reyes *et al.*, 2005).

También se ha postulado que los beneficios de la suplementación con piruvato no sólo se deben al aporte de la energía necesaria para el metabolismo primario del ovocito, si no que también regularía el estrés oxidativo del ambiente de maduración (Downs y Mastropolo, 1994; Gonzáles-Figueroa y Gonzáles-Molfino, 2005). Esta acción antioxidante ha sido demostrada en cultivo de células somáticas (O'Donnell-Tormey *et al.*, 1987) y espermatozoides (Bruemmer *et al.*, 2002).

Una pequeña proporción de los gametos incubados en el medio control, sin suplementación, fue capaz de alcanzar la MII evidenciando que si bien la adición de piruvato al medio de cultivo favorece el desarrollo meiótico, no es esencial para completar la maduración ovocitaria. Esto difiere con lo señalado previamente en ratones donde se ha mostrado que la ausencia de este suplemento en el protocolo de cultivo impide la consecución de la maduración nuclear (Biggers *et al.*, 1967; Kim y Schuetz, 1991). A diferencia de esos experimentos, en el presente estudio, los ovocitos seleccionados para madurar *in vitro* se incubaron con sus células del cúmulo, las cuales se ha demostrado son capaces de producir ácido pirúvico mediante el metabolismo glicolítico de la glucosa (Biggers *et al.*, 1967) y de suministrarlo al ovocito a través de uniones comunicantes (Anderson y Albertini, 1976; Webb *et al.*, 2002; Senbon, *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2004). Además se ha señalado que aunque la glucosa puede sustentar el desarrollo meiótico de ovocitos incubados en presencia de células del cúmulo, el mayor número de MII se alcanza con la suplementación adecuada de ambos sustratos (Downs y Hudson, 2000).

No obstante el efecto benéfico del piruvato en el desarrollo meiótico de ovocitos caninos demostrado en este trabajo, los valores de ovocitos en MII obtenidos a las 72 y 96 horas de cultivo en el medio con suplementación, aun están por debajo a lo alcanzado en la

maduración *in vitro* de otras especies como bovinos (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986; Ocaña-Quero *et al.*, 1994; De los Reyes *et al.*, 1999) y porcinos (Funahashi *et al.*, 1994), donde se han logrado porcentajes cercanos al 90%.

La mayoría de los ovocitos quedaron arrestados en los estados intermedios de la maduración nuclear, (GVBD y MI), lo que pareciera ser frecuente en los ovocitos caninos (Fastard, 2000; Luvoni, 2000; Luvoni *et al.*, 2005; De Los Reyes *et al.*, 2005)

Distintos autores han explicado esta falla en la progresión nuclear *in vitro* como una consecuencia de la utilización de ovocitos meióticamente incompetentes y/o la incubación en condiciones de cultivo inapropiadas (Fastard, 2000; Luvoni, 2000; Luvoni *et al.*, 2005).

En este trabajo, los gametos utilizados para cultivo fueron seleccionados de acuerdo a parámetros previamente reportados como favorecedores de la competencia meiótica, como el citoplasma oscuro y homogéneo (Hewitt y England, 1998), un diámetro superior a 110  $\mu\text{m}$  (Otoi *et al.*, 2002) y completamente rodeados por al menos dos capas compactas de células del cúmulo (Nickson *et al.*, 1993).

Por otra parte, es posible que la concentración de piruvato utilizada no haya sido la óptima para promover el desarrollo ovocitario en cánidos. A diferencia de los otros mamíferos, los ovocitos de perra adquieren su competencia meiótica en el ambiente intrafolicular (bajo elevadas concentraciones de progesterona) (Concannon, 1989) y extrafolicular (oviducto), siendo este último el lugar donde reinician y completan su maduración (Fastard, 2000; Luvoni, 2000). Estas peculiaridades complican la adaptación de los conocimientos ganados en otras especies y la definición de un ambiente de cultivo adecuado. La concentración de piruvato en el líquido oviductual ha sido definida en varias especies, incluyendo a los roedores (Gardner y Leese, 1990), bovinos (Edwards *et al.*, 1997) y humanos (Tay *et al.*, 1997; Leese *et al.*, 2001) sin embargo, aun es desconocida en la perra. Los requerimientos de maduración *in vitro* son particulares para los ovocitos de cada especie lo que cobra importancia al momento de instaurar las condiciones de incubación.

