



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN MITOCONDRIAL EN
OVOCITOS DE PERRA: INMADUROS, MADURADOS *IN*
VITRO Y MADURADOS *IN VIVO***

PAMELA CRISTINA SAFFIE VÁSQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento De Fomento De La
Producción Animal

PROFESORA GUIA: MÓNICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1080618

**SANTIAGO - CHILE
2009**

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	8
MADURACIÓN OVOCITARIA	10
CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES CITOPLASMÁTICOS.	11
REDISTRIBUCIÓN MITOCONDRIAL Y RED MICROTUBULAR.	12
DISTRIBUCIÓN ANORMAL MITOCONDRIAL.	15
ROL DE LAS MITOCONDRIAS EN LA MADURACIÓN DEL OVOCITO.	16
GENERACIÓN DE ATP.	16
APOPTOSIS Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.	18
OTROS ROLES: MITOCONDRIAS E IONES.	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
<i>Detección de ovulación</i>	24
<i>Transporte de ovarios y oviductos</i>	24
<i>Obtención de ovocitos</i>	24
<i>Ovocitos inmaduros</i>	25
<i>Ovocitos madurados in vitro</i>	25
<i>Ovocitos madurados in vivo</i>	25
EVALUACIÓN MITOCONDRIAL.	26
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.	27
RESULTADOS	28
DISCUSION.	34
CONCLUSIONES.	42
BIBLIOGRAFÍA.	43

RESUMEN

En caninos, el desarrollo de las biotecnologías reproductivas ha sido inferior en comparación al realizado en otras especies, básicamente debido a la baja eficiencia en la maduración *in vitro* de los ovocitos. La adecuada maduración comprende tanto al núcleo como al citoplasma, a nivel citoplasmático involucra la redistribución y desarrollo de organelos, entre estos, la organización y la actividad metabólica de las mitocondrias. Sin embargo, no hay mayores antecedentes respecto al desarrollo citoplasmático *in vitro* en los caninos, por lo que en la presente memoria se estudió la actividad y distribución mitocondrial en ovocitos de perras en estado inmaduro, madurados *in vitro* por 72 y 96h y madurados *in vivo*.

Se analizó un total de 766 ovocitos obtenidos de perras sanas sometidas a ovariectomía. Del total de estos ovocitos estudiados, 215 fueron utilizados como inmaduros, 254 fueron madurados durante 72 horas y los otros 297 durante 96 horas. Adicionalmente se analizó una cantidad total de 15 ovocitos madurados *in vivo*, obtenidos por lavados del oviducto a perras en estro, ovariectomizadas 72 h después de la ovulación, la que se determinó mediante análisis de progesterona sérica. Tanto los ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo* fueron procesados de forma separada para evaluar la distribución y actividad mitocondrial, usando la sonda de fluorescencia MitoTracker Red CMXRos®. Las observaciones se realizaron en un microscopio invertido con epifluorescencia.

La actividad mitocondrial se evaluó de acuerdo a la fluorescencia emitida en alta, media y baja para cada uno de los estados de maduración de los ovocitos y se analizó mediante chi-cuadrado. Se estableció dependencia entre las frecuencias de ovocitos con distintas intensidades de fluorescencia (alta, media, baja) al comparar las muestras provenientes de ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 h, y madurados *in vivo* (chi cuadrado = 30,59; $p < 0,01$), indicando que la actividad mitocondrial se encuentra directamente asociada al estado de maduración del ovocito de perra.

En la actividad mitocondrial todos los ovocitos madurados *in vivo* presentaron fluorescencia de tipo media, la que predominó en ovocitos de perra inmaduros y madurados *in vitro*; sin embargo, se observó un aumento en el porcentaje de ovocitos con

esta emisión de fluorescencia durante la maduración *in vitro* que indicaría una actividad mitocondrial progresiva durante el cultivo, asociada al tiempo de maduración.

La distribución mitocondrial se evaluó mediante análisis descriptivo, determinándose cuatro patrones: Homogéneo liso completo (A), Homogéneo granuloso completo (B), Heterogéneo granuloso periférico y central (C), y Heterogéneo granuloso central (D). En ovocitos inmaduros se encontraron dos patrones de distribución mitocondrial A (72,1%) y B (27,9%); en aquellos madurados *in vitro* por 72 h se presentaron los cuatro patrones, predominando el B (63,8%), seguido por C (20,5%), el A (9,8%) y finalmente el D (5,9%). en los ovocitos madurados por 96 h se observaron los patrones, B (63,6%), seguido por C (35,7%) y finalmente D (0,7%). En el caso de los ovocitos madurados *in vivo* se describió sólo un patrón de distribución mitocondrial que correspondió a B.

Con estos antecedentes se indica que en ovocitos inmaduros de perra predomina una distribución uniforme de las mitocondrias en su citoplasma. Además la presentación de tres patrones diferentes en los ovocitos madurados *in vitro* a aquel descrito en ovocitos madurados *in vivo* podría indicar que durante la maduración *in vitro* se producen movimientos de las mitocondrias en el citoplasma ovular. También, las distribuciones de las mitocondrias, variaron a través de la maduración *in vitro*, asemejándose a aquellos madurados *in vivo*, sin embargo, hubo diferencias entre ambos tipos de maduración lo que podría estar asociado a las condiciones de cultivo.

ABSTRACT

In canines, the development of reproductive biotechnologies has been lower compared with other mammalian species, basically due to the very poor efficiency of *in vitro* oocyte maturation in this species. The adequate maturation of the oocyte includes both the nucleus and cytoplasm, the cytoplasmic maturation involves redistribution and development of organelles; among these, the organization and metabolic activity of mitochondria. However, the *in vitro* cytoplasmic reorganization during maturation has not been fully described in canine; thus, in the present memory it was studied the activity and distribution of mitochondria in: immature, *in vitro* matured (for 72 and 96 h) and *in vivo* matured bitch oocytes.

oocytes (766) were obtained from healthy ovariectomized bitches, 215 oocytes were used as immature, 254 oocytes were cultured *in vitro* for 72 h and the 297 remaining ones were cultured for 96 h. In addition, there were analyzed 15 *in vivo* matured oocytes, which were obtained by flushing the oviducts of bitches in estrous that were ovariectomized 72 h after the ovulation, which was determined by serum progesterone analysis. Immature, *in vitro* and *in vivo* matured oocytes were treated separated to evaluate the mitochondrial distribution and activity, assessed by MitoTracker Red CMXRos®, fluorescence probe. The evaluations were performed by epifluorescence inverted microscope.

The activity of mitochondrias was evaluated in each oocyte according to the fluorescence intensity, which was classified as: high, medium, and low, the percentage of each type of fluorescence accounted for immature, *in vitro* matured or *in vivo* matured oocyte was analyzed by chi-square test. Dependence was established between the frequencies of oocytes with different intensities of fluorescence (high, medium, low) when it was compared with immature, *in vitro* matured for 72 and 96 h, and *in vivo* matured oocytes ($\chi^2 = 30,39$; $p < 0,01$). This would indicate that mitochondrial activity is directly associated with the maturation state of the oocyteS.

All oocytes matured *in vivo* showed medium intensity of fluorescence, the same type was predominant in immature and *in vitro* matured oocytes; however, increasing percentage of oocytes with this type of fluorescence was observed during the *in vitro* maturation, which could be associated with mitochondrial activity during culture, throughout the time of maturation.

Distribution of mitochondrias was evaluated by descriptive analysis, establishing four patterns: (A), Homogeneous complete smooth; (B) Homogeneous complete granulated ; (C) Heterogeneous peripheral and central granulated and, (D) Heterogeneous central granulated. In immature oocytes were found two patterns of mitochondrial distribution patterns A (72,1%) and B (27,9%); in those matured *in vitro* for 72 h the described four patterns were observed, B (63,8%), followed by C (20,5%), A (9,8%), and D (5,9%). At 96 h of culture, it was observed the pattern B (63,6%), C (35,7%), and D (0,7%). In *in vivo* matured oocytes only the pattern B was observed in all of them.

These results would indicate that in immature canine oocytes predominate uniform mitochondrial distributions in the ooplasm. In addition the three patterns observed only in the *in vitro* matured oocytes might indicate that during the *in vitro* maturation movements of the mitochondria take place in the cytoplasm. Also, the mitochondrial distribution changed across the *in vitro* maturation to resemble those *in vivo* matured; however, there were differences between both types of maturation what might be associated with the culture conditions.

INTRODUCCIÓN

La implementación y desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida en caninos domésticos, tiene importantes aplicaciones también en caninos no-domésticos, en orden de poder aumentar el potencial reproductivo de aquéllos que se encuentren en amenaza o en peligro de extinción. La producción *in vitro* de embriones mamíferos tiene una gran gama de aplicaciones, desde la producción de animales clonados hasta tratamientos de infertilidad por medio de biotecnologías reproductivas asistidas (Prather *et al.*, 2003). Sin embargo, en caninos, el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas como son la fecundación *in vitro* (FIV), producción y transferencia embrionaria *in vitro*, ha sido inferior en comparación a lo logrado en otras especies, básicamente debido a la baja eficiencia en la maduración *in vitro* de los ovocitos (Luvoni, 2000; Luvoni *et al.*, 2005).

La menor eficiencia de maduración *in vitro* de los ovocitos caninos, se ha atribuido a características especiales de estos gametos, como el ser ovulados en estado de ovocitos primarios o en vesícula germinal (GV) a diferencia de las otras especies de mamíferos, y completar la maduración en el oviducto bajo la influencia de niveles crecientes de progesterona (Rota y Cabianca, 2004; Songsasen y Wildt, 2007).

In vivo, la maduración meiótica del ovocito de perra ocurre entre 48 a 72 horas después de ser ovulados, para alcanzar el estado de metafase de la segunda división meiótica (MII) (Tsutsui, 1989; Reynaud *et al.*, 2005; Songsasen y Wildt, 2007). El prolongado tiempo de maduración de los ovocitos caninos, sumado a la influencia de dos ambientes diferentes involucrados en este evento (folicular y oviductual), ha hecho más difícil lograr imitarlo adecuadamente *in vitro*. Por esto, los sistemas de cultivo desarrollados para la maduración *in vitro* de ovocitos en otras especies no han sido adecuados para los ovocitos de perra (Songsasen y Wildt, 2007).

La adecuada maduración del ovocito involucra tanto al núcleo como al citoplasma y las envolturas ovocitarias. Este proceso se adquiere de forma progresiva durante el desarrollo (Luvoni *et al.*, 2005). A nivel nuclear se considera principalmente el reinicio meiótico y a nivel citoplasmático la redistribución y desarrollo de organelos. Entre estos últimos, la organización y la actividad metabólica de las mitocondrias son características necesarias para la maduración citoplasmática y reinicio de la meiosis influyendo significativamente en el desarrollo pos fecundación (Krisher, 2004). Se ha descrito un aumento de las

mitocondrias a lo largo del periodo de crecimiento ovocitario, que se ve reflejado como un aumento en la actividad metabólica del ovocito (Songsasen y Wildt, 2007).

En ovocitos de algunas especies de mamíferos, como cerdos (Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Brevini *et al.*, 2005; Sturmey *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007), equinos (Aguilar *et al.*, 2002), ratones (Nishi *et al.*, 2003), bovinos (Stojkovic *et al.*, 2001; de Paz *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006), humanos (Van Blerkom *et al.*, 2000; Wilding *et al.*, 2001), y ovinos (Cran *et al.*, 1980), se ha determinado que la maduración de los ovocitos se encuentra asociada a cambios en la distribución de las mitocondrias activas. Las condiciones de maduración *in vitro* pueden causar movimientos incompletos de las mitocondrias al interior (centro) del citoplasma, pudiendo afectar la maduración citoplasmática (Sun *et al.*, 2001). Según lo anterior, existirían en ovocitos de cerda diferencias en la distribución mitocondrial en aquellos ovocitos inmaduros, madurados *in vivo* e *in vitro* (Sun *et al.*, 2001). Debido a que la función mitocondrial es un componente esencial en definir la competencia funcional del ovocito (Cummins, 2004), y en lograr por tanto, una adecuada reproducción (Tarazona *et al.*, 2006), el tipo y tiempo de maduración podría afectar el desarrollo posterior del ovocito previo y posterior a la fecundación.

La maduración *in vitro* en ovocitos de perra se ha evaluado mayormente a nivel nuclear (reinicio meiótico) (Mahi y Yanagimachi, 1976; Yamada *et al.*, 1992; 1993; Hewitt y England, 1998; Rota y Cabianca, 2004; De los Reyes *et al.* 2005). Con excepción de un trabajo que evaluó la migración de los gránulos corticales durante la maduración en cultivo (De los Reyes *et al.*, 2007) y estudios ultraestructurales (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a,b), no hay mayores antecedentes respecto al desarrollo citoplasmático *in vitro* en esta especie, lo que cobra importancia en la adecuada implementación de los sistemas de biotecnologías reproductivas en caninos.

