



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

Memoria de Título

“EVALUACIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES
DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* EN
OVOCITOS CANINOS Y SU RELACIÓN CON EL
DESARROLLO MEIÓTICO”

DANIELA FANNY LUNA FERNÁNDEZ

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

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“EVALUACIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* EN OVOCITOS CANINOS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO MEIÓTICO”

DANIELA FANNY LUNA FERNÁNDEZ

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA.
PROFESOR CONSEJERO	: VÍCTOR MARTÍNEZ MONDACA.
PROFESOR CONSEJERO	: MARIA SOLEDAD FERNANDEZ GARAY

SANTIAGO, CHILE
2011

MEMORIA DE TITULO

"EVALUACIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* EN OVOCITOS CANINOS Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO MEIÓTICO"

Daniela Luna

Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la distribución de los gránulos corticales (GC) en el citoplasma ovular, y su relación con el desarrollo meiótico en ovocitos caninos durante la maduración *in vitro* (MIV) a las 48, 72 y 96h, comparados con aquellos ovocitos no sometidos a cultivo (no madurados) y ovocitos madurados *in vivo* (ovulados). La distribución de los GC durante la MIV e *in vivo* fue evaluada a través de la tinción con la lectina *lens culinaris* conjugada con FITC mediante microscopia de epifluorescencia, en tanto, la configuración cromatínica se evaluó paralelamente mediante la tinción con DAPI y microscopia de epifluorescencia. A través del tiempo de incubación se pudieron establecer tres patrones de distribución de los GC que indicarían el movimiento de estas estructuras durante el proceso de maduración del ovocito. El patrón A, Homogéneo liso; en el cual la marca fluorescente se presentó fina y homogénea en todo el citoplasma ovular, Patrón B, Homogéneo granuloso; pequeñas agrupaciones o conglomerados de aspecto granular ("Clusters") distribuidos uniformemente por todo el citoplasma, Patrón C, Granuloso cortical; de aspecto granular, en la cual los gránulos se ubicaron inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del ovocito en todo su perímetro. El patrón A, se observó sólo en ovocitos en vesícula germinativa (VG) (19%), y fue encontrado sólo en ovocitos no madurados, no obstante la mayoría ($p < 0,05$) de los ovocitos en VG presentó el patrón B, observándose mayoritariamente ($p < 0,05$) en ovocitos no madurados (94%), también en ovocitos madurados en cultivo por 48h (4%), disminuyendo ($P < 0,05$) al aumentar el tiempo de cultivo hasta las 96h. El patrón C se observó sólo en aquellos ovocitos sometidos a MIV aumentando significativamente con el tiempo de cultivo, además de observarse en todos (100%) los ovocitos ovulados. A medida que el tiempo transcurrió, la maduración meiótica progresó sólo con el tiempo de cultivo a una tasa menor que la alcanzada por los GC durante la MIV, a pesar de observar que ovocitos con una distribución cortical o periférica de los gránulos (patrón C), aumentaron en estados nucleares de metafase I (MI) y metafase II (MII) con el tiempo de cultivo. Además considerando que el desarrollo meiótico sólo alcanzó un 27 % de MII a las 96 h en comparación al 90% de ovocitos ovulados en MII, es posible establecer que sólo la distribución de los GC progresaría paralelamente al tiempo de cultivo indicando con esto que la maduración citoplasmática evaluada a través de la migración de estas vesículas no ocurre coordinadamente con la maduración nuclear.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the distribution of cortical granules (GC) in the ovular cytoplasm, and its relationship to meiotic development in canine oocytes during *in vitro* maturation (IVM) at 48, 72, and 96 h, compared to those that were non-matured and *in vivo* matured oocytes (ovulated). The distribution of GC during canine oocyte maturation (both *in vitro* and *in vivo*) was assessed by staining with lectin *lens culinaris* conjugated FIT-C using epifluorescence microscopy, whereas, chromatin configuration was concurrently evaluated with epifluorescence microscopy and DAPI staining. During IVM, could be established three distribution patterns of GC, that indicate movement of these structures during oocytes maturation. The pattern A, homogeneous smooth; in which the fluorescent mark was presented fine and homogeneous throughout the cytoplasm ovulate, Pattern B, Homogeneous granular; small groups or clusters of granular ("Clusters") distributed evenly throughout the cytoplasm, Pattern C, cortical granules; granular appearance, in which the granules were located immediately below plasma membrane of the egg around the perimeter. Pattern A was observed only in oocytes in GV (19%), and was found only in oocytes non- matured, however the most ($p < 0,05$) of oocytes in GV showed the pattern B, mainly observed ($p < 0,05$) in oocytes non-matured (94%), also in oocytes matured in culture 48h (4%), decreasing ($p < 0,05$) with increasing time culture until 96 h. Pattern C was seen only in those oocytes IVM, increasing significantly with the culture time, also was seen in all (100%) ovulated oocytes. As time passed, the meiotic maturation progressed only with the time culture a lower rate than that achieved by the GC during IVM, despite observed that oocytes with cortical distribution or peripheral granules (pattern C), increased state MI and MII nuclear with culture time. Addition considering that the meiotic development only reached 27% MII at 96h compared to 90% of ovulated oocytes MII, it is possible to establish that only the distribution of GC would progress in parallel with time culture indicating thereby that the cytoplasmic maturation assessed by migration of these vesicles does not occur in coordination with nuclear maturation.

KEYWORDS: Cortical granules, Canine oocytes, *In vitro* maturation, Cytoplasmic maturation, Meiotic development.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y la aplicación de tecnologías reproductivas en perros, ha tenido como limitante la maduración ovocitaria *in vitro*, la cual muestra resultados muy inferiores a lo alcanzado en otras especies (Reynaud *et al.*, 2006 ; Songsasen y Wildt, 2007). La gran mayoría de los protocolos destinados a la maduración *in vitro* en ovocitos caninos han sido generalmente adaptados a partir de los utilizados en otros mamíferos, debido básicamente al desconocimiento de muchos de los requerimientos especie-específicos de los caninos, los cuales presentan características distintas en su fisiología reproductiva que los diferencian de las otras especies (Concannon, 1989; Yamada *et al.*, 1992; De los Reyes *et al.*, 2005), como presentar durante el estro niveles de estrógenos en declinación y niveles de progesterona en aumento, a diferencia de la mayoría de las hembras mamíferas (Songsasen y Wildt, 2007).

Dentro de las características reproductivas especiales, destaca la ovulación de ovocitos inmaduros, en profase de la primera división meiótica, en estado de vesícula germinal (VG) (Luvoni *et al.*, 2005; Songsasen y Wildt, 2007), y no en segunda metafase (MII) como ocurre en las otras especies. Esto implica que los ovocitos requieren de un tiempo de maduración en el oviducto, reanudando allí la

meiosis con la consiguiente extrusión del primer corpúsculo polar (Tsutsui, 1975; Renton *et al.*, 1991).

A pesar de que el tiempo en que ocurre la maduración del ovocito canino en el oviducto no ha sido determinado en exactitud, se estima que se produce 2 a 5 días después de ocurrida la ovulación (Holst y Phemister, 1971; Tsutsui, 1975 ; Renton *et al.*, 1991 ; Reynaud *et al.*, 2005), período en el cual los ovocitos experimentan cambios nucleares y citoplasmáticos. A nivel nuclear, comienza el reinicio meiótico hasta llegar al estado de MII (Luvoni *et al.*, 2005) y a nivel citoplasmático la síntesis de diversas proteínas necesarias para el desarrollo, redistribución de organelos tales como; mitocondrias (Valentini *et al.*, 2010; De los Reyes *et al.*, 2011), gránulos corticales (GC) (De los Reyes *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2011), Aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Moreno *et al.*, 2010), y cambios en la forma, tamaño, ubicación, número y actividad de éstos (De Lesegno *et al.*, 2008^a).