Los resultados obtenidos de MII empleando suplementación con piruvato fueron inferiores a lo registrado en trabajos previos (De los Reyes *et al.* 2005), utilizando el mismo protocolo de cultivo. Esta diferencia se podría deber a características individuales de las hembras donantes. Por otro lado, si bien en ambos trabajos las donantes se encontraban a distintos estados del ciclo estral, diversos estudios han demostrado que no existe asociación entre competencia meiótica y estado reproductivo y que el mejor predictor de el potencial meiótico de los ovocitos son sus cualidades inherentes ya antes señaladas (Nickson *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1999; Otoi *et al.*, 2002; Rodrigues y Rodrigues, 2003; Fastard, 2000). Esto hace pensar que para mejorar los resultados de maduración *in vitro* obtenidos hasta ahora en esta especie sería necesario identificar parámetros adicionales de selección.

Otro factor que ha demostrado influir en la MIV de ovocitos caninos, es la duración del cultivo (Hewitt y England, 1998; Yamada *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1993). Incrementar progresivamente el tiempo de incubación potencialmente disminuye las proporciones de GV y aumenta las proporciones de GVBD-MII (Luvoni *et al.*, 2005). Esto se puede explicar porque el tiempo fisiológico requerido por los ovocitos de perra para madurar en el interior del oviducto es prolongado; se demoran de 2-5 días en alcanzar la completa maduración nuclear (Holst y Phemister, 1971).

En este experimento, se estudió la influencia del tiempo de incubación (72 v/s 96 horas) sobre el efecto de la suplementación con piruvato en la maduración meiótica y se observó que la prolongación del cultivo no afectó de forma significativa ninguno de los estados de maduración nuclear. En la literatura existen resultados conflictivos en relación a este tema. Se han observado ovocitos en reinicio meiótico desde las 24 horas, un aumento de los estados más avanzado de maduración a partir de las 48 y un incremento en los porcentajes de segunda metafase a las 72 (De los Reyes *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se determinó que 72 horas de cultivo eran suficientes para obtener ovocitos nuclearmente maduros, corroborando lo descrito previamente en otros estudios (Hewitt y England, 1999; Fujii *et al.*, 2000; Rodrigues y Rodrigues, 2003; Kim *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2005). Esto es similar a lo observado *in vivo* en hembras de zorro azul donde se han

encontrado, en el interior del oviducto, ovocitos en MII luego de 48 a 72 horas de la ovulación (Hyttel *et al.*, 1990).

Sin embargo, otros trabajos han demostrado que al incrementar la duración del cultivo a 96 horas, aumenta la cantidad de ovocitos madurados a MII (Hewitt y England, 1999; De los Reyes *et al.*, 2005). En contraste, otros informes han señalado que bastan 48 horas de incubación para obtener ovocitos meióticamente maduros (Nickson *et al.* 1993; Bolamba *et al.*, 1998; Saint-Dizier *et al.*, 2001; Bogliolo *et al.*, 2002) y que tiempos mayores de incubación aumentarían la degeneración de los gametos (Bogliolo *et al.*, 2002).

Esta discrepancia con respecto al tiempo requerido por los ovocitos para madurar *in vitro* se debe en parte a la diversidad de protocolos de maduración utilizados, ya que los nutrientes presentes en el medio de maduración influyen la sobrevivencia de los gametos (Luvoni *et al.*, 2005). En consecuencia, para limitar la degeneración de los ovocitos en cultivo y poder mejorar así las tasas de maduración se debe lograr un correcto balance entre el tiempo de incubación y el sistema de cultivo empleado.

Un sistema efectivo de maduración *in vitro* para ovocitos de perra constituye un requisito esencial para poder desarrollar adecuadamente otras biotecnologías reproductivas, tales como la producción *in vitro* de embriones, que permitirían aumentar el potencial reproductivo de esta especie, como así mismo estudiar los procesos fisiológicos relacionados con la fecundación.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. El reinicio meiótico *in vitro* de ovocitos de perra se ve favorecido por la suplementación de piruvato al medio de cultivo.
2. La adición de ácido pirúvico al medio de cultivo mejora los porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos caninos.
3. El incremento del tiempo de incubación de 72 a 96 horas no influye sobre el efecto de la suplementación con piruvato en la maduración nuclear de ovocitos de perras.

**BIBLIOGRAFÍA**

- **ALI, A.; SIRARD, M.A.** 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod.* 66:901-905
- **ANDERSON, E.; AIBERTINI, D.** 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol.* 71:680-686.
- **BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; DONAHUE, R.P.** 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 58:560-567.
- **BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M.T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S.** 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:265-273.
- **BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S.** 1998. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology.* 49:933-942.
- **BOLAMBA, D.; RUSS, K.; OLSON, M.; SANDLER, J.; DURRANT, B.** 2002. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology.* 58:1689-1703.
- **BRUEMMER, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K.** 2002. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for 48 hours. *J Anim Sci.* 80:12-18.
- **CETICA, P. D.; PINTOS, L. N.; DALVIT, G. C.; BECONI, M. T.** 1999. Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 51:541-550.
- **CONCANNON, P.W.** 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fétil.* 39:3-25.

