

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

**ESTUDIO DE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS
PROVENIENTES DE FOLÍCULOS OVÁRICOS EN DIFERENTES ESTADOS DEL
DESARROLLO A TRAVÉS DEL CICLO ESTRAL**

Karla Paz Aspée Mallanes

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinaria

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MÓNICA DE LOS REYES

Profesora Titular, Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1140658

Santiago, Chile

2016



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

**ESTUDIO DE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS
PROVENIENTES DE FOLÍCULOS OVÁRICOS EN DIFERENTES ESTADOS DEL
DESARROLLO A TRAVÉS DEL CICLO ESTRAL**

Karla Paz Aspée Mallanes

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinaria

Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:.....

FIRMA

PROFESOR GUÍA : Mónica De Los Reyes S.....

PROFESOR CONSEJERO : Víctor Parraguez G.....

PROFESOR CONSEJERO : Oscar Peralta T.....

Mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Mónica De Los Reyes por darme la oportunidad de trabajar junto a su equipo en su laboratorio, ser una gran guía y entregarme las herramientas, conocimientos y confianza para el desarrollo de este proyecto.

Al Doctor Jaime Palomino por la dedicación de su tiempo y entrega de sus conocimientos durante todo el tiempo de trabajo.

A mi compañero de laboratorio y de trabajo Igor Astudillo por su apoyo, compañerismo y colaboración día a día. Además a mis otros compañeros tesistas Tomas Fernández y Fernando Ramírez por su buena disposición a compartir sus conocimientos y experiencia.

También agradecimientos a quienes formaron parte de una u otra forma del funcionamiento del laboratorio: Sra. Norma San Martín, Sra. Corina Norambuena y Sr. Luis Nauto. Igualmente al Centro de Atención Primaria Santo Tomas y Centro de Salud Veterinaria el Roble por facilitarme las muestras.

Muchas gracias a mi familia quienes me dieron la oportunidad de acercarme a lograr mi gran sueño de ser Médico Veterinaria, por su paciencia, apoyo y confianza incondicional en mis capacidades como persona y como profesional. A mis amigos tanto de la facultad como los externos, por su apoyo y entrega de energías positivas cada vez que fueron necesarias.

Y finalmente agradecer a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por entregarme las herramientas que me permitirán ser una gran profesional de la Medicina Veterinaria, una profesión rica en conocimientos, llena de humanidad y con grandes desafíos en el futuro de los cuales me gustaría ser parte

Resumen

La tasa de maduración *in vitro* de ovocitos (IVM) caninos ha sido tradicionalmente baja. En el presente estudio se propuso evaluar la IVM de ovocitos caninos considerando el desarrollo folicular desde donde provenían los ovocitos y las etapas del ciclo estral. Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de perras ovariectomizadas. Mediante las estructuras ováricas y progesterona plasmática se identificaron los estados del ciclo (Anestro, Proestro/Estro y Diestro) y el desarrollo folicular: preantral, antral chico, antral mediano y antral grande. De cada tamaño folicular se recolectaron ovocitos que se incubaron para maduración por 72 h en medio TCM-199 suplementado. El estado nuclear fue clasificado en vesícula germinal (VG), reinicio meiótico (GVBD) y metafase I y II (MI-MII). Los resultados se analizaron por ANOVA evaluando el estado nuclear de acuerdo al desarrollo folicular y ciclo reproductivo. El desarrollo folicular y estado reproductivo influyeron ($P < 0.05$) en el desarrollo meiótico. Los mayores porcentajes de ovocitos en MI-MII correspondieron a perras en Proestro/Estro y Diestro ($P < 0.05$) y de folículos antrales ($P < 0.05$). En Anestro, se obtuvo el mayor porcentaje de ovocitos en VG ($P < 0.05$), correspondiendo a ovocitos ($P < 0.05$) de folículos preantrales. La etapa del ciclo estral influyó el desarrollo meiótico independiente del tamaño folicular, siendo Proestro/Estro y Diestro las etapas con mayores tasas de MI-MII. Independiente de la etapa del ciclo, los tamaños foliculares con mayor desarrollo meiótico fueron los ovocitos de folículos antrales, principalmente medianos y grandes, indicando que la procedencia de los ovocitos influye en la capacidad de maduración *in vitro*.

Abstract

Canine *in vitro* maturation rate (IVM) has been traditionally low. In the present study evaluated the IVM of canine oocytes, considering the stage of the follicular development and the phases of the estrous cycles. The oocytes were collected from ovaries from ovariectomized bitches according sizes of developing follicles throughout the estrus cycle. The phases of the estrous cycle (anestrus, proestrous/estrus and diestrus) were assessed by evaluating the presence or absence of follicles and corpus luteum on the ovarian surface and by progesterone analysis. The oocytes were incubated for IVM for 72 h

in a supplemented TCM-199. The nuclear development was classified in germinal vesicle (GV), meiotic resumption (GVBD) and metaphase I and II (MI-MII). The results were analyzed by ANOVA. The follicular development and reproductive phase influenced the oocyte meiotic development ($P < 0.05$). The highest rates of oocytes in MI-MII were mostly from dogs in Proestrus/Estrus and Diestrus ($P < 0.05$), in antral stage. In Anestrus, the mayor percentage ($P < 0.05$) of oocytes remained at GV, being mainly at preantral follicles stage ($P < 0.05$). The reproductive phases influenced the meiotic development regardless the follicular size. The oocytes from bitches at proestrus/estrus and diestrus phases showed the highest rates of MI-MII. Independently the reproductive phases, the highest advance in meiotic development were observed in oocytes from antral follicles, mostly medium and large, indicating that the source of oocytes influences the ability of *in vitro* maturation.

1. Introducción

La perra doméstica es monoestrica no estacional, ovula una o dos veces al año. Su ciclo se divide en cuatro etapas: Proestro, Estro, Diestro y Anestro. El Proestro y el Estro, tienen en promedio nueve días de duración cada uno. La etapa de Anestro puede durar de dos a diez meses y el Diestro o fase luteal dura en promedio 63 días (Concannon, 2011). Dentro de las características reproductivas de la perra, destacan ciertos aspectos que la diferencian del resto de los mamíferos domésticos, donde se destaca la ovogénesis/foliculogénesis que comienza luego de su nacimiento, por lo que recién a los cinco a seis meses de edad se pueden encontrar folículos antrales pequeños (Hasegan *et al.*, 2012). Además, la luteinización folicular en la perra es preovulatoria, comenzando en proestro, por lo que se observa un aumento de los niveles de progesterona previo al alza de LH con un consecuente descenso de los niveles de estrógenos (Concannon, 2009; Hasegan *et al.*, 2012)

La ovulación en la perra es una de las características reproductivas más importantes que la diferencian de otras hembras, ya que ocurre con un ovocito en estado de vesícula germinal (GV) en la profase de la primera división meiótica (VG) (Concannon, 2011) y no en etapa de segunda metafase (MII) como ocurre en otras especies (Dumesic *et al.*, 2016). El reinicio meiótico ocurre en el oviducto y el estado de segunda metafase (MII) se alcanza alrededor de las 48 a 96 horas posterior a la ovulación (Rodrigues y Rodrigues. 2003;

Reynaud *et al.*, 2009; 2005). La adquisición de la capacidad meiótica se ha asociado a los niveles hormonales preovulatorio (Rodrigues y Rodrigues, 2003; Fernandez *et al.*, 2016) y a la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo (Luvoni *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2005). No obstante, aún no ha sido posible esclarecer completamente las condiciones que permiten al ovocito alcanzar la MII.