En general, la mayoría de los estudios de maduración de ovocitos contemplan la evaluación de la maduración a nivel del núcleo; sin embargo, estudios realizados en ovocitos de mamíferos (Krisher, 2004) como los de cerdas (Sun, 2003), perras (De Lesegno *et al.*, 2008^b; De los Reyes *et al.*, 2007; 2011), y humanos (Combelles *et al.*, 2002) sugieren que tanto la maduración nuclear como citoplasmática son

necesarias para lograr el adecuado desarrollo del ovocito.

La maduración ovocitaria comprende una serie de eventos complejos (Ferreira *et al.*, 2009), donde el núcleo y el citoplasma deben desarrollarse en forma sincrónica para ser capaces de sustentar un adecuado desarrollo embrionario, de acuerdo a lo estudiado en otras especies, (De Sousa *et al.*, 1998; Krisher, 2004).

Estudios de maduración *in vitro* en ovocitos caninos, indican que un bajo porcentaje de los ovocitos logra alcanzar la maduración nuclear en comparación a lo observado en otras especies (Luvoni *et al.*, 2005), observándose entre un 20 y 58% de progreso hasta MII (Farstad, 2000; Nickson *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Rodrigues y Rodrigues, 2003; Otoi *et al.*, 2004; Luvoni *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2005). Esto, podría estar asociado a deficiencias en los medios de maduración utilizados (De los Reyes *et al.*, 2005) que podría afectar además del desarrollo nuclear el desarrollo del citoplasma. Estudios de distribución de organelos en ovocitos de perra muestran que éstos adquieren diferentes localizaciones en el citoplasma durante la transición del estado nuclear de vesícula germinal (VG) hasta el estado de metafase II. Estudios mediante microscopía de fluorescencia (De los Reyes *et al.*, 2007) y electrónica de transmisión (De Leseño *et al.*, 2008^a) en ovocitos caninos,

han señalado que la distribución de GC cambiaría durante la maduración. En ovocitos inmaduros, este patrón ha sido descrito uniforme y homogéneo en todo el citoplasma, a diferencia de lo observado con aquellos ovocitos madurados *in vitro*, los cuales presentan una distribución periférica de sus gránulos luego de 96 horas de maduración (De los Reyes *et al.*, 2007). Por ende, los cambios en la distribución y localización de los gránulos corticales durante la maduración podría ser utilizado como un importante indicador de la maduración citoplasmática de los ovocitos (Liu *et al.*, 2005).

Los GC, corresponden a pequeños organelos esféricos derivados del aparato de Golgi, son ricos en enzimas y están rodeados por una membrana (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Wassarman, 1996). Durante la fecundación, una vez que el espermatozoide ha penetrado la zona pelúcida (ZP) y entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito, se fusionan con ésta, induciendo la exocitosis de su contenido hacia el espacio perivitelino, evento denominado "reacción cortical" (Raz *et al.*, 1998; Sun, 2003). Este proceso modificaría las propiedades estructurales, bioquímicas y funcionales de la ZP (Sun, 2003), a través de la inactivación de los receptores espermáticos (Dandekar y Talbot, 1992; Ward y Kopf, 1993; Yanagimachi., 1994; Sun, 2003). Esto provoca modificaciones que impedirían la receptividad a nuevos espermatozoides, además de modificaciones a nivel de la membrana

plasmática y del espacio peri vitelino (EPV), lo que conduce a la formación de una barrera biológica que bloquea y previene la penetración poliespérmica (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Yanagimachi., 1994; Sun, 2003).

Los GC son sintetizados durante la etapa inicial del crecimiento folicular de ovocitos en mamíferos (Hoodbhoy y talboy, 1994; Yanagimachi., 1994; Wassarman, 1996) aumentando en su número antes de la ovulación y fecundación en la mayoría de las especies mamíferas (Wassarman, 1996), para luego migrar hacia la periferia del ovocito (Hoodbhoy y Talbot ,1994; Yanagimachi, 1994; Wassarman, 1996) , hasta ubicarse por debajo de la membrana plasmática, de acuerdo a lo estudiado en hámster (Austin, 1956, citado por Yanagimachi, 1994; Cherr *et al.*, 1988), ratón (Ducibella *et al.*, 1988; Yanagimachi, 1994) bovinos (Niimura y Hosoe., 1995; Wang *et al.*, 1997; Adona *et al.*, 2008), cabras (Velilla *et al.*, 2004) , cerdos (Cran y Cheng, 1986; Wang *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 2002), y perras (De los Reyes *et al.*, 2007).

En caninos, existe poca información acerca de la sincronización entre la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito. Considerando que estos eventos ocurren posterior a la ovulación durante un período prolongado de tiempo, a diferencia del resto de los mamíferos, se puede hipotetizar que los ovocitos de perra presentan durante la

maduración *in vitro* cambios en la ubicación y densidad de los GC que se relacionarían con los cambios nucleares cromatínicos, asemejándose a aquellos observados en los ovocitos madurados *in vivo*, sin embargo con diferencias relacionadas a sus distintas capacidades de desarrollo. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la distribución de los GC antes y durante la maduración *in vitro*, así como también su comparación *in vivo*, analizando simultáneamente la relación con el estado de maduración nuclear.

MATERIALES 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. El protocolo utilizado fue aprobado por el Comité de Bioética de esta Facultad y por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

Procesamiento de ovocitos ováricos

Los ovocitos que se trabajaron como no madurados y madurados *in vitro* se obtuvieron a partir de ovarios de perras (n=50) ovariectomizadas en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de La Pintana. Se utilizaron perras clínicamente sanas de 1- 6 años, de distintas razas y en diferente estado del ciclo estral, los ovarios se transportaron al

laboratorio en una solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina, mantenidos a una temperatura de 35 a 37° C, dentro de 2 a 3 horas de realizada la ovariectomía.

En el laboratorio, los ovocitos se obtuvieron a partir de la maceración de los ovarios a través de cortes finos realizados en el tejido ovárico utilizando una hoja de disección y tijeras. Los complejos cúmulo ovocito (COCS) se recolectaron en medio buffer fosfato salino (PBS) a 30-35° C. Se seleccionaron bajo la lupa estereoscópica aquellos ovocitos que presentaron citoplasma homogéneo y oscuro, rodeados completamente de al menos tres capas de células del cúmulo (Hewitt *et al.*, 1998 ; De los Reyes *et al.*, 2005).

Los ovocitos que no se sometieron a cultivo, se utilizaron inmediatamente como ovocitos inmaduros depositándolos en cápsulas de cultivo (Falcon # 3001; Becton Dickinson, Lincoln Park, NY, USA) con medio buffer fosfato salino (PBS) con 0,1% de albúmina sérica bovina BSA, y fueron lavados 2 veces en el mismo medio, para luego ser evaluados.

Maduración in Vitro

Los COCs seleccionados que se utilizaron para la maduración, se lavaron 3 veces en PBS luego de ser seleccionados desde los ovarios. Los ovocitos se depositaron en cápsulas (Falcon # 3001) en gotas de 100 µL

(10-15 ovocitos) de medio TCM-199 (Earle's salt, con 25mM HEPES; Invitrogen, NY,USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, In Vitrogen), 0,25 mM de piruvato (Sigma, , St. Louis ,USA), 10 UI/ml gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma, St. Louis ,MO, USA) , 100 UI/mL de penicilina y 30 µg /mL de estreptomina (Sigma, St. Louis ,MO,USA) ,cubiertos por aceite mineral estéril, a 38,5° C, 5% de CO₂ y 98% de humedad en la estufa (Forma Scientific, USA) por períodos de 48 ,72 y 96 horas de acuerdo a lo descrito en De los Reyes *et al.* (2005).

