

01669
8.
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUCCION

**OBTENCION Y MADURACION
DE OVOCITOS DE PERRA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL:
R E P R O D U C C I O N
P R E S E N T A :
PERLA CITLALLIN RUIZ JIMENEZ

ASESORES:

MVZ DVM. JAVIER VALENCIA MENDEZ
MVZ PHD. ROSA MARIA PARAMO RAMIREZ
MVZ M EN C. DEMETRIO AMBRIZ GARCIA
MVZ M. SC. SALVADOR ROMO GARCIA
MVZ. CARLOS ESQUIVEL LACROIX

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis fue financiado por el proyecto número IN303793 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y además por el Convenio ante CONACYT número 400200-5-3211N.

DEDICATORIAS.

A mi padre:

**Por su amor, apoyo y valiosos consejos
en cada segundo de mi vida.**

A mi madre:

**Por su ejemplo de responsabilidad en el
trabajo y en el hogar, además de su confianza
y cariño.**

A mi hermana Diana:

**Por su cariño, ejemplo y apoyo a lo
largo de mi vida.**

A Guillermo:

**Por su paciencia, confianza e inigualable amor
que me han brindado un amanecer lleno de esperanzas
y un hermoso porvenir. Te amo!!**

A toda la familia Rodríguez Bernal, Coquito y Tete:

**Por sus palabras de aliento, cariño y amistad incondicionales
que han ayudado a mitigar momentos difíciles.**

AGRADECIMIENTOS.

- Al Departamento de Biología de la Reproducción de UAM-Iztapalapa, por todo el apoyo brindado para la realización de éste trabajo.
- Al MVZ. MenC. Demetrio A. Ambriz García, asesor de mi tesis; por su imprescindible dirección, valiosos consejos y sincera amistad.
- A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología Celular a cargo del Dr. Miguel Betancourt en la UAM-Iztapalapa por sus valiosas enseñanzas, su ayuda y amistad.
- A la MVZ. MenC. Minerva Muñoz Gutiérrez, por su estupenda amistad, valiosa ayuda y gran apoyo a lo largo de la elaboración de esta tesis.
- MVZ. Fortino Anzúrez Barrera; MVZ. E. Carolina Bello Quiroz y a todos los que hoy trabajan en el Laboratorio de Manejo de Embriones por su linda amistad que hizo posible que el transcurso de mis experimentos se desarrollara en un ambiente de respeto y alegría.
- Al MVZ. Carlos F. Esquivel Lacroix, asesor de mi tesis, por sus valiosas enseñanzas, y sincera amistad.
- Al MVZ. Fernando Borderas, por su amistad y colaboración desinteresada e incondicional.
- Al MVZ.PhD. Luis Zarco Quintero; MVZ.M.Sc. Gustavo A. García Sánchez y al MVZ.MenC. Rafael Hernández, jurados de mi tesis, por su tiempo, comentarios y valiosas sugerencias.
- A todas las personas que de alguna manera intervinieron positivamente en esta investigación.
- A Pinguito, Agüita y Bolita por su paciencia y cariño incondicionales.

- **A todos los animales, que en muchas ocasiones con sus vidas permiten el avance de la Ciencia.**
- **A Dios, que me ha permitido alcanzar esta nueva meta en mi vida.**

CONTENIDO.

	Pagina
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	2
3. JUSTIFICACION	23
4. HIPOTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIAL Y METODOS	26
7. RESULTADOS	32
8. DISCUSION	42
9. CONCLUSIONES	52
10. RECOMENDACIONES	54
11. LITERATURA CITADA	55
ANEXOS	

RESUMEN.

RUIZ JIMENEZ PERLA CITLALLIN. Obtención y Maduración *in vitro* de ovocitos de perra (Bajo la dirección de MVZ.DMV. Javier Valencia Méndez; MVZ.PhD. Rosa María Páramo Ramírez; MVZ.MenC. Demetrio Ambriz García; MVZ.MSc. Salvador Romo García y MVZ. Carlos F. Esquivel Lacroix).