En el presente estudio se evaluó la distribución mitocondrial en ovocitos de perras en estado inmaduro, madurados *in vivo* e *in vitro* durante dos tiempos de cultivo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La fisiología reproductiva de las hembras cánidas difiere de la del resto de las especies en muchos aspectos: son monoestricas no estacionales y por ende la ovulación ocurre con un intervalo de 5 a 12 meses (Concannon *et al.*, 1989). Los ovocitos necesitan de un ambiente folicular y de otro oviductual para lograr desarrollarse de forma adecuada y ser fecundados (Holst y Phemister, 1971). Asimismo, el ambiente endocrino en la ovulación de la perra difiere significativamente de lo observado en el resto de las especies estudiadas. En la perra la ovulación ocurre 48 h (36 a 50 h) después del peak de la hormona luteinizante (LH), coincidente con niveles crecientes de progesterona, a diferencia de lo que ocurre en otras especies (Concannon *et al.*, 1989; England y Yeager, 1993; de Gier *et al.*, 2006). Este hecho se asocia a la luteinización preovulatoria de los folículos provocando el incremento en las concentraciones de progesterona en la sangre pocos días antes de la ovulación (Luvoni *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2005), siendo una característica típica de los cánidos (Luvoni *et al.*, 2005). Los patrones inusuales respecto de la progresión meiótica de los ovocitos, se deben básicamente a que los ovocitos son liberados en etapa inmadura de vesícula germinal (VG) y el reinicio meiótico ocurre después de 48 a 72 h en el oviducto, tiempo superior a 12 - 36 h que suele ser necesario por otras especies mamíferas (Yamada *et al.*, 1993; Rota y Cabianca., 2004; Reynaud *et al.*, 2005; Songsasen y Wildt., 2007). Los ovocitos caninos por tanto, deben completar la maduración citoplasmática y nuclear dentro del oviducto bajo la influencia del aumento de progesterona circulante (Luvoni *et al.*, 2005; Rota y Cabianca, 2004; Songsasen y Wildt., 2007).

La maduración oviductual y una sobrevida prolongada en el oviducto son características propias del ovocito canino. Este tiempo en el oviducto fluctúa entre 8 y 10 días, lo que difiere de lo observado en otras especies mamíferas, este tiempo en los caninos es necesario para que el ovocito logre completar la maduración, y ser capaz de ser fecundado, e iniciar el desarrollo embrionario temprano (Holst y Phemister, 1971; Hyttel *et al.*, 1990). La iniciación de la maduración nuclear de los ovocitos es influenciada por el peak de LH, el que induce cambios en las comunicaciones entre células, modifica la composición intracelular de iones e inicia una cascada de señales para la célula (Motlík *et al.*, 1998). Sin embargo, el factor que gatilla el reinicio de la meiosis después de la ovulación en los caninos aún es desconocido y muy poca información se encuentra

disponible respecto de los mecanismos celulares existentes, y aunque la ovulación es inusual al resto de las especies mamíferas existe evidencia experimental que parece probar que la maduración de los ovocitos en las perras parece seguir la misma ruta bioquímica que en las otras especies mamíferas que se han estudiado (Saint-Dizier *et al.*, 2004).

La comunicación entre el ovocito y las células del cumulo también difiere al de el resto de las especies ya que las células del cúmulo se mantienen fuertemente unidas al ovocito durante varios días después del peak de LH y ovulación (Reynaud *et al.*, 2006), lo que se ha asociado al retardo en el reinicio meiótico. En el resto de las especies, el alza de LH gatilla una ruptura en las comunicaciones entre las células del cúmulo y el ovocito, y consecuentemente el reinicio meiótico (Luvoni *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Incluso la mucificación o expansión de las células del cúmulo *in vitro* de los ovocitos caninos es más difícil que en el resto de las especies (Reynaud *et al.*, 2004).

Las tasas de maduración *in vitro* en ovocitos caninos, evaluados a nivel nuclear, son bajas cuando se comparan con los de otros mamíferos; lo que se debe probablemente a las diferencias reproductivas de los canidos (Reynaud *et al.*, 2006), como también a la falta de información sobre los mecanismos regulatorios *in vivo* durante la maduración en esta especie (Luvoni *et al.*, 2005). Esto hace necesario estudiar en profundidad los cambios asociados al proceso de maduración para desarrollar un sistema de cultivo *in vitro* efectivo para aplicar otras biotecnologías reproductivas en esta especie (Luvoni *et al.*, 2005).

Desde el primer estudio realizado en maduración *in vitro* (IVM) y fecundación (IVF) en ovocitos de perra donde aproximadamente un 25% de los ovocitos cultivados logró llegar a la primera (MI) y/o segunda metafase (MII) (Mahi e Yanagimachi, 1976), se ha logrado escaso progreso, con rangos de 0 a 40% de ovocitos que completarían la maduración nuclear *in vitro* (Yamada *et al.*, 1992; 1993; Hewitt y England, 1998; Otoi *et al.*, 1999; 2000; 2001; Luvoni *et al.*, 2001; 2003; Kim *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2005). Algunos estudios han permitido mejorar los sistemas de cultivos tratando de imitar las condiciones *in vivo*, lo que ha permitido mayores porcentajes (De los Reyes *et al.*, 2005).

Maduración ovocitaria

La calidad del ovocito tiene impacto en el desarrollo embrionario temprano y desarrollo fetal, mantención de la preñez, e incluso en enfermedades durante la adultez (Reynier *et al.*, 2001, Krisher, 2004). La calidad o la competencia ovocitaria, se adquiere desde la foliculogénesis durante el periodo de maduración del ovocito. Las tecnologías reproductivas, con el manejo de gametos *in vitro*, no logran reproducir este proceso fielmente y resultan por tanto en ovocitos con competencia de desarrollo reducida (Combelles y Albertini, 2001; Krisher, 2004).

Si bien la maduración del ovocito debe considerarse como un todo, los procesos de maduración a nivel citoplasmático son relativamente independientes de la maduración del núcleo y se le denomina genéricamente “maduración citoplasmática” (Krisher, 2004). Aunque la meiosis, o la maduración nuclear pueden completarse, los cambios en la organización del citoplasma en el ovocito deben también llevarse a cabo con precisión para asegurar fecundación y desarrollo embrionario (Combelles y Albertini, 2001; Krisher, 2004).

La maduración citoplasmática implica la expresión de la organización adecuada de los factores que son esenciales para la activación del ovocito, desarrollo pronuclear, especificación del eje para futuras divisiones mitóticas y de herencia materna (Eppig *et al.*, 1994). Un ovocito que no ha completado la maduración citoplasmática es de mala calidad y por ende no logrará desarrollar el proceso completo (Krisher, 2004). Por su parte, la maduración nuclear usualmente se refiere al proceso que involucra el desarrollo meiótico con la segregación de los cromosomas durante la meiosis (Albertini *et al.*, 1993).

La maduración nuclear del ovocito tendría un rol central en la calidad ovocitaria; sin embargo, aunque el reinicio meiótico pudiese producirse de forma espontánea en cultivo, no se lograría la competencia necesaria para el desarrollo embrionario (Duranthon y Renard, 2001). Esto ocurre porque en los ovocitos, la progresión meiótica va acompañada de cambios tanto en el citoplasma como en las envolturas ovocitarias, los que son necesarios para completar la maduración citoplasmática y nuclear, evento que involucra mayores cambios en el citoplasma que en el núcleo (Brevini *et al.*, 2007).

Cambios ultraestructurales citoplasmáticos.

Los cambios estructurales en el citoplasma toman lugar durante la maduración; por ende, la remodelación citoplasmática es uno de los factores claves para completar y coordinar una correcta maduración (Brevini *et al.*, 2007). Se han descrito cambios en la ultraestructura del ovocito durante la maduración. Por ejemplo, estudios de ovocitos caninos durante el desarrollo *in vivo*, han descrito estos cambios por medio de microscopía electrónica en diferentes etapas (Tesoriero, 1981; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a,b), donde el ovocito del folículo primordial contendría un gran núcleo central con nucléolo, rodeado de mitocondrias, retículo endoplasmático liso (REL) y pequeños cuerpos de Golgi. En esta etapa temprana de desarrollo, la interconexión entre el ovocito y las células del folículo se encuentra incompleta. Se comienza a formar la zona pelúcida del ovocito del folículo primario volviéndose más evidente con el crecimiento celular (Tesoriero, 1981). En el caso del citoplasma del ovocito del folículo primario, existen matrices granulares con hilos o láminas de REL, los cuerpos de Golgi aumentan en número al igual que las mitocondrias y las gotas lipídicas aparecen primero en el ovocito primario del folículo en crecimiento y aumentarían a medida que el proceso avanza (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a).

En los caninos, antes del peak de LH, los complejos cúmulo-ovocitos (COC), contienen pocos organelos, principalmente REL y mitocondrias (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Entre el peak de LH y la ovulación, el ovocito del folículo antral contiene ya abundantes mitocondrias, las que aumentan en gran número formando grupos entre ellas. Paralelamente, hay un incremento en el número de gotas lipídicas dándole una apariencia oscura al citoplasma, lo que lo hace distinto al resto de los ovocitos de otros mamíferos (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Los gránulos corticales aparecen en la región cortical durante esta etapa. (Tesoriero, 1981; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Además, en estudios *in vitro*, se ha visto que a medida que avanza el proceso de maduración los gránulos corticales migran hacia la periferia mostrando un patrón similar a lo descrito en otras especies (De los Reyes *et al.*, 2007). Por medio de estudios con microscopía electrónica de transmisión durante el desarrollo ovocitario *in vivo*, se describe que el aparato de Golgi también aumenta en número, el retículo endoplasmático rugoso (RER) se encuentra en baja cantidad, a diferencia de REL que se encuentra en abundancia frecuentemente rodeados de gotas lipídicas y/o de pequeños grupos de mitocondrias, los

que también se pueden encontrar cercanos a la envoltura nuclear. Los gránulos corticales se encuentran en gran número y reunidos en grandes líneas o grupos de mediano tamaño generalmente cerca del aparato de Golgi (Viaris de Leseño *et al.*, 2008a). Los estudios de microscopía electrónica de transmisión muestran que en los primeros tres días post ovulación la mayoría de los grupos mitocondriales se unen para formar grandes hileras. Desde las 24 h post ovulación las mitocondrias aumentan aún más en número y se distribuyen de forma homogénea, no se visualizan en grupo. Los aparatos de Golgi disminuyen tanto en número como en tamaño en esta época y el REL se encuentra en mayor cantidad que en las etapas anteriores; además los gránulos corticales se hacen más numerosos (Viaris de Leseño *et al.*, 2008a). El citoplasma de los ovocitos después del reinicio meiótico se compone esencialmente de mitocondrias y REL de forma homogénea. Las estructuras concéntricas de REL no se observan (Viaris de Leseño *et al.*, 2008a). Por ende, en el caso específico de las mitocondrias, estas empiezan a aumentar en número reflejando un aumento en la actividad metabólica.

Usando la ultraestructura como un indicador de la maduración citoplasmática, se ha visto que la madurez citoplasmática se encuentra correlacionada con la localización del núcleo (Viaris de Leseño *et al.*, 2008b). En ovocitos derivados de ovarios de perras en etapa de anestro se pueden encontrar ovocitos con un perfil citoplasmático menos maduro que en aquellos provenientes de folículos antrales previos al peak de LH. También se observan en algunos ovocitos provenientes de perras en anestro, una organización citoplasmática similar a aquellos ovocitos post ovulación (Viaris de Leseño *et al.*, 2008b). La presencia de ovocitos con signos de maduración citoplasmática podría ser una consecuencia de la exposición a las gonadotropinas durante la segunda parte del anestro (Okkens y Kooistra, 2006), pudiendo estos ovocitos terminar en atresia (Viaris de Leseño *et al.*, 2008b).

Redistribución mitocondrial y red microtubular.

La compartimentalización del citoplasma cumple un rol importante en la coordinación de la maduración citoplasmática y nuclear (Combelles y Albertini., 2001). Las mitocondrias sufren un proceso de reubicación o de redistribución durante en proceso de maduración (Brevini *et al.*, 2007; Songsasen y Wildt., 2007). El cambio en la posición de éstas indicaría un requerimiento de adenosin trifosfato (ATP) y/o de iones, como el calcio, para los eventos claves durante la maduración, fecundación y desarrollo temprano embrionario (Van Blerkom, 1991). La actividad y organización de las mitocondrias son características

necesarias entre los diversos eventos involucrados en la maduración (Van Blerkom y Runner, 1984). De esta forma, se ha descrito que una maduración citoplasmática inadecuada durante la maduración *in vitro* llevaría a un desarrollo embrionario deficiente (Sun *et al.*, 2001). *In vitro*, los patrones de distribución mitocondrial han sido estudiadas en ratones (Van Blerkom y Runner 1984; Nishi *et al.*, 2003), bovinos (de Paz *et al.*, 2001; Stojkovic *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006), equinos (Aguilar *et al.*, 2002) humanos (Van Blerkom *et al.*, 2000; Wilding *et al.*, 2001), ovinos (Cran *et al.*, 1980) y porcinos (Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Brevini *et al.*, 2005; Sturmey *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007) y la asociación entre los patrones mitocondriales y la etapa del ciclo estral en ovocitos de perra está siendo estudiada sólo recientemente (Iorga *et al.*, 2008)

La distribución de las mitocondrias a través del proceso de maduración ovocitaria representa un evento fundamental, su reubicación sería mediada por redes del citoesqueleto, fenómeno que se ha descrito en ratones (Van Blerkom, 1991) y en porcinos (Sun *et al.*, 2001). Por esto la reubicación mitocondrial en el citoplasma dependerá de la funcionalidad de los microtúbulos del citoesqueleto.

Los microtúbulos están involucrados en diversas funciones como: determinar la forma y movimiento celular, transportar moléculas y organelos, meiosis y mitosis celular (Brevini *et al.*, 2005). Las mitocondrias son transportadas por complejos de proteínas motoras que transportan a los organelos a diferentes áreas de la célula (Van Blerkom, 1991). Tanto las mitocondrias, como otros organelos, complejos proteicos y RNAm son transportados a lugares específicos por medio de los microtúbulos, que al afectar los patrones de distribución mitocondrial influirían en la producción de energía dentro de la célula, evento esencial para la apropiada función del ovocito (Brevini *et al.*, 2007). Los cambios en la distribución mitocondrial pueden ser utilizados como indicadores de la capacidad que tendría el ovocito para sustentar un posible desarrollo embrionario (Bavister y Squirrel, 2000). En cerdas, se ha descrito tanto *in vivo* (Sun *et al.*, 2001) como *in vitro* (Torner *et al.*, 2004), que las mitocondrias migran durante la maduración desde la periferia a la región interna del ovocito. Aunque no está definida la correlación entre este fenómeno y el subsecuente desarrollo embrionario, se ha indicado en cerdas que la reubicación mitocondrial es significativamente más frecuente en aquellos ovocitos más competentes (siendo de mayor nivel) que en aquellos de bajo nivel, donde no hubo reubicación o fue muy leve luego de la maduración *in vitro*. Esto sugeriría entonces que la inmadurez del

citoplasma es un factor que lleva a la baja redistribución mitocondrial y que además, se relacionaría con una baja capacidad de desarrollo posterior (Brevini *et al.*, 2005).