Procesamiento de ovocitos ovulados (madurados in vivo).

Los ovocitos madurados *in vivo* se obtuvieron de perras en estro ovariectomizadas aproximadamente 72 horas después de ocurrida la ovulación. La utilización de estos animales se realizó con el consentimiento informado de los dueños de cada perra, los cuales previamente habían solicitado el servicio de esterilización de su perra. El momento de la ovulación se determinó a través de signología clínica de estro, frotis seriados de la citología vaginal y niveles de progesterona sérica circulantes, los que se evaluaron mediante el kit comercial de ELISA semi-cuantitativo (Bio Veto Test, ovulación® Test La Seyne-Sur-Mer, France), se transportaron al laboratorio los ovarios, oviductos y parte superior de los cuernos, en

solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI/ml de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina, a 35 a 37° C, dentro de 2 a 3 horas de realizada la ovariectomía.

Los ovocitos se obtuvieron por canulación del lumen del oviducto, utilizando una aguja de 25 G y un volumen de 15 mL de PBS suplementado con 30 mg/mL de albúmina sérica bovina fracción V (BSA). Una vez obtenidos, los ovocitos se recolectaron en cápsulas de cultivo con PBS suplementado con 30 mg/mL de BSA, para evaluar la distribución de los GC y el estado de maduración nuclear.

Detección de gránulos corticales y estado de la cromatina nuclear

Para la detección de los gránulos corticales en los ovocitos no madurados, madurados *in vitro* y ovulados, se removieron las células del cúmulo mediante pipeteo suave a través de la incubación en una solución con 5mg/mL de citrato de sodio en PBS suplementado con 30 mg/ mL de albúmina sérica bovina fracción V (BSA) (De los Reyes *et al.*, 2005). La remoción de la ZP se realizó en base a lo descrito por Adona *et al.* (2008), modificado. Brevemente, los ovocitos desnudados de las células del cúmulo se incubaron en una solución de pronasa (Sigma, St. Louis, USA) 0,5% en PBS, para luego ser lavados tres veces en solución PBS. Posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS por 30 minutos, para ser lavados 3 veces en PBS, bloqueando la reacción posteriormente

por 2 horas en PBS suplementado con 0,1% BSA, 0,75% glicina (Sigma, St. Louis, USA) y 0,2% de ázida de sodio (Sigma, St. Louis, USA) (solución de bloqueo). Las muestras se permeabilizaron con 0,1% tritón X-100 (Sigma, St. Louis, USA) en solución de bloqueo por 10 minutos y lavadas posteriormente 3 veces en solución de bloqueo. Después de realizado el bloqueo los ovocitos se incubaron durante 20 minutos en 1µg/mL de diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford IL, USA) conjuntamente con 1µg/mL Lectina *lens culinaris* aglutinin, conjugada con FITC (LCA-FITC) (Sigma, St. Louis, USA) que corresponden a proteínas de origen no inmune que tienen la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos correspondientes a los presentes en los GC (Goldstein *et al.*, 1980). Luego los ovocitos se lavaron 3 veces en solución de bloqueo, posteriormente fueron montados entre porta y cubre objeto con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA).

Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su observación, con un microscopio de luz invertida, Olympus IX71 (Tokio, Japón), equipado con epifluorescencia a través de una lámpara IX2-RFA a la cual se interpuso un filtro de 488 nm para excitar el FITC y de 360 nm para excitar la molécula de DAPI. (De los Reyes *et al.*, 2011). Para la obtención de las imágenes, se utilizó una cámara

ProgRes-Capture Pro 2.5 (Jenoptik, Alemania) anexada al microscopio.

Los estados de maduración nuclear se clasificaron de acuerdo a lo descrito previamente (De los Reyes *et al.*, 2005) en; Vesícula germinal (VG), donde la cromatina se encontró dispersa en el núcleo del ovocito; reinicio meiótico (VGBD), la cromatina fue encontrada en el citoplasma en proceso de compactación; primera metafase-anafase (MI-AI), en los cuales se observaron los cromosomas alineados en la placa metafásica (MI) o la progresiva migración de éstos hacia los polos (AI); segunda metafase (MII), en la cual se observaron los cromosomas alineados en la placa metafásica acompañados de la expulsión del primer corpúsculo polar.

Análisis estadístico

Para la evaluación de la distribución de los GC y estado de maduración nuclear, se analizaron alrededor de 100 ovocitos por cada estado de maduración (no madurados, madurados *in vitro* por 48, 72 h y 96 h), cifra que se alcanzó través de 6 – 7 réplicas experimentales. Los ovocitos madurados *in vivo* se obtuvieron en 6 réplicas, lográndose un total de 31 ovocitos.

Los patrones de distribución de los GC en los distintos estados de maduración de los ovocitos se analizaron y compararon, dentro y entre los diferentes grupos de maduración,

mediante un análisis descriptivo de los resultados obtenidos.

La posible asociación entre los patrones de distribución de los gránulos corticales y los distintos estados de maduración nuclear de los ovocitos tanto no madurados, madurados *in vitro* por 48, 72 y 96 h, como madurados *in vivo*, se evaluaron mediante análisis de frecuencia con una prueba de Chi-cuadrado (χ^2), para lo cual se utilizó el programa InfoStat/Profesional versión 2004d.1. (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Diferencias entre grupos con un $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Se evaluaron un total de 469 ovocitos; 118 no madurados, 320 MIV y 31 ovocitos madurados *in vivo* (ovulados), a los cuales se les pudo observar paralelamente el estado de cromatina nuclear y la distribución de los GC a nivel citoplasmático.

La evaluación nuclear mostró ovocitos en distintos grados de desarrollo meiótico lo cual estuvo relacionado al tiempo de cultivo (Tabla 1); los estados de maduración nuclear descritos previamente (De los Reyes *et al.*, 2005; 2011), fueron: vesícula germinal (VG), reinicio o reanudación meiótica (VGBD), primera metafase-anafase (MI-AI), segunda metafase (MII) (Fig 1).

Las distintas localizaciones y distribuciones de los gránulos corticales, fueron determinadas a través de las marcas fluorescentes a nivel citoplasmático dada por la unión de los GC con la lectina *lens culinaris* conjugada con FITC (Fig. 2). De acuerdo a esto, se observaron 3 patrones de distribución en los distintos tiempos de maduración ovocitaria, Patrón A: homogéneo liso, en el cual la marca fluorescente se presentó fina y homogénea en todo el citoplasma ovular (Fig. 2a), observándose sólo en los ovocitos no madurados (Tabla 1). Patrón B: Homogéneo granuloso, en los cuales se observan pequeñas agrupaciones o conglomerados de aspecto granular, distribuidos uniformemente por todo el citoplasma ovocitario (Fig. 2b), encontrándose en ovocitos inmaduros y madurados por 48, 72 y 96 h (Tabla 1). Patrón C: Granuloso cortical, con aspecto granular, en la cual los gránulos se ubicaron inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del ovocito en todo su perímetro (Fig. 2c), este patrón se observó en ovocitos sometidos a cultivo por 48, 72 y 96 horas y en todos los ovocitos ovulados (Tabla 1). Este criterio fue adaptado a partir de estudios anteriores realizados en esta especie (De los Reyes *et al.*, 2007) como en otras (Takano *et al.*, 2002; Velilla *et al.*, 2004).

La distribución citoplasmática de tipo A de los GCs, se observó en 4,7% del total de ovocitos evaluados sólo en aquellos que no fueron sometidos a maduración *in vitro*, representando un 19% de éstos (Tabla 1).

