



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

**MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE PERRA
PROVENIENTES DE FOLÍCULOS POLIOVOCÍTICOS**

Igor Antonio Astudillo Obreque

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

PROFESOR GUÍA: MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA
Profesora Titular
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1140658

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE PERRA
PROVENIENTES DE FOLÍCULOS POLIOVOCÍTICOS**

Igor Antonio Astudillo Obreque

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento a la
Producción Animal

NOTA FINAL:.....

PROFESORA GUÍA: Mónica De Los Reyes
PROFESOR CONSEJERO: Victor Parraguez
PROFESOR CONSEJERO: Oscar Peralta

NOTA

FIRMA

Debo agradecer en primer lugar a la Dra. Mónica De Los Reyes, quien fue la principal guía para el desarrollo de mi proyecto de memoria de título, por entregarme sus conocimientos y enseñanzas, además de permitir y darme la confianza de trabajar junto su equipo de trabajo en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Al Dr. Jaime Palomino por su dedicación y entrega de conocimientos en la práctica y la dinámica del laboratorio. Además de sus consejos y ayuda para el desarrollo de esta memoria.

A mi compañera de laboratorio y trabajo Karla Aspée por su apoyo, compañerismo y su colaboración día a día para la realización de mi memoria de título. Además, a mis otros compañeros de laboratorio Fernando Ramírez y Tomás Fernández, por su disposición y entrega de conocimientos, y de hacer un ambiente grato para el trabajo en el laboratorio.

También agradecer a quienes forman parte del equipo del Departamento de Fomento de la Producción Animal con las que compartí durante el desarrollo de mi tesis, la Sra. Norma San Martín y Sra. Corina Norambuena, por su valiosa colaboración.

Mis más sinceros agradecimientos a mi familia y amigos quienes me acompañaron durante la realización de este gran proyecto que me permitirá cumplir un logro más en mi vida a nivel profesional, por su apoyo, entrega de buenas energías y confianza incondicional.

Finalmente agradecer a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por darme las herramientas necesarias para mi formación como profesional integral del área de la salud.

RESUMEN

La perra presenta un alto porcentaje de folículos poliovocíticos (FPOs) con respecto a otras especies; sin embargo, se desconoce la capacidad de maduración de los ovocitos provenientes de estos folículos. Este estudio evaluó la maduración de ovocitos provenientes de FPOs *in vitro*, de acuerdo al estado de desarrollo folicular y de la etapa del ciclo estral de la perra. Se utilizaron ovarios de 64 perras adultas, identificando la etapa del ciclo estral en: anestro, proestro-estro y diestro. Se clasificaron, bajo lupa estereoscópica, distintos estados de desarrollo folicular en: pre-antrales (<300 μm), antrales pequeños (300-490 μm), antrales medianos (500-790 μm) y antrales grandes (>800 μm), separándolos en folículos mono y poli- ovocíticos. Los ovocitos de cada tipo folicular se extrajeron y se incubaron por 72h en TCM-199 suplementado bajo condiciones de cultivo. Posterior al cultivo se evaluó el desarrollo nuclear de los ovocitos previa fijación y tinción nuclear DAPI mediante microscopía de epifluorescencia. El desarrollo meiótico se clasificó en vesícula germinativa (VG), reinicio meiótico (GVBD) y metafase I y II (MI-MII). Los resultados analizados por ANOVA, indicaron que, aunque los ovocitos de FPOs presentaron en general mayor porcentaje de VG en comparación a los de folículos monovocíticos ($P < 0,05$), no hubo diferencias en los porcentajes de MI-MII alcanzados entre los ovocitos provenientes de ambos tipos foliculares a través del desarrollo folicular y etapas del ciclo estral. Esto sugiere que los FPOs son una característica normal de la perra que no afectaría especialmente la maduración *in vitro* de los ovocitos.

ABSTRACT

The female dog presents a high percent of multiocyte follicles (MOFs) compared to other species; however, the maturation capacity of the oocytes from these follicles is unknown. The present study evaluated the *in vitro* maturation (IVM) of bitch oocytes from MOFs according to follicular development and phases of the estrous cycle. Canine oocytes obtained from 64 adult bitches at different phases of the estrous cycle r.g. anestrus, proestrus/estrus and diestrus were classified under stereomicroscope, according to stages of follicular development: pre-antral (<300 μm), small antral (300-490 μm), medium antral (500-790 μm) and preovulatory (>800 μm) and type of follicles: MOFs and unioocytes follicles (UOFs). The oocytes from each type of follicles were incubated for 72 h in TCM-199 medium supplemented under culture conditions. After fixation and DAPI staining, oocytes meiotic development was evaluated by epifluorescence microscopy. Meiotic developmental was classified into germinal vesicle (GV), germinal vesicle break down (GVBD) and metaphase I/II (MI/MII). The result analyzed by ANOVA indicated that although oocytes from MOFs showed mainly higher percentage of VG compared to those UOFs ($P < 0,05$) there was no difference in the MI/MII rates between MOFs and UOFs follicles throughout development and estrus cycle. This suggests that MOFs might be a normal feature in bitches that this might not affect the *in vitro* oocytes maturation.

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento se han obtenido tasas bajas de éxito en las biotecnologías reproductivas en las perras, principalmente por los bajos porcentajes de maduración *in vitro* (IVM) de los ovocitos, que en esta especie no superan el 40% de MII (De los Reyes *et al.* 2005), con un promedio de no más de un 20% (Chastant-Maillard *et al.*, 2011). Dichos porcentajes pueden atribuirse a ciertas características reproductivas de la perra, las cuales difieren de otras hembras mamíferas y hacen más difícil su replicación *in vitro*.

La perra presenta un ciclo reproductivo de tipo monoéstrico no estacional de ovulación espontánea con 4 etapas características: proestro y estro de alrededor de 9 días cada una, diestro de 63-65 días y anestro, siendo esta última la de mayor duración entre 90-150 días aproximadamente (Concannon, 2011). La característica reproductiva más representativa en los caninos es que ovulan un ovocito en estado de Profase de la primera división meiótica (Reynaud *et al.*, 2009; De los Reyes *et al.*, 2011), es decir en un estado inmaduro, donde reanuda la meiosis a nivel del oviducto, alcanzando el estado de metafase de la segunda división meiótica 2 a 3 días posterior a la ovulación (Hasegan *et al.*, 2012). Otra característica reproductiva en esta especie es la luteinización folicular previo a la ovulación (Kowaleski *et al.*, 2015), por mecanismos aún no del todo conocidos, evidenciándose un alza en las concentraciones de progesterona sérica previo a la ovulación, relacionada a su vez con el incremento de los niveles de LH al inicio del estro (Reynaud, *et al.*, 2009; Concannon, 2011).

Dentro de las diferentes características reproductivas de la perra, se encuentra la mayor incidencia de folículos poliovocíticos (FPOs), es decir, folículos que contienen más de un ovocito en su interior. El interés por este tipo de folículos radica en la influencia sobre la tasa de ovulación y la prolificidad (Telfer y Gosden, 1987). Hay diferentes hipótesis que permiten explicar este fenómeno, siendo hasta el momento la más aceptada la que indica que éstos folículos provienen de un accidente del desarrollo, debido a un desequilibrio entre el número de células germinales y el número de células del estroma (Reynaud *et al.*, 2010), resultando en una inclusión de muchas células germinales dentro de un folículo (Payan-Carreira y Pires, 2008). En relación a este tipo de folículos en la perra, se ha descrito que se presentan hasta un 55% de prevalencia (Lunardon *et al.*, 2015). La

prevalencia se ha relacionado a la edad, donde en algunos estudios se señala que es más alta en animales jóvenes, en comparación a aquellas hembras mayores (Payan-Carreira y Pires, 2008). Otros reportes señalan que los FPOs son más prevalentes en hembras de edades post puberales entre 1 a 2 años que en animales de más de 7 años (Telfer y Gosden, 1987). Por otro lado, se ha descrito que las perras mestizas presentarían una mayor prevalencia de FPOs que las de raza (Payan-Carreira y Pires, 2008), por lo que se podría relacionar con la mayor prolificidad que generalmente poseen las hembras mestizas, aunque dependería del tamaño de la misma (Payan-Carreira y Pires, 2008).

Los FPOs en la perra pueden contener de 2-17 ovocitos por folículo, con un promedio de 2-3 ovocitos (Payan-Carreira y Pires, 2008), reportándose que existiría una relación morfológica homogénea entre éstos cuando los folículos contienen menos de 3 ovocitos y heterogénea, cuando los folículos contienen un número mayor, lo que podría indicar que estos se encuentran en distinto estado de desarrollo o que algunos están en proceso de degeneración (Songsasen y Wildt, 2007).