Si bien se tiene definido el rol de los microtúbulos en formar el huso meiótico, la dinámica de la asociación citoplasma-microtúbulos en ovocitos aún no está clara (Brevini *et al.*, 2005), ya que la evidencia experimental es contradictoria, donde algunos estudios no han logrado identificar una red microtubular en el citoplasma ovocitario (Kim, 1996). La inadecuada reubicación mitocondrial durante el proceso de maduración de un ovocito defectuoso (de baja competencia) podría deberse a la falta de formación de una apropiada red de microtúbulos o por una falta de acoplamiento entre las mitocondrias y los microtúbulos (Rozinek *et al.*, 1995). Asimismo, la inapropiada distribución de las mitocondrias activas al interior del citoplasma estaría relacionado con la ausencia de una adecuada formación de la red de citoesqueleto (Brevini *et al.*, 2005). También se sugiere que la falla en la reubicación que se observa en ovocitos defectuosos, se deba posiblemente a la incapacidad de formar la red microtubular más que a una alteración misma en la migración por los túbulos (Brevini *et al.*, 2005).

En ovocitos de cerda la reorganización correcta de la malla de microtúbulos en el citoplasma, lleva a una adecuada distribución de energía y a una localización específica del RNAm, factores cruciales en la modulación de la competencia meiótica (Brevini *et al.*, 2007). La falla en la red microtubular citoplasmática puede llevar además, a una incorrecta reubicación de las mitocondrias, lo que se vería reflejado como una compartimentalización alterada del citoplasma (Brevini *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha intentado relacionar la distribución mitocondrial con el contenido de ATP y no se ha logrado definir si la falla en la reubicación mitocondrial tendría un efecto directo sobre el contenido de ATP, ya que en ovocitos de cerda no se ha logrado relacionar la reubicación de las mitocondrias con diferencias en el contenido total de ATP (Brevini *et al.*, 2005).

Las mitocondrias también estarían involucradas en las señales del calcio durante la activación del ovocito (Duchen, 2000; Liu *et al.*, 2001). Se ha observado la presencia de receptores para β -estrógenos en las mitocondrias, sugiriendo de esta forma que debiera ser necesaria una distribución específica de este organelo para una correcta respuesta del ovocito al 17β -estradiol, hormona que se encuentra en altos niveles en el folículo preovulatorio (Yang *et al.*, 2004).

Distribución anormal mitocondrial.

Una disfunción en la distribución mitocondrial puede causar infertilidad, ya que una maduración citoplasmática defectuosa en los ovocitos puede alterar el proceso de fecundación (Reynier *et al.*, 2001). Estudios en ratones y humanos han descrito que también se vería afectada la relación entre el potencial de membrana de las mitocondrias y el desarrollo embrionario (Wilding *et al.*, 2001, Van Blerkom *et al.*, 2002). La distribución asimétrica de las mitocondrias en el estado pronuclear se ha asociado en humanos, con una segregación desproporcional de las mitocondrias entre las blastómeras y la subsecuente división celular; además, habría consecuencias negativas en el desarrollo que incluiría detención de la división celular y probablemente muerte celular por una baja producción de ATP (Van Blerkom *et al.*, 2000).

La distribución anormal de las mitocondrias en ovocitos en estado de segunda metafase (MII) es una de las causas de retardo en el desarrollo en ratones (Nagai *et al.*, 2006). Durante la maduración ovocitaria, la distribución y producción de ATP de las mitocondrias son procesos importantes para la activación, fecundación y desarrollo embrionario, y son necesarios para la embriogénesis normal, donde la demanda de energía es alta (Nagai *et al.*, 2006). Una falta de conglomerados mitocondriales y/o fragmentación de éstas, probablemente lleve a una inactivación ovocitaria, debido a que las mitocondrias no podrían aportar suficiente energía al núcleo y otros organelos. Por esta razón, un patrón de distribución anormal podría resultar en una reducción de la competencia en el desarrollo (Nagai *et al.*, 2006). Por ende, la distribución de las mitocondrias en ovocitos es importante en la predicción del desarrollo embrionario y competencia durante la incubación en cultivo.

La distribución y localización de las mitocondrias en las diferentes especies no es igual, por lo que comparar la función y localización mitocondrial se hace difícil (Torner *et al.*, 2004). Sin embargo, la selección de ovocitos con desarrollo meiótico hasta MII con una distribución mitocondrial adecuada podría prevenir los resultados bajos en las biotecnologías reproductivas (Nagai *et al.*, 2006), especialmente en los caninos donde la maduración en cultivo es aún más deficiente.

Rol de las mitocondrias en la maduración del ovocito.

Las mitocondrias fueron descritas en 1890 como “bioblastos: estructura citoplasmática de ocurrencia ubicua, similar a una bacteria y con un funcionamiento elemental” (Ernster y Schatz, 1981). Tiempo después esta idea fue confirmada con el descubrimiento que las mitocondrias tenían su propio DNA (Ernster y Schatz., 1981). Además contienen las enzimas para el ciclo de Krebs, oxidación de ácidos grasos y fosforilación oxidativa, siendo entonces el mayor sitio de producción de ATP en las células eucariontes (Ernster y Schatz, 1981). Además de este rol, cumplen una función regulatoria en el desarrollo temprano, que es diferente a su contribución metabólica y sólo recientemente se han considerado otras funciones, como la capacidad de secuestrar y liberar calcio (Ca^{2+}), modificar proteínas o iniciar la apoptosis (Duchen, 2000; Van Blerkom, 2004).

En los ovocitos, se pueden encontrar dos poblaciones de mitocondrias: una población se encuentra en una estructura especializada denominada “cuerpo Balbiani” (germ plasm) las que se segregan a la línea germinativa, el resto de la población mitocondrial está dispersa en el ovoplasma y se transmite a la línea somática. No obstante, aún no está claro si las funciones de ambas poblaciones mitocondriales son diferentes (Kloc *et al.*, 2004).

Generación de ATP.

El número de mitocondrias por célula dependerá del tipo celular y se relaciona directamente con el requerimiento de energía. De esta forma las mitocondrias son los principales generadores de energía en forma de ATP dentro del citoplasma, la que es necesaria para el movimiento y mantención de la homeostasis celular y así regular la sobrevivencia de ésta (Van Blerkom y Runner, 1984; St John, 2002). En las células eucariontes las mitocondrias son los organelos que catalizan la formación de ATP a través del metabolismo de carbohidratos y grasas contenidos dentro del citoplasma del ovocito y en el medio externo (Wilding *et al.*, 2001). La tasa de respiración celular depende de la eficiencia de conversión de precursores metabólicos como glucosa a piruvato en el citoplasma del ovocito. Y también de la eficiencia de la matriz mitocondrial en la conversión de piruvato a ATP (Bavister, 1995; Gardner, 1998). Por tanto, las mitocondrias jugarían un rol en proveer de energía al ovocito para la maduración, fecundación y el desarrollo embrionario pre-implantacional (Torner *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2006).

Los ovocitos madurados *in vitro* generalmente tienen un metabolismo energético alterado y por ende un potencial de desarrollo reducido (Gardner *et al.*, 2000). Esto puede ser reflejo de una deficiencia en el medio de maduración, características propias del ovocito, o ambas. Sin embargo, a no ser que el ovocito sea capaz de controlar correctamente su metabolismo, mostrará una viabilidad reducida (Gardner *et al.*, 2000). La regulación del metabolismo es controlada en varios niveles, incluyendo el substrato disponible en el ambiente, sistemas de transporte de membrana, y actividad enzimática y de regulación (Gardner *et al.*, 2000). Los sustratos oxidables para la síntesis de ATP pueden encontrarse disponibles de forma exógena y endógena, ésta última como glicógeno o lípidos en forma de triglicéridos (TG); los ovocitos contienen una cantidad considerable de almacenaje energético endógeno (Sturmey *et al.*, 2006), el que es evidente en los ovocitos de la perra, ya que contienen una alta cantidad de lípidos, confiriéndole una apariencia oscura y homogénea (Guraya *et al.*, 1965; Tesoriero, 1982). La síntesis de lípidos tiene lugar durante el crecimiento folicular y marca una de las etapas tempranas de maduración del ovocito (Tesoriero, 1981). Durante el periodo pre-ovulatorio las mitocondrias son los organelos más prominentes en el citoplasma y junto al REL forman conglomerados (m-REL) los que podrían encontrarse involucrados en la producción de un reservorio energético para la fecundación (Torner *et al.*, 2004). Los TG son metabolizados por β -oxidación y ciclo de Krebs dentro de la matriz mitocondrial. Para que esto pueda realizarse las mitocondrias deben encontrarse en estrecha asociación junto a las gotas lipídicas, formando de esta forma unidades metabólicas (Sun *et al.*, 2001).

Los cambios en la actividad metabólica de las mitocondrias alteran la maduración citoplasmática, meiosis y el desarrollo embrionario post fecundación en diversas especies (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001). De esta forma, el rol del ATP en la adquisición de la competencia meiótica se ha analizado en variadas especies, sin embargo, aún no se ha definido en su totalidad (St John, 2002). Así, se ha descrito que una eficiencia reducida en la respiración mitocondrial estaría relacionada con un efecto negativo en el posterior desarrollo embrionario, esto porque el contenido de ATP funcionaría como un indicador de la viabilidad celular en general y en particular de la pre-implantación de embriones mamíferos (Van Blerkom *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Wilding *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2006; Brevini, *et al.*, 2007; Van Blerkom *et al.*, 2003). De esta manera, tasas altas de desarrollo embrionario se han asociado a altas concentraciones de ATP en ovocitos de bovinos y ratones (Stojkovic *et*

al., 2001). La reorganización mitocondrial y los niveles de ATP variarían según la calidad morfológica del ovocito como también se han observado correlaciones significativas entre el contenido de ATP y el número celular total de la blástula (Stojkovic *et al.*, 2001).

En ovocitos de cerdas se ha descrito que la reorganización mitocondrial afecta fuertemente los patrones de distribución y finalmente de producción energética celular (Brevini, *et al.*, 2007). También se ha observado un aumento significativo en el contenido de ATP en estos ovocitos, mientras progresan de estado de vesícula germinal (VG) a MII durante la maduración *in vitro*. (Stojkovic *et al.*, 2001; Brevini *et al.*, 2005; 2007). Se ha reportado un aumento en la actividad oxidativa de las mitocondrias durante la maduración *in vivo* en estos ovocitos (Torner *et al.*, 2004). En las cerdas la progresión meiótica involucra cambios en el contenido de ATP, pero el desarrollo de la competencia ovocitaria parece no estar directamente relacionado con las cantidades disponibles de ATP en la célula (Brevini, *et al.*, 2007). Incluso no se han encontrado diferencias entre el contenido de ATP entre ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro* en cerdas (Brad *et al.*, 2003), como tampoco en las diferentes condiciones de maduración (Brevini *et al.*, 2007). Por lo tanto, la correcta reubicación mitocondrial parece ser un punto crítico e importante. Se sugiere que esto se relaciona con la necesidad de una apropiada distribución de la energía dentro del ovoplasma (Brevini, *et al.*, 2007). Aunque no hay una explicación clara para que exista esta diversidad entre las especies referente al contenido de ATP durante la maduración ovocitaria *in vitro*, no hay duda que los ovocitos de cerdas difieren de otros por la gran cantidad de lípidos endógenos que contienen; por ende no se puede descartar que ésta característica pueda hacer que estos ovocitos realicen otras rutas metabólicas (Brevini *et al.*, 2007). De la misma forma, los ovocitos de perra también contienen grandes cantidades de lípidos endógenos (Tesoriero, 1981) por lo que también estos ovocitos podrían comportarse de forma similar a los ovocitos de cerda.

Apoptosis y actividad mitocondrial.

La apoptosis se define como el proceso de muerte celular programada, ya sea como parte normal de la diferenciación de un tejido o como la eliminación de células defectuosas (Cummins, 2001). Las mitocondrias contienen una gran cantidad de moléculas pro-apoptóticas que activan proteínas citosólicas que activan la apoptosis (Yuan *et al.*, 2005). Los cambios mitocondriales podrían relacionarse con diferentes grados de apoptosis, la

que involucra una activación mitocondrial en la que se libera el citocromo c, que activará a la caspasa-9 para iniciar la cascada de la apoptosis (Cummins, 2001).

Se ha descrito en algunas especies mamíferas como en cerdos que durante la etapa final de maduración pre-ovulatoria la activación mitocondrial en los ovocitos y la apoptosis en las células del cumulo serían eventos dominantes (Torner *et al.*, 2004). Las células del cumulo juegan un rol crítico en la maduración del ovocito y en la fecundación al liberar y mediar las señales hacia el ovocito (Phillips y Dekel 1991; Tanghe *et al.*, 2002), y en los caninos, como en otros mamíferos, las células del cumulo sostendrían la maduración ovocitaria (Yamada *et al.*, 1993; Otoi *et al.*, 2001; 2007). Los ovocitos de perra en el oviducto están rodeados por 2 o 3 capas de las células de la granulosa, y las células de la corona radiata se mantienen unidas durante varios días después de la ovulación (Reynaud *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006). Esto sugiere que la persistencia de la relación entre el ovocito y las células de la corona radiata podrían contribuir al retraso que existe entre la ovulación y el reinicio meiótico en la perra, mientras que en el resto de las especies el alza de LH gatilla una ruptura en las comunicaciones entre las células del cúmulo y el ovocito, y consecuentemente el reinicio meiótico, en los caninos esto no sería del todo así (Luvoni *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Incluso la denudación *in vitro* de los ovocitos caninos es mucho más difícil que en el resto de las especies (Reynaud *et al.*, 2004).