No obstante, la mayoría de estos ovocitos no sometidos a cultivo, presentó la distribución tipo B, homogénea granulosa (81%). Esta distribución tipo B, en forma de conglomerados se observó también en los ovocitos sometidos a cultivo, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) conforme aumentó el tiempo representando el 25, 10 y 3% a las 48 h, 72 h y 96h respectivamente. El patrón B correspondió a un tercio del total de ovocitos. El patrón C, granuloso cortical, se observó en los ovocitos madurados *in vitro* y en todos aquellos madurados *in vivo* (Fig. 3), representando un 66% del total de ovocitos evaluados en este estudio. Se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) de los ovocitos que presentaron este patrón C a medida que aumentó el tiempo de cultivo, representando el 75, 90 y 97% de los ovocitos madurados por 48 h, 72h y 96h respectivamente (Tabla 1).

El patrón de distribución A, se encontró sólo en los ovocitos que a nivel nuclear estaban en VG (Tabla 1). En este estado nuclear, se observaron además ovocitos con distribución B (75%) y C (5,3%). La mayoría ($p < 0,05$) de los ovocitos que presentaron el núcleo en VG correspondió a los no madurados (94%), no encontrándose en este trabajo ovocitos madurados *in vivo* (ovulados) en VG. En los ovocitos madurados *in vitro*, el estado nuclear VG, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) después de 48 horas de cultivo (4, 1 y 2% a las 48, 72 y 96 horas, respectivamente) (Tabla 1).

Los ovocitos que presentaron patrón de distribución tipo B, se encontraron al igual que el patrón A, mayoritariamente ($p < 0,05$) en el estado de VG (61%), siendo el 90% ovocitos no madurados. Sin embargo, en los ovocitos con patrón tipo B se presentaron también otros estados de maduración nuclear, llegando hasta estado de MI en los ovocitos no madurados y MII solamente en los ovocitos madurados *in vitro* por 48h. En los ovocitos madurados *in vitro* que presentaron patrón B, el reinicio meiótico (VGBD) y continuación de la meiosis (MI-MII) se observó mayoritariamente ($p < 0,05$) desde las 48 horas de maduración (Tabla 1).

Los ovocitos que presentaron patrón de distribución tipo C se observaron sólo en aquellos grupos sometidos a MIV y en todos los ovocitos obtenidos desde el oviducto (madurados *in vivo*) (Tabla 1). Durante la MIV se observó un aumento ($p < 0,05$) de los ovocitos que presentaron este patrón de distribución tipo C (75, 90 y 97% a las 48, 72 y 96 h, respectivamente) (Tabla 1).

De los ovocitos madurados *in vitro*, que presentaron el patrón C, sólo un pequeño porcentaje (2%; $p < 0,05$) se encontró en estado nuclear de VG. Los ovocitos con distribución tipo C en estado VGBD disminuyeron ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de maduración *in vitro* (31, 22 y 10 %, a las 48, 72 y 96 h, respectivamente). Además, La mayoría ($p < 0,05$) de los ovocitos MIV en estado

VGBD, presentaron el patrón tipo C (67%), el patrón B en cambio, con una menor proporción, disminuyó ($p < 0,05$) a medida que aumentó el tiempo de incubación a 15%, 4% y 1%, a las 48, 72 y 96 horas, respectivamente (Tabla 1).

El porcentaje de ovocitos con distribución tipo C en estados nucleares de MI y MII, aumentó con el tiempo de cultivo ($p < 0,05$) de 31, 51 y 58 % de MI y 9, 16 y 27 % en MII, a las 48, 72 y 96 h, respectivamente (Tabla 1). En los ovocitos *in vivo* (Fig.3), el 90% con patrón tipo C, estaba en MII y el porcentaje restante (10%) en MI (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró una clara relación en la distribución de los GC y el tiempo de maduración. Se observó que la migración de los GC progresa conforme aumenta el tiempo de cultivo durante la maduración *in vitro* de los ovocitos de perra, pero paralelamente, esta migración, en comparación a lo observado en ovocitos madurados *in vivo*, no ocurriría coordinadamente con la reanudación y progresión meiótica, la cual no alcanza porcentajes altos de MII en cultivo.

En ovocitos de mamíferos, la migración y distribución de los gránulos corticales ha sido utilizado como un criterio para la evaluación de la maduración citoplasmática (Damiani *et al.*, 1996; Wang *et al* 1997^b; Carneiro *et al.*, 2002; Liu *et al* 2005). Se sabe que la

distribución de los gránulos corticales es especie-específica, no obstante la migración de los GC hacia la corteza es un fenómeno común en ovocitos de mamíferos durante la maduración (Yanagimachi, 1994). En este trabajo utilizando la *lectina lens culinaris* conjugada con FITC, que tiñe los gránulos corticales presentes en los ovocitos (Cherr *et al.*, 1988; Ducibella *et al.*, 1988; 1994; Long *et al.*, 1994; Niimura y Hosoe, 1995; Wang *et al.*, 1997b; Velilla *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2007), se pudo establecer durante los diferentes tiempos de incubación *in vitro*, 3 patrones de distribución de los GC que indicarían el movimiento de estas estructuras durante el proceso de maduración del gameto.

Se ha descrito en especies como bovinos (Ferreira *et al.*, 2009) y cerdos (Brevini *et al.*, 2007), que tanto la maduración nuclear como la citoplasmática, dada por el movimiento de los organelos y la dinámica de los filamentos del citoesqueleto, ocurren de manera coordinada. Lo que al parecer no ocurre con tal grado de coordinación durante la MIV de los ovocitos caninos. Porque a medida que transcurrió el tiempo de cultivo, la maduración meiótica no progresó con igual eficiencia en relación a los cambios en la distribución de los GC. Observándose casi la totalidad de los ovocitos con una distribución periférica de los GC (patrón C) al cabo de 72 y 96 h, similar a lo observado en los ovocitos ovulados, No así a nivel nuclear, donde sólo

se alcanzó un 16 y 27% de MII a las 72 y 96h respectivamente.

La distribución homogénea fina por todo el citoplasma (Patrón A), representó ovocitos que paralelamente presentaban su núcleo en estado de VG (inmaduros), siendo en general un porcentaje bajo del total de ovocitos. Estos, correspondieron básicamente a gametos que no se incubaron para maduración. Se podría concluir que este patrón representaría el punto de partida o comienzo de la distribución de los GC en ovocitos caninos.

No obstante, el mayor porcentaje del grupo de ovocitos sin madurar presentó en cambio, una distribución de los GC en forma de conglomerados por todo el citoplasma ovular (patrón B; 81%), similar a lo descrito en ovocitos MIV de cabras (Velilla *et al.*, 2004). Lo que podría estar relacionado a la acumulación y agregación que deben experimentar estas vesículas previo a la migración hacia la periferia del citoplasma.

De acuerdo a lo observado, existirían cambios en la organización intracitoplasmática de los GC durante la MIV, reflejado en los diferentes patrones de distribución encontrados. Estos patrones muestran un grado de maduración citoplasmática más avanzado en comparación a la maduración del núcleo, ya que la maduración nuclear solo evidenció una progresión en relación al tiempo de cultivo

más tardía a la alcanzada por los gránulos corticales, al parecer, dado el alto porcentaje de ovocitos no madurados con distribución B, la distribución de los gránulos comienza antes de la ovulación a diferencia del reinicio meiótico que ocurre después de ovulado el gameto. Por lo tanto, la maduración citoplasmática, evaluada a través de la distribución de GC se iniciaría en el ovario previo al proceso de ovulación.