Estas características reproductivas de la perra y la falta de conocimientos respecto a las características especie-específicas de un proceso fisiológico complejo y largo, han hecho que el cultivo *in vitro* de los ovocitos caninos tenga una muy baja tasa de éxito en relación a otros mamíferos (Sha *et al.*, 2010), en términos del porcentaje de ovocitos que logran llegar a MII. En la perra, si bien el rango de éxito va de un 5% - 50% (Rodrigues y Rodrigues, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005; Otoi, *et al.*, 2007; Evecen *et al.*, 2010) en general no se supera el 15% como promedio. Por este motivo obtener ovocitos maduros parece ser la principal limitante en el desarrollo de biotecnologías en esta especie (De los Reyes *et al.*, 2013). Lo complejo del cultivo *in vitro* de ovocitos de perra se debe principalmente a la dificultad de poder imitar *in vitro* las condiciones *in vivo*.

En la perra, no se ha logrado determinar claramente la influencia de la etapa del ciclo estral sobre la maduración *in vitro* de ovocitos, existiendo aún controversia entre los diferentes estudios. Algunos estudios señalan que el estado reproductivo no afectaría la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos, influyendo sólo el porcentaje de ovocitos con características morfológicas que favorecen el desarrollo meiótico en cultivo (Rodrigues y Rodrigues, 2003; Songsasen y Wildt., 2005). Otros estudios señalan diferencias entre las distintas etapas (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Evecen *et al.*, 2010).

La etapa de Anestro se caracteriza por tener una duración larga, entre dos a diez meses (Concannon, 2011), lo que implica que el mayor porcentaje de ovarios obtenidos para maduración de ovocitos en el cultivo provienen de perras en esta fase. En este periodo se inicia el crecimiento folicular (Hasegan *et al.*, 2012), con un mayor porcentaje de folículos preantrales que contienen ovocitos que probablemente aún no tengan la competencia meiótica o de desarrollo (De los Reyes *et al.* 2013). Se han observado cambios en la expresión de factores como BMP-15 y GDF-9 en la etapa de Anestro que sugieren que en esta etapa del ciclo ocurre la selección de los folículos que continuarán su

crecimiento ya que se detectó una mayor expresión del factor GDF-9 en relación a las otras etapas del ciclo, este factor se ha asociado a inicio del crecimiento folicular (Fernandez *et al.*, 2016).

La técnica de recolección de los ovocitos podría tener una influencia importante sobre las tasas de éxito del cultivo *in vitro* de ovocitos de perra. En el resto de los mamíferos la aspiración del folículo es la técnica de elección; pero en el caso de la perra los ovarios son demasiado pequeños para su manipulación y es difícil visualizar los folículos. Por este motivo la técnica de elección ha sido el “Slicing” o cortes finos del ovario (Reynaud *et al.*, 2009) la cual selecciona sólo los ovocitos en base a criterios morfológicos: citoplasma oscuro y homogéneo, con un diámetro del ovocito mayor a 100 μm y al menos dos o tres capas de las células del cúmulo rodeando al ovocito (Otoi *et al.*, 2007), genéricamente conocidos como “Ovocitos tipo 1”, siendo estos ovocitos los que se seleccionarán para los cultivos *in vitro*. Por lo tanto, es muy probable que los principales ovocitos recolectados aún no tengan la competencia meiótica (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Durrant *et al.*, 1997) ya que provienen de folículos preantrales.

Estudios en otras especies han observado que los ovocitos van adquiriendo la competencia meiótica a lo largo del desarrollo folicular (Blondin y Sirard, 1995; Pangas *et al.*, 2015). Esto es concordante con lo observado en un estudio realizado por Songsasen y Wildt 2005 en donde señalan que ovocitos de perra provenientes de folículos de más de 2 mm de diámetro tendrían mejores porcentajes de maduración nuclear (MII).

Debido a lo complejo de la maduración *in vitro* de ovocitos de perra y lo poco eficiente de las técnicas utilizadas hasta la fecha, se hace necesario estudios en relación a la influencia que tendría la etapa de desarrollo folicular del ovocito y las diferencias en las distintas etapas del ciclo estral. Es por esto que en este trabajo el objetivo fue evaluar el desarrollo meiótico *in vitro* de los ovocitos de acuerdo al desarrollo folicular en las diferentes etapas del ciclo.

2. Materiales y método

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Las muestras fueron procesadas y obtenidas según el protocolo aprobado por los comités de bioética de FONDECYT y FAVET.

2.1. Procesamiento de muestras

Los ovarios se recolectaron de perras ovariectomizadas en los Centros de Atención primaria Santo Tomás y de Salud Veterinaria El Roble, Universidad de Chile. Se utilizaron 61 perras clínicamente sanas entre 8 meses a 6 años de edad, en diferentes estados del ciclo reproductivo. Inmediatamente después de realizada la cirugía, los ovarios fueron transportados en solución salina 0,9% NaCl suplementado con 50 µg/mL de estreptomicina 100 IU (Sigma, St. Louis, MO, USA) y penicilina G sódica (Sigma) (De los Reyes *et al.*, 2012) a 38 °C. En el Laboratorio los ovarios se lavaron en solución buffer fosfato salina (PBS) (KCl 0.02% (Fluka, Buchs, Suiza), Na₂HPO₄ 0.142% (Merck, Darmstadt, Alemania), NaCl 0.9% (Merck, Darmstadt, Alemania), KH₂PO₄ 0.024% (Merck, Darmstadt, Alemania)) en agua pura MILLIQ (Thermo Scientific, Barnstead Smart2Pure, Hungría) a un pH entre 7,2 – 7,4 (De los Reyes *et al.*, 2011). Se seleccionaron los ovarios que no presentaron alteraciones visibles como quistes, tumores o malformaciones de cualquier índole y las muestras fueron procesadas en un tiempo menor a dos horas tras la cirugía.

La etapa del ciclo se evaluó mediante la visualización de las estructuras ováricas predominantes (folículos o cuerpos lúteos), de acuerdo a estudios previos (Figura 1) (Fernández *et al.*, 2016). Además de un análisis de Progesterona sérica de una muestra de 5mL de sangre obtenidas durante la cirugía. Estas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. El plasma se mantuvo a -20 °C hasta su utilización. Para su análisis se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (PHomo Microplate Reader; Autobio Labtec Instruments, Zhenghaidong, China) con un kit de progesterona (P4) canina (Prog ELISA Kit, MyBioSource; San Diego, CA, USA) (Fernández *et al.*, 2016).