Se ha relacionado el tamaño y la localización del ovocito dentro del folículo con la capacidad de competencia, determinándose que los ovocitos situados en la periferia son más pequeños y su desarrollo dentro del folículo lo alcanzan de manera más tardía (Al-Mufti *et al.*, 1988). Esta selección de tamaño ovocitario puede resultar de dos mecanismos: un proceso pasivo, si un ovocito es intrínsecamente de mejor calidad y entonces capaz de sobrevivir, o un proceso activo, si uno de los ovocitos puede inhibir el crecimiento y/o sobrevivencia de otros (Reynaud *et al.*, 2012). Por otra parte, a pesar de que se sabe que estos folículos pueden alcanzar un estado preovulatorio (Reynaud *et al.*, 2009), no se ha determinado su capacidad para ovular y alcanzar el estado de segunda metafase (MII), requisito para que sean fecundados. Hasta la actualidad no existen estudios que hayan evaluado la capacidad de maduración de estos ovocitos provenientes de FPOs en la perra, a diferencia de otras especies como en cerdos (Stankiewicz *et al.*, 2009), ratas (Iguchi *et al.*, 1991) y mujeres (Dandekar *et al.*, 1988), en las cuales se determinó que tienen menor competencia meiótica que los ovocitos únicos en un folículo, a pesar que se presentan en mucha menor frecuencia de lo observado en caninos.

Debido a muchas de las características reproductivas, que la diferencian de otras especies mamíferas, no se ha logrado reproducir las condiciones *in vivo* en los protocolos *in*

vitro para la maduración de ovocitos caninos, donde independiente del sistema de cultivo no se ha logrado altas tasas de éxito en la MIV (De los Reyes *et al.* 2005; Songsasen and Wildt, 2007; Chastant-Maillard *et al.*, 2011; Salavati *et al.*, 2012).

Considerando las características reproductivas de la perra, que podrían estar influenciando los porcentajes bajos de maduración *in vitro*, incluyendo entre estas características el alto porcentaje de folículos poliovocíticos, en este estudio se propuso como hipótesis que la maduración *in vitro* de los ovocitos extraídos desde folículos poliovocíticos era menor en comparación a los ovocitos extraídos desde folículos monovocíticos, independiente del estado de desarrollo folicular y de la etapa del ciclo estral. Para probar esta hipótesis, el objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de maduración nuclear *in vitro*, de acuerdo al estado de desarrollo folicular y etapa del ciclo estral, en ovocitos provenientes de folículos poliovocíticos en comparación a los monovocíticos, evaluando adicionalmente, la prevalencia de estos folículos en la perra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales 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 obtenidas y procesadas de acuerdo al protocolo aprobado por los comités de Bioética de FONDECYT y de FAVET.

1.-Procesamiento de las Muestras

1.1. Ovarios: Se utilizaron 128 ovarios obtenidos de 64 perras entre mestizas y de raza, no preñadas y clínicamente sanas entre 8 meses y 6 años de edad, de las cuales 16 estaban en Anestro, 17 en Proestro-Estro y 31 en Diestro. Los ovarios fueron extraídos por medio de ovariohisterectomías realizadas en el Centro de atención primaria de mascotas Santo Tomás y Centro de salud veterinaria El Roble, Universidad de Chile. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina 0,9% NaCl, suplementada con 100 UI de penicilina G sódica (Sigma #K5021, ST. Louis, MO, USA) y 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma #S-9137) (De los Reyes *et al.*, 2012), a 38 °C, para ser procesados en un tiempo menor a dos horas desde su extracción quirúrgica hasta la incubación. En el laboratorio los ovarios se mantuvieron en solución buffer fosfato salina (PBS; (KCl 0.02%, Na₂HPO₄ 0.142%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.024%) y agua miliQ (18,2 MΩcm, Thermo Scientific, Barnstead Smart2Pure, Budapest, Hungría) durante su manipulación, a un pH de 7.4 y a una temperatura de 38°C, de acuerdo a estudios previos (De los Reyes *et al.*, 2011).

1.2. Muestra de sangre: Durante la cirugía de las perras se obtuvo además una muestra de 5 mL de sangre por medio de una jeringa para la determinación de la concentración de Progesterona sérica mediante la técnica de ELISA como se describió previamente (Fernandez *et al.*, 2016).

En el laboratorio se evaluó el estado del ciclo estral de la perra donante mediante la identificación de las estructuras ováricas que predominaban y su estado de desarrollo (folículos, cuerpos lúteos) (Fig. 1) y mediante las concentraciones de progesterona sérica, de acuerdo a lo señalado anteriormente por Fernández *et al.* (2016). En breve, la muestra de sangre sin anticoagulante fue centrifugada a 3000 rpm en una centrífuga

(Arquimed, Centrífuga 5415 D Eppendorf, Hamburgo, Alemania) por 10 minutos. El plasma sanguíneo se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Las concentraciones de progesterona sérica se determinaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (PHomo Microplate Reader®; Autobio LabtecInstruments, Zhenghaidong, China) con un Kit canino de progesterona (Prog ELISA Kit, MyBioSource®; San Diego, CA, USA).

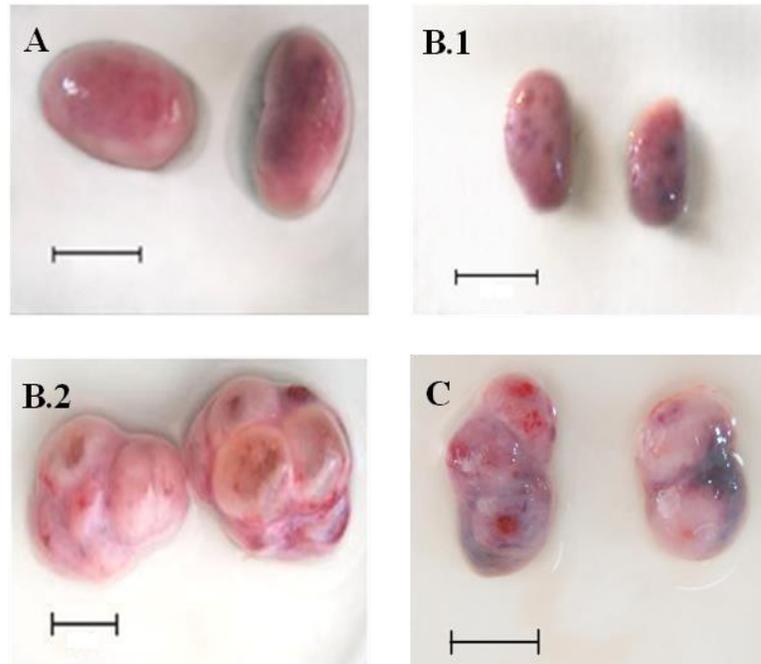


FIG. 1. Fotografías de ovarios en diferentes etapas del ciclo estral: A) ANESTRO, no se visualizan externamente estructuras foliculares ni cuerpos luteos; B.1) PROESTRO, se evidencian pequeños folículos en desarrollo; B.2) ESTRO, se evidencian folículos antrales grandes o preovulatorios, o bien, folículos con la fosa ovulatoria o estigma; y D) DIESTRO, se evidencia la presencia de cuerpos lúteos. Barra= 1cm.

2.-Prevalencia de FPOs

Posterior a la evaluación de los ovarios, se determinó de forma descriptiva, la prevalencia de folículos poliovocíticos en las perras (al menos un folículo poliovocítico en un ovario), considerando: el total de hembras, edad y etapa del ciclo de la donante.

3.-Recolección de ovocitos provenientes de folículos poliovocíticos y monovocíticos

En el laboratorio, cada ovario se depositó en placas Petri 15 cm (PetriDish) con PBS, donde cada ovario se seccionó en pequeños trozos con un bisturí. La identificación de los folículos poliovocíticos y monovocíticos, de acuerdo a los distintos estados de desarrollo folicular (Fig. 2), se realizó bajo lupa estereoscópica 10X (Krüss Optronic GmNH, Alemania), con la ayuda de un ocular cuadrulado (American optical company, Buffalo, NY, USA) clasificándolos en: a) preantrales (< 300 μm de diámetro) los cuales presentaron ovocitos (78 - >100 μm) con o sin una zona pelucida (ZP) distinguible, rodeado por una o dos capas de células foliculares y sin presencia de cavidad antral; b) antrales pequeños (~300-490 μm de diámetro) con ovocitos (>100 μm) con una ZP distinguible, rodeado por una multicapa de células foliculares comenzando a diferenciarse, en los cuales hay una cavidad antral incipiente, c) antrales medianos (~500-990 μm) con ovocitos mayores a 100 μm con una ZP distinguible rodeado por una multicapa de células foliculares diferenciadas en células de la granulosa del cúmulo y células de la granulosa murales, en los cuales hay una cavidad antral medianamente desarrollada y d) antrales grandes (>1000 μm) con ovocitos entre 118-135 μm , con una ZP distinguible rodeado por una multicapa de células foliculares diferenciadas en células de la granulosa del cúmulo y células de la granulosa murales, con una cavidad antral desarrollada (Luvoni *et al.*, 2005; Songsasen and Wildt., 2007; Payan-Carreira and Pires., 2008; Serafim *et al.*, 2010).