En cerdas las tasas de maduración de los COCs disminuyen significativamente cuando estos son cultivados con las células del cumulo al ser comparados con aquellos en que estas células fueron removidas (Isobe *et al.* 1996). En los ovocitos de perra existe una pérdida de las uniones entre el ovocito y las células del cumulo en el oviducto sólo después de 48 a 72 horas de haber sido ovulados (Holst y Phemister, 1971). Por lo tanto esto indicaría que las células del cumulo unidas al ovocito durante la maduración podrían retrasar la progresión meiótica en ovocitos caninos. En relación a esto, Otoi *et al.*, (2007) indicaron que la pérdida de las comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulo podrían promover el término de la maduración meiótica en ovocitos caninos.

Existe evidencia contradictoria respecto a que la apoptosis de las células del cúmulo tenga relación con el potencial de desarrollo del ovocito, e incluso en algunos estudios no se ha descrito la existencia de apoptosis en estas células en ovocitos de bovinos

maduros e inmaduros (Yuan *et al.*, 2005) cuestionando su presencia también en ovocitos de humano y ratón (Van Blerkom y Davis, 1998). Por lo tanto, no estaría clara la ocurrencia de la apoptosis en las células del cúmulo de ovocitos ovulados, y su impacto sobre el desarrollo potencial del ovocito (Tanghe *et al.*, 2002).

En cerdas se ha observado que los ovocitos con células del cúmulo sin expansión se encuentran en su mayoría en estado de vesícula germinal (VG) y aquellos ovocitos con células del cúmulo expandidas se encuentran en un estado más maduro (telofase I y metafase II), indicando que la expansión de las células del cúmulo se relacionaría con la maduración nuclear, y que la expansión precedería a la maduración nuclear (Torner *et al.* 2004). En ovocitos de perra cultivados *in vitro* se ha observado que a medida que se incrementa el tiempo de cultivo aumenta la expansión de las células del cúmulo, al menos hasta las 72 h de cultivo (De los Reyes *et al.*, 2005). Estudios *in vivo* en ovocitos de zorros muestran que la disrupción de las células del cúmulo empezaría entre el segundo y tercer día después del peak de LH (Hyttel *et al.*, 1990), y en caninos, se observó por medio de microscopía electrónica de transmisión de ovocitos *in vivo*, que previo a la ovulación el ovocito está fuertemente unido a las células del cúmulo, pero a los dos días de haber ovulado los signos de comunicación entre éstos han disminuido y al tercer día parecen estar totalmente desconectados de las células del cúmulo. De esta manera, se sugiere que en la perra la expansión de las células de cúmulo *in vivo* no estaría asociada al peak de LH a diferencia del resto de las especies ya que en caninos este proceso comenzaría 3 a 4 días después del peak de LH (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a).

Se ha observado en cerdos que alteraciones en el núcleo del ovocito y en las células del cúmulo, se asociarían con cambios en las distribuciones mitocondriales y que la activación de las mitocondrias en los ovocitos podría ser el punto de inicio de la apoptosis, como una señal de diferenciación en las células del cúmulo (Torner *et al.* 2004). Incluso se ha descrito que niveles mayores de actividad respiratoria en los ovocitos están relacionados con niveles altos de apoptosis en las células del cúmulo, lo que podría ser causado por la estimulación pro-apoptótica de las mitocondrias (Torner *et al.* 2004).

Otros roles: Mitocondrias e iones.

Las mitocondrias regulan la homeostasis del calcio, siendo éste un regulador de numerosas funciones celulares, como: control del ciclo celular, remodelación

citoplasmática (por medio del citoesqueleto), regulación de la respiración mitocondrial, movimientos morfo dinámicos, transducción de diversas señales, y muerte celular, entre otras (Duchen, 2000). En las mitocondrias el calcio tiene varias funciones cruciales como: activador de la fosforilación oxidativa, estimular diversos eventos del ciclo de Krebs y participar en la cadena transportadora de electrones (Duchen, 2000). Por ende, un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} incrementaría la producción de ATP (Duchen, 2000).

El Ca^{2+} es regulado por ondas periódicas (transitorias u oscilantes); estas ondas transitorias pueden afectar la actividad de organelos como las mitocondrias e iniciar una activación dependiente de señales de Ca^{2+} que regulará el desarrollo celular, diferenciación, proliferación, y eventos moleculares relacionados con la vida o la muerte (Berridge *et al.*, 1998). Ya que en las células somáticas las mitocondrias captan y liberan Ca^{2+} durante las ondas transitorias, las mitocondrias activas podrían modular al Ca^{2+} (Duchen, 2000). Las mitocondrias hiper-polarizadas en ovocitos de ratón mantienen los niveles suficientes de producción de ATP o capacidad buffer en el citoplasma, mientras que otras mitocondrias se desplazan a regiones peri-nucleares durante la remodelación espacial en la maduración ovocitaria y en el desarrollo embrionario temprano (Van Blerkom *et al.*, 2002; 2003). Las mitocondrias tienen un potencial electronegativo que provee una fuerza para llevar a cabo el influjo de Ca^{2+} a su matriz (Dumollard *et al.*, 2006). Las despolarizaciones transitorias de las mitocondrias hiper-polarizadas en los ovocitos maduros podrían tener un rol local en la regulación del Ca^{2+} al aumentar la amplitud o tasa de propagación de éste en etapas tempranas de la activación ovocitaria (Berridge *et al.*, 1998; Van Blerkom *et al.*, 2002; 2003). Estas señales de Ca^{2+} y los incrementos transitorios de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular son necesarias para la activación del ovocito y regulación de la maduración meiótica y citoplasmática. Sin embargo, aún no está claro del todo si las ondas de Ca^{2+} transitorias en ovocitos inmaduros realmente influyen la ruptura de la VG (Dumollard *et al.*, 2003; Krisher, 2004). En ovocitos de cerda, un aumento en el Ca^{2+} intracelular gatilla la ruptura de la envoltura nuclear, evento que al parecer descansaría sólo en las fuentes intracelulares de Ca^{2+} , como son el RE y mitocondrias (Kaufman y Homa, 1993). Aunque la ruptura de la VG depende de las reservas internas de Ca^{2+} , el progreso de la meiosis y la formación del primer corpúsculo polar podría requerir Ca^{2+} extracelular, el que debiera ser aportado por el tracto reproductivo (*in vivo*) o por el medio de cultivo (*in vitro*) (Homa, 1995). Bajo condiciones

fisiológicas, las ondas transitorias de Ca^{2+} sirven como mensajeros secundarios en las células de los mamíferos y estimulan la producción de ATP por la mitocondria. Excesos de Ca^{2+} provocan la apertura de poros permeables en las mitocondrias o megaporos, resultando en la liberación de citocromo C y en la activación de caspasas proteolíticas que llevan a la apoptosis (Krieger y Duchon, 2002). Una membrana mitocondrial dañada también disminuye el potencial de acción. Sin el mecanismo funcional que produce energía, el ovocito entraría en necrosis, muerte celular por el consumo y depleción de las reservas de energía (Altura *et al.*, 1982)

La energía en forma de ATP es necesaria para los eventos de maduración nuclear y citoplasmática. Ya que las mitocondrias sintetizan ATP y sirven como una fuente interna de Ca^{2+} , es posible que las mitocondrias se redistribuyan dentro del ovocito para concentrar ATP y Ca^{2+} en los sitios de alta demanda (Ducibella *et al.*, 1977; Li, 1997). Durante la maduración del ovocito la ruptura de la membrana nuclear requiere concentraciones elevadas de ATP. Por ende, determinar la distribución y actividad de las mitocondrias, podría ser clave en el entendimiento del rol de éstas en la maduración de ovocitos (Krisner, 2004).

HIPÓTESIS

Los ovocitos caninos en estado inmaduro presentarán cambios a través del tiempo de maduración en cultivo tanto en la distribución como en la actividad mitocondrial, los que se irán asemejando a aquéllos observados en los ovocitos caninos madurados *in vivo*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar ultraestructuralmente y funcionalmente, a través del tiempo de cultivo, el desarrollo mitocondrial en ovocitos de perras madurados *in vitro*, en relación al de ovocitos madurados *in vivo*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la distribución y actividad mitocondrial en ovocitos de perra inmaduros como durante diferentes tiempos de cultivo *in vitro*.
- Evaluar el estado mitocondrial en relación a la distribución y actividad, en ovocitos ovulados y madurados *in vivo* en el oviducto de la perra.
- Comparar de forma descriptiva la distribución y actividad de las mitocondrias entre ovocitos de perra inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se trabajó con ovocitos de perras, los que fueron obtenidos desde ovarios (ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* por 72 Y 96 h), como también desde oviductos luego de la ovulación (ovocitos madurados *in vivo*).

Tanto los ovarios como los oviductos se obtuvieron de un total aproximado de 50 perras adultas, sanas, de diferentes razas, ovariectomizadas en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de la Pintana.

DetECCIÓN DE OVULACIÓN

Se realizó seguimiento del ciclo reproductivo a las perras desde el momento en que empezó el sangramiento vulvar, indicativo de etapa proestruo, tomando una muestra de sangre sin anticoagulante con jeringa estéril a través de la vena safena, con el fin de medir los niveles de progesterona sérica y determinar así el día de la ovulación. Para esta medición se utilizó el kit diagnóstico semi-cuantitativo Ovulación® (BVT, Francia) programándose la ovariectomía para tres días después de la fecha de ovulación.

TRANSPORTE DE OVARIOS Y OVIDUCTOS

Los ovarios y oviductos se transportaron al laboratorio en solución salina (0,9% NaCl) suplementada con 100 UI/mL de penicilina y 50 µl/mL de estreptomicina (Sigma) a 37°C.

OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Los complejos ovocitos-células del cúmulo (COCs) fueron liberados del parénquima ovárico a través de cortes finos de los ovarios con una hoja de bisturí y tijeras, en medio PBS (buffer fosfato salino). Los ovocitos fueron seleccionados bajo la lupa estereoscópica, donde aquellos con citoplasma homogéneo y oscuro, rodeados completamente por al menos tres capas de células del cúmulo se destinaron a maduración *in vitro*.

Ovocitos inmaduros

Se realizaron cuatro réplicas experimentales, para evaluar 215 ovocitos totales que fueron obtenidos desde los ovarios, y utilizados como ovocitos inmaduros. Inmediatamente después de la selección, éstos se depositaron en cápsulas de cultivo con medio PBS (0,1% BSA), donde fueron lavados 2 veces, previo a la fijación y tinción.

Ovocitos madurados *in vitro*

Se realizaron para cada tiempo de cultivo cuatro réplicas experimentales, para evaluar de diferentes ovarios 254 y 297 COCs totales de acuerdo a las características señaladas respectivamente para cada tiempo de maduración *in vitro*: 72 y 96 horas. Los COCs seleccionados fueron llevados a la sala de cultivo bajo cámara de flujo laminar, y lavados dos veces en PBS suplementado con 2,5 µl/mL de solución piruvato (11,2 mg/mL de ácido pirúvico), 5 µl/ml de solución antibiótica (12,2 mg/mL de penicilina y 20 mg/mL de estreptomina, Sigma), y 3 mg/ml de albúmina sérica bovina, fracción V (Sigma). Posteriormente se realizó un tercer lavado en medio de maduración TCM 199 (Earle's salt, tamponada con 25mM HEPES; Invitrogen, Grand Island NY, USA), suplementado de acuerdo a lo descrito por De Los Reyes *et al.*, (2005). Posteriormente los COC'S fueron depositados aleatoriamente en gotas de 100 µl de medio de cultivo TCM 199 suplementado, de acuerdo a lo descrito anteriormente, en cantidad de 10 a 15 ovocitos por gota, bajo aceite mineral estéril (Sigma) para evitar la deshidratación de la muestra en la estufa de cultivo (Forma Scientific), a 38.5°C, 5% de CO₂ y máxima humedad (98%) por 72 y 96 horas.

Ovocitos madurados *in vivo*

En el laboratorio, para la obtención de los ovocitos del oviducto, se canuló el lumen del oviducto de aquellos ovarios recolectados de perras en estro (según el resultado del kit diagnóstico), usando una aguja de 25 G realizando un lavado con 15 ml de PBS suplementado a 37°C. Los ovocitos fueron recolectados en cápsulas de cultivo con PBS suplementado y fueron lavados 2 veces en el mismo medio, previo a su fijación y tinción. Se realizaron aproximadamente tres a cuatro réplicas experimentales para utilizar un total de 15 ovocitos.

EVALUACIÓN MITOCONDRIAL.

Los ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo* fueron procesados de forma separada para evaluar la distribución y actividad mitocondrial.