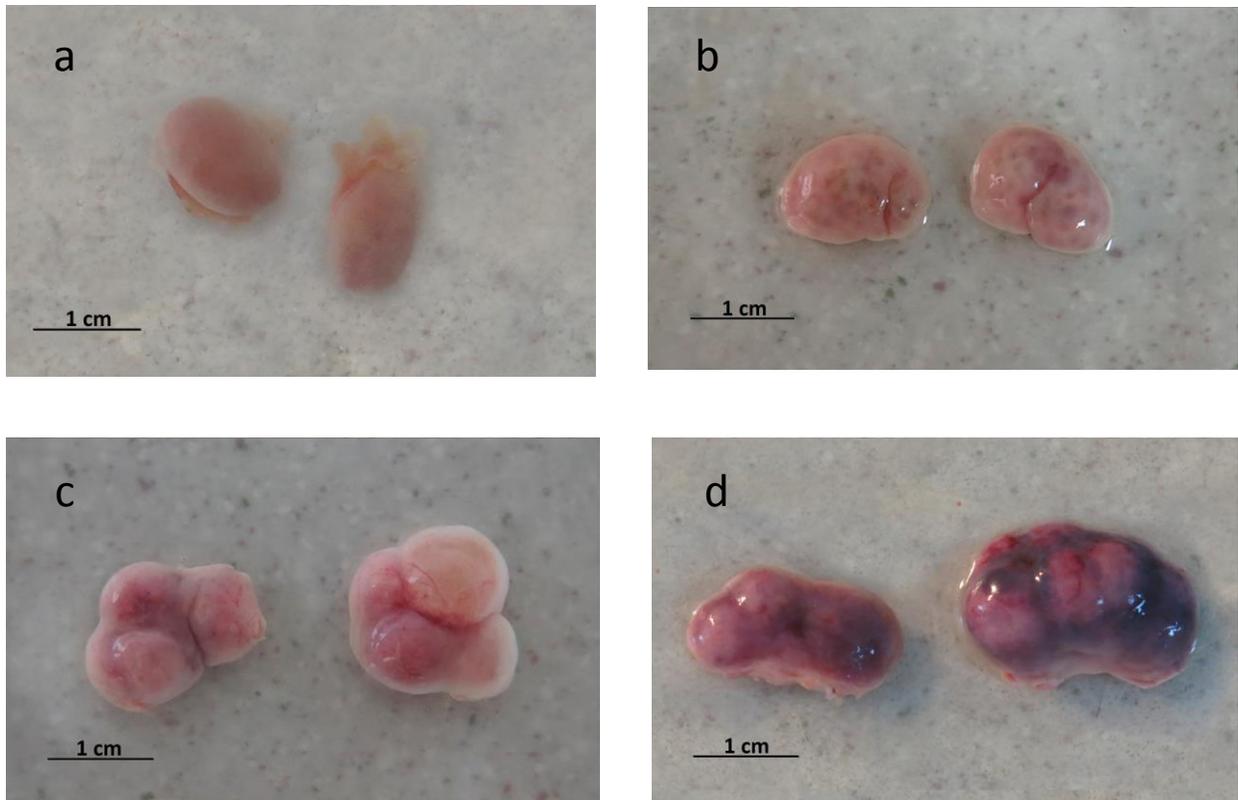


Figura 1: Ovarios de perra en las diferentes etapas del ciclo estral: a. Anestro: se observa un ovario pálido sin estructuras de desarrollo folicular o cuerpo lúteo; b. Proestro: se observan macroscópicamente folículos en crecimiento; c. Estro: evidencia de folículos antrales preovulatorios; d. Diestro: se observa la presencia de cuerpos lúteos. Barra = 1 cm.

2.2. Recolección de Ovocitos

Cada ovario se seccionó en trozos utilizando un bisturí N°2 para posteriormente bajo una lupa estereoscópica (Krüss Optronic GmNH, Alemania) y un ocular cuadriculado (American optical company, Buffalo, NY, USA) identificar los folículos según su estado de desarrollo en preantrales (≈ 0.2 mm), antral pequeño ($\approx 0.2 - 0.4$ mm), antral mediano ($\approx 0.4 - 6$ mm) y antral grande o preovulatorio ($\approx 6 - 10$ mm) (Figura 2).

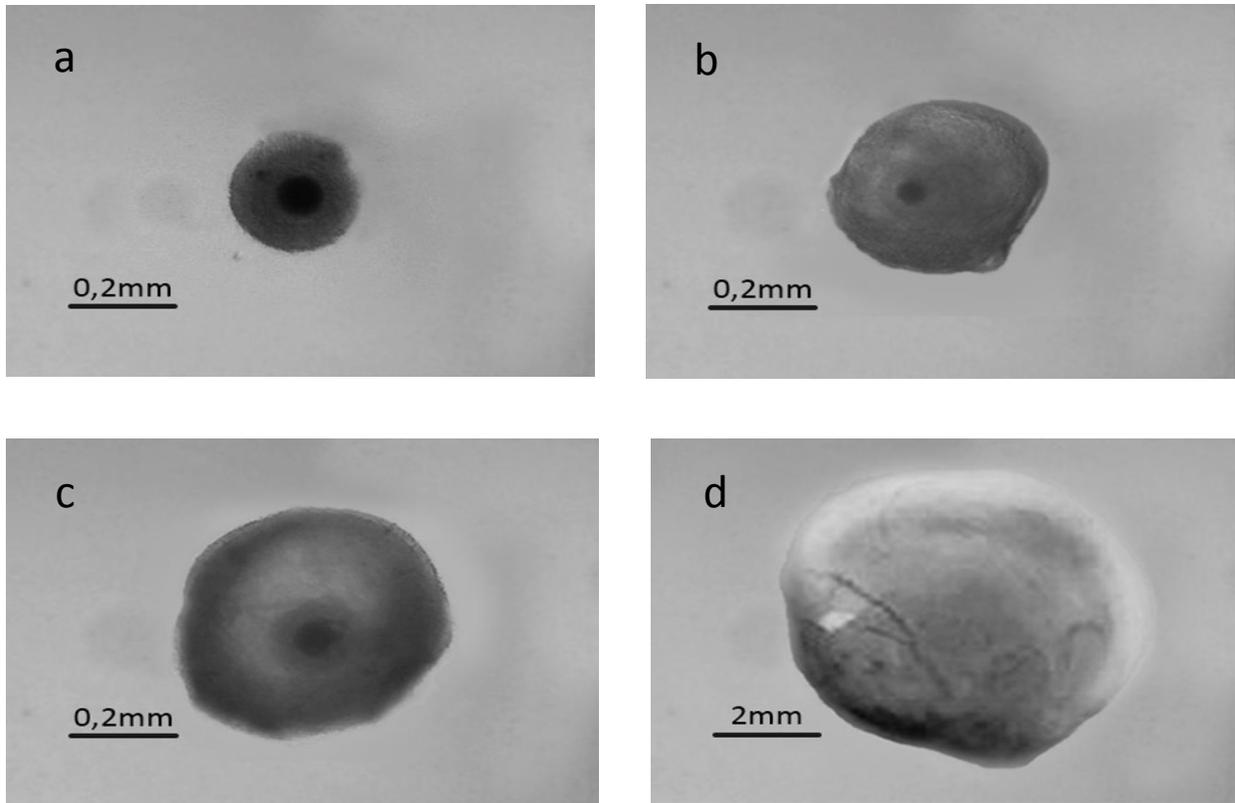


Figura 2: Etapas del desarrollo folicular: a. Folículo Preantral, no presenta cavidad antral; b. Folículo antral pequeño, donde ya se observa el desarrollo de cavidad antral; c. Folículo antral mediano con una cavidad antral a mitad del desarrollo; d. Folículo antral grande o preovulatorio, con cavidad antral grande y disminución de la transparencia del folículo.

Luego de identificar los folículos (Figura 2), se recolectó cada ovocito mediante una pequeña perforación en los folículos con una aguja 25G unida a una jeringa de 1mL (BD Plastipak, Curitiba, Brasil) y con la ayuda de una pipeta pasteur de punta fina se aspiraron y se trasladaron a capsulas de cultivo (4 cm) de vidrio con PBS suplementado con suero fetal bovino 10% (FCS) (Sigma, St. Louis, MO, USA), previamente entibiado a 38° C. Posteriormente los ovocitos en cápsulas con PBS suplementado fueron trasladados a la sala de cultivo bajo ambiente estéril.