- **DE LOS REYES, M.; AGUAYO, J.; DEL CAMPO, H.; BARROS, C.** 1999. Evaluación de ovocitos de vacas para maduración en cultivo. *Avances Cs Vet.* 14:49-60.
  
- **DE LOS REYES M.; DE LANGE J.; MIRANDA P.; PALOMINOS J.; BARROS C.** 2005. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology.* 64:1-11.
  
- **DE LOS REYES M.; PALOMINO J.; SEPÚLVEDA S.; MIRANDA P.; PARRAGUEZ V.; BARROS C.** 2006. Evaluation of cortical granules and viability evaluation during *in vitro* maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. *Vet Rec* (en prensa).
  
- **DOWNS, S.M.** 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology.* 39:65-79
  
- **DOWNS, S.M.** 1995. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol.* 167:502-512.
  
- **DOWNS, S.M.; MASTROPOLO, A.** 1994. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev Biol.* 162:154-168.
  
- **DOWNS, S.M.; MASTROPOLO, A.** 1997. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 46:551-566.
  
- **DOWNS, S.M.; HOUGHTON, F.D.; HUMPHESON, P.G.; LEESE, H.J.** 1997. Substrate utilization and maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes: evidence that pyruvate oxidation does not mediate meiotic induction. *J Reprod Fétil.* 110:1-10
  
- **DOWNS, S. M.; HUDSON, E. D.** 2000. Energy substrates and the completion of spontaneous meiotic maturation. *Zigote.* 8:339-351.

- **DUKELOW, W.R.; RIEGLE, G.D.** 1974. Transport of gametes and the survival of the ovum as functions of the oviduct. En: Johnson, A. D.; Foley, C. W. The oviduct and its functions. Academic press. Nueva York, Estados Unidos. pp. 193-220. (citado por Hewitt, D.A; England, G.C. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. Anim Reprod Sci. 55:63-75).
  
- **EDWARDS, L.J.; BATT, P.A.; GANDOLFI, F.; GARDNER, D.K.** 1997. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. Mol Repod Dev. 46:146-154.
  
- **ELLIOTT, D. S.** 1974. Ova and embryo metabolism: functions of the oviduct. En: Johnson, A. D.; Foley, C. W. The oviduct and its functions. Academic press. Nueva York, Estados Unidos. pp. 300-332. (citado por Hewitt, D.A; England, G.C. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. Anim Reprod Sci. 55:63-75).
  
- **EPPIG, J.J.** 1989. Mammalian oocyte maturation: mechanisms for regulation and prospects for practical application of *in vitro* technology. En su: Medically assisted conception: An agenda for research. Estados Unidos, The National Academies Press. pp. 176-190.
  
- **EPPIG, J.J.** 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 122:829-838.
  
- **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. Theriogenology. 53:175-186.
  
- **FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T.** 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. J Vet Med Sci. 62:305-307.
  
- **FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.; DAY, B.N.** 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. J Reprod Fertil. 101:159-165.

- **GARDNER, D.K.; LEESE, H.J.** 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 88:361-368.
  
- **GESHI, M.; TAKENOUCI, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T.** 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod.* 63:1730-1734.
  
- **GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T.** 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 82-83:431-446.
  
- **GONZÁLES-FIGUEROA, H.; GONZÁLES-MOLFINO, H.M.** 2005. Maturation of pig oocyte *in vitro* in a medium with pyruvate. *Braz J Med Biol Res.* 38:869-872.
  
- **HEWIIT, D.A.; ENGLAND, G.C.** 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology.* 49:957-966.
  
- **HEWIIT, D.A.; ENGLAND, G.C.** 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 55:63-75.
  
- **HYTTEL, P.; FARSTAD, W.; MONDAIN-MONVAL, M.; BAKKE, K.; SMITH, A.** 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anat Embryol.* 181:325-331.
  
- **HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D.** 1971. The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol Reprod.* 5:194-206.
  
- **IN-HA BAE.; SOON-O CHUNG.** 1975. The *in vitro* maturation of the mouse oocyte. *Yonsei Med J.* 16 (1):18-28.
  
- **KIM, H.; SCHUETZ, A.W.** 1991. Regulation of nuclear membrane assembly and maintenance during *in vitro* maturation of mouse oocytes: role of pyruvate and protein synthesis. *Cell Tissue Res.* 265(1):105-112.