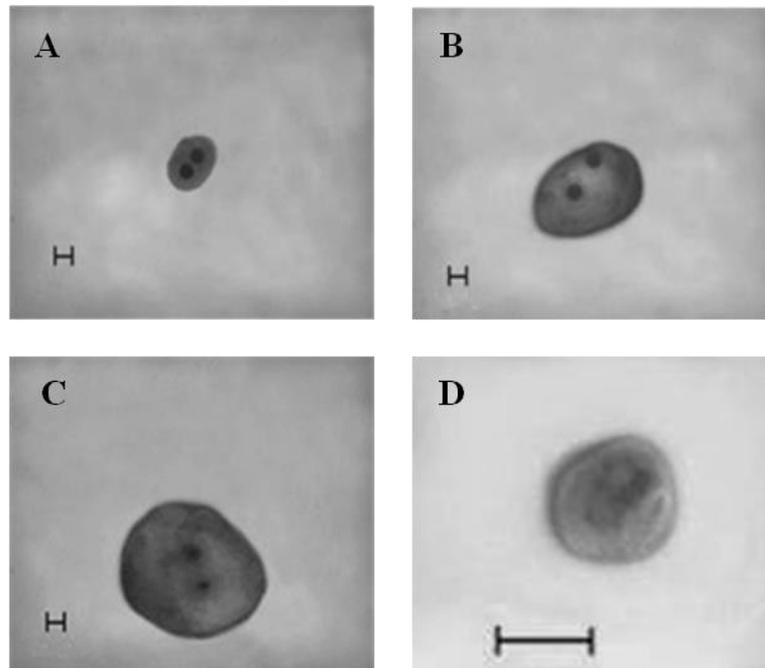


FIG. 2. Fotografías de folículos poliovocíticos en los distintos tamaños foliculares: A) pre-antral; B) antral pequeño; C) antral mediano; D) antral grande. Escala de la barra: 100 μ m (A, B, C) y 1 cm (D).

Los ovocitos se recolectaron desde cada folículo previamente clasificado mediante una pipeta pasteur de punta fina ayudándose con una aguja 25G en una jeringa de 1mL (BD Plastipak, Curitiba, Brasil). Los ovocitos de cada tipo folicular se trasladaron a placas Petri 5cm (Abdos, New Delhi, India) con PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) (Sigma), previamente entibiado a 38 °C. De esta forma los ovocitos se trasladaron a la sala de cultivo bajo cámara de flujo laminar (Quimis, Diadema, Brasil) y ambiente de esterilidad.

Se extrajeron 1179 folículos, de los cuales 270 correspondieron a FPOs y 909 a FMOs. Se recolectó un total de 978 ovocitos de los cuales 301 ovocitos provenían de FPOs y 677 ovocitos de FMOs. Logrando evaluar un total de 176 ovocitos de folículos poliovocíticos y 351 ovocitos de folículos monovocíticos.

Paralelamente se cultivaron de cada tamaño folicular y ciclo estral, entre 31 y 96 ovocitos provenientes de folículos monoovocíticos como controles.

4.-Cultivo de los ovocitos

En la sala de cultivo, bajo la cámara de flujo laminar, los ovocitos obtenidos en cada replica experimental se lavaron 2 veces en medio de cultivo previamente preparado con: TCM 199: sal de Earl, tamponada con 25 mM HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 400 μ L de FCS (Sigma #A6003-5G) 10%, 0.25 mM de piruvato (Sigma #P-5280), 10 UI mL^{-1} de hCG (Sigma #CG10-1VL), 300 UI mL^{-1} de penicilina (Sigma #K0521) y 20 mg mL^{-1} de estreptomina (Sigma #S-9137) (De los Reyes *et al.*, 2011) a un pH de 7,4 y filtrado utilizando un filtro de 0,22 μm (Biofil syringe Filter, Hong kong, China). Los ovocitos se incubaron para maduración *in vitro* en gotas de 100 μ L del medio (previamente preparado y adaptado en la estufa de cultivo por 2 horas), en placas de cultivo (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA), con no más de 10 ovocitos por gota de medio de cultivo, las que se cubrieron con aceite mineral estéril (Sigma #M8410-1L) por 72 horas, bajo condiciones ambientales controladas a 38°C, 98% de humedad y 5% de CO₂ en estufa de cultivo (Forma Cientific, Marietta, OH, USA) (De los Reyes *et al.* 2011).

Las incubaciones se realizaron separadamente considerando el tamaño folicular del que provenían los ovocitos, ciclo estral de la perra donante y tipo de folículo (Poliovocíticos y Monovocíticos). Para el análisis del desarrollo meiótico en todas las etapas del ciclo, solo se consideraron los ovocitos provenientes desde folículos antrales pequeños y medianos de FPOs y FMOs.

5.-Fijación y tinción nuclear de ovocitos

Posterior al cultivo y bajo lupa estereoscópica (Krüss Optronic GmNH, Alemania), los ovocitos se retiraron de las gotas con medio de cultivo y se depositaron en placas desechables con PBS a temperatura ambiente y con la ayuda de una pipeta pasteur de punta fina, fueron desnudados de las células del cúmulo.

Los ovocitos desnudados se fijaron en 100 μ L de solución de paraformaldehído (4% en PBS) por 20 minutos y luego se lavaron dos veces en PBS por 5 minutos cada lavado. Posterior a los lavados, los ovocitos se incubaron en una solución 1 $\mu\text{g/L}$ 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) por 25 minutos y

luego lavados dos veces en solución PBS por 5 minutos cada uno, para retirar el excedente de la tinción (De los Reyes *et al.*, 2011).

Finalmente, los ovocitos se pusieron en portaobjetos en un medio de montaje para fluorescencia (Vectashield ®; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) dispuesto entre hilillos de parafina cubiertos con un cubre objeto.

6.-Evaluación del desarrollo meiótico

Todas las muestras fijadas y teñidas se evaluaron en un microscopio de epifluorescencia invertida (Olympus IX71, Miami, FL, USA) (UV emission 480 nm), equipado con una lámpara IX2-RFA y una cámara ProgRes-Capture Pro (Olympus; Tokyo, Japan). El estado de desarrollo meiótico se clasificó de acuerdo a lo descrito previamente (De los Reyes *et al.*, 2011) (Fig. 3), en breve: (I) vesícula germinal (VG), cuando la vesícula está claramente visible; (II) reanudación meiótica (GVBD), cuando la cromatina está dispersa e iniciando la condensación; (III) metafase de la primera división meiótica a telofase de la primera división meiótica (MI-TI), cuando los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial o cuando están migrando hacia los polos; (IV) y metafase de la segunda división meiótica (MII), la cual se manifiesta por la presencia de cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito metafásico, con el primer cuerpo polar extruido. Los ovocitos que no se les distinguieron las estructuras nucleares o con una distribución de cromatina irregular o cromatina anormal, se descartaron del estudio.

7.- Análisis estadístico

Cada experimento se repitió para lograr al menos 15 ovocitos por cada estado de desarrollo folicular (antrales pequeños y antrales medianos) en las diferentes etapas del ciclo estral.

Los resultados expresados como porcentajes se transformaron por Arcosen $\sqrt{\%}$, los cuales fueron evaluados mediante Análisis de Varianza, utilizando el Software InfoStat versión 2015e; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, incluyendo los efectos del tipo de folículo del cual provienen los ovocitos, etapa del ciclo estral y el tamaño folicular.

Las diferencias entre las medias fueron evaluadas usando prueba de Duncan. Para todos los casos se utilizó un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Adicionalmente se evaluó, de forma descriptiva, la prevalencia de estos folículos en las perras, de acuerdo a su edad y estado del ciclo.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio mostraron que, de las 64 perras utilizadas, un 70,3% tenían al menos un FPOs en sus ovarios (Tabla 1). Los FPOs se encontraron en todas las etapas del ciclo estral y en todas las edades estudiadas (entre 8 meses y 6 años de edad). No se relacionó la prevalencia de FPOs con la etapa del ciclo estral, pero se observó que la prevalencia de este tipo de folículos disminuye con la edad de la perra (Tabla 1).

Tabla 1: Prevalencia y número de FPOs de acuerdo a la edad y etapa del ciclo estral de la perra

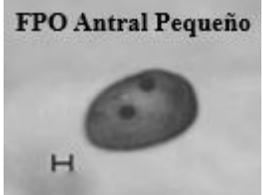
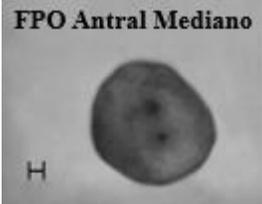
Etapa Del Ciclo	Edad	N Total de Perras	N Perras con FPOs	N Total de FPOs
Anestro	8 meses-1 año	3	3	48
	1-3 años	9	7	24
	4-6 años	4	1	4
Proestro-Estro	8 meses-1 año	5	4	65
	1-3 años	10	7	38
	4-6 años	2	2	6
Diestro	8 meses-1 año	4	4	23
	1-3 años	15	14	57
	4-6 años	12	3	5

FPOs: Folículos Poliovocíticos.