2.3. Cultivo de ovocitos *in vitro*

En la sala de cultivo, con una lupa estereoscópica (Meiji Techno SKT, Miyoshi, Iruma Japón) en una cámara de flujo laminar (Quimis, Diadema, Brasil) los ovocitos se lavaron 2 veces dentro de una placas de cultivo (Falcon, USA) con medio de cultivo tisular (TCM 199: sal de Earle, tamponada con 25 mM HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con Suero Fetal Bovino 10% (FCS) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,25 mM de piruvato (Sigma), 10 UI mL⁻¹ de hCG (Sigma), 100 UI mL⁻¹ de penicilina (Sigma) y 20 mg/mL⁻¹ de estreptomina (Sigma) (De los Reyes *et al.*, 2013). El medio de cultivo fue preparado dos horas previas dejándolo en la estufa de cultivo para su adaptación. Posteriormente se filtró con membrana de 0,22 μm (Biofil Syringe Filter, Hong kong, China). En cada replica experimental, no más de 10 ovocitos se incubaron en gotas de cultivo de 100 μL del medio anteriormente mencionado, las que se cubrieron con aceite mineral estéril (Sigma, St. Louis, MO, USA) y se mantuvieron en la estufa (Forma Cientific, Marietta, OH, USA) por 72 horas a 38 °C y 5% de CO₂ y máxima humedad (De los Reyes *et al.*, 2011).

2.4. Fijación de los ovocitos

Posteriormente al cultivo, con una pipeta pasteur de punta fina, se depositaron los ovocitos en cápsulas desechables (Falcon, USA) con PBS, desnudándolos de sus células del cúmulo hasta separarlos completamente de estas. Luego, los ovocitos se pusieron en solución de paraformaldehído (4%) por 20 minutos para fijación. Posteriormente, se hicieron dos lavados en PBS por 5 minutos cada uno, se tiñeron con una solución 1 μg de 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) en 1 mL de PBS por 20 minutos, bajo oscuridad. Lavándolos posteriormente en solución PBS por 5 minutos dos veces.

Finalmente, los ovocitos se depositaron en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) y se cubrieron con el cubre objeto dispuesto sobre cuatro puntos de una mezcla de parafina con vaselina.

2.5. Evaluación del desarrollo meiótico

Los ovocitos se evaluaron en el microscopio de epifluorescencia de luz invertida (Olympus IX71, Miami, FL, USA) (UV emission 480 nm), equipado con una lámpara IX2-RFA y una cámara ProgRes-Capture Pro (Alympus, Tokyo, Japan) del Laboratorio de Reproducción. Los ovocitos se clasificaron según el estado de desarrollo meiótico descrito previamente (De Los Reyes *et al.*, 2011) como se muestran en la Figura 3: A. Vesícula germinal (VG) cuando la vesícula está claramente visible; B. Reanudación meiótica (GVBD), cuando la cromatina está dispersa e iniciando la condensación; C. Metafase (MI) a telofase de la primera división meiótica, cuando los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial; y D. metafase de la segunda división meiótica (MII), la cual se manifiesta por la presencia de cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito, con el primer cuerpo polar extruido. Los ovocitos con una distribución de cromatina irregular o cromatina anormal, en los que no sea posible evaluar su desarrollo, se consideraron como ovocitos no evaluables.

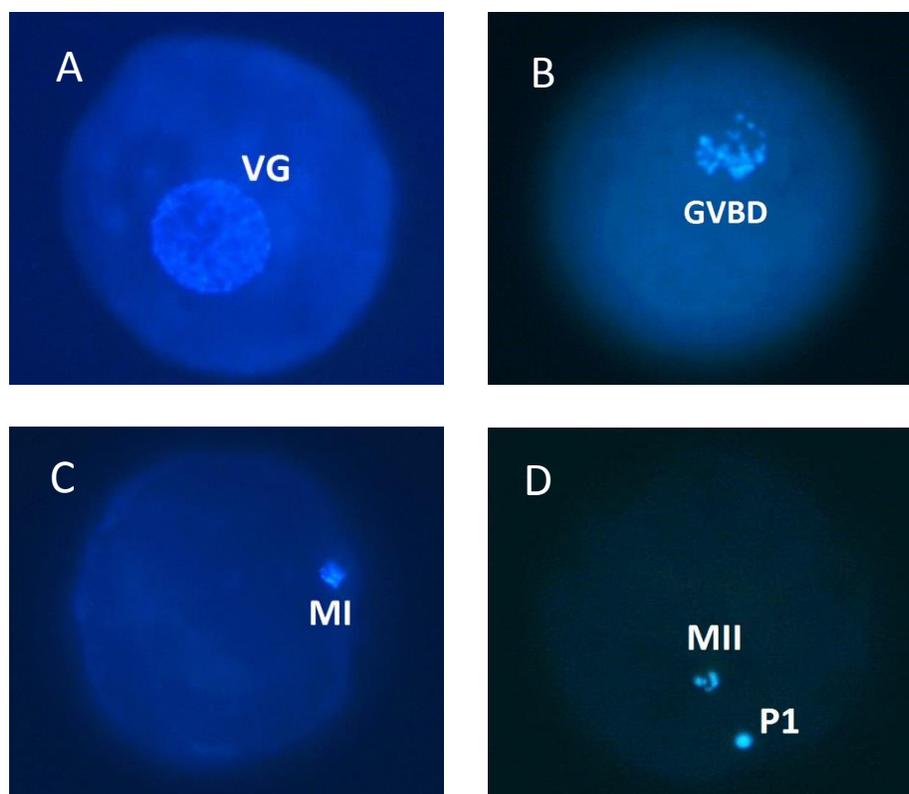


Figura 3. Microfotografías microscopio de epifluorescencia de ovocitos de perra con tinción DAPI en las distintas etapas del desarrollo meiótico. A. Vesícula germinal o Profase I (VG); B. Reinicio meiótico (GVBD); C. Metafase I (MI); D. Metafase II (MII) con Primer cuerpo polar (P1)

2.6. Análisis estadístico

El desarrollo meiótico (VG, GVBD, MI-MII) alcanzado por los ovocitos en las diferentes fases del ciclo estral (anestro, proestro/estro y diestro) y a través del desarrollo folicular (preantral, antral chico, antral mediano y antral grande) expresados como porcentaje, se transformaron por $\sqrt{\%}$ previo al análisis. Los resultados se evaluaron por ANOVA y prueba de Duncan para determinar las diferencias. Se utilizó el programa InfoStat versión 2015 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se consideró un nivel de significancia de $P \leq 0,05$.

3. Resultados

El número de perras evaluadas, en las diferentes etapas del ciclo estral y la cantidad de ovocitos recolectados en los diferentes tamaños foliculares y los ovocitos evaluables se muestran en la Tabla 1. Los resultados en el desarrollo nuclear obtenidos de acuerdo al tamaño folicular y ciclo estral se muestran en la Tabla 2.

Se evaluaron un total de 61 perras en las diferentes etapas del ciclo estral y un total de 450 ovocitos (Tabla 1), que correspondió a un 49.5% del total de ovocitos recolectados de los diferentes tamaños foliculares.

Tabla 1: Número de perras donantes, número de ovocitos evaluados en los diferentes tamaños foliculares y número de ovocitos evaluados en cada etapa del ciclo estral.