El presente estudio tuvo como objetivo el desarrollar las técnicas de obtención y maduración de ovocitos de la perra doméstica (*Canis familiaris*) como parte de la técnica de fertilización *in vitro* (FIV). La implementación de la FIV utilizando a la perra como modelo de investigación permitirá transpolar y aplicar estas técnicas a otros cánidos silvestres en peligro de extinción, como el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*). Se obtuvieron los ovarios de perras recién sacrificadas en los Centros de Control Canino dependientes del Departamento del Distrito Federal. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución salina fisiológica a 37°C. En la primera fase del experimento se compararon tres técnicas de obtención de ovocitos: aspiración de folículos, disección y aspiración más disección. Las perras se clasificaron en dos grupos según su edad: prepúberes (n=30) y adultas (n=30). A su vez cada grupo se subdividió de acuerdo a su talla en grandes (n=15) y pequeñas (n=15). Por lo mismo, el número de ovarios por grupo fué de 60. Con la técnica de disección se obtuvieron 614 ovocitos competentes a partir de 60 ovarios, con un promedio de 10.22/ovario. La técnica de aspiración sólo pudo ser efectuada en 6/60 ovarios, recuperándose tan sólo 2 ovocitos. Con la técnica de aspiración más disección el número de ovocitos obtenidos fué bajo, de 6/60 ovarios se obtuvieron 44 ovocitos. Se pudo comprobar que la técnica de disección de ovarios es la más eficaz para recuperar ovocitos ya que de 60 ovarios se obtuvieron 614 ovocitos competentes. Las perras adultas, tanto de talla pequeña como grande produjeron más ovocitos que las prepúberes (481 vs 133). Existiendo diferencia significativa ($P<0.05$) entre los subgrupos de animales prepúberes grandes y adultas pequeñas y grandes. Para la maduración se cultivaron 394 ovocitos obtenidos por disección, los cuales fueron cultivados en TCM-199 (Sales de Hank's) adicionado de L-glutamina, piruvato de sodio (25 mM), lactato de sodio (4.79 mM), gentamicina (50 ug/ml), estradiol (20 ug/ml), y

10% de suero de perra en celo. Los ovocitos se mantuvieron en cultivo en microgotas, a una temperatura de 37°C en una mezcla de aire más 5% de CO₂ durante 96 horas. Para la evaluación de la maduración, 338 ovocitos se tiñeron con acetorceína, de los cuales sólo 321 pudieron ser evaluados. De éstos, 221 ovocitos (68.8%) presentaban vesícula germinal y 100 (31.1%) estaban en prometafase. Se concluye que la técnica de disección es la más eficaz para la obtención de ovocitos de perra. Así mismo, con la técnica utilizada solo se pudo alcanzar una maduración parcial de los ovocitos.

1. INTRODUCCION.

En los últimos años, el campo de la reproducción animal ha sido objeto de numerosas investigaciones encaminadas al perfeccionamiento de técnicas tales como la fertilización *in vitro* (FIV), misma que es base prometedora para el mejoramiento genético de las especies productivas (43,92,105) y la preservación de especies en peligro de extinción (102).

A través de la FIV ha sido posible lograr el nacimiento de individuos viables en humanos (78,87), rumiantes domésticos (7,9,22,23,37,53,59), equinos (24), porcinos (3,9,15,99), felinos (41,56), animales silvestres (8,26,27,28,36,38,42,67,88) y de laboratorio (14,51,60,62,79,81,83); sin embargo, aún no se ha tenido éxito con los cánidos (34,63,64).

Lo anterior quizás se deba a que el interés por la reproducción de la perra se ha dirigido más hacia el control de natalidad. Otra razón podría ser la dificultad para conseguir el material biológico requerido para los estudios (4,32). Por otra parte la investigación de la FIV en los canidos también puede ser utilizada para desarrollar técnicas de control de la reproducción.

Aunque el mejoramiento y manipulación genética de las razas constituyen puntos importantes en el manejo zootécnico de los cánidos, no representan el único factor que incentive a una mayor investigación sobre FIV. De hecho, la importancia de profundizar en el desarrollo de técnicas vanguardistas en la reproducción canina, se fundamenta en la obtención de herramientas útiles para desarrollar programas encaminados a la preservación de especies afines en peligro de extinción; ejemplo de ello, el Lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*) (85).

Dado que la FIV implica procedimientos muy delicados y complejos, se hace necesario realizar investigaciones que permitan establecer la metodología para desarrollar cada una de las etapas involucradas, en la especie estudiada. La obtención y maduración de ovocitos, son fases de incuestionable importancia en dicho proceso, lo cual constituye el tema central del presente estudio.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1 ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA PERRA.

2.1.1 ASPECTOS ANATOMICOS.

Existen marcadas diferencias en cuanto a la anatomía de los órganos reproductivos de los mamíferos, la perra en particular posee una vagina larga, siendo más amplia en su porción craneodorsal, donde se observa la os externa del cervix. El útero es bicornual y consta de un cuerpo corto de paredes gruesas y unos cuernos largos, delgados y rectos dispuestos en forma de "V" (2,47).

Los ovarios de la perra son órganos pares y ovalados que se localizan en la parte superior de la cavidad abdominal, por detrás de los riñones, aproximadamente a nivel de la tercera o cuarta vértebra lumbar. Son relativamente pequeños, con un tamaño aproximado de 1.5 x 0.7 x 0.5 cm en una perra de 12 kg; su superficie es lisa, aunque después de varios ciclos y particularmente después de la preñez se torna visiblemente áspera y nodular (16,57).