Se utilizaron 270 FPOs en todos los estados de desarrollo folicular, desde preantrales hasta antrales medianos, en todas las etapas del ciclo estral y un folículo preovulatorio en la etapa de proestro-estro, los cuales se presentan en la Tabla 2. En relación al total de FPOs en cada etapa del ciclo estral, se pudo observar un mayor porcentaje de FPOs preantrales en anestro en comparación a las otras etapas del ciclo estral. En proestro-estro se encontraron un mayor número de folículos poliovocíticos antrales, de los cuales solo 1 FPOs se encontró en el estado preovulatorio, de un total de 33 folículos

preovulatorios evaluados. En diestro se encontró un mayor número de folículos antrales pequeños, en relación a folículos preantrales y antrales medianos.

Tabla 2: Número de FPOs de acuerdo a la etapa del ciclo estral y tamaño folicular.

Ciclo Estral / Folículo	Anestro	Proestro/Estro	Diestro	Total
FPOs Preantral 	19	16	16	51 (18,8%)
FPO Antral Pequeño 	31	42	49	122 (45,2%)
FPO Antral Mediano 	26	50	20	96 (35,5%)
FPO Antral Grande 		1		1 (0,4%)
Total	76 (28,1%)	109 (40,3%)	85 (31,4%)	270

FPOs: Folículos Poliovocíticos. Barra=100 µm (Pre Antral, Antral Pequeño y Antral Mediano) y 1 cm (Antral Grande).

El número de ovocitos por folículo varió de 2 a 8. Sin embargo, la mayoría de estos contenían entre 2 a 3 ovocitos por folículo. Se observaron diferencias morfológicas entre los ovocitos provenientes de un mismo folículo, en relación a su tamaño (~50µm->100µm), citoplasma oscuro e integridad de las células del cúmulo. A medida que aumenta el número de ovocitos dentro del folículo, mayor es la diferencia entre estos (Fig. 3). En cambio, la mayoría de los FPOs que contenían 2 ovocitos, estos tenían un tamaño similar (Fig. 2A, B y C).

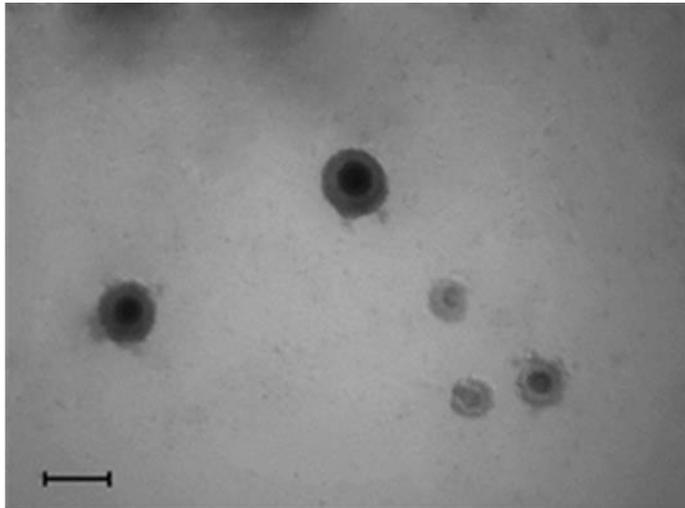


Fig. 3 Foto representativa de ovocitos provenientes de un Folículo Poliovocítico Antral Mediano. Barra= 100 µm.

Maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos provenientes de FPOs y FMOs

Los resultados de la IVM de ovocitos provenientes de FPOs vs los controles FMOs según la etapa del ciclo estral y el desarrollo folicular se presentan en la Fig. 4 y Tabla 3.

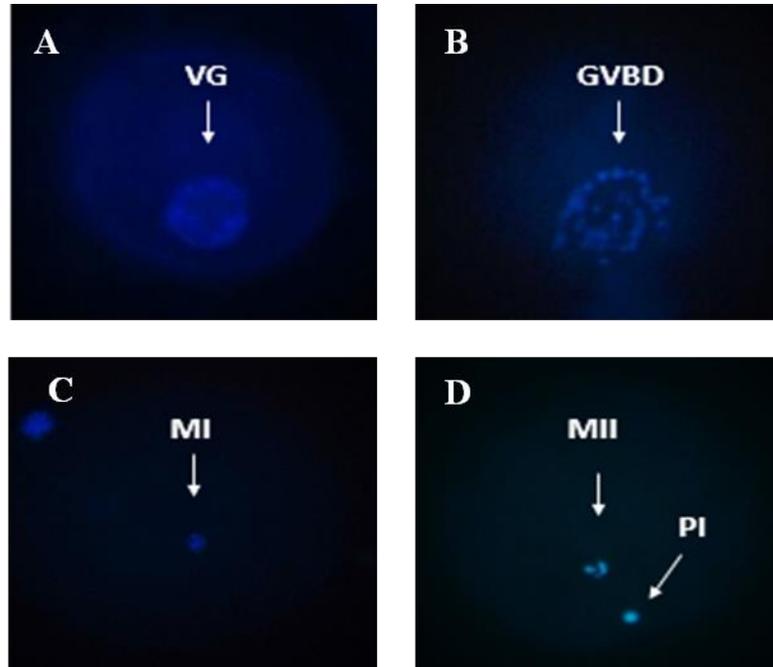


Fig. 4. Microfotografías de los distintos estados de desarrollo meiótico evaluados por epifluorescencia con tinción DAPI. A) VG, vesícula germinal claramente visible; B) GVBD, cromatina dispersa e iniciando la condensación; C) C.1. MI-TI, cuando los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial o cuando están migrando hacia los polos; y D) MII, cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito metafásico, con el primer cuerpo polar extruido.

Tabla 3: IVM de ovocitos provenientes de FPOs y FMOs de acuerdo a la etapa del ciclo estral y al tamaño folicular.

Fases del Ciclo Estral		Desarrollo Meiótico									
		VG (%)		GVBD (%)		MI-MII (%)		Evaluados (N)		Total (N)	
Tipo Folículo		P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
Anestro	ACH	57,1 ^{ax}	31 ^{ax}	14,3 ^{ax}	24,1 ^{ax}	28,6 ^{ax}	44,8 ^{ax}	14	58	29	91
	AM	33,3 ^{ax}	21,9 ^{ax}	28,6 ^{ax}	26,8 ^{ax}	38,1 ^{ax}	51,2 ^{ax}	21	41	24	67
Proestro/estro	ACH	33,3 ^{ax}	32,2 ^{ax}	30,3 ^{ax}	19,3 ^{ax}	36,3 ^{ax}	48,3 ^{ax}	33	31	56	87
	AM	36,8 ^{ax}	4,9 ^{by}	26,3 ^{ax}	31,7 ^{ax}	53,4 ^{ax}	63,4 ^{ax}	57	41	80	83
Diestro	ACH	31,3 ^{ax}	26,1 ^{ax}	40,6 ^{ax}	35,7 ^{ax}	28,1 ^{ax}	38 ^{ax}	32	84	84	186
	AM	15,8 ^{ax}	16,6 ^{ax}	31,6 ^{ax}	39,5 ^{ax}	52,6 ^{ax}	43,7 ^{ax}	19	96	28	163
Total		34 ^x	21,9 ^y	29,5 ^x	31,9 ^x	36,3 ^x	46,1 ^x				

Desarrollo meiótico: GV (Vesícula Germinal); GVBD (Reinicio meiótico); MI-MII (Primera metafase y Segunda metafase). Folículo: ACH (Antral Chico); AM (Antral Mediano); Tipo: P (Poliovocítico) y M (Monovocítico).

a-b: los valores con letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

x-y: los valores con letras distintas dentro de cada fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los ovocitos obtenidos de FPOs antrales pequeños y antrales medianos, no evidenciaron diferencias significativas en su capacidad de alcanzar las distintas etapas del desarrollo meiótico (VG, GVBD, MI-MII), independiente de la etapa del ciclo estral.

En la Figura 5 se representan los porcentajes de los distintos estados de desarrollo meiótico (VG, GVBD y MI-MII) de ovocitos provenientes de FPOs de acuerdo al tamaño folicular (ACH y AM) y en las distintas etapas del ciclo estral. En anestro (Figura 5A) no se evidencian diferencias significativas en los ovocitos que permanecieron como VG, que reiniciaron la meiosis o que alcanzaron estados de MI-MII de folículos antrales pequeños y medianos. En proestro-estro (Figura 5B) los ovocitos provenientes de folículos antrales pequeños alcanzaron porcentajes similares de VG, GVBD y MI-MII que los ovocitos provenientes de folículos antrales medianos ($P > 0,05$). En diestro (Figura 5C) los

porcentajes de ovocitos de folículos antrales pequeños no tuvieron diferencias significativas en los distintos estados de desarrollo meiótico (VG, GVBD y MI-MII) en comparación con los ovocitos de folículos antrales medianos.