Etapa del Ciclo	Perras	PA	AP	AM	AG	Ovocitos evaluados
Anestro	15	34	58	41	-	133
Proestro-Estro	16	16	31	41	18	106
Diestro	30	31	84	96	-	211

PA, Folículo Preantral; AP, Folículo antral pequeño; AM, Folículo antral mediano; AG, Folículo antral grande.

Los ovocitos evaluados por etapa del ciclo mostraron diferencias en su capacidad de alcanzar las distintas etapas del desarrollo meiótico. Igualmente el tamaño folicular también influencia la competencia meiótica, esto independiente de la etapa del ciclo. (Tabla 2)

Tabla 2. Porcentaje de desarrollo meiótico de ovocitos caninos maduradores *in vitro*, desde folículos en las diferentes etapas del desarrollo y las diferentes etapas del ciclo estral.

Etapa del Ciclo	Folículos	Desarrollo Meiótico (%)			Evaluados (n=450)	Total
		VG (n=121)	GVBD (n= 145)	MI – MII (n=184)		
Anestro (n=133)	PA	58.8 ^a	38.2	2.9 ^a	34	89
	AP	31 ^{ab}	24.1	44.8 ^b	58	91
	AM	21.9 ^b	26.8	51.2 ^b	41	67
Proestro-Estro (n=106)	PA	50 ^a	31.2	18.7 ^a	16	38
	AP	32.2 ^a	19.3	48.3 ^{ab}	31	87
	AM	4.8 ^b	31.7	63.4 ^b	41	83
	AG	5.5 ^b	22.2	72.2 ^b	18	32
Diestro (n=211)	PA	48.3 ^a	35.4	16.1 ^a	31	73
	AP	26.1 ^a	35.7	38 ^b	84	186
	AM	16.6 ^b	39.5	43.7 ^b	96	163

Estado nuclear: VG, vesícula germinal; GVBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. PA, folículo preantral; AP, folículo antral chico; AM, folículo antral mediano; AG, Folículo antral grande. a-b: los valores con diferentes superíndice son diferentes entre los distintos tamaños foliculares dentro de la respectiva etapa del ciclo ($P < 0.05$).

En la figura 4 se observa el porcentaje de ovocitos que alcanzaron las diferentes fases de la meiosis en las distintas etapas del ciclo estral, independiente del tamaño folicular. Los mayores porcentajes de ovocitos que permanecieron como VG se observaron en perras en Anestro y Diestro y las mayores tasas de metafase I y II se alcanzan en perras en Proestro-Estro y en Diestro.

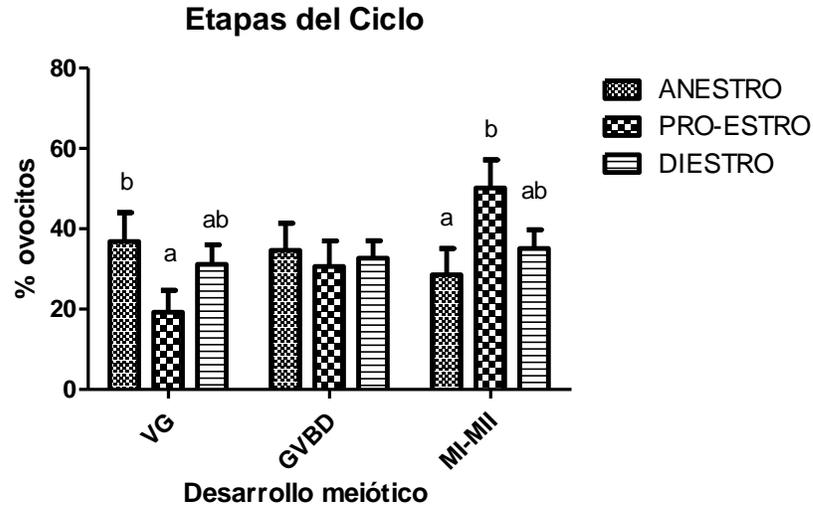


Figura 4: Desarrollo meiótico de ovocitos en las diferentes etapas del ciclo estral de la perra. Estado nuclear: VG, vesícula germinal; GVBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. Pa, Folículo Preantral; AP, Folículo antral chico; AM, Folículo antral mediano; AG, Folículo antral grande. a-b: Las barras con diferente letra son significativamente diferentes. $P < 0.05$

En la figura 5, se muestra el porcentaje de ovocitos que alcanzaron las diferentes etapas del desarrollo meiótico según los diferentes tamaños foliculares en cada una de las etapas del ciclo.

En Anestro (figura 5a), los ovocitos provenientes de folículos preantrales y antrales pequeños en su mayoría permanecieron como VG ($P < 0,05$) y los ovocitos que alcanzaron las mayores tasas de MI-MII correspondieron a ovocitos de folículos antrales chicos y medianos, en comparación con los preantrales ($P < 0,05$).

En las etapas de Proestro y Estro (figura 5b) los ovocitos recolectados de folículos preantrales y antrales pequeños permanecieron en mayor porcentaje en estado de VG ($P < 0,05$). Los ovocitos provenientes de folículos antrales, chicos, medianos y grandes alcanzaron las mayores tasas de MI-MII ($P < 0,05$)

En Diestro (figura 5c) los ovocitos obtenidos desde folículos preantrales y antrales pequeños permanecieron mayoritariamente como VG (P <0,05) y los que alcanzaron los más altos porcentajes de MI-MII fueron los ovocitos de folículos antrales chicos y medianos (P <0,05).