Estudios recientes en ovocitos caninos, utilizando microscopia electrónica de transmisión (MET), muestran que el patrón de distribución de GC cambiaría después de la maduración *in vitro* (Viaris de Leseño *et al.*, 2008^b) y ovulación (Viaris de Leseño *et al.*, 2008^a). En los estudios *in vitro*, se observó que ovocitos no madurados presentan diferentes distribuciones de GC, al igual que lo observado en este trabajo (patrones A y B). No obstante, se ha visto que estos ovocitos presentan un mismo estado de maduración nuclear (VG) (Viaris de Leseño *et al.*, 2008^b). Las características de la distribución de los GC descrita por Viaris de Leseño *et al.*, (2008^b), en ovocitos no madurados, muestran a estos organelos organizados en pequeños conglomerados distribuidos simultáneamente tanto cerca de la membrana plasmática, como al interior del citoplasma ovocitario. A pesar que la evaluación por MET, sólo se hace en un pequeño número de ovocitos, mostrando un área muy restringida de éstos, Este tipo de distribución de GC, se asemeja al patrón B

descrito en el presente trabajo, por lo tanto, los resultados hallados aquí concuerdan con las evidencias bibliográficas, en el sentido que efectivamente la agregación de los GC comienza antes de la ovulación, durante la maduración del ovocito al interior del folículo. Además, en estudios previos en esta especie (De los Reyes *et al.*, (2007), se observó que en ovocitos inmaduros de perra, los GC se encuentran distribuidos uniforme y homogéneamente en todo el citoplasma, muy similar al patrón A descrito en este estudio. Sin embargo, en este trabajo, el patrón B fue el principal patrón de distribución de GC encontrado en los ovocitos no madurados, Esta situación podría estar relacionada a que los ovocitos provienen de folículos en diferentes estados de desarrollo, pudiendo algunos tener cierto grado de desarrollo citoplasmático más avanzado que otros, como también a una evaluación más detallada con la remoción previa de la ZP efectuada en este trabajo, lo que permitiría una mejor discriminación entre un patrón A o B.

Además se encontró un tercer patrón de distribución de los GC a nivel subcortical (patrón C), el cual se observó en todos los ovocitos ovulados y en porcentajes crecientes al aumentar los tiempos de cultivo. Este patrón C reflejaría el resultado de la migración de estos organelos, producto de la maduración del citoplasma ovocitario (Viaris de Leseño *et al.*, 2008^b). Se ha observado que el movimiento de los organelos

citoplasmáticos, durante la maduración ovocitaria, entre ellos GC (Kim *et al.*, 1996; Connors *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2001), ocurre a través de la acción de microtúbulos y microfilamentos presentes en el citoesqueleto de los ovocitos. En ovocitos humanos, se observó que filamentos de actina presentes en el citoplasma cortical, impiden la migración periférica y activación prematura de los GC (Sathananthan *et al.*, 1985), lo cual implicaría que la organización del citoesqueleto, en particular la dinámica de los microfilamentos, es esencial en el movimiento y la correcta migración de los GC hacia la corteza del ovocito, durante la maduración del ovocito y posterior fecundación. En ovocitos caninos se ha descrito que a pesar de las características particulares del reinicio meiótico (reinicio en el oviducto), la organización y actividad de los constituyentes del citoesqueleto, siguen un patrón similar a lo observado en otras especies de mamíferos (Saint-Dizier *et al.*, 2004).

A pesar de estos antecedentes, en caninos se dispone de poca información acerca de la sincronización entre la maduración nuclear y el movimiento que exhiben los GC durante la maduración citoplasmática del ovocito. Estudios realizados en especies como el ratón (Yanagimachi, 1994) han establecido que la producción y migración de los GC ocurren durante la ovogénesis y maduración meiótica previo a la ovulación, observándose que los GC de ovocitos en VG estarían distribuidos

uniformemente por toda la corteza del ovocito (Yanagimachi, 1994), para posteriormente migrar hacia la periferia de éste, a medida que la maduración nuclear progresa (Barros y Yanagimachi, 1972; Ducibella 1988). En ovocitos caninos, en cambio, el proceso de maduración es más prolongado (Luvoni *et al.*, 2005), los GC estarían distribuidos a través de todo el citoplasma ovular, en una etapa temprana, probablemente a nivel folicular incluso en la profundidad de éste, para luego de un tiempo, migrar hacia la periferia (De los Reyes *et al.*, 2007; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008^b), patrón que se observó en todos los ovocitos ovulados y en la mayoría de los ovocitos MIV de este estudio.

En cerdas se ha observado que ovocitos inmaduros en estado de VG presentan un patrón de distribución homogéneo a nivel del citoplasma cortical, y que a medida que son madurados *in vitro* y la maduración nuclear progresa hacia MI y MII estas vesículas sufren un proceso de reorganización, migrando hacia la periferia, ubicándose inmediatamente por debajo de la membrana plasmática formando una monocapa continua (Takano *et al.*, 2002; Wang, 1997^b; Yoshida *et al.*, 1993). En este y otros estudios en ovocitos caninos (De los Reyes *et al.*, 2007), recién al cabo de 96 h de MIV, la mayoría de los ovocitos presentaron una distribución orientada hacia la periferia del citoplasma. En cerdos, sin embargo, se concluye que la distribución de los GC, cambiaría casi

paralelamente con la maduración nuclear, estableciéndose además, que el reinicio de la maduración nuclear estaría determinada por el inicio del movimiento de los gránulos corticales en el citoplasma (Takano *et al.*, 1997). Diferente situación ha sido observada en trabajos realizados en ovocitos caninos, en donde se ha descrito que la distribución de los GC en los ovocitos MIV no progresa en correspondencia con los cambios que ocurren a nivel nuclear (Apparicio *et al.*, 2011). En este trabajo, se observó también una asincronía entre la maduración citoplasmática (evaluada a través de los GC) y el reinicio de la meiosis en los ovocitos a través del tiempo de cultivo.

Si bien la identificación de los diferentes patrones de distribución de GC obedecen a una interpretación en las diferentes especies estudiadas, ya sea por medio de estudios realizados con microscopia de epifluorescencia o microscopia confocal, sólo dos estudios se asemejan al patrón homogéneo liso observado en los ovocitos no madurados en estado de VG. Uno de los estudios en ovocitos de cerdas, observó que el 21 % de los ovocitos inmaduros en VG, presentaron un patrón de distribución homogéneo al interior del citoplasma ovular (Wang *et al.*, 1997^b), similar al patrón A encontrado en el presente estudio, asimismo, en cabras, se ha observado que más de un tercio de los ovocitos no madurados en estado de VG, tiene un patrón homogéneo liso y que luego de 27 h de cultivo, la

mayoría presentan distribución periférica de los GC y alcanzan la MII (Velilla *et al.*, 2004). En el presente trabajo, se logra efectivamente que la mayoría de los ovocitos tenga una distribución cortical de los GC hacia finales del cultivo pero con bajos porcentajes de MII. En general y a pesar que la localización de los GC en los ovocitos caninos madurados es similar a la de especies como bovinos (Niimura y Hosoe, 1995; Adona *et al.*, 2008), cerdos (Yoshida *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 2002), ratones (Ducibella *et al.*, 1988), cabras (Velilla *et al.*, 2004), ranas (Dumont, 1975), hámster (Cherr *et al.*, 1988), yeguas (Carneiro *et al.*, 2002), e igualmente, la mayoría de éstos la presenta, los porcentajes de desarrollo nuclear (MII), permanecen bajos, no obstante la gran mayoría de los ovocitos que alcanzaron la MII, también presentaron los GC a nivel cortical (93%), reflejando por tanto que la completación de la maduración citoplasmática se puede alcanzar en cultivo, no así en forma eficiente, la maduración nuclear.