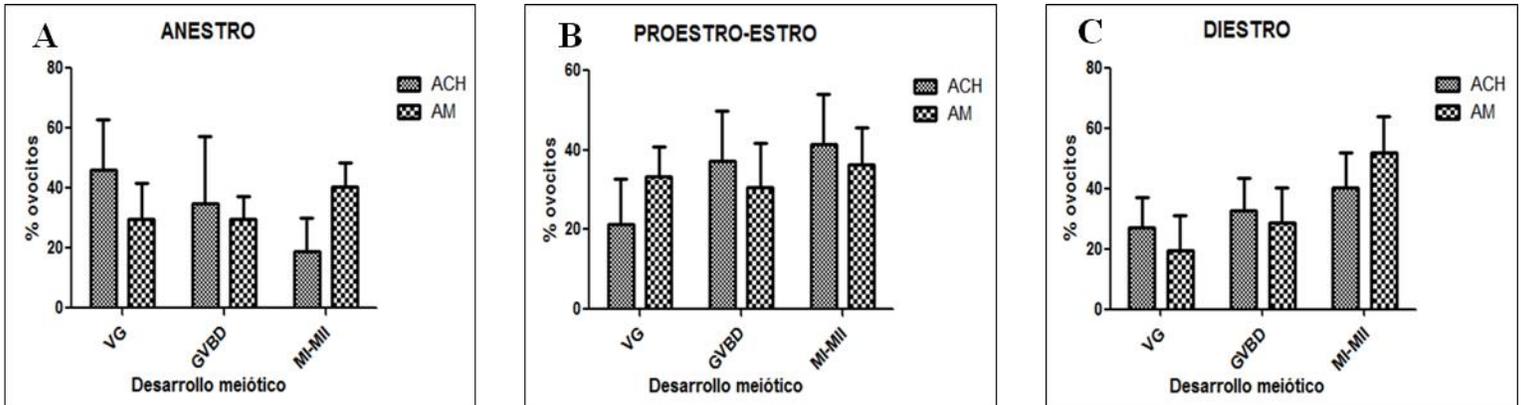


Figura 5: Desarrollo meiótico de ovocitos provenientes de FPOs Antrales Pequeños y Antrales Medianos de acuerdo a la etapa del ciclo estral. ACH: Antral Pequeño; AM: Antral Mediano.

En la Figura 6 se representan los porcentajes de IVM de ovocitos de FPOs, de acuerdo al tamaño folicular, en las distintas etapas del ciclo estral. En relación a los ovocitos provenientes de folículos antrales pequeños (Figura 6A) no se evidencian diferencias significativas en los que permanecieron como VG, que reiniciaron la meiosis o los que alcanzaron estados de MI-MII independiente de la etapa del ciclo estral. En los ovocitos provenientes de folículos antrales medianos (Figura 6B), no hubo diferencias significativas en los porcentajes del desarrollo meiótico (VG, GVBD, MI-MII) en las distintas etapas del ciclo estral.

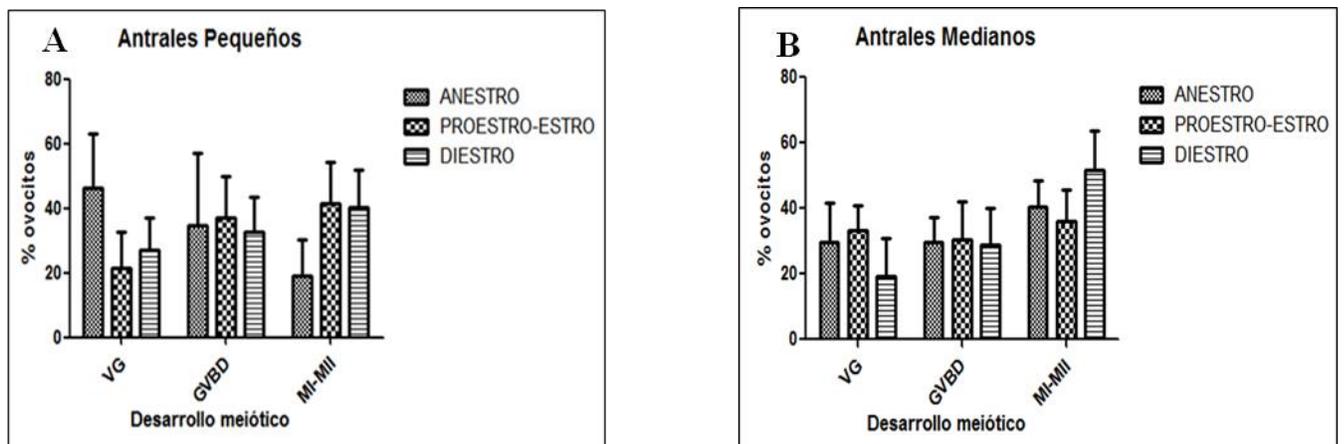


Figura 6: Desarrollo meiótico de ovocitos provenientes de FPOs de acuerdo al tamaño folicular en las diferentes etapas del ciclo estral.

En comparación a los ovocitos de FMOs, los ovocitos provenientes de FPOs tuvieron mayores tasas de VG ($P < 0,05$) (Tabla 3). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en la capacidad de reiniciar la meiosis y alcanzar el estado de MI-MII.

En anestro no hubo diferencias significativas en los ovocitos que permanecieron como VG y que avanzaron en el desarrollo hasta MI-MII, entre folículos antrales pequeños de FPOs y FMOs (Figura 7A). En relación a los antrales medianos, no hubo diferencias en la capacidad de desarrollo meiótico, teniendo porcentajes similares de VG, GVBD y MI-MII en ambos tipos de folículos (FPOs y FMOs) (Figura 6B).

En la etapa de proestro-estro, no hubo diferencias significativas entre los ovocitos provenientes de FPOs y FMOs antrales pequeños (Figura 7C). Sin embargo, los ovocitos provenientes de FPOs antrales medianos tuvieron mayores tasas de permanencia en vesícula germinal ($P < 0,05$) en comparación a los ovocitos de FMOs en el mismo estado de desarrollo folicular (Figura 7D).

En la etapa de diestro, no hubo diferencias significativas en los ovocitos provenientes de folículos antrales pequeños y medianos de FPOs y FMOs que permanecieron como vesícula germinal o en su capacidad de reiniciar la meiosis, alcanzando porcentajes similares de MI-MII (Figura 7E y 7F).

