

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REPORTE FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE PERRAS COCULTIVADAS CON
CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO.**

Prestadora de Servicio Social:
Fernanda Cecilia Hernández Alvarado
Matrícula: 2132035880

Asesores:
Interno: Dr. José Ernesto Hernández Pichardo
Núm. Económico: 16587

Externo: MBE. José Luís Rodríguez Suástegui.
Cédula Profesional: 9598993

Lugar de realización:
Laboratorio "Manejo de la Reproducción", Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y Término:
Del 27 de mayo al 27 de noviembre del 2019.

ÍNDICE	Páginas
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. Ciclo estral de la perra	4
3.2. Crecimiento de los ovocitos	5
3.2.1. Aspectos estructurales y bioquímicos	5
3.2.1.1. Lípidos	6
3.2.1.2. Zona Pelúcida	6
3.3. Maduración <i>in vitro</i>	6
3.3.1. Factores que afectan la maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos	8
3.3.1.1. Características del donador	8
3.3.1.1.1. Edad	8
3.3.1.1.2. Raza	8
3.3.1.1.3. Etapa del ciclo estral	8
3.3.1.2. Tamaño del folículo	9
3.3.1.3. Medio de cultivo	9
3.3.1.4. Tiempo de cultivo	9
3.3.1.5. Suplementación de los medios de cultivo	10
3.4. MIV cocultivado con células del oviducto	10
4. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivos particulares	11
5. METODOLOGIA UTILIZADA	11
6. ACTIVIDADES REALIZADAS	13
7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS	13
8. RESULTADOS	14
9. DISCUSIÓN	15
10. CONCLUSIONES	17
11. RECOMENDACIONES	17
12. LITERATURA CITADA	18

1. RESUMEN

El objetivo del Servicio Social fue evaluar el efecto del cocultivo de las células oviductales suplementado con gonadotropinas (Hormona Folículo Estimulante 0.5 UI/mL y Gonadotropina Coriónica Humana 0.5 UI/ml) en la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de caninos, evaluadas a las 24, 48 y 72 h. Se obtuvo un total de 593 ovocitos (200 perras) en donde se observaron los estadios de Vesícula Germinal (50.86%, 44.81% y 34.47%) ($P < 0.05$), Metafase I (16%, 16.23% y 20.45%), Metafase II (1.71%, 0.65% y 1.89%) y no evaluados (31.43%, 38.31% y 43.18%) a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente, no observándose diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los estadios. Se concluye que la suplementación con células del oviducto no mostro una mejoría en la MIV, esto puede ser debido diversos factores como son: estado del ciclo estral de la perra, tamaño de los folículos de donde se obtuvieron los ovocitos o falta de suplementación del medio de cultivo.

2. INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo, el perro doméstico ha sido utilizado como animal de compañía en el mundo, así como una herramienta en las actividades cotidianas de los humanos como: la caza, pastoreo, cultivos agrícolas. Además, esta especie se utiliza como una herramienta de ayuda a personas con discapacidad visual u otras discapacidades (trastornos emocionales y de comportamiento como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad "TDAH"), el estrés, la ansiedad o la depresión, adicciones o alteraciones psíquicas y neurológicas como el Alzheimer, trastornos del espectro autista, con personas dependientes y de edad avanzada (Songsasen y Wildt, 2007). También es utilizado como modelo de estudio genético, ya que hay trastornos y enfermedades que se asemejan a los humanos (Songsasen y Wildt, 2007). De ahí la importancia de esta especie y la aplicación de biotecnología para su reproducción como es la fertilización *in vitro* (FIV), siendo un prerrequisito para esta técnica, la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), que actualmente representa un obstáculo para la FIV, ya que a pesar de ser una de las especies más investigadas no se cuenta con un protocolo establecido de MIV específico para los caninos (No *et al.*, 2018).

La MIV en la especie canina ha tenido poco éxito, ya que menos del 20% alcanza la maduración en metafase II (MII) después de un periodo de 48–72 h (No *et al.*, 2018). Se reporta que los ovarios de los carnívoros que son transportados durante largos periodos a temperaturas de 35 °C a 38 °C sufren una autólisis celular que afectan la MIV de los ovocitos (Evence *et al.*, 2010).

Existen diferencias en la fisiología reproductiva de los caninos, como es la maduración de los ovocitos que es llevada a cabo en el oviducto en lugar del folículo, por lo que se han utilizado las células epiteliales del oviducto para aumentar el porcentaje de MIV de los ovocitos (No *et al.*, 2018).

El oviducto en perras cumple una función muy importante en la reproducción, ya que es el sitio de almacenamiento de los gametos, además de llevarse a cabo la fertilización y desarrollo embrionario temprano. El oviducto consta de tres segmentos principales: infundíbulo, ámpula e istmo. Se ha reportado que células epiteliales oviductales obtenidas de la región ampular, afectan el endurecimiento de la zona pelúcida *in vitro*, mientras que las células recuperadas del istmo influyen principalmente en la tasa del desarrollo embrionario temprano (Enginler *et al.*, 2014). Además, las células secretoras del oviducto producen un fluido abundante en aminoácidos y diversos factores que proporcionan un microambiente óptimo para la maduración de los ovocitos, capacitación de los espermatozoides, la fertilización y desarrollo embrionario (No *et al.*, 2018).