El tamaño del ovario aumenta en el proestro, alcanzando su máximo peso y tamaño al momento de la ovulación, después de lo cual disminuye paulatinamente hasta el anestro (16,57). En las perras adultas la correlación entre el peso de los ovarios y el corporal es de 0.77 (16).

Dos características significativas del ovario canino en referencia a su anatomía son el ligamento ovárico, el cual es corto y en forma de abanico, y el desarrollo pleno de la bolsa ovárica, que envuelve completamente a la gónada y posee paredes grasas y una abertura de 0.2 a 1.8 cm de largo (2,16,47,57).

2.1.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS
2.1.2.1 DINÁMICA OVARICA EN LAS DIFERENTES FASES
DEL CICLO ESTRAL

La perra alcanza la pubertad entre los 6 y 24 meses de edad. Esta variabilidad es natural, tomando en cuenta los factores interactuantes tales como el tiempo en el cual alcance su peso adulto, los celos silenciosos que dificultan el diagnóstico del primer estro y la raza del animal, siendo más precoces las perras de talla pequeña (35,66,84,101,107).

Fisiológicamente la hembra canina es monoéstrica estacional, por lo que solamente tiene una etapa de aceptación en cada ciclo reproductivo, con duración variable (16,20,57,66,107) y con intervalos entre ciclos, de 5 a 12 meses (19).

Los mecanismos básicos de control de la función ovárica, son los mismos existentes en otras especies que presentan estro estacional, aunque todavía hay que esclarecer los factores precisos que inician el retorno a la actividad sexual e incluso, aquellos que determinan un período de latencia sexual tan prolongada.

El ciclo reproductivo está controlado por tres grupos hormonales principales: las hormonas liberadoras, las gonadotróficas y las esteroides. Las primeras se originan en el hipotálamo y controlan la síntesis y liberación de las hormonas gonadotróficas (Hormona Foliculoestimulante (FSH), la Luteinizante (LH) y Prolactina (PRL)), regulando así, la maduración de las células germinales y la producción de las hormonas esteroideas: estrógenos y progesterona (2,16,35,66).

Como se observa en el Cuadro 1, el proestro y estro de la perra están caracterizados principalmente por el incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos durante el proestro, alcanzando su pico al final de este período y descendiendo posteriormente; este pico precede al notable incremento de los

niveles máximos a lo largo de los dos últimos días del proestro y los primeros cuatro días del estro. Junto con esto, se observa el incremento significativo de los niveles plasmáticos de progesterona desde la última fase del proestro, alcanzando sus valores más altos desde el día 7 del estro aproximadamente (17,30,44).

Como es bien conocido, el ciclo estral de la hembra canina, consta de 4 fases: proestro, estro, diestro y anestro (16,35,66,107).

PROESTRO. Es el comienzo de la estación reproductiva o de actividad sexual y el periodo de desarrollo folicular que precede al estro. Se extiende desde la primera observación del sangrado vaginal, hasta cuando la perra acepta la monta del macho. El proestro, etapa de dominancia estrogénica, normalmente dura cerca de 9 días, teniendo un intervalo de 3 a 21 días (2,19,72,98).

En esta fase se lleva a cabo el desarrollo folicular, por efecto de la FSH y los estrógenos, que alcanzan su máximo nivel al final del periodo. En el proestro temprano existe una concentración de estrógenos mayor de 2.5 pg/ml y en el tardío se alcanza niveles de hasta 100 pg/ml, uno a dos días antes de comenzar el estro (19), declinando cuando la aceptación se observa por primera vez. Durante los siguientes 5 a 9 días, las concentraciones retornan paulatinamente a los niveles basales (8 ng/ml) (35).

Las concentraciones de progesterona permanecen basales (menos de 0.5 ng/ml) durante los dos a tres días previos a la aceptación, posteriormente hay un ligero incremento por encima de 0.5 ng/ml, relacionado con la luteinización preovulatoria de los folículos ováricos (71).

Por su parte la LH sérica permanece en concentraciones casi basales durante la mayor parte de esta fase (1.7-2.8 ng/ml) y empieza a incrementarse al final de ella para alcanzar su pico después de iniciar el estro (17,20,50).