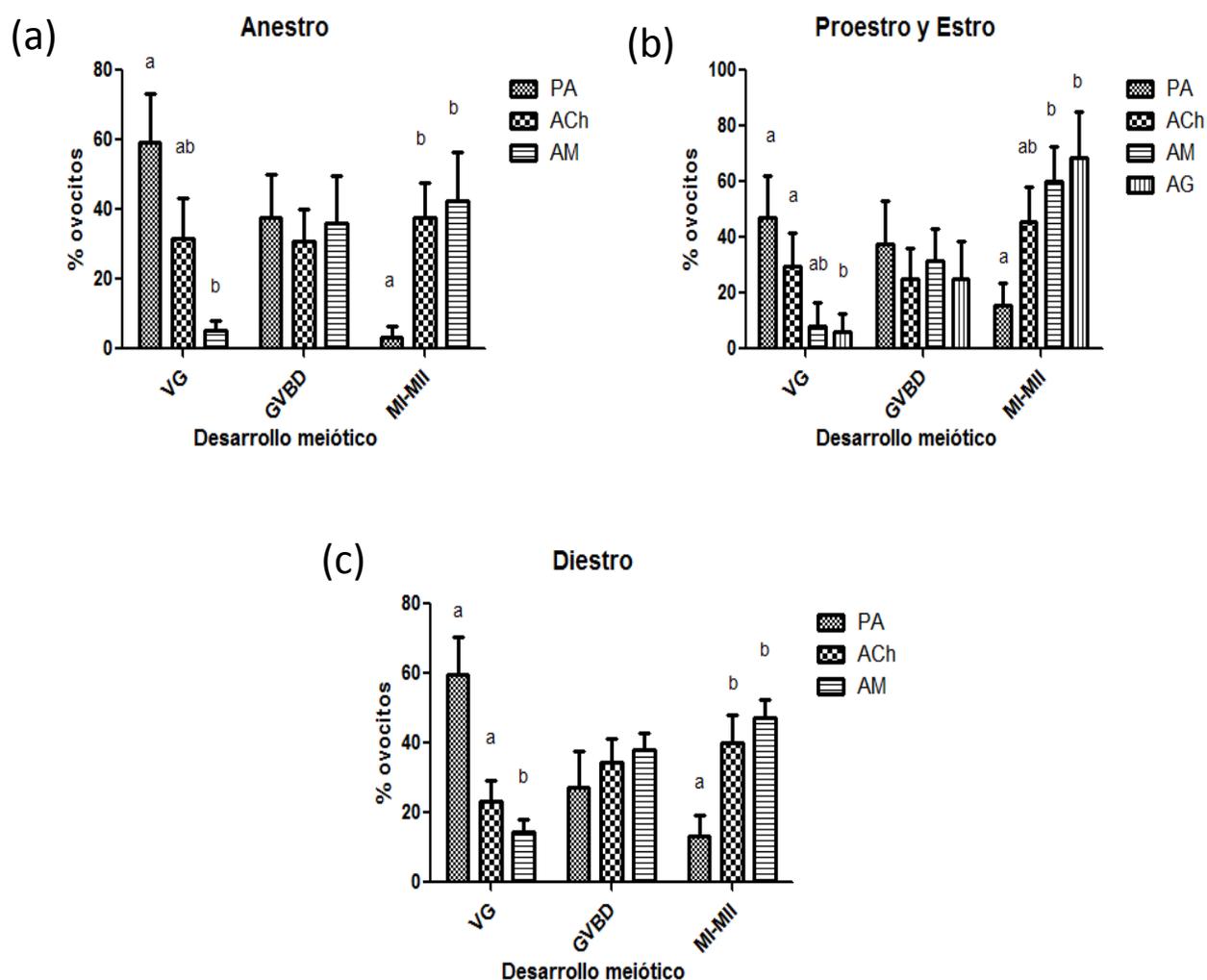


Figura 5: Desarrollo meiótico de los ovocitos provenientes de las distintas etapas del desarrollo folicular en a) Anestro, b) Proestro-Estro y c) Diestro. a-b: Las barras con diferente letra son significativamente diferentes P<0,05.

En la figura 6, se muestra el porcentaje de ovocitos que alcanzaron las diferentes etapas del desarrollo meiótico en cada etapa del ciclo según el tamaño folicular.

Los ovocitos provenientes de folículos preantrales (figura 6a), antrales chicos (figura 6b) y antrales medianos (figura 6c), en las diferentes etapas del ciclo no mostraron diferencias en su capacidad de desarrollo nuclear dentro de cada una de las etapas del ciclo ($P > 0,05$).

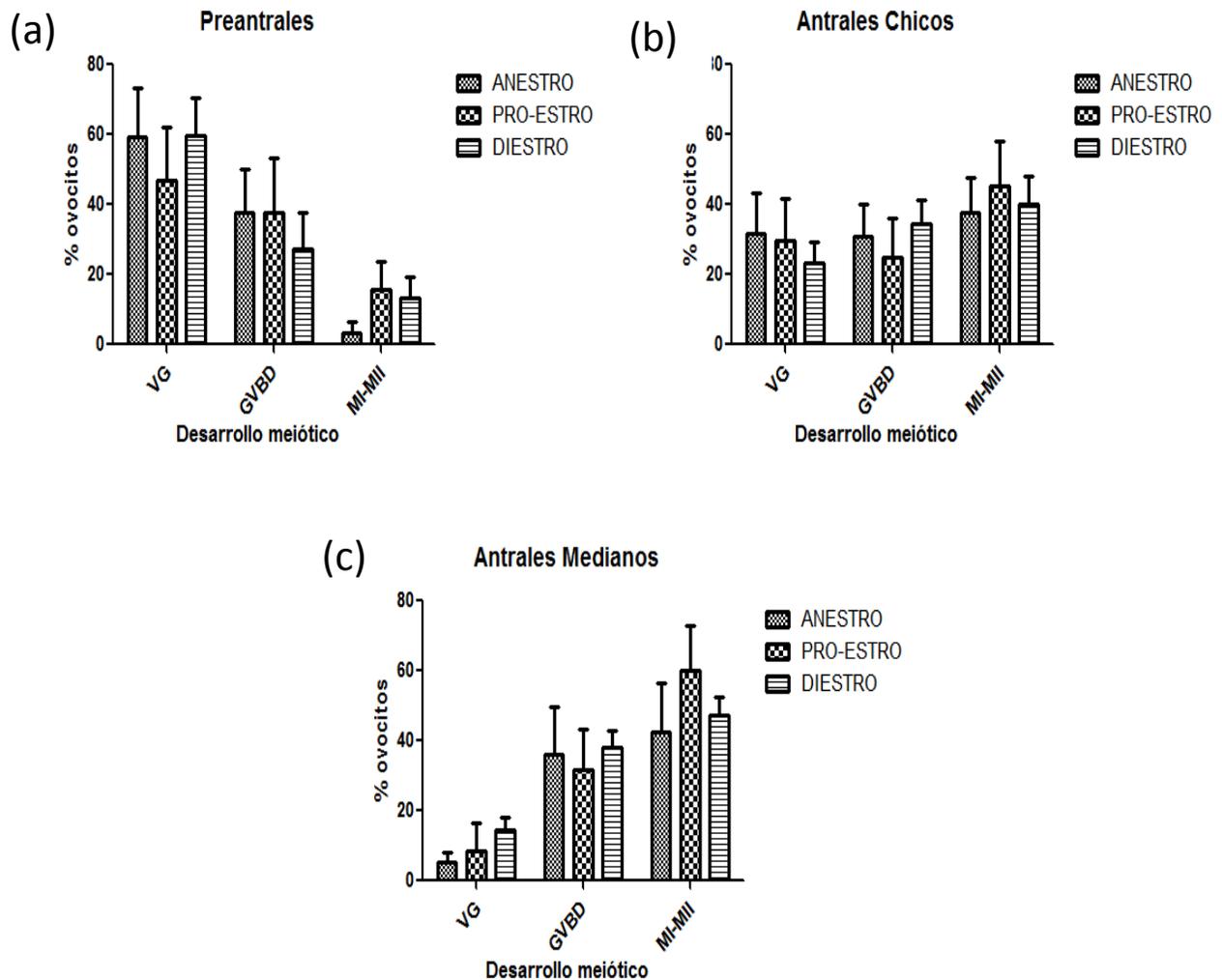


Figura 6: Desarrollo meiótico de ovocitos provenientes de folículos a) preantrales, b) antrales chicos y c) antrales medianos en las distintas etapas del ciclo estral: anestro, proestro-estro y diestro.

En relación a la interacción entre la etapa del ciclo estral y los diferentes estados del desarrollo folicular, los ovocitos de folículos preantrales son los que se encuentran mayormente detenidos en VG y los ovocitos de folículos antrales son los que alcanzan las mayores tasas de metafases, esto es independiente de la etapa del ciclo estral ($P < 0,05$).

4. Discusión

En el presente estudio, se determinó que la capacidad de los ovocitos de alcanzar las distintas etapas del desarrollo meiótico se ve influenciado por la etapa del ciclo estral y por el tamaño folicular, ambas independientes una de la otra.