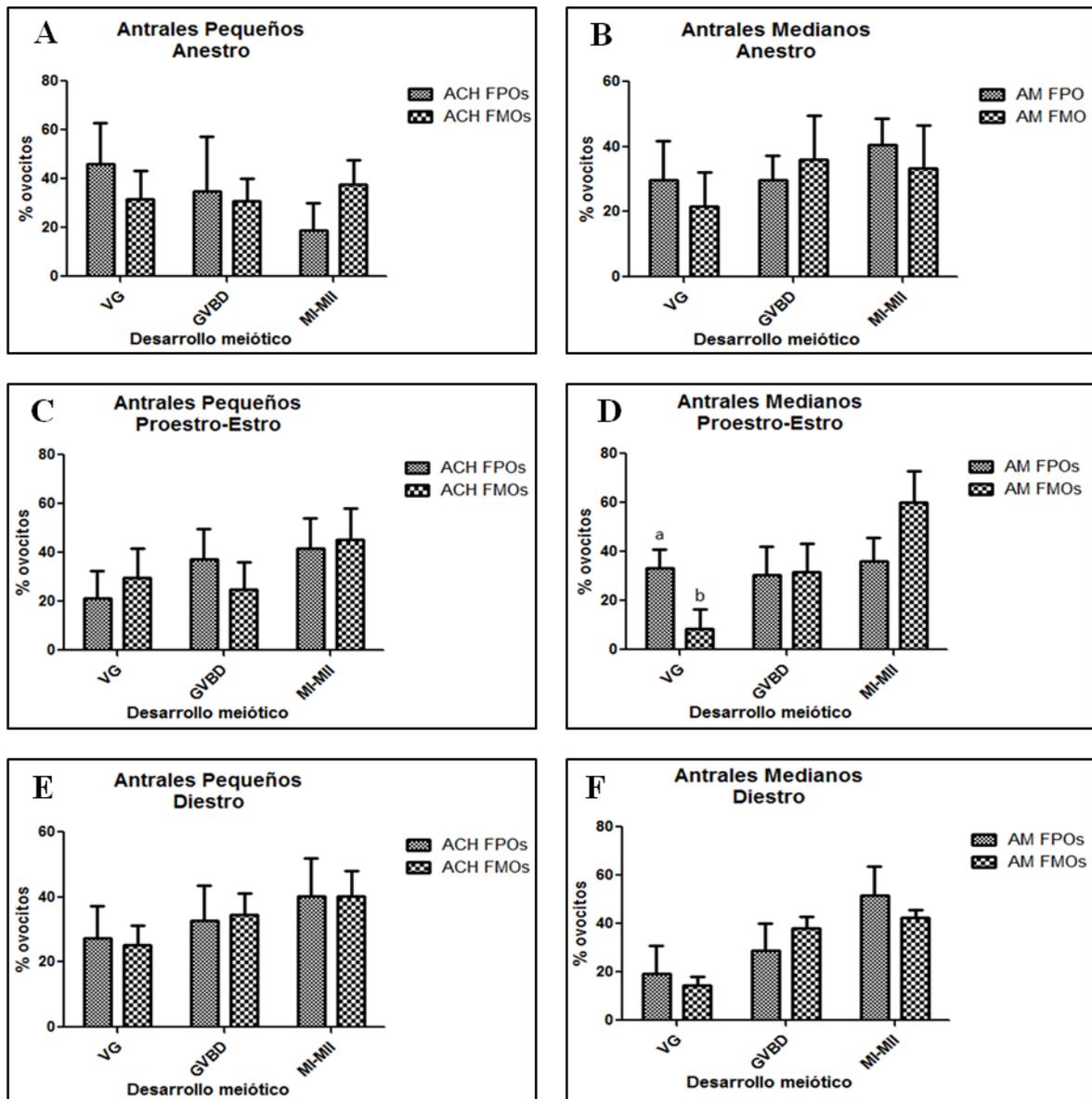


Figura 7: Comparación de maduración *in vitro* entre FPOs y FMOs de acuerdo al Tamaño Follicular y Etapa del Ciclo Estral. ACH: Antral Pequeño; AM: Antral Mediano; FPO: Folículo Poliovocítico; FMO: Folículo Monovocítico.

DISCUSIÓN

Los FPOs en la perra representan un alto porcentaje en comparación a otras especies. En este trabajo se pudo evaluar por primera vez la capacidad de maduración en cultivo de los ovocitos provenientes de FPOs en comparación a aquellos provenientes de FMOs diferenciando el tamaño folicular de origen y etapa del ciclo de la donante.

Los resultados mostraron que los ovocitos provenientes de FPOs permanecieron en mayores porcentajes en estados de VG que los ovocitos de FMOs. Esto se podría relacionar al diferente tamaño observado en el presente estudio, entre los ovocitos de FPOs independiente de la etapa del ciclo estral, coincidiendo con estudios previos (Reynaud *et al.*, 2009), dado que en la perra se determinó que el tamaño tiene influencia sobre la calidad del ovocito y por lo tanto en la competencia meiótica (Hewitt y England, 1998; Otoi *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2009). En los FPOs, se ha evidenciado que los ovocitos de mayor tamaño dentro de un folículo tienen mayores tasas de mucificación en la perra (Reynaud *et al.*, 2009) y la coneja (Al-Mufti *et al.*, 1988), y en esta última además se determinó que tienen menor capacidad de desarrollo *in vitro* que los de menor tamaño (Al-Mufti *et al.*, 1988), indicando que sólo algunos ovocitos dentro del mismo folículo tienen competencia meiótica. Por otra parte, al haber una mayor cantidad de ovocitos dentro de un folículo, los factores inductores de la meiosis como MPF y MAPK (Saint-Diezer *et al.*, 2004) podrían ser menos eficientes en todos los ovocitos para inducir el reinicio meiótico. Estos factores promotores de la meiosis serían activados posterior al peak de LH en la perra (Luvoni *et al.*, 2005), coincidiendo con el cambio de la configuración de la cromatina de VG difusa previo al peak de LH, a una más condensada (Reynaud *et al.*, 2009). Además, posterior al peak de LH, ocurre la mucificación de las capas más externas de las células del cúmulo dentro del folículo (Reynaud *et al.*, 2005), inhibiendo la reanudación meiótica, por mecanismos aún no dilucidados en la perra, la cual se reinicia dentro del oviducto (Chastant-Maillard *et al.*, 2011), cuando la actividad de MPF y MAPK aumenta (Saint-Dizier *et al.*, 2004). Por ende, la acción de estos factores promotores de la meiosis en la perra sería más tardía en comparación a otras especies, en las cuales la reanudación de la meiosis ocurre al interior del folículo (Hasegan *et al.*, 2012).

El hecho de que los ovocitos de FMOs permanecieron en bajo porcentaje como VG, indica que tendrían una mayor capacidad para avanzar en el desarrollo meiótico en

comparación a los ovocitos de FPOs. La falta de diferencias significativas en los estados finales de desarrollo meiótico entre los ovocitos de ambos tipos de folículos, puede ser debido a que los ovocitos de FMOs fueron quedando en etapas intermedias sin alcanzar la metafase, explicando que no haya diferencias significativas en los porcentajes de GVBD.

No se observaron diferencias en las tasas de MI-MII en los ovocitos provenientes de estos FPOs en comparación a aquellos ovocitos únicos en un folículo. Lo anterior indicaría que en la perra sería una característica reproductiva adicional, independiente del tamaño de desarrollo folicular y de la etapa del ciclo estral, lo cual se podría relacionar incluso con la alta tasa de prolificidad en la hembra canina doméstica (Payan-carreira y Pires, 2008).

En la cerda, los ovocitos de FPOs tienen una menor tasa de IVM, en comparación a los provenientes de FMOs. En otras hembras mamíferas como la coneja (Al-mufti *et al.*, 1991) y la mujer (Dandekar *et al.*, 1988) los ovocitos de FPOs tienen una baja capacidad meiótica, considerando que la coneja en promedio tiene una tasa de MII de 70% (Tao *et al.*, 2007) y la mujer tiene sobre un 50% de MII (Combelles *et al.*, 2002). En aquellas especies, la prevalencia de FPOs es menor en comparación a la perra, por lo que su presencia en esta última puede tener una mayor significancia en términos del desarrollo. A pesar de los bajos porcentajes de maduración de los ovocitos de FPOs en aquellas especies, el llegar a alcanzar la MII, indicaría que al menos algunos ovocitos de este tipo de folículos tienen competencia meiótica. En estudios de cerdas, también se ha logrado la fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* hasta la etapa de blastocisto (Stankiewicz *et al.*, 2009), aunque en un menor porcentaje en comparación a los ovocitos únicos en un folículo.

En la perra hay poco conocimiento acerca del periodo en el cual los ovocitos adquieren la competencia meiótica. Algunos estudios describen que ésta se adquiere gradual y secuencialmente durante la foliculogénesis (Songsasen y Wildt, 2005; Hussein *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2016). Hay muchos factores involucrados en el desarrollo de los folículos ováricos y la dinámica entre estos a través del ciclo estral proporcionarían la competencia meiótica del ovocito, como se ha descrito en otras especies (Hinrichs, 2010; De Bem *et al.*, 2014; Kubo *et al.*, 2015; Topfer *et al.*, 2016). Entre ellos, factores endocrinos como hormona folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), estradiol (E2) y progesterona (P4), los cuales en estudios de maduración *in vitro* en la perra, mejoran los porcentajes de IVM (De Los Reyes *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; 2010; Lee *et al.*, 2007).

Además, hay factores paracrinos como el factor de crecimiento diferencial (GDF-9) y proteína morfogenética ósea (BMP-15), en que su expresión varía durante el desarrollo folicular (Fernández *et al.*, 2016; Palomino y De Los Reyes, 2016). Al haber más de un ovocito dentro de un folículo y ser estos factores producidos también por el ovocito en la perra (De Los Reyes *et al.*, 2013), se puede asumir que los FPOs pueden tener mayores concentraciones de estas y otras proteínas, influenciando los porcentajes finales de maduración. Aunque en cerdas (Stankiewicz y Blaszczyk, 2014), no se han observado diferencias en la concentración de GDF-9 y BMP-15 en el fluido folicular de FPOs y FMOs, no se sabe si en la perra el nivel de los factores paracrinos intrafoliculares varía en los FPOs, influyendo en el desarrollo de los ovocitos de FPOs.

Estudios de la influencia del ciclo estral sobre las tasas de maduración *in vitro* han mostrado resultados contradictorios. Hay reportes donde no se han encontrado asociaciones (Otoi *et al.*, 2002; Rodrigues y Rodrigues, 2003) y otros donde evidenciaron una influencia significativa (Luvoni *et al.*, 2001; Otoi *et al.*, 2001; Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Evecen *et al.*, 2010). Sin embargo, en ninguno se ha diferenciado el tipo de folículo de procedencia FPO o FMO en relación a la etapa del ciclo. Por tanto, es probable que en las diferentes etapas del ciclo reproductivo haya más factores que estén influenciando la competencia meiótica.