Cuadro 1. NIVELES HORMONALES EN LA SANGRE DE LA PERRA BEAGLE

Etapa Reproductiva	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	Prolactina (ng/ml)	Progesterona (ng/ml)	Estradiol (pg/ml)
Proestro	2.8±0.1	59±9	27	1.7±0.3	58±7
Estro	36±10	168±37	32	<2.0	69±11
		297.0*			
Diestro	4.2±1.1	108±19	20 a 35	18±6	23±7
Gestación	3.0±0.2	197±21	57±14**	15±10	19±2
		255±28**		3.8±2.4**	
		255±28**		1.2±0.4***	
Anestro	2.8±0.3	-	-	0.6±0.1	33±15
Final del anestro	21 a 15	240 a 294	1.95 a 33.15	<1.0	20 a 46

± Desviación estándar promedio

* Valores pico

** Días 55-58 de gestación

*** En el parto

Modificado de: Concannon, et al. 1978; Olson, et al. 1982 y McDonald, 1991.

En cuanto a la Prolactina, ésta experimenta variaciones leves y se mantiene en concentraciones cercanas a los 27 ng/ml (19,66).

Durante el proestro, la perra no se interesa en los machos y éstos por el contrario, manifiestan gran atracción hacia ellas (72). A medida que transcurre este período, la hembra se torna más pasiva en su resistencia a la aproximación del macho. La edematización y turgencia de la vulva son signos característicos de esta etapa (16,66,84).

ESTRO. Es el período de la receptividad sexual, comprendido normalmente en un lapso de 9 días, con un intervalo de 3 a 21; el primer día en que la hembra permite la cópula es el inicio del estro y la fase finaliza cuando ella no acepta más la copula (16,35,98).

Vale la pena aclarar que este período es muy prolongado en la perra, en comparación a hembras de otras especies (94). Durante este período los folículos de Graaf alcanzan su máximo desarrollo (0.6 a 1cm de diámetro) y los niveles séricos de estrógenos empiezan a descender hasta 69 pg/ml (66), coincidiendo con un incremento paulatino de progesterona por encima del nivel basal (2 ng/ml), condición necesaria para la presentación del celo (66,80). Además hay una breve elevación de LH, de 12 a 24 horas, para posteriormente descender a niveles basales (2.8 ng/ml) (66). Este pico de LH precede al incremento en la concentración de FSH, e inicia la ovulación 24 a 72 horas después (20,50,71,72). En cuanto a la prolactina, durante esta fase presenta concentraciones aproximadas de 32 ng/ml (66).

Dichos cambios hormonales reflejan acontecimientos externos, tales como secreción vulvar más o menos hemorrágica, inflamación vulvovaginal marcada, textura vulvovaginal suave y flácida, reflejo de ladear la cola, así como atracción y aceptación del macho (19,107).

DIESTRO. Es la etapa posterior al celo, mediada por la progesterona; su duración promedio es de 57 a 68 días en la perra gestante y de 60 a 80 en la hembra vacía (98). El diestro comienza cuando una perra que ha sido receptiva, rechaza abruptamente al macho (72).

Durante esta fase del ciclo, después de la ovulación se manifiesta el desarrollo de cuerpo lúteo, lo que da lugar al aumento en progesterona circulante hasta 5 ng/ml, razón por la cual las perras vacías que han pasado el celo son "pseudogestantes", en el sentido de que tienen cuerpo lúteo funcional, a pesar de una ausencia de gestación (5,12). Dicho cuerpo amarillo, es refractario a dosis altas de prostaglandinas (250 ng/kg) durante los días uno al cinco del diestro (35,70).

Después de un pico de progesterona de 15 a 80 ng/ml hasta los 20 a 30 días postovulación, se encuentra una fase de meseta que declina con la regresión lútea, entre los 75 y 80 días posteriores, independientemente de la presencia de LH, cuya secreción junto con la FSH se considera episódica (35,52).

Por lo que respecta a los estrógenos, estos se encuentran en niveles basales al principio de este período (23 pg/ml) (66); sin embargo al igual que la LH, se elevan durante los últimos días de la fase lútea (20,50). En cuanto a la prolactina, ésta se detecta en niveles de 20 a 35 ng/ml en el diestro (35).

Con respecto a la signología externa, se observa que la vulva retorna a su tamaño normal o de anestro, perdiendo fláccidez (2,16,35).

ANESTRO. Es el estado de inactividad sexual reproductiva, durante el cual el útero involuciona; dicha etapa comprende desde el momento del parto o el final de la pseudogestación hasta la fase del proestro (72); se menciona que durante este período, ni los ovarios, ni la hipófisis se encuentran estáticos (35).

La duración del anestro es de 1 a 8 meses, haya o no preñez (19,55,98); sin embargo, al igual que las otras fases del ciclo estral, tiene una duración variable, dependiendo de la raza, edad y estado de salud.

Al final de este período, la LH presenta niveles de 2.8 ng/ml (66) que preparan el desarrollo folicular para iniciar el proceso de maduración y ovulación (20,50,55). La FSH no manifiesta las amplias fluctuaciones de concentración periférica observadas en la LH (66).