Los porcentajes más altos de desarrollo se obtuvieron en Proestro/Estro y Diestro. La influencia del ciclo estral en la capacidad de desarrollo meiótico es concordante a lo observado en estudios previos en perra mediante la técnica de *slicing*, se obtuvieron tasas más altas de MII en ovocitos de perras en estro, esto sin considerar el tamaño folicular (Otoi *et al.*, 2001; Willingham-Rocky *et al.*, 2003). Luvoni (2001) encontró mayores tasas de MII en Proestro en comparación con anestro. Los efectos de la etapa del ciclo sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* de los ovocitos de perra aún no está clara, ya que en otros estudios (Rodrigues y Rodrigues, 2003; Songsasen y Wildt 2005) no se evidenciaron diferencias, lo que podría deberse a menores tiempos de cultivo utilizados en los protocolos de maduración *in vitro* en estos últimos trabajos.

Las diferencias en la competencia meiótica que mostraron los ovocitos según las etapas del ciclo pueden atribuirse a que a lo largo del ciclo reproductivo de la perra ocurren una serie de cambios: hormonales (Concannon, 2011), de población folicular (Raynaud *et al.*, 2009; England *et al.*, 2009), interacción ovocito-células del cúmulo (Luvoni *et al.*, 2005), expresión de factores de crecimiento (De los Reyes *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2016) entre otros. Estos cambios a lo largo del ciclo, proporcionan al ovocito diferentes ambientes que podrían estar influenciando la competencia de estos.

En anestro se obtuvo un alto porcentaje de ovocitos que permanecieron en VG tanto aquellos de folículos preantrales como antrales chicos y a la vez hubo reinicio meiótico, pero bajas tasas de metafase en los ovocitos provenientes de folículos antrales. El menor

porcentaje de desarrollo obtenido en anestro se ha relacionado a una menor comunicación entre las células foliculares y el ovocito, lo que disminuiría la capacidad de reanudar la meiosis (Luvoni *et al.*, 2001). En anestro se encontraron folículos antrales chicos y medianos, sin embargo, el momento del anestro: temprano, medio o tardío, en el cual se encontraban los folículos cuando fueron extraídos, podría estar influenciando los porcentajes de IVM obtenidos. Aunque no está totalmente claro el inicio del desarrollo folicular en las perras, en anestro temprano es posible que los ovocitos tengan menos competencia, ya que estarían probablemente iniciando el desarrollo a diferencia de aquellos de anestro medio o tardío. Por tanto, los ovocitos de folículos obtenidos en anestro pueden representar poblaciones con diferente grado de desarrollo debido a lo prolongado de esta etapa, que además tiene cambios dinámicos no del todo conocidos.

Se han observado cambios en la expresión de factores paracrinos en las distintas etapas del ciclo estral (Fernandez *et al.*, 2016), si bien la función de estos factores aun no está totalmente clara, podrían estar influenciado a las diferencias en la maduración del ovocito observadas en este estudio. En la perra se desconoce si existe una o más ondas de crecimiento folicular, pero se cree que el desarrollo folicular comienza en la etapa de anestro ya que en otros estudios (Songsasen y Wildt, 2005; Raynaud *et al.*, 2009) y en el presente, se ha observado que la población folicular en esta fase corresponde principalmente a folículos preantrales, donde comienzan a aumentar los pulsos de la hormona folículo estimulante (FSH) (Concannon *et al.*, 2009). A finales de esta etapa y comienzo del proestro aumentan aún más la frecuencia de los pulsos de FSH estimulando la actividad aromatasa (Concannon *et al.*, 2011). Por otra parte, comienza el aumento de los pulsos de la hormona luteinizante (LH) (Concannon *et al.*, 2012) que estimula las células de la Teca para la producción de esteroides. Por tanto, durante el anestro tardío los folículos que iniciaron el desarrollo, en su mayoría ya han desarrollado antra y tendrían una mayor posibilidad de ser seleccionados como folículos ovulatorios. En este trabajo no fue posible clasificar de acuerdo a la etapa anestro por la cantidad de muestras requeridas, pero es probable que los porcentajes de MII logrados en ovocitos obtenidos en esta fase, podrían corresponder a aquellos ovocitos obtenidos al final del anestro.

En la fase de proestro/estro, se encontraron las mayores tasas de primera y segunda metafase y las menores tasas de ovocitos que permanecieron como VG. En las etapas del proestro hasta inicios del estro, los niveles de estrógenos son los más altos (Hildegarde et al., 2002) y esta alza de estrógeno es importante para la maduración final de los folículos junto con el laza de LH, determinando así los que ovularán o que quedarán atrésicos (Concannon, 2012). En otras especies como el porcino se ha visto que la alza de estrógeno está fuertemente relacionado con la diferenciación de las células del cúmulo (Tasaki *et al.*, 2013). Se ha visto que el estado de las células del cumulo influenciarían esta competencia, tanto en ovocitos de perra, ya que las *gap-junction* son más permeables en esta fase, lo que favorece la competencia meiótica (Luvoni *et al.*, 2001; De los Reyes *et al.*, 2005; Otoi, *et al.*, 2007; Reynaud *et al.*, 2009; Evecen *et al.*, 2010), como en otras especies (Sutton *et al.*, 2003). Se ha visto que a medida que avanza el desarrollo antral aumenta la capacidad de mucificación de las células del cúmulo (Reynaud *et al.*, 2009) lo cual ha sido asociado a mayores tasas de metafase II (De los Reyes *et al.*, 2005), lo que podría tener relación con los resultados obtenidos en este estudio en proestro/estro, donde ovocitos de folículos en estados más avanzados del desarrollo antral, mediados y grandes, alcanzan mayores porcentajes de metafase. Además, la LH y FSH también se han asociado a la disminución de la atresia de los folículos en ratas (Markström *et al.*, 2002). Ambas hormonas durante proestro-estro están en altas concentraciones en relaciones a las otras etapas.

En la etapa de diestro se encontró, al igual que en anestro, mayores tasas de ovocitos que permanecieron en VG, lo que podría deberse a que muchos folículos podrían haber comenzado el proceso de atresia (Spanel-Borowsky *et al.*, 1981). Por el contrario se obtuvo porcentajes similares que en proestro/estro de metafase I y II. En diestro hay mayores concentraciones de progesterona (Willingham-Rocky *et al.*, 2003), no está claro en perras, pero en ratas se ha visto que altos niveles de progesterona tiene un efecto antiapoptótico en las células de la granulosa tanto en folículos inmaduros como en preovulatorios (Markström *et al.*, 2002), manteniéndose en altos niveles hasta finales de diestro lo que podría permitirle a los ovocitos cultivados en esta fase alcanzar la metafase.

En este estudio aproximadamente la mitad de los ovocitos cultivados no fueron evaluables. En estudios previos la tasa de ovocitos no evaluables se ha descrito también

alta, los que se atribuye a diferentes estados de degeneración (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Songsasen y Wildt, 2005; Evecen *et al.*, 2010). Esto se podría asociar a diferentes grados de atresia folicular. La atresia en la perra ha sido poco estudiada pero en otras especies se ha visto que el paso de folículos preantrales a antrales es clave para el crecimiento del folículo y por tanto del ovocito; sin embargo, los folículos más susceptibles a la atresia, serían los antrales (Reynaud y Driancourt *et al.*, 2000).