La interacción entre el ovocito y células del cúmulo (Luvoni *et al.*, 2001; Silva *et al.* 2005; Sun *et al.* 2010) y el tamaño folicular de procedencia del ovocito para el cultivo en la perra, serían factores importantes, debido a lo reportado previamente por Songsasen y Wildt, (2005) y Reunaud *et al.*, (2009) quienes indican que los ovocitos de folículos antrales mayores a 2 mm y 4 mm, respectivamente, tendrían mayor capacidad meiótica. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio donde se utilizaron solo los ovocitos provenientes de folículos antrales pequeños (3-4,9 mm) y medianos (5-7,9 mm), ambos encontrados en todas las etapas del ciclo estral, tuvieron tasas similares de MI-MII.

La prolongada duración de la etapa de anestro en la perra (Concannon, 2011) permite que haya una dinámica hormonal particular. Si bien en esta especie no se conoce la dinámica de las ondas foliculares, se sugiere que comienza a mediados de esta etapa del ciclo, entre los días 100 y 60 previo al peak de LH (England *et al.*, 2009), coincidente con el aumento de los pulsos de FSH y LH (Concannon, 2011), permitiendo el desarrollo de

folículos antrales, aumentando su proporción a finales de anestro, donde la frecuencia de los pulsos de LH y FSH es aún mayor (Concannon, 2011). Lo anterior permite que se encuentren folículos en distintos estados de desarrollo, desde folículos pre-antrales hasta antrales medianos, como se evidenció en el presente estudio. Sin embargo, según reportes previos en la perra, se ha señalado que la mayor población folicular presente durante el anestro, en comparación a otras etapas del ciclo, son folículos pre-antrales (Lunardon *et al.*, 2015), los cuales contienen ovocitos con baja competencia meiótica (Bolamba *et al.*, 1998; 2002; Songsasen y Wildt, 2005; Serafim *et al.*, 2010), influyendo en los bajos porcentajes de maduración *in vitro* (Luvoni *et al.*, 2001; Otoi *et al.*, 2001; Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Evencen *et al.*, 2010) en comparación a proestro, estro y diestro, por lo que los ovocitos provenientes de estos folículos no fueron considerados en ninguna etapa del ciclo estral, en este estudio.

En proestro-estro, una proporción cercana a un 85% de los folículos correspondieron a folículos antrales, como se observó en el presente estudio y en otros (England *et al.*, 2009; Reynaud *et al.*, 2009), lo que estaría relacionado a las altas tasas de VG en los ovocitos de FPOs en estado antral mediano en comparación a los provenientes de FMOs, durante estas fases del ciclo estral (Fig. 7D). Como se observó en el presente estudio y en otros (Reynaud *et al.*, 2009) a mayor desarrollo folicular, mayor es la diferencia en relación a la morfología y tamaño de los ovocitos al interior del mismo folículo. Según estudios previos en la perra, los ovocitos de folículos antrales tienen una mayor competencia meiótica (Songsasen y Wildt, 2005; Reynaud *et al.*, 2009) y además, en estro se pueden encontrar folículos antrales grandes o preovulatorios, los cuales contienen ovocitos con una mayor tasa de MII (Otoi *et al.*, 2001; Songsasen y Wildt, 2007; Reynaud *et al.*, 2009), influyendo de cierta manera sobre los diferentes porcentajes de maduración *in vitro* a través del ciclo estral en aquellos estudios (Luvoni *et al.*, 2001; Otoi *et al.*, 2001; Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Evencen *et al.*, 2010).

En diestro, la población folicular se ve en desmedro, debido a la gran proporción de cuerpos luteos en la corteza ovárica (England *et al.*, 2009). Sin embargo, se encontraron folículos pre-antrales hasta antrales medianos, con una mayor proporción de folículos antrales pequeños, lo que sugiere que provenían de una onda folicular previa, por ende, estos folículos podrían estar en atresia. Sin embargo, alcanzaron porcentajes similares de

MI-MII a las demás etapas del ciclo estral, lo que se puede deber a las altas concentraciones de P4 durante el diestro (Concannon, 2011), hormona la cual se ha relacionado a la inhibición de la atresia folicular en ratas (Markstrom *et al.*, 2002), aunque no está claro su rol antiapoptótico en la perra.

De un total de 64 perras, la prevalencia de FPOs fue de más de un 70%, porcentaje superior a lo obtenido en otros estudios, donde se evidenció un 55% (Lunardon *et al.*, 2015), 40% (Payan-Carreira y Pires, 2008) y 14% (Telfer y Gosden, 1987). En esos estudios se evaluó un menor número de perras a lo utilizado en este trabajo.

Los FPOs se presentaron en todas las edades evaluadas, lo que concuerda con otros trabajos donde se describe su presencia incluso en perras de más de 10 años (Payan-Carreira y Pires, 2008). La incidencia de estos folículos es más alta en perras <1 año (92%) que en hembras >4 años (33%), concordando con otros estudios que han descrito una asociación negativa entre la prevalencia de estos folículos y la edad de la perra (Telfer y Gosden, 1987; Payan-Carreira y Pires, 2008). Se ha planteado que los FPOs van disminuyendo con la edad, debido a que tendrían la capacidad de ovular y así se reduce el stock de este tipo de folículos (Payan-Carreira y Pires, 2008), o bien, al haber más de un ovocito al interior de un folículo, estos compitan por los recursos, no siendo suficientes para su crecimiento, por ende el ovocito entraría en un proceso de atresia, extendiéndose en todo el folículo, con lo cual este pierde su integridad y funcionalidad (Sharma, 2000; Chedrese, 2003), teniendo como consecuencia una disminución del stock de estos folículos a medida que aumenta la edad de la hembra.

En el presente estudio, se encontraron FPOs en todos los tamaños foliculares desde pre-antral hasta antrales grandes. Los estados de desarrollo folicular que en mayor proporción se encontraban fueron los antrales pequeños y antrales medianos, en comparación a preantrales y antrales grandes, lo que indicaría que este tipo de folículos tienen capacidad de avanzar en el desarrollo folicular hasta conseguir el estado preovulatorio, aunque en un porcentaje bajo de ellos, según lo encontrado en el presente estudio (3%) concordando con otros (Reynaud *et al.*, 2005; 2009). Al parecer, este tipo de folículos tendrían una menor capacidad de desarrollo folicular en comparación a los FMOs. Otros estudios en la perra, han encontrado FPOs preantrales, antrales pequeños y antrales medianos (Lunardon *et al.*, 2015), al igual que en la gata (Miclaus *et al.*, 2009), la cerda

(Stankiewicz *et al.*, 2009) y la coneja (Al-Mufti *et al.*, 1988), siendo esta última la única especie, aparte de la perra, en la que se han encontrado estados finales de desarrollo folicular, aunque en un bajo porcentaje (Brambell y Mills, 1947 citado por Reynaud *et al.*, 2010; Al-Mufti *et al.*, 1988). En la perra no se ha determinado la capacidad de ovulación de los FPOs, estudios sugieren que pueden ovular, aunque en un bajo porcentaje (Reynaud *et al.*, 2005).

No se encontró diferencias en los porcentajes de FPOs de acuerdo a la etapa del ciclo estral. Sin embargo, en Proestro-Estro, el número y la prevalencia de FPOs tiende a ser mayor, en comparación a las otras etapas del ciclo estral. Lo anterior se relaciona a que en esta etapa del ciclo estral hay un mayor desarrollo de folículos ováricos (England *et al.*, 2009) y además según un reporte previo, se determinó que las hembras en proestro-estro tienen una alta prevalencia de FPOs, cercana a un 52% (Reynaud *et al.*, 2009), aunque en este último no se comparó con las otras etapas del ciclo estral. Por otra parte, la mayoría de las perras en Proestro-Estro utilizadas en el presente estudio eran jóvenes (8 meses hasta 3 años), por ende, podría estar influenciando el factor edad sobre la prevalencia de estos folículos, más que el factor hormonal.

De 270 FPOs evaluados, el número de ovocitos por folículo varió entre 2 a 8 ovocitos, habiendo un promedio de 2-3 ovocitos por folículo, coincidiendo con estudios previos (Payan-Carreira y Pires, 2008; Lunardon *et al.*, 2015), aunque se ha descrito que la perra puede tener hasta 17 ovocitos al interior de un folículo (Payan-Carreira y Pires, 2008). Además, se pudo evidenciar que a mayor cantidad ovocitos dentro de un folículo la morfología entre estos varía en relación al tamaño de cada ovocito y la calidad de estos al igual como se reportó en un estudio previo (Reynaud *et al.*, 2009), independiente de la etapa del ciclo estral.