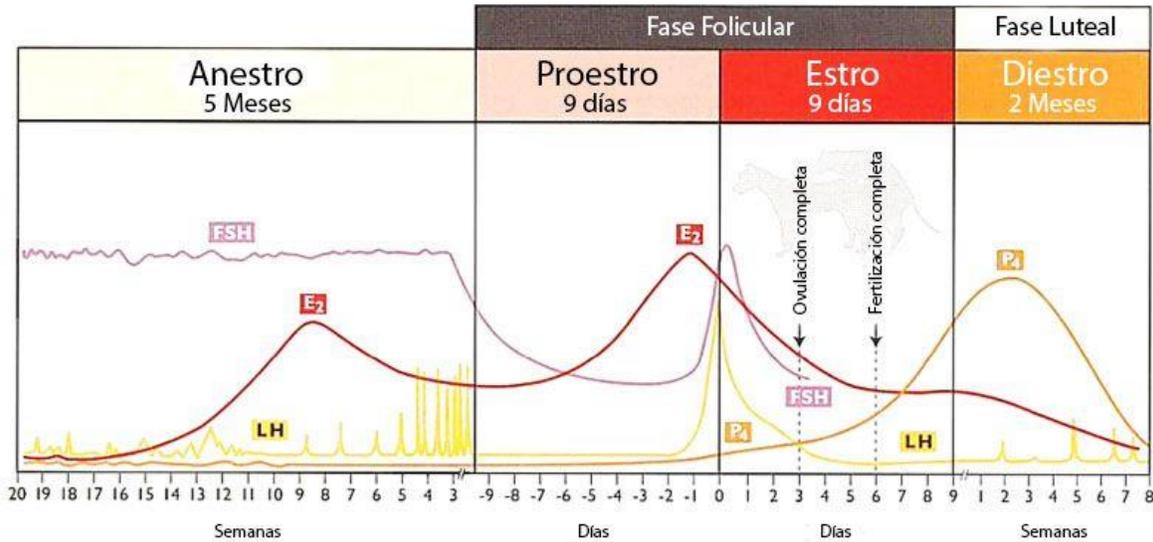
3. MARCO TEÓRICO

3.1. Ciclo estral de la perra

La fisiología reproductiva de la perra es peculiar en comparación con otras especies domésticas (Vannucchi *et al.*, 2006), ya que generalmente es monoéstrica estacional, ovulando solo una o dos veces al año en un intervalo de 5 a 12 meses (Songsasen y Wildt, 2007). El ciclo estral de la perra doméstica se caracteriza por una fase folicular (proestro y estro) donde los folículos ováricos se desarrollan y aumentan de tamaño a medida que se acerca la ovulación, dicha fase tiene una duración de 2 semana aproximadamente (Enginler *et al.*, 2014), una fase lútea

(diestro) tiempo en donde los niveles de progesterona circulante son elevados con una duración de aproximadamente 2 meses y por ultimo una fase anéstrica (anestro), que se caracteriza por la falta de comportamiento sexual o actividad gonadal que dura de 2 a 10 meses (Songsasen y Wildt, 2007) (Fig. 1).

Figura 1. Ciclo estral de la perra.



Fuente: (Senger, 2003).

3.2. Crecimiento del ovocito

3.2.1. Aspectos estructurales y bioquímicos

El ovocito del folículo primordial contiene un núcleo central grande con nucleolo, muchas mitocondrias grandes y redondeadas, retículo endoplásmico liso y pequeños cuerpos de Golgi. En esta etapa temprana del desarrollo, la interconexión entre el ovocito y las células foliculares está incompleta (Tesoriero, 1981). Las mitocondrias están presentes en cantidades crecientes a lo largo del período de crecimiento del ovocito, lo que refleja un aumento natural de la actividad metabólica (Tesoriero, 1981). En los folículos antrales tempranos, los ovocitos se llenan de mitocondrias grandes y redondeadas. A lo largo del desarrollo, el ovocito continúa aumentando de tamaño (Songsasen y Wildt, 2007).

Hasta ahora, no está claro cómo esta gran cantidad de lípidos intracelulares influye en la maduración y el desarrollo de los ovocitos del perro. Sin embargo, se especula que algunos de los desafíos asociados con la maduración de los ovocitos de perra

utilizando medios convencionales y las condiciones de cultivo están relacionados con el alto contenido de lípidos intracelulares de los ovocitos. Los ovocitos de perra pueden requerir diferentes condiciones de cultivo de aquellos con niveles inferiores de lípidos para que puedan madurar y desarrollarse *in vitro* con éxito (Songsasen y Wildt, 2007).

3.2.1.1. Lípidos

En perras de diferentes razas, el análisis de los lípidos totales extraídos de los ovocitos ha revelado que los lípidos intracelulares incluyen grasas saturadas, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y glicolípidos. Además, los tipos y cantidades de la fracción lipídica son consistentes entre individuos dentro y entre razas (Tesoriero, 1982).