Por otra parte, la progesterona se encuentra en niveles basales (0.5 ng/ml) (55,80,107) y los estrógenos totales en concentraciones elevadas (33 pg/ml) (66), comparables a las observadas durante el proestro y estro (44,71,80).

De esta forma, durante el anestro el aparato reproductivo se prepara para el comienzo del siguiente ciclo, que inicia con la llegada del proestro.

2.1.2.2 OVOGENESIS.

Mediante el proceso de ovogénesis se lleva a cabo la formación, crecimiento y maduración de gametos femeninos. Dicho proceso inicia cuando las células germinales primordiales (gonocitos) invaden la gónada femenina, donde se diferencian en ovogonias, las cuales se multiplican activamente por mitosis incrementando así al máximo, el número de células germinales femeninas (91).

Antes del nacimiento, las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios. Las células epiteliales aplanadas empiezan a rodearlos, constituyendo así los folículos primordiales. Una vez rodeados los ovocitos primarios experimentan la profase de la primera división meiótica, al finalizar ésta etapa se suspende el proceso de división quedando la célula en dictioteno. Los ovocitos primarios permanecerán así durante el resto del desarrollo embrionario, de tal modo que al nacimiento la hembra presenta ya en sus ovarios un número determinado de células germinales, el cual no aumentará sino por el contrario irá disminuyendo conforme transcurra el tiempo(54,66, 91).

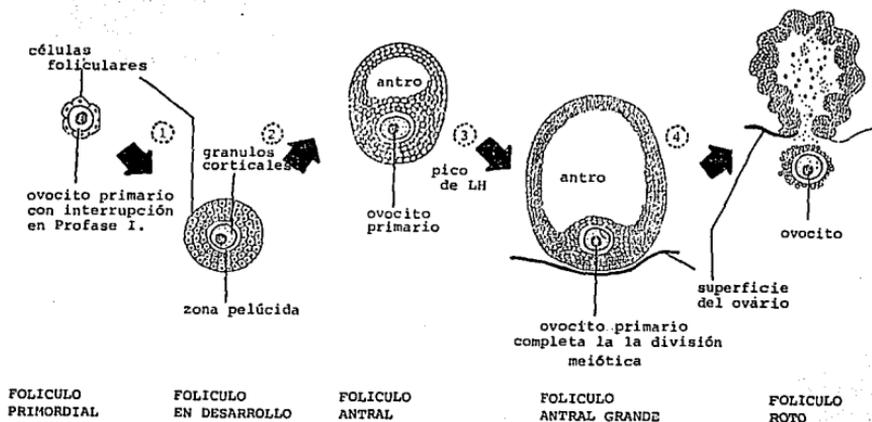
Al nacer, la perra contiene en sus ovarios aproximadamente 700 mil ovocitos primarios, que disminuyen a 250 mil en la pubertad, a 33 mil a los 5 años y a 500 a los 10 años (82); la gran mayoría de estos ovocitos sufrirán atresia durante la vida de la hembra y únicamente unos cuantos podrán formar parte de un folículo de De Graaf y ser ovulados (40,47,54).

Bajo influencia de factores intrínsecos ováricos algunos folículos primordiales crecen y se desarrollan a folículos primarios, provistos de células cuboidales que se multiplican aceleradamente por mitosis. En esta fase también tiene lugar la formación de la zona pelúcida y las tecas interna y externa (1,47).

Conforme el folículo crece, el ovocito primario es rodeado por una masa de células granulosas que constituyen la capa del mismo nombre y conforman el denominado *cumulus oophorus* al que se encuentra sujeto. Esta estructura recibe el nombre de folículo secundario (40,47).

Posteriormente el folículo experimenta una tercera fase de crecimiento (folículo de De Graaf), durante la cual el antro o cavidad folicular se llena de líquido folicular aumentando su diámetro (Figura 1). Siendo el ambiente donde el ovocito continúa su maduración (66).

Figura 1. MORFOLOGIA DEL FOLICULO DE GRAAF Y ESTADOS DE DESARROLLO DEL OVOCITO.



Modificado de: Alberts, B. et al., 1993.

Durante la meiosis se llevan a cabo dos divisiones, cada una de las cuales consta de profase, metafase, anafase y telofase. En la primera división (reduccional), se disminuye a la mitad el número de cromosomas característico de la especie (de 78 a 39 en la perra) para dar origen a un ovocito secundario susceptible a ser fertilizado (94) y a un primer cuerpo polar que es eliminado en el oviducto y que ocasionalmente se divide en dos (66) (Figura 2).