De acuerdo a un protocolo modificado en base a lo descrito por Torner *et al.*, (2004), en ovocitos de cerda, las células del cúmulo se removieron de los ovocitos mediante pipeteo suave y tratados con una solución de citrato de sodio al 3%; luego fueron lavados 2 veces en PBS a 37°C e incubados por 30 minutos en una solución de PBS con 3% de BSA y 180 nM de sonda MitoTracker Red CMXRos® (Marcador Mitocondrial, Molecular Probes), a 38°C en oscuridad. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados 3 veces en PBS, para eliminar el excedente del marcador. Luego los ovocitos fueron fijados por 15 minutos en una preparación fresca de paraformaldehído al 2% en una solución salina balanceada de Hank (HBSS) (1,26mM CaCl₂; 5,36mM KCl; 0,44mM KH₂PO₄; 0,49mM MgCl₂; 0,41mM MgSO₄; 137mM NaCl; 4,17mM NaHCO₃; 0,34mM NaHPO₄; 5,55mM D-glucosa). Después de la fijación fueron lavados 3 veces en PBS para ser incubados por 15 minutos en DAPI (tinción nuclear, Molecular Probes) a una concentración de 300 nM, luego fueron lavados 3 veces en PBS y montados entre porta y cubre objeto 10 a 15 ovocitos (separados por dos hilos de vaselina semi-sólida), dentro de una gota de medio de montaje Vectashield (Vectors Laboratory). Las muestras fueron llevadas a refrigeración hasta su observación. Las observaciones se realizaron en un microscopio Olympus IX71 equipado con epifluorescencia. La excitación de la sonda Mitotracker red se realizó interponiendo un filtro de excitación de 580nm (filtro G2A) y la excitación de la sonda DAPI se realizó interponiendo un filtro de excitación UV.

Se caracterizó el patrón de distribución mitocondrial por medio de observación en el citoplasma ovular, describiéndose estos patrones de distribución de acuerdo a:

- Distribución citoplasmática: homogéneo (a través de todo el citoplasma) o heterogéneo (distribuido de forma desigual),
- Formación de agregados mitocondriales (Torner *et al.*, 2004) como liso (sin gránulos), granuloso,
- Posición citoplasmática como: completo, nuclear, periférico y/o central (Sun *et al.*, 2001).

La actividad mitocondrial se evaluó de acuerdo a la fluorescencia emitida en alta, media y baja. Para objetivizar esta medición se cuantificó la fluorescencia de acuerdo a la intensidad de los pixeles registradas mediante el programa Adobe Photoshop 7.0. Los valores de intensidad de pixeles se consideraron como: Alto 60-90; medio 30-59 y bajo 1-29.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Los patrones de distribución mitocondrial en los distintos estados de maduración de los ovocitos (inmaduros, madurados *in vitro* por 72 h y 96 h, y madurados *in vivo*), fueron analizados y comparados mediante un análisis descriptivo de los resultados obtenidos.

La posible asociación entre la actividad mitocondrial y los distintos estados de maduración de los ovocitos (inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 h, y madurados *in vivo*) fueron evaluados mediante una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para lo cual se utilizó el programa InfoStat/Profesional versión 2004d.1, se utilizó un nivel de significancia de $p \leq 0,01$.

RESULTADOS

Se analizó una cantidad total de 766 ovocitos, a través de 14 réplicas experimentales, con aproximadamente 50 ovocitos por réplica. Del total de estos ovocitos estudiados, 215 fueron utilizados como inmaduros, 254 fueron madurados durante 72 horas y los otros 297 durante 96 horas. Adicionalmente se analizó una cantidad total de 15 ovocitos madurados *in vivo*, provenientes de 4 réplicas experimentales.

Se evaluó la actividad mitocondrial según la fluorescencia emitida en alta, media y baja (Figura 1) para cada uno de los estados de maduración de los ovocitos y se estableció la dependencia de estas características mediante chi-cuadrado; encontrándose dependencia entre las frecuencias de ovocitos con distintas intensidades de fluorescencia (alta, media, baja) al comparar las muestras provenientes de ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 h, y madurados *in vivo* (chi cuadrado = 30,59; $p < 0,01$), (figuras 1 y 2), indicando que la emisión de fluorescencia por los ovocitos se encuentra asociada al tiempo de maduración.

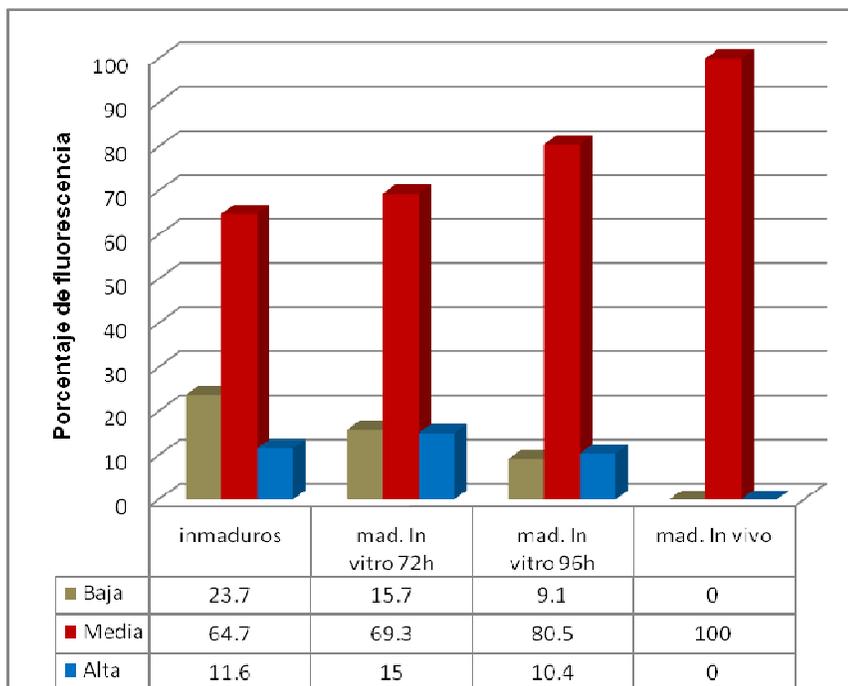


FIGURA 1: Porcentajes de fluorescencia emitida en ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 h, y madurados *in vivo*.

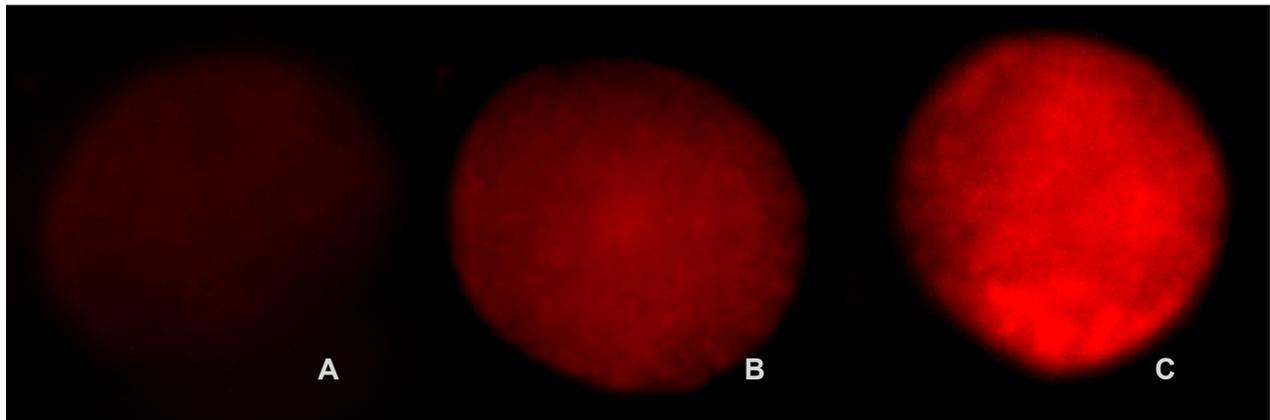


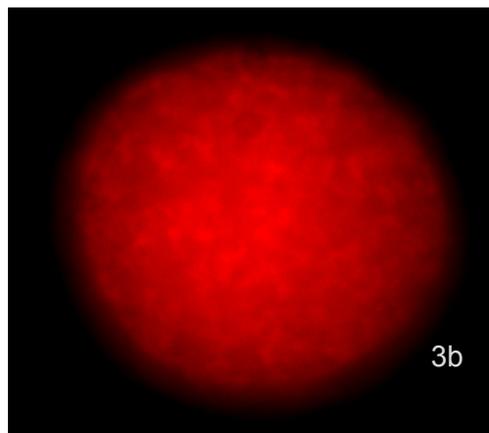
FIGURA 2 (x100); Epifluorescencia en ovocitos de perra, comparación de emisión de fluorescencia. **A:** fluorescencia baja, **B:** fluorescencia media, **C:** fluorescencia alta.

Además, se evaluó la dependencia entre la fluorescencia emitida, entre diferentes tiempos de maduración ovocitaria. Así por ejemplo, durante las primeras 72 horas de maduración no hubo un aumento significativo en la intensidad de la fluorescencia emitida, al compararla con ovocitos recién obtenidos desde el ovario (chi cuadrado = 5,15; $p \geq 0,01$). Sin embargo, sí se encontró un aumento significativo de la intensidad de la fluorescencia cuando se aumentó el tiempo de maduración in vitro de 72 a 96 horas (chi cuadrado = 9,5; $p < 0,01$). De la misma manera al comparar ovocitos inmaduros y madurados por 96 horas, también se encontró una dependencia en la intensidad de la fluorescencia emitida entre estos dos tipos de ovocitos (chi cuadrado = 21,91; $p < 0,01$).

En la distribución mitocondrial, se determinaron cuatro patrones, los que correspondieron a: Homogéneo liso completo (A), Homogéneo granuloso completo (B), Heterogéneo granuloso periférico y central (C), y Heterogéneo granuloso central (D) (tabla 1, figura 3)

TABLA 1: Distribución mitocondrial en ovocitos de perra inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 horas, madurados *in vivo*.

	Ovocitos							
	Inmaduros		<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>	
			72 horas		96 horas			
Distribución mitocondrial	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Homogéneo liso completo	155	72,1	25	9,8	-	-	-	-
Homogéneo granuloso completo	60	27,9	162	63,8	189	63,6	15	100
Homogéneo granuloso periférico y central	-	-	52	20,5	106	35,7	-	-
Homogéneo granuloso central	-	-	15	5,9	2	0,7	-	-
Total	215	100	254	100	297	100	15	100



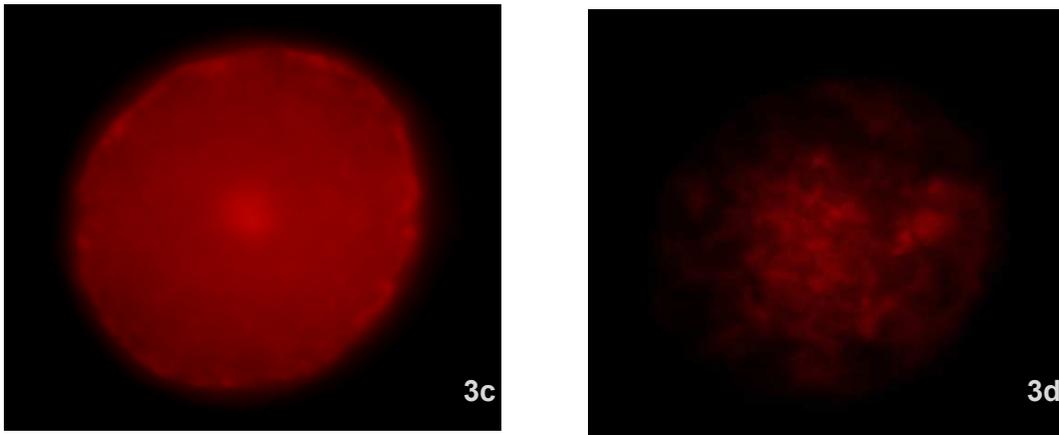


FIGURA 3 (x100); Epifluorescencia en ovocitos de perra, **3a**: Homogéneo liso completo, **3b**: Homogéneo granuloso completo, **3c**: Heterogéneo granuloso periférico y central, **3d**: Heterogéneo granuloso central.

Al analizar la distribución mitocondrial en ovocitos inmaduros, se observó que éstos se encontraron sólo con una distribución mitocondrial de tipo A y B. El análisis nuclear mostró que estos ovocitos en ambos tipos de patrones, se encontraban en Profase I temprana, dictiateno en VG; sin embargo, algunos ovocitos con distribución homogéneo granuloso completa se encontraron en un estado nuclear de Profase I tardía, inicio de la ruptura de la VG (figura 4a).

Al observar los ovocitos madurados *in vitro* por 72 h se encontraron cuatro patrones de distribución mitocondrial, siendo predominante el patrón tipo B (63,8%), seguido por el C (20,5%), A (9,8%) y finalmente por el tipo D (5,9%). En el caso de aquellos madurados *in vitro* por 96 h se observaron tres de los cuatro patrones de distribución mitocondrial: siendo mayoritario el tipo B (63,6%), seguido por C (35,7%) y finalmente por D (0,7%) (Tabla 1, figura 3).

Al evaluar el estado nuclear de estos ovocitos se observó que aquellos con una distribución tipo A presentaron un estado nuclear de VG; la distribución tipo B un estado nuclear desde inicio de ruptura de la envoltura nuclear (GVBD) a Metafase II (figura 4); aquellos tipo C sólo se encontraron en Metafase I y II, y finalmente la distribución tipo D se encontró al menos en Metafase I (figura 4b,c).