3.2.1.2. Zona Pelúcida (ZP)

La ZP es fácilmente visible en los ovocitos de los folículos secundarios en desarrollo. Las proteínas de la Zona Pelúcida de perra se originan tanto de las células de la granulosa como del ovocito y se sintetizan y expresan de forma secuencial (Blackmore *et al.*, 2004). Los ovocitos con una capa de células de la granulosa no muestran transcripción de ZP durante el cultivo *in vitro*, y casualmente ninguno de estos ovocitos puede completar la maduración nuclear (Barber *et al.*, 2001).

3.3. Maduración *in vitro* (MIV)

Las técnicas *in vitro* constituyen una herramienta importante para el desarrollo de investigaciones básicas sobre la fecundación, para mejorar el rendimiento reproductivo de las especies y para la preservación de la biodiversidad (Gutiérrez, 2006). Entre estas técnicas de biotecnologías reproductivas, se encuentran la criopreservación e inseminación artificial (IA), MIV, FIV, desarrollo y manipulación embrionaria *in vitro* (Gutiérrez, 2006).

La biotecnología canina está mucho menos desarrollada que en otras especies animales, esto puede deberse a una serie de razones, siendo la más importante, la falta de interés comercial (Gobello y Corrada, 2003), pero el hecho de que muchos caninos no domésticos estén actualmente en peligro de extinción, ha impulsado a

la comunidad científica a progresar en este campo de estudio, por lo cual en los últimos años y utilizando al perro como modelo comparativo, ha evolucionado de forma sustancial (Luvoni, 2000). Además, los gametos femeninos caninos tienen características únicas en comparación con los ovocitos de muchos otros mamíferos domésticos. Las principales diferencias están representadas tanto por el entorno folicular como por la etapa meiótica de los ovocitos en la ovulación. Estas características han complicado la adaptación del conocimiento bioquímico obtenido de otras especies. En la práctica, las técnicas de reproducción asistida se han limitado en los caninos principalmente a la criopreservación de semen y a la IA y las tecnologías más avanzadas se han limitado a los laboratorios de investigación (Gobello y Corrada, 2003).

A pesar de los avances biotecnológicos obtenidos en esta área en los últimos años, los resultados de FIV en caninos y el desarrollo embrionario *in vitro* son pobres, ya que en pocos estudios en donde se ha logrado la fertilización y el desarrollo embrionario, las tasas de éxito son muy inferiores a lo logrado en otras especies (Gutiérrez, 2006).

Hay que recordar que la perra ovula sus ovocitos como primarios y se necesitan de 48–72 h para completar la maduración postovulatoria hasta la etapa de ovocito secundario en MII lo cual ocurre en el istmo del oviducto, para que sean fecundados (Enginler *et al.*, 2014).

La MIV es de gran importancia en la producción de embriones caninos (Enginler *et al.*, 2014). El primer estudio sobre la MIV y la FIV de ovocitos de perra fue informado en 1976 por Mahi y Yanagimachi, quienes informaron que aproximadamente el 25% de los ovocitos ováricos obtenidos de perras en etapas aleatorias del ciclo reproductivo lograron reanudar la meiosis y, desarrollarse a metafase I (MI) o metafase II (MII) después de ser cultivadas a las 48 - 72 horas (Songsasen y Wildt, 2007).

3.3.1. Factores que afectan la maduración *in vitro* de ovocitos

Existen varios factores que afectan la MIV al tratar de imitar lo más posible las condiciones bioquímicas foliculares y oviductales, entre estos se encuentran: la raza, edad del donador, etapa del ciclo estral, tamaño del folículo, medio de maduración, tiempo de maduración, así como los suplementos del medio como hormonas, proteínas, sustratos energéticos y otros compuestos que han sido probados para MIV (Songsasen y Wildt, 2007).

3.3.1.1. Características del donador

3.3.1.1.1. Edad

La edad de la perra influye en el número de ovocitos recuperados para los estudios de maduración. Se tiene un mayor rendimiento de folículos y ovocitos en perras con una edad entre 1 a 6 años en comparación a perras más jóvenes (<12 meses de edad) y mayores de 7 años, debido a que en perras prepúberes (4 a 6 meses) los ovocitos son incapaces de desarrollarse y completar la meiosis (Songsasen y Wildt, 2007).

3.3.1.1.2. Raza

Sonsagen *et al.*, (2002) reportaron que, al realizar un estudio de comparación de maduración de ovocitos, no observaron que la raza influya en la capacidad de maduración del ovocito, ya que no encontraron diferencias en la maduración nuclear *in vitro* entre diferentes razas como: Bóxer, Golden Retriever, Labrador, cruza de labrador y mestizos, sin embargo, las razas mestizas o cruza con labrador se obtuvieron un número mayor de folículos ováricos.