Casi todos los ovocitos madurados *in vivo* (ovulados) estaban con su núcleo en estado de MII (90%) y presentaron el patrón C, similarmente a lo observado en ovocitos ovulados de cerdos (Crang y Cheng, 1985; Wang *et al.*, 1997), bovinos (Kruip *et al.*, 1983), y cabras (Velilla *et al.*, 2004). En los ovocitos madurados en cultivo, el patrón C se observó en un 75% de aquellos incubados por 48 h, aumentando a casi la totalidad

(90% y 97%) al incubarlos por 72 y 96 h respectivamente, lo cual indica que la distribución de los GC progresa con el tiempo de cultivo, al igual que la maduración meiótica, similar a lo descrito en otros estudios de esta especie (De los Reyes *et al.*, 2005; 2011), pero con porcentaje finales significativamente menores de maduración nuclear. Al parecer, por tanto, el que los ovocitos hayan alcanzado la distribución de GC periférico, no implica que hayan culminado la maduración nuclear. Un estudio reciente en GC de ovocitos caninos MIV, mostró que tanto la distribución de los GC, como la reanudación meiótica no fueron capaces de progresar sincrónicamente con el tiempo de cultivo, obteniéndose extremadamente bajos porcentajes de ovocitos con patrón periférico de GC al cabo de las 72 y 96 h de MIV (3 y 1% respectivamente), y muy bajos porcentajes de ovocitos que lograron completar la maduración nuclear (4 y 2% a las 72 y 96h de MII) (Apparicio *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que la distribución de los GC en ovocitos caninos comenzaría antes que la maduración nuclear ya que un porcentaje alto de éstos ya presentaba un patrón B antes de la maduración en cultivo, lo que implica que el movimiento de agregación de organelos se inicia antes de la ovulación al igual que lo descrito en otras especies (Eppig, 2001), continuando el movimiento hasta llegar a la ubicación pericortical típica de un ovocito

maduro citoplasmáticamente después de la ovulación, lo que difiere de las otras especies. En comparación a la distribución de otros organelos citoplasmáticos en esta especie. Estos resultados muestran diferencias a la localización mitocondrial, donde se ha indicado que la mayoría de los ovocitos inmaduros presentan las mitocondrias uniformemente distribuidas por el citoplasma ovocitario, agregándose durante la maduración, probablemente después de la ovulación (De los Reyes *et al.*, 2011). Sin embargo, el movimiento de las mitocondrias al igual que los GC, logra una distribución similar a la de los ovocitos madurados *in vivo*, y el desarrollo del núcleo no se alcanza en iguales porcentajes. Por lo tanto las evidencias encontradas en este trabajo indicarían que el cultivo de los ovocitos induce cambios citoplasmáticos que se manifiestan en agregación y relocalización de los gránulos corticales. Sin embargo, el movimiento de los GC no ocurre en coordinación con los cambios nucleares experimentados por el ovocito durante la maduración. Por lo que se hace esencial, nuevas investigaciones enfocadas a los cambios morfológicos, moleculares y funcionales involucrados en la reanudación de la meiosis *in vivo*, a modo de obtener mayores tasas de maduración meiótica *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas colaboraron directa o indirectamente en la realización de esta memoria de título, desde ya un profundo agradecimiento a todas ellas por su invaluable ayuda.

Deseo agradecer especialmente a la Doctora Mónica De Los Reyes, de quién siempre recibí un total e incondicional estímulo y apoyo.

A los integrantes de mi querido Laboratorio de Reproducción, quienes fueron un indiscutible pilar en el logro de esta tarea.

A mi amigo, Doctor Jaime Palomino, por su grata amistad, su incondicional apoyo y paciencia inagotable.

A Octavio Gonzales, por su amistad, ayuda y estímulo día a día.

A Javiera Vergara, por todos los gratos momentos que compartimos juntas.

Especialmente quiero agradecer a quienes jamás olvidaré, a mis amigas; Paula, Daniela, María Ignacia, Isabel, Anita, Alejandra y Josefina, con quienes compartí parte de mi vida durante mi carrera.

Por último, y me detendré en este punto. A mis queridos padres, hermanos, amigos y en especial a Gonzalo Vidal, por su inmenso amor, de quien siempre recibí incondicionalmente, un hombro, una palabra y una sonrisa. A todos ellos Gracias por hacer posible esta etapa de mi vida.

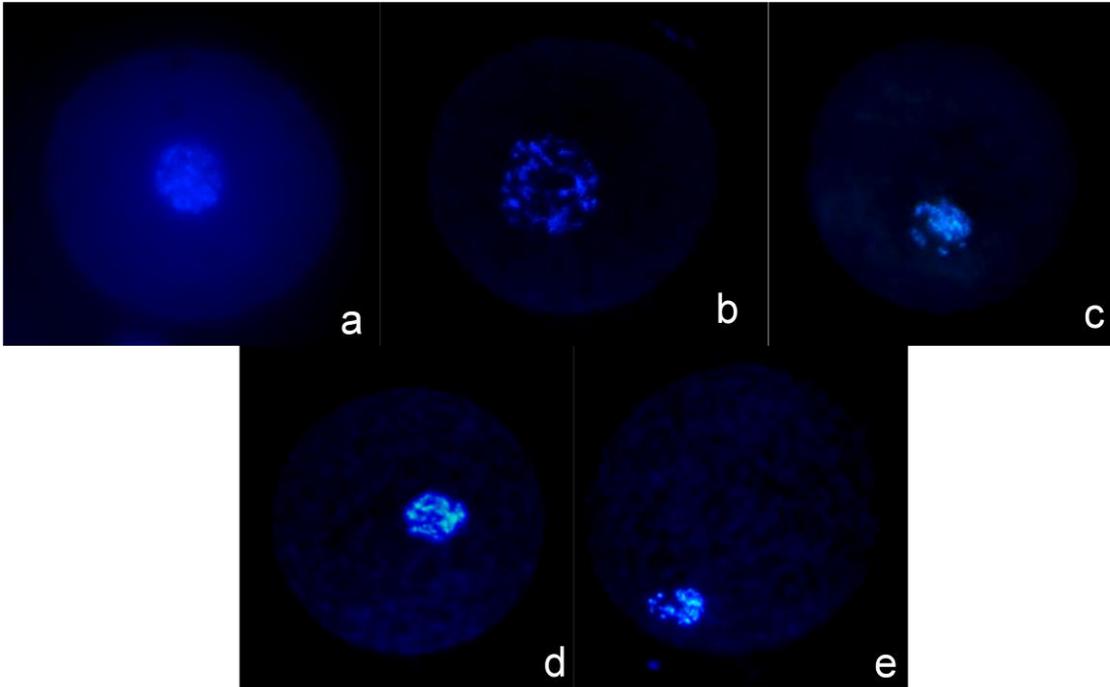


Fig. 1. Microfotografía de ovocitos caninos teñidos con diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI), observados al microscopio de epifluorescencia (x200), en la cual se observa: (a) Vesícula germinal (VG), la cromatina se encontró dispersa en el núcleo del ovocito; (b) Reinicio meiótico (VGBD), la cromatina fue encontrada en el citoplasma en proceso de compactación ; (c) Primera metafase (MI), se observan los cromosomas alineados en la placa metafásica; (d) Anafase (A), se observa la progresiva migración de los cromosomas hacia los polos; (e) Metafase II (MII), los cromosomas se encuentran alineados, acompañados de la expulsión del primer corpúsculo polar.