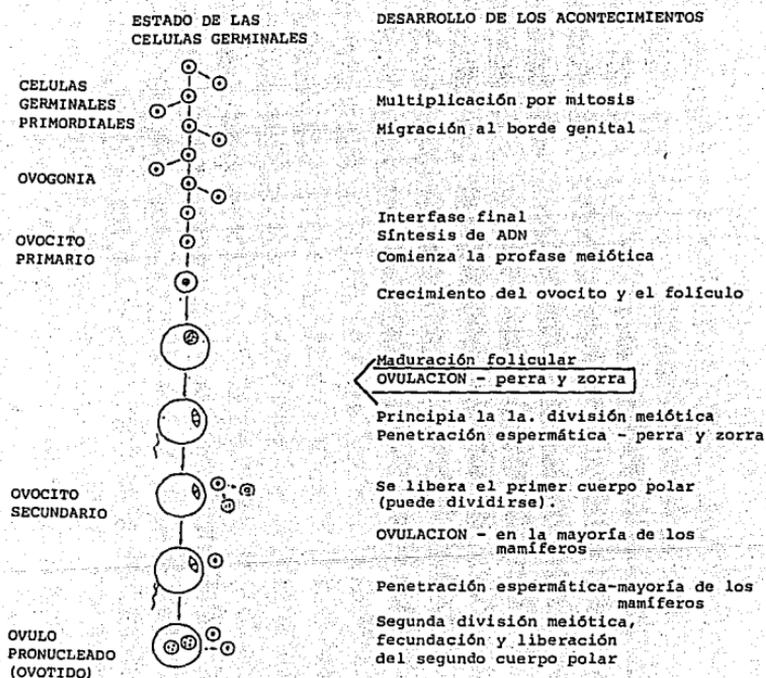
La profase I se ha dividido en 5 etapas para su estudio: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. En el leptoteno los cromosomas se observan como filamentos dentro del núcleo, resultado de un proceso de espiralización de la cromatina; por su parte el núcleo aumenta ligeramente de tamaño y el centriolo se hace aparente (1,54,91).

Durante el cigoteno, los cromosomas empiezan a aparearse y se inicia el intercambio de fragmentos de ADN; mientras que en el paquiteno al continuar con este proceso de espiralización de los cromosomas (intercambio de material genético) se provoca que éstos se vean aún más gruesos, además durante esta etapa hay un crecimiento del núcleo (1,91).

La fase de diploteno comprende una mayor separación de dichos cromosomas, es decir, ya es posible evidenciar los dos cromosomas homólogos separados. En las hembras de los mamíferos domésticos las células que sufren meiosis pueden permanecer en esta etapa por largo tiempo y en la mayoría de las especies, los ovocitos entran en profase I antes del nacimiento permaneciendo así hasta la pubertad, momento en el cual reanudan la meiosis; durante todo este tiempo los ovocitos permanecen en dictioteno, donde existe desespiralización de los cromosomas y síntesis de ARN, al final de esta fase desaparece el nucleolo y la envoltura nuclear. El centriolo se divide en dos partes cada una de las cuales se dirige a los polos opuestos de la célula sirviendo como puntos de origen al huso cromático (91,97).

La segunda fase de la meiosis denominada metafase I, inicia cuando la envoltura nuclear desaparece completamente y empieza la formación del huso

Figura 2. PROCESO DE OVOGENESIS.



Modificado de: Hafez, E.S.E. 1993.

cromático (97); donde los cromosomas homólogos que aún permanecen apareados se ubican alrededor del ecuador de dicho huso (91).

Posteriormente en la anafase I de la primera división meiótica, un cromosoma homólogo completo migra hacia uno de los polos, mientras que el otro lo hace hacia el polo opuesto. Al desplazarse los cromosomas hacia los polos hay un acortamiento de las fibras cromosómicas que componen el huso. Finalmente, la telofase I de la primera división meiótica suele ser corta; los cromosomas se desespirilizan y se integra de nuevo la envoltura nuclear (91).

En la segunda división de la maduración el ovocito secundario se divide en un ovótide (n) y en el segundo cuerpo polar, que al igual que el primero (se halla dividido o no) queda atrapado en la zona pelúcida del ovocito donde degenera (1,47).

Durante la profase II, hay condensación de material nuclear, desaparición del nucléolo y de la envoltura nuclear, al mismo tiempo que se inicia la formación del huso. En la metafase II, los cromosomas se alinean en el ecuador y cada cromosoma se asocia por su centrómero con fibras cromosómicas provenientes de uno y otro polo del huso. En la anafase II los cromosomas se parten a nivel del centrómero, las cromátides se separan y migran hacia los polos; durante la telofase II las cromátides se desespirilizan, se integra la envoltura nuclear y aparece de nuevo el nucléolo (91).