3.3.1.1.3. Etapa del ciclo estral

Aparentemente los ovocitos obtenidos de folículos preovulatorios y los recuperados durante la fase folicular (estro / proestro) completan la maduración nuclear con más éxito que los recuperados durante otras etapas reproductivas (Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, en otro estudio se encontró que los ovocitos de hembras en diestro fueron capaces de alcanzar el estadio de MII *in vitro*, como la de los ovocitos obtenidos de las hembras que se encontraban en estro, indicando además que la etapa del ciclo reproductivo también influye en la capacidad de fertilización, ya que observó una

mayor frecuencia de formación de pronúcleos en los ovocitos recolectados de perras en etapas foliculares en comparación a los obtenidos de perras en etapas lúteas (Rodrigues *et al.*, 2004).

3.3.1.2. Tamaño del folículo

Las diferencias en la competencia meiótica de los ovocitos a lo largo de las etapas del ciclo reproductivo se deben probablemente a la distribución del tamaño de los folículos y los ovocitos durante cierta etapa del ciclo estral. Otoi, et al., (2001) han demostrado que existen diferencias significativas en el diámetro medio de los ovocitos foliculares recuperados durante el estro, el diestro y el anestro ($119,2 \pm 0,7$, $107,7 \pm 0,7$ y $103,6 \pm 0,8$ μm , respectivamente). Además, se recuperan más ovocitos de ≥ 120 μm de diámetro en una fase folicular que en otras etapas reproductivas (Otoi et al., 2001). Esto es importante porque sabemos que los ovocitos deben tener al menos 100 a 120 μm (Otoi et al., 2001) para permitir la reanudación meiótica, y la maduración nuclear se mejora en los ovocitos de 120 μm en comparación con tamaños más pequeños (Otoi et al., 2001).

3.3.1.3. Medio de cultivo

Entre los principales medios de cultivo que se han usado para la MIV de ovocitos de perras, se encuentran: el medio de cultivo de tejido (TMC 199), Fluido Oviductal Sintético (SOF) y Connaught Medical Research Laboratories (CMRL 1066). Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la maduración tomando en cuenta la maduración nuclear de los ovocitos entre el TCM 199 y SOF (1 y 2% respectivamente) (Hewitt y England, 1999; Songsasen y Wildt, 2007). Aunque Songsasen et al., (2002) compararon dos medios complejos, TCM 199 y CMRL 1066 (utilizados habitualmente para IVM de ovocitos de mono rhesus) y demostraron que mayores proporciones de ovocitos cultivados en el primero (7 a 16%) completaron la maduración nuclear en comparación con el último (0– 1%).

3.3.1.4. Tiempo de cultivo

El tiempo de cultivo que requieren los ovocitos de perra para progresar meióticamente hasta la MII, ha sido tema de discusión. Si bien se ha evidenciado que la duración del cultivo tiene un efecto significativo sobre las tasas de

maduración nuclear (Hewitt y England, 1999; De los Reyes *et al.*, 2005), aún no existe acuerdo sobre el tiempo necesario para que el mayor porcentaje de los ovocitos incubados alcance la MII con la expulsión del primer corpúsculo polar. Diferentes reportes han postulado tiempos óptimos de MIV que van desde las 48 hasta las 96 h (Hewitt y England, 1999; Bogliolo *et al.* 2002; De los Reyes *et al.*, 2005).

3.3.1.5. Suplementación de los medios de cultivo

La suplementación de los medios de cultivo está orientada a cubrir los requerimientos del desarrollo de los ovocitos y mejorar las tasas de MIV (Luvoni *et al.*, 2005). Ésta se puede realizar con distintas fuentes y concentraciones de proteínas como son: Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0.3%, Suero Fetal Bovino (SFB) al 10-20%, hormonas esteroidales como estrógenos (20 µg/mL) y progesterona (20 µg/mL), gonadotropinas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH: 0.5 – 5 UI/mL), Hormona Luteinizante (LH: 0.5 – 5 UI/mL) y Gonadotropina Coriónica Humana (10 µg/mL), sustratos energéticos como ácido pirúvico (2.5 µL/mL), sin embargo, otros investigadores buscando el mismo fin, han utilizado la cafeína como complemento en el medio de maduración de ovocitos de perra durante 72 h (Luvoni *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2006; Vannucchi *et al.*, 2006; Songsasen y Wildt, 2007; Bukowska *et al.*, 2012; Salavati *et al.*, 2013).

3.4. MIV utilizando un co-cultivo con células epiteliales del oviducto.

Se ha demostrado que el enriquecimiento del medio de cultivo de maduración de los ovocitos con el Complejo Cúmulo Ovocito (COC's) bovino aumenta significativamente la maduración nuclear de los ovocitos de perra (Abdel-Ghani *et al.*, 2011). Recientemente, se han utilizado las células epiteliales del oviducto de perra para enriquecer el medio de cultivo para la maduración de ovocitos de perra, observándose un aumento en la maduración de ovocitos por la presencia de MII (13.23%) cuando las células del oviducto son obtenidas mediante lavado en comparación a las del grupo control sin células del oviducto (2.48%) (No *et al.*, 2018).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos de perra cocultivadas durante 24, 48 y 72 h con células epiteliales del oviducto de perras.

4.2. Objetivos particulares

Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos de perra cocultivadas con células epiteliales del oviducto a las 24 h.

Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos de perra cocultivadas con células epiteliales del oviducto a las 48 h.

Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos de perra cocultivadas con células epiteliales del oviducto a las 72 h.

5. METODOLOGÍA UTILIZADA

El presente Servicio Social se realizó en el laboratorio “Manejo de la Reproducción” en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, ubicado en Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México.

5.1. Obtención de Ovarios de perras

Los ovarios de las perras fueron recuperados mediante la técnica convencional de oforosalingohisterectomía (Campos, 2013). Para el procedimiento quirúrgico se utilizó una mezcla de zoletil (5 mg/kg) y Xilacina al 2% (1.4 mg/kg). El procedimiento se

5.2. Transporte de los ovarios

Los ovarios fueron transportados al laboratorio en una solución salina fisiológica (0,9% NaCl) con gentamicina (100 µg/mL) a 4 °C, dentro de las primeras 2 h posteriores a su extracción (Taş *et al.*, 2006).

5.3. Recuperación de los ovocitos y medio de maduración

Los ovarios fueron fragmentados por micro disección, con tijera y escalpelo en cajas de Petri de 90 mm en una solución de HEPES 1,4 mg/mL, piruvato de sodio 0,25

mg/mL, lactato de sodio 0,6 mg/mL, L-glutamina 0,15 mg/mL y gentamicina 0,055 mg/mL (Waurich *et al.*, 2010). Los COC's fueron identificados mediante un microscopio estereoscópico (American Optical mod. 56C-103) y colectados con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, para posteriormente ser transferidos a una caja de Petri de 35 mm con gotas de 70 μ l de TCM 199 (Abdel-Ghani *et al.*, 2012).

Los ovocitos fueron madurados en microgotas de 70 μ L de medio TCM199 con sales de Earle, L-Glutamina y 20 mM de bicarbonato de sodio suplementado con BSA al 0.3%, cisteína 1.3 mg/mL, 0.5 UI/mL de FSH-r, 0.5 UI/mL hCG, y gentamicina 0,055 mg/mL (Waurich *et al.*, 2010). La maduración se realizó en una atmósfera de 38.5 °C, 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación (Evence *et al.*, 2010), durante 24, 48 y 72 h.

5.4. Obtención y cultivo de las células epiteliales del oviducto

Después de la oforosalingohisterectomía, los ovarios se mantuvieron a 30–35 °C en solución salina fisiológica (0,9% NaCl). Los oviductos se diseccionaron de la bolsa ovárica inmediatamente y se colocaron en otra placa de Petri que contenía TCM 199. La luz del oviducto se enjuagó con el mismo medio y se raspó ligeramente, colocando dicho contenido celular en un tubo Eppendorf. Las células oviductales se lavaron mediante centrifugación de los tubos Eppendorf a 3500 rpm durante 1,5 minutos y las células se resuspendieron en TCM-199 dos veces. Se descartó el sobrenadante y se añadieron a los pellets 100 μ L de medio de maduración (Enginler *et al.*, 2014). Posteriormente se agregaron cinco microlitros del diluyente que contenía células oviductales a las microgotas que contenían los ovocitos seleccionados (Enginler *et al.*, 2014).

5.5. Evaluación de la maduración nuclear

Una vez transcurrido en tiempo de maduración (24, 48 o 72 h), los ovocitos fueron desnudados en medio TCM 199 con un gentil pipeteo utilizando un capilar de cristal. Posteriormente se fijaron en 250 μ L de solución de paraformaldehído al 2% por 15 minutos y lavarse tres veces en solución Imacel. Una vez realizado lo anterior los

ovocitos se colocaron en un portaobjetos y se les agregó 10 μ L de 4'-6-Diamidino-2phenylindole (DAPI) y se les colocó un cubreobjeto (Astudillo, 2016).

Todas las muestras fijadas y teñidas se evaluaron usando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E-600) con filtro UV (Ex. 330-380 nm). El estado de desarrollo meiótico se clasificó de acuerdo a: Vesícula Germinal (VG) la cual se identificaba por la dispersión de la cromatina; Metafase I (MI), cuando la cromatina se observa completamente condensada; Metafase II (MII) se observan los cromosomas y el primer cuerpo polar; No Evaluados (NE) los cuales no se podían identificar debido a la falta de tinción o ausencia de la cromatina (De los Reyes *et al.*, 2011).

5.6. Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de perra y las horas de incubación (24 h, 48 h o 72 h) se utilizó la prueba de chi cuadrada (χ^2) tomando como valor de significancia de $P < 0.05$ (Wayne y Cross, 2013).

6. ACTIVIDADES REALIZADAS

Las actividades que se realizaron del 27 de mayo al 27 de noviembre del 2019 durante el Servicio Social fueron: Obtención, maduración y evaluación de ovocitos recuperados de 400 ovarios de perras, elaboración de medios de cultivo y cultivos de células del oviducto, así como la revisión de literatura sobre el tema de investigación.

7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Se realizó el 100% de los objetivos y metas propuestas ya que se obtuvieron un total de 400 ovarios de perra, recuperándose 593 ovocitos los cuales se incubaron en un medio con células del oviducto durante 24, 48 y 72 h para evaluar su estado de maduración.

8. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 593 ovocitos que fueron incubados durante 24, 48 y 72 h (175, 154, 264 ovocitos respectivamente) para posteriormente ser evaluados y clasificados según su fase de maduración en: VG, MI, MII y NE.

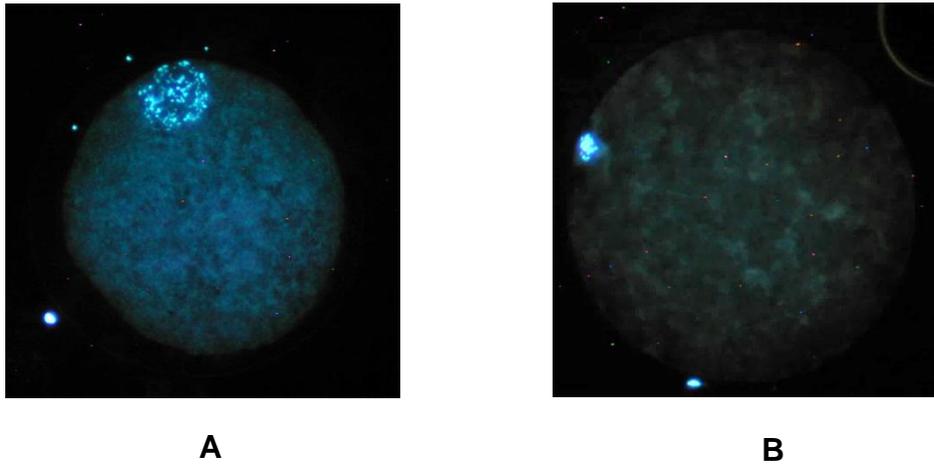
La tabla 1 nos muestra que se encontraron un mayor porcentaje de ovocitos en VG (50.8%) a las 24 h de incubación en comparación a los ovocitos cultivados durante 48 h (44.8%), y 72 h (34.4%), determinándose una diferencia significativa ($P<0.05$) con este último grupo. Se observa además que se incrementa el porcentaje de ovocitos en MI (16.0%, 16.2% y 20.4%) al igual que los ovocitos no evaluado (31.4%, 38.3% y 43.1%), conforme se incrementa el tiempo de incubación (24, 48 y 72 h, respectivamente), sin determinarse diferencia significativa entre los grupos ($P>0.05$). Los mayores porcentajes de ovocitos en MII se observaron en ovocitos cultivados a las 72 y 24 h (1.8% y 1.7%, respectivamente), siendo a las 48 h de solo 0.6%, sin encontrarse diferencia significativa entre los grupos ($P>0.05$).

Tabla 1. Resultados del estado de la cromatina de ovocitos de perra, después de diferentes tiempos de maduración *in vitro*.

TABLA GENERAL					
Tiempo de cultivo	VG (%)	MI (%)	MI I (%)	NE (%)	Total de ovocitos
24	89/175 (50.8) ^a	28/175 (16.0) ^a	3/175 (1.7) ^a	55/175 (31.4) ^a	175
48	69/154 (44.8) ^{ab}	25/154 (16.2) ^a	1/154 (0.6) ^a	59/154 (38.3) ^a	154
72	91/264 (34.4) ^b	54/264 (20.4) ^a	5/264 (1.8) ^a	114/264 (43.1) ^a	264
Total	249/593 (41.9)	107/593 (18.0)	9/593 (1.5)	228/593 (38.4)	593

VG (Vesícula Germinal), MI (Metafase I), MII (Metafase II) y NE (No Evaluados)
Diferente literal en columna significa diferencia significativa ($P<0.05$)

Figura 2. Ovocitos caninos después de 72 h



A) Ovocito en Vesícula Germinal (VG) **B)** Ovocito en Metafase I (MI)

9. DISCUSIÓN

La maduración meiótica completa comprende la progresión nuclear desde el dictioteno (estado de prolongación del diploteno) de la primera profase meiótica hasta la segunda metafase (Gutiérrez, 2006). En la primera etapa del proceso de maduración el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la meiosis y posteriormente, de forma paulatina, va obteniendo la capacidad de completar los siguientes estados de maduración nuclear hasta alcanzar la segunda metafase (Gutiérrez, 2006). El estado de VG, que corresponde a un ovocito inmaduro sin reinicio meiótico, es la forma predominante previa al cultivo y durante las primeras 24 h de incubación en ovocitos caninos recolectados de ovarios (De los Reyes *et al.*, 2005).

En el presente estudio, el porcentaje de ovocitos en VG mostró una disminución con respecto a las horas de cultivo y aumento el número de ovocitos NE, lo cual coincide a lo reportado por Vannucchi *et al.*, (2006), quienes reportan una disminución en el porcentaje de VG con respecto al tiempo de cultivo 48, 72 y 96 h (42.3, 28.8 y 10% respectivamente) y aumento el porcentaje de ovocitos no evaluados o degenerados, utilizando un sistema de cocultivo, con estrógenos (54.5, 59.7 y 55.2) y sin estrógenos (42.3, 50, 76.7%).