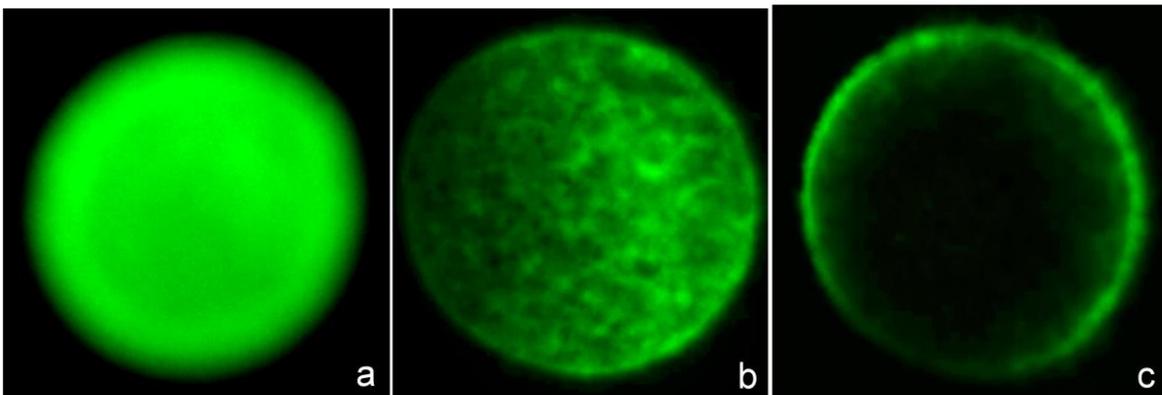


Fig. 2. Patrones de distribución de gránulos corticales de ovocitos caninos teñidos con *lectina lens culinaris* conjugada con FITC, observados al microscopio de epifluorescencia. (x200). (a) Patrón A: Homogéneo liso, marca fluorescente fina y homogénea en todo el citoplasma ovular; (b) Patrón B: Homogéneo granuloso, pequeñas agrupaciones o conglomerados de aspecto granular, distribuidos uniformemente por todo el citoplasma ovocitario; (c) Patrón C: Granuloso cortical, de aspecto granular, los gránulos se ubican inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del ovocito en todo su perímetro.

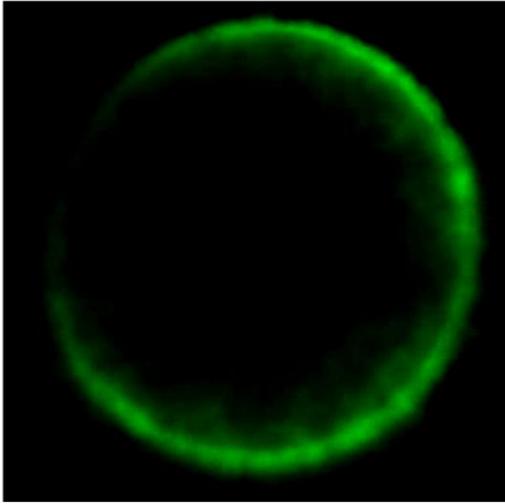


Fig. 3. Ovocito canino madurado in vivo (ovulado) , con patrón de distribución de gránulos corticales periférico, observado con microscopio de epifluorescencia (x200)

TABLA 1 Distribución de los Granúlos corticales en relación al estado de maduración nuclear, en ovocitos de perra no madurados, madurados *in vitro* por 48, 72, 96 horas, y madurados *in vivo* (ovulados). Número (% en cada grupo de maduración).

Tipos de Ovocito	Estado de Maduración Nuclear	Patrones de Distribución de GC			n total =469
		Homogéneo Liso (n=22)	Homogéneo Granuloso (n=139)	Granuloso Cortical (n=308)	
No madurados n=118	VG	n=22 (19) 22 (19)	n=96 (81) 84 (71)	n=0 —	106 (90)
	VGBD	—	10 (8)	—	10 (8)
	MI-A	—	2 (2)	—	2 (2)
	MII	—	—	—	—
Madurados 48h n=119	VG	n=0 —	n=30 (25) A 1 (1)	n=89 (75) A 3 (3)	4 (3) x
	VGBD	—	15 (13) a	37 (31) a	52 (44)
	MI-A	—	10 (8)	38 (32) a	48 (40)
	MII	—	4 (3)	11 (9) a	15 (13)
Madurados 72h n=100	VG	n=0 —	n=10 (10) B —	n=90(90) B 1 (1)	1 (1) y
	VGBD	—	4 (4) b	22 (22) b	26 (26)
	MI-A	—	6 (6)	51 (51) b	57 (57)
	MII	—	—	16 (16) b	16 (16)
Madurados 96h n=101	VG	n=0 —	n=3 (3) C —	n=98 (97) C 2 (2)	2 (2) z
	VGBD	—	1 (1) c	10 (10) c	11 (11)
	MI-A	—	2 (2)	59 (58) c	61 (60)
	MII	—	—	27 (27) c	27 (27)
Madurados <i>in vivo</i> n=31	VG	n=0 —	n=0 —	n=31 (100) —	—
	VGBD	—	—	—	—
	MI-A	—	—	3 (10)	3 (10)
	MII	—	—	28 (90)	28 (90)

Estado nuclear: VG, vesícula germinal; VGBD, reinicio meiótico; MI-A, primera metafase-anafase ;MII, segunda metafase.

A,B,C: Letras diferentes representan diferencias significativas en los totales, por tipo de ovocito dentro de un mismo patrón de distribución de los GC.

a,b,c: Letras diferentes representan diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos que presentan el mismo patrón de distribución de GC y el mismo estado nuclear entre los diferentes grupos.

x, y, z: Letras diferentes representan diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos totales, con el mismo estado nuclear, entre los diferentes tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

ADONA, P., RATTO, P., QUETGLAS, M., SCHWARZ, K., LIMA VERDE, C. 2008. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science* .108: 49-65.

APPARICIO, M., ALVES, A.E., PIRES-BUTLER, E.A., RIBEIRO, A.P.C., COVIZZI, G.J., VICENTE, W.R.R. 2011. Effects of Hormonal Supplementation on Nuclear Maturation and Cortical Granules. *Reproduction in domestic animals*. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01761.x.

AUSTIN, CR. 1956. Cortical granules in hamster eggs. *Exp Cell Res* (Citado por Yanagimashi, R. 1994. *Mammalian Fertilización*, **In:** Edited Knobil, E. y Neil, J.D., *The physiology of reproduction*, 2ª. ed., Raven Press, Ltd., Nueva York, Estados Unidos. pp 189-317).

BREVINI, T.A., CILLO, F., ANTONINI, S., GANDOLFI, F. 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science* . 98: 23-38.

CARNEIRO, G.F., LIU, I.K., HYDE, D., ANDERSON, G.B., LORENZO, P.L., BALL BA. 2002. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Molecular Reproduction and Development* . 63: 451–458.

CHERR, G., DROBNIS , E., KATZ , D. 1988. Localization of cortical granule Constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *The Journal of Experimental Zoology*. 246:81-93.

COMBELLES, C.M.H., CEKLENIK, N.A., RACOWSKY, C., ALBERTINI, D.F. 2002. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Human Reproduction . 17(4): 1006-1016

CONCANNON, P. W. 1989. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Journal Reproduction and Fertility 39: 3 – 25.

CONNORS, S.A., SHINOHARA, M.K., SCHULTZ, R.M., KOPF, G.S. 1998. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. Developmental Biology. 200:103–115.

CRAN . D.G, CHENG.W.K.T.1986. The cortical reaction in pig oocytes during in vitro and in vivo fertilization. Gamete Res 13:241-251

DAMIANI, P., FISSORE, R.A., CILELLI J.B., LONG, C.R., BALISE, J.J., ROBL, J.M., DUBY, R.T. 1996. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. Molecular Reproduction and Development. 45: 521–534.

DANDEKAR. P, TALBOT. P. 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. Molecular Reproduction and Development. 31: 135-143.

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., SEPÚLVEDA, S., MORENO, R., PARRAGUEZ, V., BARROS, C. 2007. Evaluation of cortical granules and viability of canine oocytes during long-term in Vitro maturation. *The Veterinary Record* 160: 196-198.

DE LOS REYES, M ., PALOMINO ,J., PARRAGUEZ, V.H., HIDALGO, M., SAFFIE, P. 2011 . Mitochondrial distribution and meiotic development in canine oocytes during in vitro and in vivo maturation. *Theriogenology* . 75: 346-353.