Cabe hacer mención que el ovocito detendrá su proceso de maduración en Metafase II y sólo lo reanudará si recibe un estímulo adecuado que, en la mayoría de las ocasiones, es la penetración del espermatozoide; resultando con ello la formación de dos células, una pequeña de vida muy corta denominada "segundo cuerpo polar" y la otra voluminosa, llamada huevo o cigoto, la cual si es fertilizada inicia el desarrollo embrionario. En caso de no haber fecundación el ovocito sufre autólisis (1,47,91).

2.1.2.3 OVULACION.

En la perra los gametos femeninos se encuentran en la primera división meiótica (ovocito primario) al momento de producirse la ovulación (19,94), miden de 90 a 110 micras de diámetro (66) y maduran hasta dos a tres días después de ovular, es decir, 4 a 5 días después del pico de LH. Desde este momento, el ovocito tiene una vida fértil de 48 a 72 horas (18). El número de ovocitos ovulados por folículo puede variar, pues mientras algunos autores mencionan que solamente tienen uno, otros indican que puede haber diez o más ovocitos en cada folículo (89).

El proceso de ovulación es espontáneo y tiene lugar entre los días 1 a 4 del estro, aunque en algunos casos llega a retrasarse hasta el séptimo día (12,18,94,100), dependiendo de factores como la edad y la raza (17). Con respecto a esta última característica, perras de razas pequeñas ovulan de 2 a 10 gametos por ciclo, mientras que animales de razas grandes ovulan hasta 20 (66).

En la práctica, el momento en que la perra está próxima a ovular puede ser pronosticado mediante la citología vaginal exfoliativa, la arborización del moco cervico-vaginal y pruebas hormonales encaminadas a determinar la concentración plasmática de progesterona (10,30,31). Experimentalmente se utilizan ultrasonografías, endoscopías, laparotomías, laparoscopías y análisis histológicos (49,61,63,98,100).

Endocrinológicamente la hembra canina difiere de otras especies de mamíferos en esta etapa. En ella se empiezan a generar pequeñas cantidades de progesterona varios días antes de ovular, alcanzando niveles circulantes de hasta 2 a 3 ng/ml durante el pico de LH y de 3.4 a 6.6 ng/ml al producirse la ovulación (10). Después de la ovulación, la concentración de estrógenos desciende hasta niveles basales (5,17,31,94,101,107).

En cuanto a los folículos, su acelerado crecimiento y maduración final, es inducido por el pico de LH, que culmina con la ovulación dos o tres días después (10,18,19,95,98,100). Se considera que los folículos de De Graaf alcanzan diámetros de 0.6 a 1 cm y los ovocitos miden de 90 a 110 micras en estados similares de evolución (66,73); los folículos que no llegan a ovular tras la onda de LH, sufren degeneración y atresia (35).

2.2 OBTENCION Y MADURACION DE OVOCITOS DE CANIDOS.

OBTENCION.

Para el desarrollo de la técnica de FIV, es indispensable contar con procedimientos idóneos que permitan obtener y madurar los ovocitos con el fin de posibilitar su adecuada interacción con el espermatozoide.

Es conveniente utilizar técnicas que sean económicas, prácticas y sencillas; pero sobre todo eficaces de tal manera que nos permitan obtener tanto cantidad como calidad de ovocitos.

Acorde a las necesidades particulares del investigador, dependiendo del material biológico, recursos disponibles y el modelo animal implementado, existen diferentes modalidades para la obtención de ovocitos, entre los cuales podemos mencionar la aspiración (*in vivo* y *postmortem*) y la disección.

A) ASPIRACION. Según el objetivo existen dos formas de recuperar ovocitos por aspiración: en animales *in vivo* y en hembras sacrificadas.

En el primer caso se utiliza la técnica conocida como aspiración guiada por ultrasonido, en donde por vía vaginal se introduce una sonda modificada. Dicho aditamento forma parte del aparato de ultrasonido y se encuentra adaptado para llevar en su posición interna una aguja hipodérmica calibre 18 conectada a una manguera plástica que la comunica a una bomba de vacío. A continuación, por vía rectal y con la ayuda visual del aparato de ultrasonido, se localiza el ovario, y manipulándolo se pone en contacto con la aguja, que gracias a la presión negativa de la bomba, succiona el líquido folicular y los ovocitos suspendidos en él (75,76).

En animales recién sacrificados, aunque el principio es el mismo, la técnica es simplificada, dado que se logra un contacto manual y óptico directo con la gónada y se posibilita la aspiración con una aguja calibre 18 y una jeringa de 5 a 10 ml (6,38,39).

B) DISECCION. Esta técnica se realiza exclusivamente en ovarios extraídos de hembras anestesiadas o en su defecto recién sacrificadas.