En los diferentes protocolos de MIV utilizan tiempos de cultivo variables, independientemente de la etapa del ciclo estral o del estado reproductivo de las donantes, siendo el periodo más utilizado es de 72 h (Luvoni, 2005). En el presente estudio, se utilizaron tres tiempos diferentes de maduración *in vitro* para los ovocitos recuperados de perras que se desconocía su estado reproductivo al momento de su recuperación, madurando más ovocitos en MII cuando se incubaron durante 72 h, lo anterior concuerda con lo encontrado por Vannucchi *et al.*, (2006) quienes encontraron un mayor porcentaje de ovocitos en MII a las 72 y 96 h (1.5 y 5.2%) de cultivo en perras anéstricas utilizando estrógenos y una monocapa de células del oviducto, sin embargo, al usar progesterona (20g μ /ml) solo obtuvieron un mayor porcentaje en MI a las 48 y 96 h (31.4 y 30.4% respectivamente), pero no aumentó el porcentaje de ovocitos en MII.

La competencia meiótica de los ovocitos depende de factores específicos, uno de los más importante son las hormonas, cuya importancia se puede verificar determinando la capacidad de los ovocitos para madurar *in vitro* de acuerdo con el estado reproductivo de la perra donante (Otoi, 2001). En el presente estudio, no se llevó a cabo una clasificación del ciclo estral en el cual se encontraban las perras, lo que posiblemente puede explicar, el bajo porcentaje de ovocitos que alcanzaron los ovocitos en MII, ya que se menciona que los ovocitos obtenidos de folículos preovulatorios así como los que están en la fase folicular, tienen una tasa de maduración más alta que aquellos ovocitos recuperados de otras etapas reproductivas (Kim *et al.*, 2004). Este hecho se puede explicar con lo reportado por Bolamba *et al.*, (2002) donde propusieron que un estímulo preovulatorio endógeno puede favorecer la síntesis de factores que estimulan la maduración nuclear de los ovocitos. Además se ha demostrado que existe una comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, pero esta depende de la fase del ciclo estral en que se encuentre la perra, ya que la formación de uniones de tipo gap ocurren durante el estro, y están involucradas en la nutrición de los ovocitos, por lo que el bajo porcentaje de ovocitos en MII puede ser consecuencia de un bajo flujo nutricional de los ovocitos ya que estas uniones de tipo gap no ocurren durante el anestro (Luvoni *et al.*, 2005).

No *et al.*, (2018) utilizaron células epiteliales del oviducto para enriquecer el medio de cultivo para la maduración *in vitro* de ovocitos de perra, haciendo una comparación entre células recuperadas de perras anéstricas y células recuperadas de perras en estro, observando un mayor número de ovocitos en MII cuando las células del oviducto son obtenidas de perras en estro. En este estudio no se sabía el estado reproductivo de las perras de donde se obtuvieron las células para realizar los cocultivos y colocar los ovocitos para su maduración, lo que pudo haber afectado los resultados obtenidos.

En este presente estudio al finalizar, solo el 1.8% (72 h) alcanzaron la MII, sin embargo, se ha mencionado que el bajo porcentaje obtenido de MII puede estar relacionado con la deficiencia en la suplementación proteica y las concentraciones de la misma (Enginler *et al.*, 2014), ya que existen reportes con porcentajes con mayor maduración 8.4% y 9.4% en MI y MII a las 24-48 h y con un porcentaje de 10.2% a las 72 h, en el cual hubo una suplementación proteica del 20% de SFB (Saint-Dizier *et al.*, 2001).

10.CONCLUSIONES

El no determinar el estado reproductivo de las perras o etapa del ciclo estral en que se encontraban al recuperar su aparato reproductor, afecto negativamente los resultados obtenidos, ya que se ha reportado que se recuperan diferentes tipos de células del oviducto, y la calidad de los ovocitos es mejor cuando las perras se encuentran en una fase estrogénica en comparación a una fase progestacional o anéstrica.

11.RECOMENDACIONES

Se recomienda que en futuros estudios sobre maduración *in vitro* de ovocitos de perras, se clasifiquen las perras en: proestro, estro, diestro y anestro, y que la recuperación de las células del oviducto sea de hembras que se encuentre en proestro o en estro. Suplementar los medios de maduración con ácido ascórbico, piruvato o cafeína, ya que protegen las células del estrés oxidativo, o la utilización

de otros medios de maduración como mSOF o adición de otros suplementos como el SFB.

12. LITERATURA CITADA

Abdel-Ghani, M.A., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S., Suzuki, H. (2011). Effect of bovine cumulus–oocyte complexes-conditioned medium on *in-vitro* maturation of canine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 10(1): 43-49.

Abdel-Ghani, M.A., Shimizu, T., Asano, T., Suzuki, H. (2012). *In vitro* maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers. *Theriogenology*, 77(2): 347-355.