En conclusión, los resultados del presente estudio revelan una alta prevalencia de FPOs en la perra, lo que probablemente correspondería a una característica reproductiva propia de la especie, sin afectar la maduración *in vitro*. Sin embargo, que los ovocitos provenientes de FPOs hayan tenido mayores tasas de VG en relación a los ovocitos de FMOs, podrían estar influenciando de cierta forma sobre los bajos porcentajes de MI-MII obtenidos *in vitro*, hasta la fecha. En base a esto, se podría inferir que los requerimientos involucrados en el reinicio meiótico de los ovocitos podrían ser mayores en comparación a

los necesarios para los estados finales de la meiosis, o bien que sólo algunos ovocitos dentro del folículo tendrían la capacidad de maduración en desmedro de otros. Sin embargo, los ovocitos de FPOs que inician el desarrollo nuclear, tendrían igual capacidad de alcanzar la maduración meiótica en comparación a aquellos ovocitos de FMOs.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÈS, J.** 1988. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. *J. Reprod. Fert* 82:15-25.
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.; DURRANT, B.** 1998. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:933-42.
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.; OLSON, M.; SANDLER, J.; DURRANT, B.** 2002. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 58:1689-703.
- BRAMBELL, F.; MILLS, I.** 1947. Studies on sterility and prenatal mortality in wild rabbits; the loss of ova before implantation. *J Exp Biol* 24(1-2):192-210.
- CHASTANT-MAILLARD, S.; VAIRIS DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; MEYLHEUC, T.; FONTBONNE, A.; CHODKIEWICZ, M.; SAINT-DIZIER, M.; REYNAUD, K.** 2011. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* 23:391-402.
- CHEDRESE, J.** 2003. Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: Efectos de los esteroides. *Rev Col Cienc Pec* 16:171-182.
- COMBELLES, C.; CEKLENIK, N.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.** 2002. Assesment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocyte. *Human Reprod* 17(4):1006-1016.
- CONCANNON, P.** 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci* 124:200-210.
- DANDEKAR, P.; MARTIN, V.; GLASS, R.** 1988. Polyovular follicles associated with human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49:483-486.
- DE BEM, T.; ADONA, P.; BRESSAN, F.; MESQUITA, L.; CHIARATTI, M.; MEIRELLES, F.; LEAL, C.** 2014. The Influence of Morphology, Follicle Size and Bcl-2 and Bax Transcripts on the Developmental Competence of Bovine Oocytes. *Reprod Dom Anim* 49:576-583.
- DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, 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.; PALOMINOS, 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.; PALOMINO, J.; JOFRÉ, S.; VILLARROEL, A.; MORENO R.** 2012. Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum dynamic during meiotic development in canine oocytes. *Reprod Dom Anim* 47:93-97.
- DE LOS REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUEZ, H.; PALOMINO, J.** 2013. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. *Theriogenology* 80:587-596.
- ENGLAND, G.; RUSSO, M.; FREEMAN, S.** 2009. Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reprod Dom Anim* 44:53-58.
- EVECEN, M.; CIRIT, U.; DEMIR, K.; OZDAS, O.; TAS, M.; BIRLER, M.; PABUCCUOGLU, S.** 2010. Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Anim Reprod Sci* 117:160-165.
- FERNANDEZ, T.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; PERALTA, O.; DE LOS REYES, M.** 2016. Differential expression of GDF-9 and BMP- 15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 167:59-67.
- HASEGAN, I.; SONEA, A.; MATEI, M.; VINTILA, L.; ION, C.; BIRTOIU, A.** 2012. Current Relevant Knowledge on Dog Reproductive Physiology- a Review. *J Anim Sci Biotechnol* 45:172-180.
- HEWITT, D.; ENGLAND, G.** 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49:957-996.
- HINRICHS, K.** 2010. The Equine Oocyte: Factors Affecting Meiotic and Developmental Competence. *Mol Reprod Dev* 77:651-661.
- IGUCHI, T.; FUKAZAWA, Y.; UESUGI, Y.; TAKASUGI, N.** 1990. Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 43:478-84.
- IGUCHI, T.; KAMIYA, K.; UESUGI, Y.; SAYAMA, K.; TAKASUGI, N.** 1991. *In vitro* fertilization of oocytes from polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* 5:359-363.

KIM, M.; HERU, Y.; JU, H.; JANG, G.; JIN, H.; SEUNG, K.; KEUN, S.; CHUN, B.; SUK, W. 2005. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J Vet Sci* 5(3):253-258.

KIM, B.; LEE, S.; HYUN, B.; SHIN, M.; YOO, D.; LEE, S.; PARK, Y.; HA, J.; RYOO, Z. 2010. Effects of Gonadotropins on In Vitro Maturation and of Electrical Stimulation on Parthenogenesis of Canine Oocytes. *Reprod Dom Anim* 45:13-18.

KOWALESKI, M.; IHLE, S.; SIEMIENUICH, M.; GRAM, A.; BOOS, A.; ZDUNCZYK, S.; FINGERHUT, J.; HOFFMAN, B.; SCHULER, G.; JURCZAK, A.; DOMOSLAWSKA, A.; JANOWSKI, T. 2015. Formation of the early canine CL and the role of PGE2 in regulation of its function: An *in vivo* approach. *Theriogenology* 83(6):1038-1047p.

KUBO, N.; CAYO-COLCA, I.; MIYANO, T. 2015. Effect of estradiol-17 β during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J* 86:251-259.

LEE, H.; SEO, Y.; YIN, X.; CHO, S.; LEE, S.; KIM, N.; CHO, S.; KONG, I. 2007. Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Reprod Domest Anim* 42:561-565.

LUNARDON, N.; SILVA-SANTOS, K.; JUSTINO, R.; DESSUNTI, G.; SENEDA, M. 2015. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multiocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology* 83:1015-1020.

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

MARKSTROM, E.; SVENSON, E.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123:23-30.

- MICLAUS, V.; PESTEAN, C.; OANA, L.; RUS, V.; OBER, C.** 2009. Assessments upon morphological and functional signification of multiocytic follicles from domestic cat (*FELIS CATUS*). *Ann Rom Soc Cell Biol* 14(1):147-151.
- OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KURNIANI, N.; SUZUKI, T.** 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 13:151-155.
- OTOI, T.; SHIN, T.; KRAEMER, DC.; WESTHUSIN, ME.** 2007. Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Dom Anim* 42: 184-189.
- PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M.A.** 2008. Multiocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. *Theriogenology* 69:977-982.
- REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130:193-201.
- REYNAUD, K.; 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.
- REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2010. Les follicules polyovocytaires. *Gynecol Obstet Fertil* 38:395-397.
- REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; SAINT-DIZIER, M.; THOUMIRE, S.; MARNIER, C.; TAHIR, MZ; MEYLHEUC, T; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2012. Folliculogenesis, Ovulation and Endocrine Control of Oocytes and Embryos in the Dog. *Reprod Domest Anim* 47:66-69.
- RODRIGUES, B.; RODRIGUES, J.** 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte 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. *Mol Reprod Dev* 68:205-212.

- SALAVATI, M.; GHAFARI, F.; ZHANG, T.; FOULADI-NASHTA, A.** 2012. Effects of oxygen concentration on in vitro maturation of canine oocytes in a chemically defined serum-free médium. *Reproduction* 144:547-556.
- SERAFIM, M.; ARAÚJO, V.; SILVA, G.; DUARTE, A.; ALMEIDA, A.; CHAVES, R.; CAMPELLO, C.; LOPES, C.; DE FIGUEIREDO, J.; DA SILVA, L.** 2010. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology* 74:749-55.
- SHARMA, R.** 2000. Follicular atresia in goat: A review. *Indian J Anim Sci* 70:1035-1046.
- SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL H.T.; ROELEN, B.A.; FIGUEIREDO, J.R.** 2005. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod Dev* 70:11-19.
- SONGSASEN, N.; WILDT, D.E.** 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.
- SONGSASEN, N.; WILDT, D.E.** 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Anim Reprod Sci* 98:2-22.
- STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.; UDALA, J.** 2009. A Study on the Occurrence of Polyovular Follicles in Porcine Pvaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone Concentrations, Quality of Oocytes and their *in vitro* Fertilization. *Anat Histol Embryol* 38:233-239.
- STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.** 2014. Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (bmp-15) and growth differentiation factor-9 (gdf-9) in follicular cysts, mono - and polyoocyte follicles in gilts. *Acta Veterinaria-Beograd* 64(1):24-32.
- SUN, R.Z.; LEI, L.; CHENG, L.; JIN, Z.F.; ZU, S.J.; SHAN, Z.Y.; WANG, Z.D.; ZHANG, J.X.; LIU, Z.H.** 2010. Expression of GDF9, BMP15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *J Mol Histol* 6:325-332.
- TAO, Y.; CAO, C.; ZHANG, M.; FANG, F.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; DING, J.; ZHANG, X.** 2007. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *J Anim Physiol Anim Nutr* 92:438-447.

TELFER, E.; GOSDEN, G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Infertil* 81:137-147.

TOPFER, D.; EBELING, S., WEITZEL, J.; SPANNBRUCKER, A. 2016. Effect of Follicle Size on In Vitro Maturation of Pre-Pubertal Porcine Cumulus Oocyte Complexes. *Reprod Domest Anim* 51:370–377.

WILLINGHAM-ROCKY, K.; HINRICHS, K.; 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.