DE SOUSA, P. A., A. CAVENEY, M. E. WESTHUSIN, AND A. J. WATSON.1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. *Theriogenology* 49:115–128.

DUCIBELLA ,T., ANDERSON ,E., ALBERTINI ,D.F., AALBERG, J., RANGARAJAN,S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Development Biology* 130:184-197.

DUCIBELLA, T., DUFFY, P., BUETOW, J. 1994 Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse. *Biology of Reproduction*. 50:467-473.

DUMONT, J.N. 1975. Oogenesis in *Xenopus Laevis* (Daudin).1. Stage of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*. 136, 153-180.

EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122:829 –38.

FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175 – 186.

FELDMAN .E.C, NELSON. R.W, 1997. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In : Internal medicine (Sydney) Proceedings, vol. 284. p . 280.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology 71 : 836-648.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.S., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. 1980.What should be called a lectin?. Nature; 285: 665–6.

HOLST, P. A., PHEMISTER, R. D. 1971. The prenatal development of the dog: preimplantation events. Biology of Reproduction. 5, 194–206.

HOODBHOY , T., TALBOT, P . 1994. Mammalian Cortical Granules: Contents, Fate, and Function. Molecular Reproduction and Development 39: 439-448

HEWITT, D.A., WATSON, P.F., ENGLAND, G.C.W. 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology. 49:1083-1101.

KIM, N.H., DAY, B.N., LEE, H.T., CHUNG, K.S. 1996. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilization in the porcine oocyte. Zygote. 4:145–149.

KRISHER, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. Journal Animal Science. 82: 14-23.

KRUIP ,T.A.M., CRAN, D.G, VAN BENEDEN, T.H., DIELEMAN, S.J. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. Gamete Research. 8:29-47.

LIU , X-Y., MAL, S-F., MIAO ,D-Q., LIU, D-J., BAO, S., TAN, J-H.2005. Cortical granules behave differently in Mouse oocytes matured under different conditions. Human Reproduction 20: 3402-3415.

LUVONI, G.C., CHIGIONI, S., ALLIEVI, E., MACIS, D. 2005. Factors involved in vivo and in Vitro maturation of canine oocytes. Theriogenology 63: 41-59

LONG, C.R., DAMINANI, P., PINTO-CORREIA, C., MACLEAN, R.A.,DUBY, R.T., ROBL, J.M. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. Journal Reproduction and Fertility Supplement. 102:361-369.

MORENO, R., PALOMINO .J., DE LOS REYES, M. 2010 Golgi apparatus distribution in canine oocyte. XVI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. P 172. Concepción 18- 20 Noviembre.

NICKSON, D.A., BOYD, J.S., ECKERSALL, P.D., FERGUSON, J.M., HARVEY, M.J., RENTON, J.P., 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. Journal Reproduction and Fertility Supplement. 47: 231-40.

NIIMURA , S., HOSOE, M . 1995. Changes in cortical granule distribution within bovine oocytes during maturation and fertilization in vitro. Journal Reproduction Development 41:103-108.

SATHANANTHAN, A.H., N.G, S.C., CHIA, C.M., LAW, H.Y., EDIRISINGHE, W.R., RATNAM, S.S. 1985. The Origin and Distribution of Cortical Granules in Human Oocytes with Reference to Golgi, Nucleolar, and Microfilament Activity. Annals New York Academy of Sciences. 442: 251-264.

OTOI, T., SHIN, T., KRAEMER, D., WESTHUSIN, M.E., 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reproduction Nutrition Development*. 44, 631–637.

RAZ, T., SKUTELSKY, E., AMIHAI, D., HAMMEL, I., SHALGI, R. 1998. Mechanisms Leading to Cortical Reaction in the Mammalian Egg. *Molecular Reproduction and Development* .51:295–303 .

RENTON, J.P., BOYD, J.S., ECKERSALL, P.D., FERGUSON, J.M., HARVEY, M.J., MULLANEY, J. & PERRY, B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*) . *Journal of Reproduction and Fertility* 93, 221–231.

REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., 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.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. 2003. Influence of reproductive status on *in vitro* oocytes maturation in dogs. *Theriogenology*. 60: 59-66.

SAINT-DIZIER, M., REYNAUD, K., CHASTANT-MAILLARD, S. 2004. Chromatin, microtubules and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 68:205–212.

SONGSASEN, N., WILDT, D.E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in Vitro maturation Systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science* 98: 2-22.

SCHATTEN .G., SCHATTEN. H. 1981. Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization: microfilament inhibitors prevent sperm incorporation and reconstructing of the fertilized egg cortex, whereas microtubule inhibitors prevent pronuclear migrations. *Experimental Cell Research*. 135:311–330.

SUN, Q-Y.2003. Cellular and Molecular Mechanisms Leading to Cortical Reaction and Polyspermy Block in Mammalian Eggs. *Microscopy Research and Technique* 61:342-348.

TAKANO, H., KANDA, C., NIIMURA, S. 2002. The relationship between nuclear maturation and cortical granule distribution in cultured porcine oocytes. *Journal. Mammalian, Ovarian Research*. 19 : 21-25.

TSUTSUI , T. 1975. Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviducto. *Japan Journal of Animal Reproduction*. 21: 70-75.

VALENTINI ,L., IORGA, A.I., DE SANTIS, T., AMBRUOSI ,B., REYNAUD, K., CHASTANT-MAILLARD, S., GUARICCI, A.C., CAIRA ,M., DELL'AQUILA, M.E. 2010.Mitochondrial distribution patterns in canine oocytes as related to the reproductive cycle stage. *Animal Reproduction Sciences*; 117: 166-177.

VIARIS DE LESEGNO, C., REYNAUD, K., PECHOUX, C., THOUMIRE, S., CHASTANT-MAILLARD, S. 2008a. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 75:115-125.

VIARIS DE LESEGNO, C., REYNAUD, K., PECHOUX, C., CHEBROUT, M., CHASTANT-MAILLARD, S. 2008b. Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 20: 626-639.

WANG WEI-HUA., SUN QING-YUAN, HOSOE MISA., SHIOYA YASUO., DAY BILLY N. 1997a. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction* 56, 1376-1382.

WANG WEIHUA., HOSOE MISA., LI RONGFENG., SHIOYA YASUO. 1997b. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Development Growth Differentiation*. 39, 607-615.

WARD, C.R., KOPF, G.S. 1993. Molecular events mediating sperm activation. *Developmental Biology*. 158: 9-34

WASSARMAN, P.M. 1989. "La fecundación en los mamíferos". *Investigación y Ciencia*, 149: 48-55.

WASSARMAN , P. 1996 . Oogenesis , **In:** Edited by E. Y. A. Rock, and Z. Rosenwaks ,*Reproductive Endocrinology. Surgery, and Technology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, Estados Unidos. pp 342-357.

YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y. 1992. Maturation, Fertilization, and Development of Dog Oocytes In Vitro. *Biology of Reproduction*. 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 47: 227 – 229.

YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian Fertilization, **In:** Edited Knobil, E. y Neil, J.D., *The physiology of reproduction*, 2ª. ed., Raven Press, Ltd., Nueva York, Estados Unidos. pp 189-317.

YOSHIDA, M., CRAN ,D.G., PURSEL, V.G. 1993 .Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 36(4):462-8.

PICTON. H., BIGGS. D., GOSDEN. R . 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145: 27-37.

VELILLA. E., IZQUIERDO.D., RODRIGUEZ-GONZALES. E., LOPEZ-BEJAR.N., VIDAL.F., PARAMIO.M.T. 2004. Distribution of prepuberal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. *Molecular Reproduction and Development* 68: 507-514.