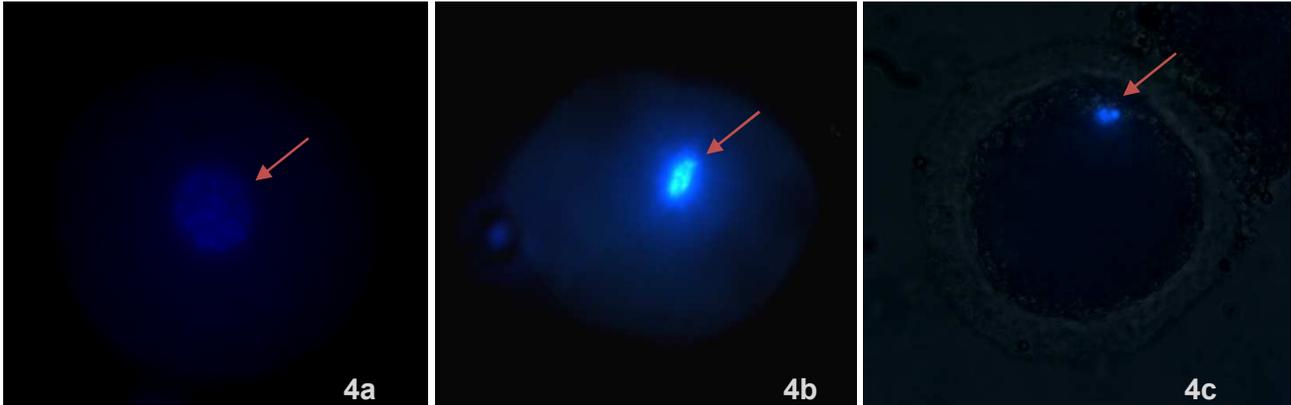


FIGURA 4: (100X). Epifluorescencia en ovocitos de perra, **4a:** ovocito en GVBD, **4b:** ovocito en al menos Metafase I, **4c:** ovocito en Metafase II.

En el caso de los ovocitos madurados *in vivo* sólo se describió un patrón de distribución mitocondrial que correspondió al de tipo B (figura 5a), presentando una apariencia muy similar a la del resto de los ovocitos con este patrón de distribución. Sin embargo, los gránulos conformados por las mitocondrias fueron más grandes que en el resto de los ovocitos tanto inmaduros como madurados *in vitro*. Al evaluar el estado de maduración nuclear todos los ovocitos madurados *in vivo* se encontraron en Metafase II (figura 5b).

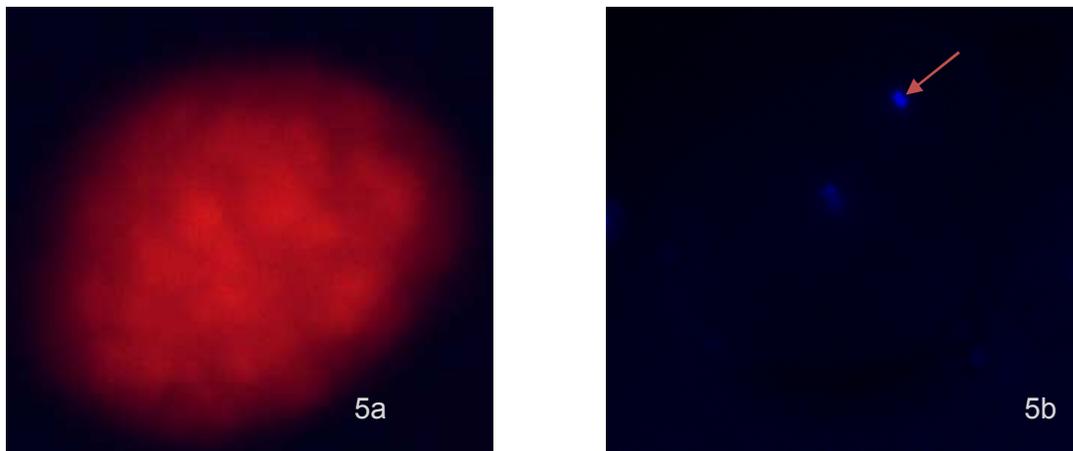


FIGURA 5 (x100); epifluorescencia, ovocito madurado *in vivo*, **5a:** Homogéneo granuloso completo, **5b:** Metafase II

Al comparar los patrones de distribución mitocondrial desde el estado de inmaduro hasta su maduración *in vitro* por 72 y 96 horas, se observó cambio en el porcentaje de cada patrón descrito en el tiempo. El patrón tipo A disminuyó de un 72,1% en su estado inmaduro a un 9,8% cuando es madurado por 72 h, llegando a desaparecer por completo cuando completan 96 h de maduración *in vitro*. Por el contrario, los patrones tipo C y D no se encontraron en los ovocitos inmaduros, y a las 72 horas de maduración *in vitro* alcanzan porcentajes de 20,5% y 5,9% respectivamente, aumentando el patrón C cuando completan 96 horas de maduración *in vitro* a un 35,7%. El patrón D, por su parte, disminuyó a un 0,7% a las 96 h. En el caso de aquellos madurados *in vivo* siempre se encontró el mismo patrón de distribución mitocondrial. (Tabla 1 y Figura 6)

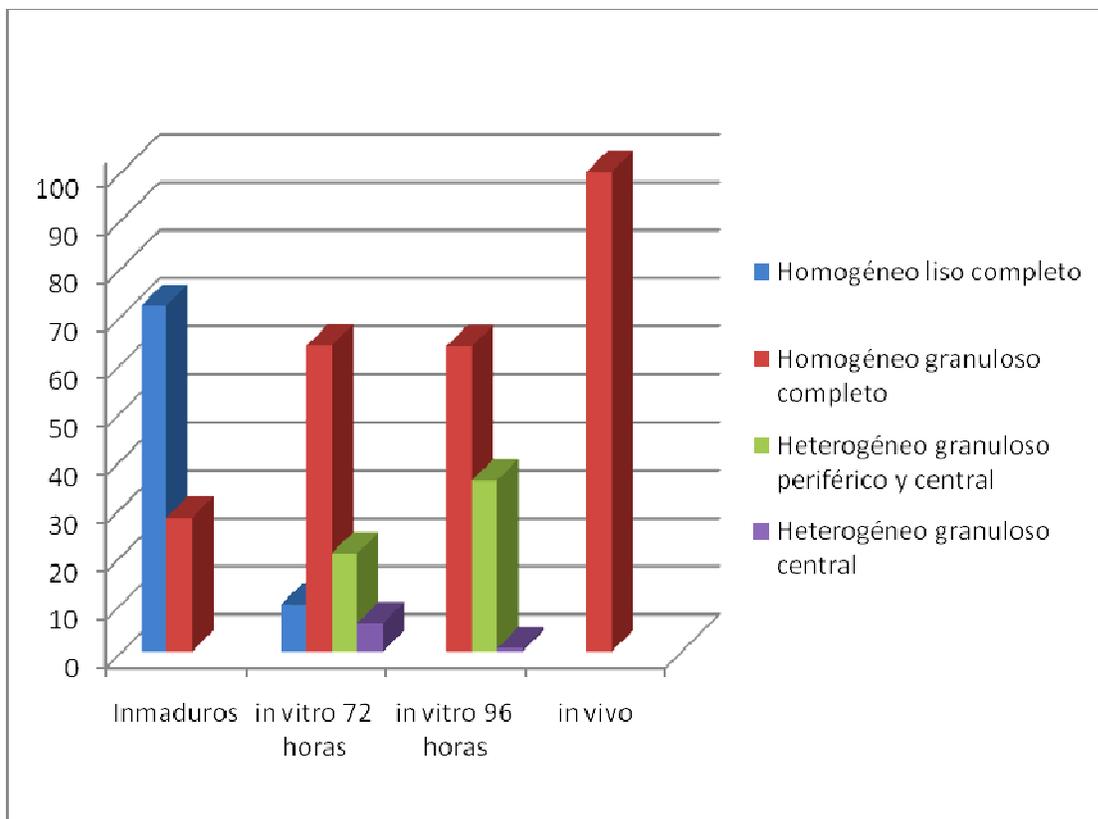


FIGURA 6: Porcentajes de distribución mitocondrial en ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* por 72 y 96 h, y madurados *in vivo*.

DISCUSION.

La maduración nuclear y citoplasmática del ovocito involucra un mecanismo complejo que incluye la redistribución de cromosomas y organelos respectivamente, como las mitocondrias (Fulka *et al.*, 1998; Stojkovic *et al.*, 2001). La distribución mitocondrial en ovocitos de perra inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo*, evaluada en este trabajo, demostró que existiría una dependencia entre la actividad mitocondrial evaluada como fluorescencia emitida y maduración de los ovocitos. Asimismo, las características o patrones de distribución específicos de las mitocondrias, variaron a través de la maduración *in vitro*, asemejándose a aquellos madurados *in vivo*, sin embargo hubo diferencias entre ambos tipos de maduración.

La coordinación de la maduración nuclear y citoplasmática es un factor clave en la maduración del ovocito (Combelles y Albertini, 2001); de esta forma, la maduración mitocondrial, redistribución, producción de ATP y acumulación de energía durante la ovogénesis son procesos cruciales para la activación, fecundación y futuro desarrollo embrionario (Van Blerkom y Runner, 1984; Van Blerkom y Davis, 1995). La existencia de dependencia entre la actividad mitocondrial, que estaría relacionada con el contenido de ATP, y la maduración ovocitaria a través de tiempo, indica que la diferencia encontrada en la emisión de fluorescencia por los ovocitos se encuentra asociada al tiempo de maduración. Sin embargo, no se observó dependencia al evaluar la actividad mitocondrial entre los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* por 72 h, lo que refleja que con este tiempo de cultivo no se logra un aumento significativo en el número de ovocitos que presentan una emisión de fluorescencia media, correspondiente a aquella observada en los ovocitos madurados *in vivo*. Por otro lado, sí existió diferencia en la intensidad de la fluorescencia emitida, entre ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* por 96 h; así como entre ovocitos madurados por 72 y 96 h.

La emisión media de fluorescencia predominó fuertemente tanto en ovocitos inmaduros como madurados *in vitro*. Sin embargo, el porcentaje de ovocitos con este tipo de emisión de fluorescencia aumentó con el tiempo de cultivo *in vitro*, lo que fue en desmedro de aquellos ovocitos con una emisión de fluorescencia baja, los que a diferencia disminuyeron desde el estado inmaduro hasta la maduración por 96 horas, lo que

indicaría una actividad mitocondrial progresiva durante el cultivo *in vitro*. Un aumento significativo en el contenido de ATP se ha observado en ovocitos de bovinos (Stojkovic *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006) y de cerdas (Brevini *et al.*, 2005; 2007), durante la maduración *in vitro* mientras progresan del estado de VG a segunda metafase (MII). Sin embargo, en esta última especie no se han evidenciado cambios en el consumo de oxígeno durante la maduración *in vitro* (Sturmey y Leese, 2003).

La intensidad de fluorescencia media, que predominó en todos los grupos de ovocitos, pareciera ser la intensidad normal, ya que este tipo de fluorescencia se observó en todos los ovocitos de perra madurados *in vivo*.

Los porcentajes de ovocitos que presentaron una intensidad alta de fluorescencia podrían deberse a una sobre activación *in situ* de las mitocondrias, lo cual se ha descrito en ovocitos de cerda (Sun *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha propuesto que esta sobre activación no sería adecuado, ya que ovocitos de cerdas madurados *in vitro* con una gran cantidad de mitocondrias en la zona perinuclear, presentando una alta actividad mitocondrial, no lograron entrar en reinicio meiótico (Sun *et al.*, 2001).

En ovocitos inmaduros, en este estudio se observaron sólo dos patrones de distribución mitocondrial, el primero tipo A y el segundo B, siendo mayoritario el primer patrón. La existencia de estos patrones con características de distribución homogénea de las mitocondrias en los ovocitos inmaduros es coincidente con lo observado en estudios realizados en ovocitos porcinos (Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Sturmey *et al.*, 2006), bovinos (de Paz *et al.*, 2001) ovinos (Cran *et al.*, 1980) y caninos (Iorga *et al.*, 2008). De esta manera se ha relacionado la distribución homogénea de las mitocondrias con ovocitos en etapas tempranas de maduración, y otra heterogénea con etapas más avanzadas de la meiosis y con las células del cúmulo expandidas, al menos en cultivos *in vitro* (Torner *et al.*, 2004).

En ovocitos inmaduros de cerda, se ha observado una agregación de las mitocondrias activas de forma homogénea con predominio en la corteza o de forma periférica como una característica común en los ovocitos en estado de VG (Brevini *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2001). También se describe que ovocitos derivados de folículos pequeños tendrían algunas mitocondrias en la región subcortical, y otras localizadas alrededor de la VG o en

el centro del citoplasma. En ovocitos de folículos de mayor tamaño en cerdas, la distribución mitocondrial se observa dispersa en el interior del citoplasma pero concentradas en la región perinuclear (Sun *et al.*, 2001). En este trabajo, no se observaron sectores específicos con más mitocondrias en los ovocitos caninos inmaduros; por el contrario, su distribución fue de forma homogénea por todo el ovoplasma, lo que podría implicar que la distribución y localización de las mitocondrias en las diferentes especies no es del todo igual, por lo que comparar la función y localización de estas se hace difícil (Torner *et al.*, 2004).

En ovocitos de bovinos en estado inmaduro se ha observado una fluorescencia homogénea más notoria, indicativa de la presencia de mitocondrias en aquellos con un citoplasma homogéneo y con sus capas de células del cúmulo compactas a diferencia de aquellos ovocitos de menor calidad (citoplasma vacuolado, células del cumulo expandido o ausente, citoplasma irregular), donde las mitocondrias se encuentran restringidas a la periferia o alrededor de las vacuolas del citoplasma. De esta forma, se ha relacionado positivamente la calidad del ovocito con el contenido de ATP, evaluado a través del número de blastómeros (Stojkovic *et al.*, 2001).