- **KIM, M.K.; FIBRIANTO, Y.H.; OH, H.J.; JANG, G.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S.** 2005. Effects of estradiol-17B and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 15:1342- 1353.
- **LEESE, H. J.** 1990. Physiology of the fallopian tube: The provision of nutrients for oocytes and early embryos. En: Evers, J. H. L.; Heineman, M. J. Ovulation to implantation. Elsevier science pub. Nueva York, Estados Unidos. pp. 121-125. (citado por Downs, S. M; Mastropolo, A. 1994. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev Biol*. 162:154-168.)
- **LEESE, H.; TAY, J.; REISCHL, J.; DOWNING, S.** 2001. Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*. 121:339-346.
- **LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; FIRST, N.L.** 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod*. 35:850-857.
- **LUVONI, G.** 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod Nutr Dev*. 40:505-512.
- **LUVONI, G.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D.** 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Dom Anim*. 38:410-414.
- **LUVONI, G.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D.** 2005. Factors involved in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63:41-59.
- **NICKSON, D.A; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENT, J.P.** 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*. 47:231- 240.
- **OCAÑA-QUERO, J.M.; MORENO, M.; VALERA, M.; RODERO, A.** 1994. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 41: 405-411.

- **O'DONNELL-TORMEY, J.; NATHAN, C. F.; LANKS, K.; DEBOER, C. J.; DE LA HARPE, J.** 1987. Secretion of pyruvate: an antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med.* 165:500-514.
  
- **OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M. OOKA, A.; SUZUKI, T.** 2000<sup>a</sup>. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology.* 54:535-542.
  
- **OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; UNE, S.; SUZUKI, T.** 2000<sup>b</sup>. Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Vet Rec.* 146:52-53.
  
- **OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.** 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction.* 124:775-781.
  
- **PINCUS, G.; ENZMANN, V.** 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med.* 62:665-675
  
- **REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIOS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction.* 130:193-201.
  
- **ROBERTS, R.; FRANKS S.; HARDY, K.** 2002. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum. Reprod.* 17:2950-2956
  
- **ROBERTS, R.; STARK, J.; IATROPOULOU, A.; BECKER, D.; FRANKS, S.; HARDY, K.** 2004. Energy substrates metabolism of mouse cumulus-oocyte-complexes: response to FSH is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and associated with oocyte maturation. *Biol Reprod.* 71:199- 209.
  
- **RODRIGUES, B.; RODRIGUES, J.L.** 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology.* 60:59-66.
  
- **SAINT-DIZIER, M.; RENARD, J-P.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *J Reprod Fert.* 121:97-105.

- **SAS INSTITUTE.** 1985. SAS® User's guide: statistics. 5th edition. SAS Institute Inc. Cary, NC. Estados Unidos.
  
- **SENBON, S.; HIRAO, Y.; MIYANO, T.** 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from *in vitro* culture. *J Reprod Fertil.* 49:259-269
  
- **SENBON, S.; FUKUMI, Y.; HAMAWAKI, A.; YOSHIKAWA, M.; MIYANO, T.** 2004. Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. *J Reprod Dev.* 50: 541-547.
  
- **SIRARD, M.; FLORMAN, H.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, F.; BARNES, F.; SIMS, M.; FIRST, N.** 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 40:1257-1263.
  
- **SIRARD, M.A.** 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 55:1241-1254
  
- **TAY, J.I.; RUTHERFORD, A.J.; KILLICK, S.R.; MAGUINESS, S.D.; PARTRIDGE, R.J.; LEES, H.J.** 1997. Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Human Reprod.* 12:2451-2456.
  
- **TSUTSUI, T.** 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 39:269-275.
  
- **UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D. M.; VISHWANATH, R.; SMITH, R. F.** 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci.* 51:275-287. (citado por Bruemmer, J. E. Coy, R. C.; Squires, E. L.; Graham, J. K. 2002. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for un 48 hours. *J Anim Sci.* 80:12-18
  
- **WEBB, R.J.; BAINS, H.; CRUTTWELL, C.; CARROLL, J.** 2002. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for mechanism of meiotic maturation. *Reproduction.* 123:41-52.

- **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1992. Maturation, fertilisation, and development of dog oocytes *in vitro*. Biol Reprod. 46:853-858.
  
- **YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J Reprod Fertil Suppl. 47:227-229.
  
- **YOSHIDA, M.; ISHIGAKI, K.; PURSEL, VG.** 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. Mol Reprod Dev. 31:68-71.
  
- **ZUELKE, K.; BRACKETT, B.** 1992. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. Endocrinology. 131:2690-2696.