Independiente de la etapa del ciclo, los ovocitos que mostraron mayor capacidad de alcanzar los estados de metafase correspondieron a ovocitos provenientes de folículos antrales. Esto es concordante con lo observado previamente en canino (Reynaud *et al.*, 2009 en la cerda (Tasaki *et al.*, 2013), el humano (Drummond *et al.*, 1999), donde la adquisición de la competencia meiótica va ocurriendo a lo largo del desarrollo folicular. Durante el crecimiento folicular la formación del antro es inducida por la diferenciación de las células de la granulosa parietal y células del cúmulo, donde estas últimas contribuyen a la capacidad de la adquisición de la competencia meiótica (Drummond *et al.*, 1999; Otoi *et al.*, 2007; Reynaud *et al.*, 2009). En folículos preantrales de la perra pareciera no existir tal diferenciación (Reynaud *et al.*, 2009; De los Reyes *et al.*, 2013) lo que explicaría los mayores porcentajes de vesícula germinal a pesar de ser cultivados en las mismas condiciones que los otros ovocitos. Igualmente, Songsasen y Wildt (2005), encontraron que los folículos que lograron mayores porcentajes de metafase II fueron los que medían más de 2 mm, medida equivalente a lo determinado en este estudio como folículos antrales medianos, sin embargo Reynaud *et al.* (2009) observaron que los ovocitos probablemente adquieren su competencia meiótica cuando los folículos alcanzan más de 4 mm.

En conclusión, si bien los ovocitos mostraron diferencias en su capacidad de maduración según la etapa del ciclo estral, lo que influye en su competencia meiótica es la fase de desarrollo folicular. También es importante considerar el estado reproductivo en que se encuentra la perra donante, debido a que en el presente estudio, se observó que en las fases de Proestro y Estro la población folicular predominante fueron folículos que ya han desarrollado antro (England *et al.*, 2009; Reynaud *et al.*, 2009). En Diestro a pesar de que gran parte del tejido del ovario está ocupado por los cuerpos lúteos, la población folicular que se observó fueron principalmente folículos antrales chicos y medianos y en

otros estudios se describe un número alto de folículos medianos (Songsasen y Wildt, 2005) a diferencia de lo que ocurre en Anestro, como se discutió anteriormente.

A pesar de que en este estudio se consideraron ambos factores, las tasas de metafase no superaron el promedio a lo obtenido en relación a estudios previos. Lo que puede implicar que aislar folículos separadamente al requerir un mayor tiempo de manipulación puede afectar la viabilidad de los ovocitos, por lo que se hace necesario mejorar la técnica de recolección de los ovocitos a partir de folículos individuales para así acortar los tiempos de procesamiento.

BIBLIOGRAFÍA

BLONDIN P., SIRARD M. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mo. Reprod Dev.* 41: 54 – 62.

CONCANNON P.W., CASTRACANE V.D., TEMPLE M., MONTANEZ A. 2009. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Anim Reprod.* 6: 172 – 193.

CONCANNON PW. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 124: 200 – 210.

CONCANNON PW. 2012. Research Challenger in Endocrine Aspect of canine Ovarian Cycles. *Reprod Dom Anim.* 47: 6 – 12.

DE LOS REYES M, PALOMINO J, PARRAGUEZ VH, VERGARA J. 2012. Sperm nuclear decondensation after *in vitro* and *in vivo* maturation of canine oocytes. *Reprod Dom Anim.* 47: 98-101.

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

DE LOS REYES M., PARRAGUEZ V., PALOMINO J. ROJAS C., 2013. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. *Theriogenology.* 80: 587 – 596.

DRUMMOND A.E., JOCK K. 1999. The role of strogen in folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 15: 57 – 64.

DUMESIC, D., MELDRUM, D., KATZ-JAFFE, M., KRISHER, R., SCHOOLCRAFT, W. 2016. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*. 103: 2.

DURRANT B., PRATT N., RUSS K., BOLAMBA D. 1997. Isolation and Characterization of canine advanced Preantral and early antral follicles. *Theriogenology*. 49: 917 – 932.

ENGLAND G.C.W., RUSSO M., FREEMAN SL. 2009. Follicular Dynamics, Ovulation and Conception Rates in Bitches. *Reprod Dom Anim*. 44: 53 – 58.

EVECEN M., CIRIT Ü., DEMIR K., ÖZDAS Ö., TAS M., BIRLET S., PABUCCUOGLU S. 2010. Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on in vitro maturation of canine oocytes. *Anim Reprod Sci*. 177: 160 – 165.

FERNÁNDEZ, T. PALOMINO J., PARRAGUEZ V., PERALTA O., DE LOS REYES M. Differential expression of GDF-9 and BMP-15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flow cytometry. *Animal Reproduction Science Sci*. :1 – 9.

HASEGAN I., SONEA A., MATEI M., VINTILA L., ION C., BIRTOIU A. 2012. Current Relevant Knowledge on Dog Reproductive Physiology – Review. *Anim Sci Biotech*. 1: 45.

HILDEGARDE V., BROECK W., CORYN M., SIMOENS P. 2002. Immunohistochemical detection of androgen receptors in the canine uterus throughout the estrus cycle. *Theriogenology*. 57: 2203 – 2216.

LUVONI G., LUCIANO A., MODINA S., GANDOLFI F. 2001. Influence of different stages of the estrus cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: Effects on the efficiency of in vitro maturation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 57: 141 – 146.

LUVONI, G; CHIGIONI, S; ALLIEVI, E; MACIS, D. 2005: Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63: 41–59.

- MARKSTRÖM E., SVENSSON E., SHAO R., SVANBERG B., BILLIG H.** 2002. Survival factor regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123: 23 – 30.
- OTOI T., OOKA A., MURAKAMI M., KURNIANI K., SUZUKI T.** 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fert Dev*. 13: 151 – 155.
- OTOI T., SHIN T., KRAEMER DC. WESTHUSIN ME.** 2007. Role of Cumulus Cells on *In Vitro* Maturation of Canine Oocytes. *Reprod Dom Anim*. 42: 184 – 189.
- PANGAS S., RAJKOVIC A.** 2015. Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Fourth Edition. Elsevier Inc. pp. 947.
- REYNAUD K., DRIANCOURT M.A.** 2000. Oocyte attrition. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163: 101 – 108.
- 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. *Society for Reproduction and Fertility*. 130: 193-201.
- REYNAUD, K., VIARIS DE LESEGNO, C., CHEBROUT, M., THOUMIRE, S., CHASTANT-MAILLARD, S.** 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. 72: 1120 – 1131.
- RODRIGUES B., RODRIGUES J.** 2003. Influence of Reproductive Status on *in vitro* Oocyte Maturation in dogs. *Theriogenology*. 60: 59 – 66.
- SHA W., XU B., LI M., LIU D., FENG H., SUN Q.** 2010. Effect of gonadotropins on oocyte maturation *in vitro*: an animal model. *Fertil Steril*. 93: 1650 – 1661.

SONGSASEN N., WILDT D. 2005. Size of the Donor Follicle, but not Stage of Reproductive Cycle or Seasonality, Influences Meiotic Competency of Selected Domestic Dog Oocytes. *Mol Reprod Dev.* 72: 113 – 119.

SPANEL-BOROWSKI K., TREPEL F., SCHICK P., PILGRIM C. 1981. Aspects of cellular proliferation during follicular atresia in the dog ovary. *Cell Tissue Res.* 219: 173 – 183.

SUTTON M.L., GILCHRIST R.B., THOMPSON J.G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update.* 9: 35 – 48.

TASAKI H., IWATA H., SATO D., MONJI Y., KUWAYAMA T. 2013. Estradiol has a major role in antrum formation of porcine Preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology.* 79: 809 – 814.

WILLINGHAM-ROCKY L., WESTHUSIN M., KRAEMER D. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction.* 126: 501 – 508