En este estudio no se observaron las diferencias antes mencionadas probablemente debido a que los ovocitos fueron seleccionados previamente de acuerdo a aquellas características que han demostrado favorecer la maduración en cultivo, evaluada por el desarrollo meiótico, tales como un citoplasma oscuro y homogéneo (Hewitt y England, 1998) y más de tres capas compactas de células del cumulo alrededor del ovocito (Nickson *et al.*, 1993; Hewitt y England, 1998). No obstante lo anterior, en aquellos ovocitos inmaduros que parecían ser de menor tamaño o tener menos capas de células del cumulo, el patrón mitocondrial encontrado siempre fue el tipo A. Coincidente con esto, el análisis nuclear mostró a todos estos ovocitos en estado de VG; en cambio, en los ovocitos de mayor tamaño y con más capas de células del cúmulo, se encontraron ambos patrones: A y B; donde el análisis nuclear de los ovocitos con el patrón de distribución tipo B mostró un estado de VG y GVBD, indicativo del reinicio meiótico, lo que podría deberse a procesos de activación del ovocito durante la obtención y manipulación de éstos. Coincidentemente, en ovocitos de perra inmaduros evaluados con microscopia electrónica de transmisión, se determinó que una distribución homogénea en el citoplasma con agregados mitocondriales correspondería a un estado más desarrollado a nivel de citoplasma (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008b).

Similarmente a lo observado en el presente trabajo, estudios con microscopia confocal, aún en curso, han descrito en ovocitos inmaduros de perra, un mayor porcentaje de ovocitos con un patrón mitocondrial homogéneo de gránulos difusos a través de todo el citoplasma. Sin embargo, en ovocitos obtenidos de perras en fases de proestro y estro, se observaron además patrones pericorticales (Iorga *et al.*, 2008). Por otro lado en estudios realizados con microscopia electrónica de transmisión en ovocitos inmaduros provenientes de perras en anestro, también se encontró, en aquellos con un citoplasma más inmaduro, un mayor número de mitocondrias en la zona cortical del ovocito (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008b). En este trabajo no se encontraron ovocitos inmaduros con patrones pericorticales, lo cual se debería probablemente a que la mayoría de las perras en este estudio estaban en anestro. Esto implicaría un menor número de ovocitos evaluados en etapa de estro, los que podrían presentar patrones pericorticales en un mayor porcentaje a diferencia de aquellos en etapa de anestro, lo que podría estar relacionado a un efecto hormonal en aquellos ovocitos en la etapa estral.

En ovocitos inmaduros de ratones, se ha descrito que las mitocondrias se encuentran en forma difusa a través de todo el citoplasma, pero también algunos presentan mitocondrias alrededor del núcleo (Nishi *et al.*, 2003). Esto no se observó en este estudio, probablemente porque los ratones ovulan ovocitos en estado de MII (Sorensen y Wassarman, 1976), por lo que sería posible encontrar a nivel ovárico ovocitos con algún grado de desarrollo citoplasmático, a diferencia de la perra que ovula en dictioteno (VG) (Holst y Phemister, 1971; Tesoriero, 1982; Sirad, 2001)

Se ha reportado que las mitocondrias se redistribuyen activamente durante la maduración y fecundación de los ovocitos en diversas especies (Bavister y Squirrell, 2000), los resultados de este trabajo sugieren que este proceso de redistribución mitocondrial también ocurre en los ovocitos de perra al menos durante la maduración *in vitro*. Los ovocitos madurados *in vitro* por 72 h, mostraron dos patrones más de distribución mitocondrial, C y D además de aquellos encontrados en los ovocitos inmaduros. En estos ovocitos, el patrón dominante fue el tipo B (63,8%), seguido del C (20,5%), y con un menor porcentaje de presentación, los patrones de tipo A y D (9,8% y 5,9% respectivamente). La aparición de estos nuevos patrones indicaría una reubicación mitocondrial durante el cultivo, indicativo de desarrollo citoplasmático; sin embargo, no todos los ovocitos lograron desarrollo en su maduración, lo que se corroboró en su estado

nuclear donde algunos no reiniciaron la meiosis. Esto concuerda con estudios previos que han evaluado el reinicio meiótico en cultivo, donde se ha visto que no todos los ovocitos reinician la meiosis (Mahi e Yanagimachi, 1976; Yamada *et al.*, 1992; 1993; Hewitt y England, 1998; Rota y Cabianca, 2004; De los Reyes *et al.* 2005). Por tanto, probablemente tampoco alcanzarían todos la maduración citoplasmática adecuadamente. Aquellos ovocitos que presentaron un patrón de distribución mitocondrial tipo A, indicativo de inmadurez, mostraron un estado nuclear de VG, y a nivel citoplasmático presentaron una falta de desplazamiento mitocondrial en estos ovocitos que no alcanzaron a formar los agregados mitocondriales. A diferencia de aquellos que presentaron un patrón tipo B reubicando las mitocondrias a nivel citoplasmático, y a nivel nuclear, reiniciando la meiosis donde se encontraron en diversos grados de desarrollo meiótico.

Los dos patrones restantes que se describen, también muestran redistribución mitocondrial acompañada de desarrollo meiótico, al evaluar paralelamente su estado nuclear, donde se observó MI en aquellos ovocitos con un patrón de distribución tipo B y MI como MII en aquellos tipo C.

En ovocitos madurados *in vitro* por 96 h, no se encontró el patrón A, lo que indicaría que en este tiempo los ovocitos habrían activado el movimiento mitocondrial; sin embargo, a nivel nuclear, no todos los ovocitos reiniciaron la meiosis, observándose ovocitos aún en estado de VG o en progresión meiótica. En un estudio de microscopía electrónica de transmisión en ovocitos de perra madurados *in vitro* por 72 h se observaron en algunos ovocitos que no habían reiniciado la meiosis, características citoplasmáticas de inmadurez. Sin embargo, en algunos ovocitos que presentaban un estado nuclear de VG, se observó una maduración citoplasmática similar a aquellos ovocitos madurados *in vivo* en metafase II (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a,b). Esta diferencia de madurez citoplasmática en estos ovocitos madurados *in vitro* que no lograron el reinicio meiótico indicaría una falla o falta en la sincronización entre la maduración nuclear y citoplasmática (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008b).

EL aumento de un 15% en el patrón de distribución mitocondrial tipo C, con una disminución notoria del patrón tipo D a la 96 horas de cultivo, podría indicar que el patrón D estaría dado por movimientos incompletos de las mitocondrias, como también podría representar un paso intermedio entre el patrón tipo A y los patrones C y D, ya que el

análisis nuclear mostró que aquellos ovocitos que presentaban el patrón Heterogéneo granuloso central sólo se encontraban en MI, y el patrón de distribución Heterogéneo granuloso periférico y central se encontró tanto en MI como en MII, siendo predominante el estado nuclear de MI. Se sugiere que la redistribución mitocondrial hacia ciertas áreas del ovocito, se debe a requerimientos mayores de ATP durante el desarrollo, siendo esta probablemente una característica necesaria para los ovocitos durante la maduración (Van Blerkom y Runner, 1984). Una distribución periférica se puede relacionar con la necesidad de metabolizar componentes y proveerlos a la periferia del ovocito (de Paz *et al.*, 2001) y lograr una metabolización rápida de éstos (Moor y Dai, 2001). Incluso, podría relacionarse con un alto requerimiento de energía por la corteza (Sun *et al.*, 2001).

En ovocitos de cerda madurados *in vitro*, se encontraron patrones similares a los descritos en este trabajo en ambas horas de cultivo, con una distribución en la periferia y en el centro del ovoplasma (Sturmey *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2001). Esto indicaría un movimiento de migración de las mitocondrias desde la periferia hacia el interior del ovoplasma (Brevini *et al.*, 2005). También se ha descrito un patrón difuso (Brevini *et al.*, 2005), similar al descrito en ovocitos de ratones (Van Blerkom *et al.*, 2002). Sun *et al.* (2001) lograron describir que en ovocitos de cerda madurados *in vitro*, que alcanzaron metafase I o anafase I, la agregación observada fue generalmente perinuclear, y en aquellos en MII la distribución mitocondrial fue en su mayoría central, aunque algunos presentaron una distribución pareja en todo el citoplasma.

Entre las 72 y 96 h de cultivo, no hubo diferencias en el porcentaje de ovocitos con el patrón tipo B, siendo en ambos tiempos el patrón de distribución mitocondrial predominante. Coincidentemente en los ovocitos de perra madurados *in vivo*, el patrón de distribución mitocondrial correspondió en su totalidad al patrón tipo B, y a nivel nuclear su estado correspondió en todos a MII. Los gránulos formados por las mitocondrias en la mayoría de los ovocitos madurados *in vivo* fueron sin embargo más grandes que en los ovocitos tanto inmaduros como madurados *in vitro* en ambos tiempos de cultivo. En ovocitos de cerda madurados *in vivo* evaluados con microscopía electrónica de transmisión (Cran, 1985) y con fluorescencia (Sun *et al.*, 2001), se ha descrito que las mitocondrias se encuentran de forma homogénea dispersa en el citoplasma ovular, aunque de forma más abundante en la periferia citoplasmática que hacia el interior (Sun *et al.*, 2001). Esto se asemeja a los resultados de este trabajo, donde las mitocondrias

también se dispusieron a través de todo el citoplasma, aunque no se logró observar un sector del citoplasma con una mayor cantidad de agregados mitocondriales, como en los ovocitos de cerda madurados *in vivo*. Esta distribución homogénea de las mitocondrias en los ovocitos caninos madurados *in vivo* también ha sido descrita en estudios con microscopía electrónica de transmisión, donde se muestra un aumento de éstas, distribuidas de forma homogénea desde el peak de LH y la ovulación. Previo al reinicio meiótico se forman agregados mitocondriales y posterior a él se encuentran distribuidas de forma homogénea en el citoplasma (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). La presencia de una población homogénea de mitocondrias en los ovocitos sería importante para mantener una viabilidad equivalente de cada blastómero, los que recibirían sólo una porción de las mitocondrias de cada ovocito fecundado (Dumollard *et al.*, 2006).

Desde las 72 h de cultivo *in vitro* se alcanzarían por tanto, porcentajes superiores al 60% de ovocitos con el patrón de distribución mitocondrial similar a los ovocitos madurados *in vivo*. Sin embargo, al comparar los ovocitos madurados *in vitro*, tanto a 72 como a 96 h, con aquellos ovocitos madurados *in vivo*, se puede inferir que los madurados en cultivo logran desarrollar el mismo tipo de patrón mitocondrial tipo B. Aunque con un porcentaje de presentación menor, y posiblemente la cantidad de mitocondrias también es inferior que *in vivo*, confiriéndole el aspecto de granulado más pequeño que se aprecia por medio de la microscopía de fluorescencia. Esta diferencia podría explicarse por movimientos incompletos de las mitocondrias en el ovoplasma debido a una maduración citoplasmática pobre asociado a las condiciones de cultivo *in vitro* (Gardner *et al.*, 2000). Se ha reportado que componentes que se adicionan a los cultivos como los sueros, podrían tener efectos adversos tanto en la distribución como en la estructura de las mitocondrias (Abe *et al.*, 2002), pudiendo afectar de la misma manera el aumento de éstas (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008a). Además, se ha demostrado el daño oxidativo producto de los cultivos *in vitro* con alta proporción de CO₂ (5%) en aire, que pueden inducir alteraciones mitocondriales debido a un aumento de los radicales libres (Kruip *et al.*, 2000).

En estudios de desarrollo meiótico en ovocitos caninos, se ha descrito que a las 72 h de cultivo habría una mayor cantidad de ovocitos que completan la maduración nuclear (Otoi *et al.*, 2004). Sin embargo, los mismos autores describen que el periodo de maduración de 48 h *in vitro* daría un mayor porcentaje de desarrollo embrionario después de la fecundación. Otros trabajos utilizando el mismo protocolo de maduración empleado en

este estudio, describen mayor porcentaje de MII a las 96 h de incubación (De Los Reyes *et al.*, 2005), pero un mayor porcentaje de penetración espermática se observaría con ovocitos madurados por 72 h versus aquellos madurados por 96 h (Oberli, 2006). Investigaciones en el desarrollo de la zona pelúcida durante la maduración *in vitro* de ovocitos caninos, demuestran que esta cubierta glicoproteica que rodea al ovocito, experimenta cambios significativos a las 72 h, y que estos cambios observados tenderían a regresar a las 96 h, posiblemente por una sobremaduración o envejecimiento ovocitario (De los Reyes *et al.*, 2009). Tomando en conjunto estos antecedentes con los resultados obtenidos en este trabajo, es posible que el tiempo necesario para lograr la maduración del ovocito canino, sea cercana a las 72 h, y las diferencias encontradas en el desarrollo mitocondrial entre la maduración *in vitro* e *in vivo* serían probablemente causadas por el sistema de cultivo, no siendo aún del todo eficiente para lograr porcentajes de desarrollo más cercano a lo que se observa *in vivo*.

CONCLUSIONES.

La actividad mitocondrial se encuentra directamente asociada al estado de maduración del ovocito de perra

El patrón de distribución mitocondrial normal de un ovocito maduro de perra, sería aquel homogéneo granuloso completo a nivel citoplasmático.

Existiría un movimiento mitocondrial durante la maduración del ovocito *in vitro*, tendiente a lograr agregados mitocondriales con una distribución homogénea.

Más de la mitad de los ovocitos madurados *in vitro* por 72 y 96 h tienden a tener un patrón de distribución mitocondrial parecido al de los ovocitos madurados *in vivo*.

Existiría una falta de coordinación entre la maduración citoplasmática, evaluada a través de la distribución mitocondrial, con la maduración nuclear, evaluada a través del desarrollo meiótico, en los ovocitos madurados *in vitro*.

Las diferencias en la actividad y distribución mitocondrial entre los ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo* se deben probablemente a condiciones de cultivo deficientes.

BIBLIOGRAFÍA.