Astudillo, I. A. (2016). Maduración *in vitro* de ovocitos de perra provenientes de folículos poliovocíticos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Chile. Recuperado el 15 de Octubre del 2019 de <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/145011>

Barber, M.R., Lee, S.M., Steffens, W.L., Ard, M., Fayrer-Hosken, R.A. (2001). Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology* 55: 1705–1717.

Blackmore, D.G., Baillie, L.R., Holt, J.E., Dierkx, L., Aitken, R.J., McLaughlin, E.A. (2004). Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 71: 661–668.

Bogliolo, L., Zedda, M.T., Ledda, S., Leoni, G., Naitana, S., Pau, S. (2002). Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction Nutrition Development* 42: 265-273.

Bolamba, D., Russ, K., Olson, M., Sandler, J., Durrant, B. (2002). *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*. 58:1689-1703.

Bukowska, D., Kempisty, B., Piotrowska, H., Zawierucha, P., Brussow, K., Jaśkowski, J., Nowicki, M. (2012). The *in vitro* culture supplements and selected

aspects of canine oocytes maturation. Polish Journal of Veterinary Sciences, 15(1): 199-205.

Campos, G. (2013). Medición del tiempo de inducción, anestesia, recuperación y seguimiento de constantes fisiológicas en la comparación de dos dosis de la mezcla de Tiletamina-Zolacepam y Xilacina en perros (*Canis familiaris*). Tesis de grado licenciatura. Unidad Laguna. Universidad Autónoma Agraria. Recuperado el 15 de Octubre del 2019 de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7499/GUSTAVO%20CAMPOS%20VIQUE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

De los Reyes, M., De Lange, J., Miranda, P., Palominos, J., Barros, C. (2005). Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. Theriogenology, 64: 1-11.

De los Reyes, M., 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.

Enginler, S.Ö., Sandal, A.İ., Özdaş, Ö.B., Arici, R., Ertürk, E., Çinar, E.M., Mohammed, I.F., Baran, A., Tek, Ç. Gündüz, M.C. (2014). The effect of oviductal cells on *in vitro* maturation of canine oocytes in different culture media. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 14-19.

Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Özdaş, Ö. B., Taş, M., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2010). Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. Animal Reproduction Science, 117(1): 160-165.

Gobello, C., Corrada, Y.A. (2003). Biotechnology in canine reproduction: an update. Analecta Veterinaria, 23(1): 30-37.

Gutiérrez, C. (2006). Evaluación de la suplementación del medio de cultivo con piruvato sobre la maduración *In vitro* de ovocitos caninos. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Chile. Recuperado el 20 de Noviembre del 2019 de <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/130838>

Hewitt, D.A., England, G.C.W. (1999). Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 55(1): 63-75.

Kim, M.K., Fibrianto, Y.H., Oh, H.J., Jang, G., Kim, H.J., Lee, K.S., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. (2004). Effect of mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. *Journal of Veterinary Science*. 5: 253–258.

Luvoni, G.C. (2000). Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5): 505-512.

Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. (2005) Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes *Theriogenology*, 63: 41-59.

Mahi, C.A., Yanagimachi, R. (1976). Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*, 196(2): 189-195.

No, J., Zhao, M., Lee, S., Ock, S.A, Nam, Y., Hur, T. (2018). Enhanced *in vitro* maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105: 66-74.

Otoi, T., Ooka, A., Murakami, M., Kurniani Karja, N.W., Suzuki, T. (2001). Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reproduction Fertilization Development* 13: 151–155.

Rodrigues, B.A., Dos Santos, L.C., Rodrigues, J.L. (2004). Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 67: 215–223.

Saint-Dizier, M, Renard, J.P. Chastant-Mailard, S. (2001). Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Journals of Reproduction and Fertility*. 121: 97-105.

- Salavati, M., Ghafari, F., Zhang, T., Fouladi-Nashta, A.A. (2013). Influence of caffeine pretreatment on biphasic *in vitro* maturation of dog oocytes. *Theriogenology*, 80(7): 784-792.
- Senger, P. L. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. 2ª Edición. Pullman Current Conceptions, Inc., EE. UU.
- Songsasen, N., Yu, I., Leibo, S. P. (2002). Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 62(3): 407-415.
- Songsasen, N., Wildt, D.E. (2007). Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, 98(1): 2-22.
- Taş, M., Evecen, M., Özdaş, Ö.B., Cirit, Ü., Demir, K., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2006). Effect of transport and storage temperature of ovaries on *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Animal Reproduction Science*, 96(1): 30-34.
- Tesoriero J.V. (1981) Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *Journal of Morphology* 168: 171– 179.
- Tesoriero J.V. (1982) A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. *Gamete Research* 6: 267–279.
- Vannucchi, C.I., de Oliveira, C.M., Marques, M.G., Assumpção, M.E.O., Visintin, J. A. (2006). *In vitro* canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology*, 66(6): 1677-1681.
- Waurich, R., Ringleb, J., Braun, B., Jewgenow, K. (2010). Embryonic gene activation in *in vitro* produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*), *Reproduction* 140(4): 531-540.
- Wayne, D., Cross, C. (2013). Biostatistics. A foundation for analysis in the health Science. 10ª Edición. Wiley Press, USA; pp 195.