- **ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T., HOSHI, H.** 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61: 57–66.
- **AGUILAR, J.J., LOSINNO, L., KONCURAT, M., MIRAGAYA, M.H.** 2002. Nuclear, cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and aged mares. *Theriogenology* 58: 689-692
- **ALBERTINI, D.F., WICKRAMASINGHE, D., MESSINGER, S., MATTSON, B.A., PLANCHA, C.E.** 1993. Nuclear and cytoplasmic changes during oocyte maturation. In: “Preimplantation Embryo Development” (B. D. Bavister, Ed.), pp. 3–21. Springer-Verlag, New York.
- **ALTURA, B., CARELLA, A., TURLAPATY, P.** 1982. Ca²⁺ coupling in vascular smooth muscle: Mg²⁺ and buffer effects on contractility and membrane Ca²⁺ movements. *Can J Physiol Pharmacol* 60:459–482.
- **BAVISTER, B.D.** 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Hum Reprod Update* 1: 91–148
- **BAVISTER, B.D. y SQUIRRELL, J.M.** 2000. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod.*15:189-198.
- **BERRIDGE, M., BOOTMAN, M., LIPP, P.** 1998. Calcium - a life and death signal. *Nature* 395: 645 – 648
- **BRAD A.M, BORMANN C.L., SWAIN J.E., DURKIN R.E., JOHNSON A.E., CLIFFORD A.L., KRISHER R.L.** 2003. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 64: 492-498.

- **BREVINI, T., VASSENA, R., FRANCISCI, C., GANDOLFI, F.** 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol reprod* 72: 1218 – 1223.
- **BREVINI, T., CILLO, F., ANTONINI, S., GANDOLFI, F.** 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 98: 23–38.
- **COMBELLES, C.M., ALBERTINI, D.F.** 2001. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of gamma-tubulin. *Dev Biol* 239: 281 – 294.
- **CONCANNON, P.W., MCCANN, J.P., TEMPLE, M.** 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl.* 39: 3–25.
- **CRAN, D.G., MOOR, R.M., HAY, M.F.** 1980. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fertil* 59: 125-132.
- **CRAN, D.G.** 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 74:237-245.
- **CUMMINS, J.M.** 2001. Mitochondria: Potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer. *Hum Reprod* 7: 217-228.
- **CUMMINS, J.M.** 2004. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115: 23-29.
- **DE GIER, J., KOOISTRA, H.S., DJAJADININGRAT-LAANEN, S.C., DIELEMAN, S.J., OKKENS, A.C.** 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* 65:1346–1359.

- **DE LOS REYES, M., DE LANGE, J., MIRANDA, P., PALOMINO, J., BARROS, C.** 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 64: 1-11.
- **DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., SEPULVEDA, S., MORENO, R., PARRAGUEZ, V., BARROS, C.** 2007. Evaluation of cortical granules and viability of canine oocytes during long-term in vitro maturation. *Vet Rec* 160: 196-198.
- **DE LOS REYES M, HETZ J, PALOMINO J.** 2009. Ultrastructural study of the canine zona pellucida surface during *in vitro* maturation. *Reprod Dom Anim* (In press).
- **DE PAZ, P., SANCHEZ, A., DE LA FUENTE, J., CHAMORRO, C., ALVAREZ, M., ANEL, E., ANEL, L.** 2001. Ultrastructural and cytochemical comparison between cow and calf oocytes. *Theriogenology* 55: 1107–1116.
- **DUCHEN, M.** 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol* 529: 57-68.
- **DUCIBELLA T., UKENA, T., KARNOVSKY, M., ANDERSON, E.** 1977. Changes in cell surface and cytoplasmic organization during early embryogenesis in preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol* 74:153–157.
- **DUMOLLARD, R., HAMMAR, K., PORTERFIELD, M., SMITH, .PJ., CIBERT, C., ROUVIERE, C.** 2003. Mitochondrial respiration and Ca²⁺ waves are linked during fertilization and meiosis completion. *Development* 130:683–692.
- **DUMOLLARD, R., DUCHEN, M., SARDET, C.** 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilization. *Semin Cell Dev Biol* 17: 314-323
- **DURANTHONN, V. Y RENARD, J.P.** 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55:1277-1289.

- **ENGLAND, G.C. E YEAGER, A.E.** 1993. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during estrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* 47:107–117.
- **EPPIG, J.J., SCHULTZ, R. M., O'BRIEN, M., AND CHESNEL, F.** 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164: 1–9.
- **ERNSTER, L. Y SCHATZ, G.** 1981. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91:227–255.
- **FULKA, J.J., FIRST, N.L., MOOR, R.M.** 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 4: 41-49.
- **GARDNER, D. K.** 1998. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 4:83–102.
- **GARDNER, D. K., POOL, T. B., LANE, M..** 2000. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, development and viability. *Sem Reprod Med* 18:205–218.
- **GURAYA, S.S.** 1965. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *J Exp Zool.* 160:123-135.
- **HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.** 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 49:957-966.
- **HOLST, P.A., PHEMISTER, R.D.** 1971. The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol Reprod* 5: 194–206.
- **HOMA S.** 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev* 40:122–134.
- **HYTTEL, P., FLAIR, T., AVERY, B., CALLESEN, H., GREVE, T.** 1990. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reprod Dom Anim* 34: 247–254.

- **IORGA, A.I., VALENTINI, L., DE SANTIS, T., AMBRUOSI, B., GUARICCI, A.C., CAIRA, M., DELL'AQUILA, M.E.** 2008. Distribution of active mitochondria in canine oocyte is related to reproductive cycle stage but can be damaged during IVM culture. *Reprod Dom Anim* 43 (suppl 3): 127-128.
- **ISOBE, N., FUJIHARA, M., TERADA, T.** 1996. Cumulus cells suppress meiotic progression in pig oocytes cultured in vitro. *Theriogenology* 45: 1479–1489.
- **KAUFMAN, M., HOMA, S.** 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *J. Exp. Zool* 265:69–76.
- **KIM, NH., FUNAHASHI, H., PRATHER, RS., SCHAHTTEN, G., DAY, BN.** 1996. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 43: 248 - 255.
- **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.** 2004. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. *J Vet Sci* 5: 253–258.
- **KLOC M, BILINSKI S, ETKIN LD.** 2004. The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later. *Curr Top Dev Biol* 59:1–36.
- **KRIEGER, C., DUCHEN, M.** 2002. Mitochondria, Ca²⁺, and neurodegenerative disease. *Eur J Pharm* 447:177–188
- **KRISHER, R. L.** 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82: 14-23.
- **KRUIP, T.A., BEVERS, M.M., KEMP, B.** 2000. Environment of oocytes and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53:611-618
- **LI, C., FAN, B.** 1997. Changes in the 3-dimensional distribution of mitochondria during meiotic division of mouse oocytes. *Theriogenology* 48:33–41.

- **LIU, L., HAMMAR, K., SMITH, P.J., INOUE, S., KEEFE, D.L.** 2001. Mitochondrial modulation of calcium signaling at the initiation of development. *Cell Calcium* 30: 423-433.

- **LUVONI, G.** 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod Nutr Dev* 40: 505-512.

- **LUVONI G, LUCIANO AM, MODINA S, GANDOLFI F.** 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 57:141-146.

- **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.

- **MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J Exp Zool* 196:189-196.

- **MOOR, R Y DAI, Y.** 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction* 58:91–104.

- **MOTLÍK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P.** 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49:461–509.

- **NAGAI, S., MABUCHI, T., HIRATA, S., SHODA, T., KASAI, T., YOKOTA, S., SHITARA, H., YONEKAWA, H., HOSHI, K.** 2006. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 210: 137-144.

- **NICKSON, D.A., BOYD, J.S., ECKERSALL, P.D., FERGUSON, JM., HARVEY, M.J., RENTON, J.P.** 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 47:231-40.

- **NISHI, Y., TAKESHITA, T., SATO, K., ARAKI, T.** 2003. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. *J Nippon Med Sch* 70: 408-415.

- **OBERLI, R.** 2006. Evaluación del tiempo de capacitación espermática en la fecundación *in vitro* en caninos. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile. 53 pp.

- **OKKENS, A.C Y KOOISTRA H.S.** 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod Dom Anim* 41:291-296.

- **OTOI, F., TANAKA, M., OOKA, A., SUZUKI, T.** 1999. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 11: 387–390.

- **OTOI, T., FUJII, M., TANAKA, M., OOKA, A., SUZUKI, T.** 2000. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54: 535–542.

- **OTOI, T., OOKA, A., MURAKAMI, M., KARJA, K., SUZUKI, T.** 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 13: 151–155

- **OTOI, T., SHIN, T., KRAEMER, D.C., WESTHUSIN, M.E.** 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev* 44: 631–637.

- **OTOI, T., SHIN, T., KRAEMER, D.C., WESTHUSIN, M.E.** 2007. Role of cumulus cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Dom Anim* 42: 184–189

- **PHILLIPS, D.M Y DEKEL, N.** 1991: Maturation of the rat cumulus oocyte complex: structure and function. *Mol Reprod Dev* 28: 297–306.

- **PRATHER, RS., HAWLEY, RJ., CARTER, DB., LAI, L., GREENSTEIN, JL.** 2003. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59: 115 – 123.

- **REYNAUD, K., SAINT-DIZIER, M., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2004. In vitro maturation and fertilization of canine oocytes. *Methods Mol Biol* 253:255–272.
- **REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., THOUMIRE, S., CHEBROUT, M., VIARIS DE LESEGNO, C., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130: 193 – 201.
- **REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., VIARIS DE LESEGNO, C., SAINT-DIZIER, M., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology* 66: 1685 – 1693.
- **REYNIER, P., MAY-PANLOUP, P., CHRÉTIEN, M.F., MORGAN, C.J., JEAN, M., SAVAGNER, F., BARRIÈRE, P., MALTHIÈRY, Y.** 2001. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 7: 425-429.
- **RODRIGUES, B.A., DOS SANTOS, L.C., RODRIGUES, J.L.** 2004. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 67: 215–223.
- **ROTA, A., CABIANCA, G.** 2004. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev* 44: 105-109.
- **ROZINEK, J., PETR, J., GROCHOLOVÁ, R., JÍLEK, F.** 1995. Microtubule rearrangement during in vitro maturation of pig oocytes. Effect of cycloheximide. *Reprod Nutr Dev* 35: 685-694.
- **SAINT-DIZIER, M., REYNAUD, K., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2004. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol Reprod Dev* 68:205-212

- **SIRAD, M.A.** 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241 – 1254.
- **SONGSASEN, N., WILDT, D.E.** 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim Reprod Sci* 98: 2-22.
- **SORENSEN, R.A. Y WASSARMAN, P.M.** 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 50: 531-536.
- **STOJKOVIC, M., MACHADO, S., STOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONCALVES, P., WOLF, E.** 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 64: 904 – 909.
- **STURMEY, R.G., O´TOOLE, P.J., LEESE, H.J.** 2006. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 132: 829-837.
- **STURMEY, R.G Y LEESE, H.J.** 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126: 197–204
- **ST JOHN, JC.** 2002. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. *Theriogenology* 57: 109 – 123.
- **SUN, Q.Y., WU, G.M., LAI, L., PARK, K.W., CABOT, R., CHEONG, H.T., DAY, B.N., PRATHER, R.S., SCHATTEN, H.** 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction* 122: 155-163.
- **TANGHE, S., VAN SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYN, M., DE KRUIF, A.** 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414 –424.

- **TARAZONA, AM., RODRÍGUEZ, JI., RESTREPO, LF., OLIVERA-ANGEL, M.** 2006. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Dom Anim* 41: 5-11.

- **TESORIERO, J.V.** 1981. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J Morphol* 168:171-179.

- **TESORIERO, J.V.** 1982. A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. *Gamete Res* 6: 267–279.

- **TORNER, H., BRÜSSOW, K.P., ALM, H., RATKY, J., PÖHLAND, R., TUCHSCHERER, A., KANITZ, W.** 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61: 1675-1689.

- **TSUTSUI, T.** 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil* 39: 269–275.

- **VAN BLERKOM, J., RUNNER, M.**1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *Am J Anat* 171: 335 - 355.

- **VAN BLERKOM, J.** 1991. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5031 – 5035.

- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P.** 1995. Evolution of the sperm after microinjection of isolated human sperm centrosomes into meiotically mature human oocytes. *Hum Reprod* 10: 2179-2182.

- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P., LEE, J.** 1995. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 10: 415-424

- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P.W.** 1998. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Hum Reprod* 13:1317–1324.
- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P., ALEXANDER, S.** 2000. Differential mitochondrial inheritance between blastomeres in cleavage stage human embryos: determination at the pronuclear stage and relationship to microtubular organization, ATP content and developmental competence. *Hum Reprod* 15: 2621 - 2633.
- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P., MATHWIG, V., ALEXANDER, S.** 2002. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse human oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 17: 493 – 406.
- **VAN BLERKOM, J., DAVIS, P., ALEXANDER, S.** 2003. Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. *Hum Reprod* 18: 2429 – 2440.
- **VAN BLERKOM, J.** 2004. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128: 269-280
- **VIARIS DE LESEGNO, C., REYNAUD, K., PECHOUX, C., THOUMIRE, S., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2008a. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol Reprod Dev* 73: 115 – 125.
- **VIARIS DE LESEGNO, C., REYNAUD, K., PECHOUX, C., CHEBROUT, M., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2008b. Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 20: 626 – 639.
- **WILDING, M., DALE, B., MARINO, M., DI MATTEO, L., ALVIGGI, C., PISATURO, M.L., LOMBARDI, L., DE PLACIDO, G.** 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 16: 909-917.

- **YANG, S.H., LIU, R., PEREZ, E.J., WEN, Y., STEVENS, S.M Jr., VALENCIA, T., BRUN-ZINKERNAGEL, A.M., PROKAI, L., WILL, Y., DYKENS, J., KOULEN, P., SIMPKINS, J.W.** 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 4130-4135.

- **YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y.** 1992. Maturation, fertilization, 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.

- **YUAN, Y.Q. , VAN SOOM, A. , LEROY, J.L.M.R. , DEWULF, J., VAN ZEVEREN, A., DE KRUIF, A., PEELMAN, L.J.** 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. Theriogenology 63:2147–2163.