El método se lleva a cabo con la ayuda de una hoja de escalpelo u otro tipo de navaja, efectuando cortes longitudinales y transversales sobre la superficie ovárica y enjuagando repetidamente al órgano con solución salina fisiológica isotónica estéril o PBS (24).

En las especies, tanto de abasto como de fauna silvestre o animales de laboratorio, el método más comúnmente utilizado para la obtención de ovocitos es el de aspiración, debido a la facilidad con que se realiza, pero principalmente al grado de desarrollo en el los ovocitos se encuentran al momento de ser recuperados. Esto es, dichos ovocitos ya han experimentado una importante fase del proceso de maduración, en tanto que los obtenidos por disección se encuentran en una etapa muy temprana de desarrollo.

Por lo que respecta a los cánidos, la obtención de ovocitos prevulvatorios se ha realizado en ocasiones con el método de aspiración folicular *postmortem* en hembras previamente superovuladas, y a partir de folículos cuyo diámetro fluctuaba entre 0.5 y 2 mm (103), lográndose obtener con ellos buenos porcentajes de recuperación, maduración e incluso penetración espermática (33,58,103,104).

Por otro lado, Nickson et al. (69) habiendo realizado trabajos relacionados con maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de perra obtenidos por disección, encontraron que su técnica era eficiente, señalando la importancia de recuperar íntegros los ovocitos con las células del *cumulus* que los rodean. El 70% de los gametos obtenidos presentaban como mínimo una capa

completa de células *cumulus*. A las 48 horas de cultivo, los ovocitos con dos o más capas celulares mostraron expansión del *cumulus*, en tanto que aquellos provistos de una capa, presentaron signos degenerativos.

MADURACION.

Como es bien sabido, los gametos deben experimentar un adecuado proceso de maduración que les capacite para fertilizar o ser fertilizados según el caso. En condiciones naturales, en la perra el gameto femenino, es ovulado como ovocito primario, y experimenta una última fase de maduración a nivel oviductal, adquiriendo la capacidad de ser fertilizado. De ésta manera, si se pretende simular los acontecimientos fisiológicos inherentes a la fertilización, todos aquellos aspectos que ocurren *in vivo* deben ser mimetizados en la técnica *in vitro*, otorgando particular importancia a la maduración, más aún si los ovocitos obtenidos se encuentran en estadios iniciales de desarrollo.

En los mamíferos existe un número predeterminado de ovocitos al momento del nacimiento; estos ya han experimentado divisiones mitóticas e iniciando las meióticas, hasta alcanzar el dictioteno de la profase I. Desde este momento y a partir de la pubertad, los gametos comienzan a madurar paulatinamente para ser fertilizados (46,77,90).

La maduración, aunque supone un desarrollo folicular, se describe como un proceso eminentemente independiente, que además incluye acontecimientos a nivel de la membrana, citoplasma y núcleo del ovocito (25,29,65,68).

El fenómeno como tal capacita al ovocito para establecer mecanismos específicos relacionados con el bloqueo de la polispermia, la descondensación espermática y la formación del pronúcleo masculino. Todo

esto gracias a la interrelación de factores foliculares, tales como prótidos, esteroides, hormonas, purinas y nucleótidos (77).

Mientras que a nivel membranar se regula la concentración de solutos, la reprogramación del citoesqueleto y las proteínas, en el citoplasma tiene lugar la aparición del factor descondensador espermático, el aumento de los gránulos corticales y el reacomodamiento de los organelos celulares. Esta intensa actividad citoplásmica incluye además una importante multiplicación de ribosomas, lo que ocasiona un incremento en la síntesis protéica y en el volumen del ovocito, el cual alcanza un tamaño de hasta 90 a 110 micras en promedio (65,66).

En la maduración del ovocito, la reprogramación protéica antes que regularse por transcripción, lo hace por traducción selectiva del ARN mensajero almacenado (29,46).

Por otro lado el núcleo, (también llamado "vesicula germinal" dada su prominencia en el dictioteno), continúa con la división meiótica, hasta alcanzar la formación de dos células hijas, una de las cuales toma el nombre de "primer cuerpo polar" debido a su estructura predominantemente nuclear y pobre en citoplasma (3).

Una vez alcanzada esta etapa, el ovocito detiene su desarrollo hasta producirse la fertilización, momento en el cual se lleva a cabo la segunda división meiótica y con ello, la expulsión del segundo corpúsculo polar (91).

Uno de los principales factores involucrados en la maduración del ovocito es el adecuado suministro de nutrientes. Para este efecto, las células foliculares desempeñan un importante papel, ya que mediante prolongaciones citoplasmáticas atraviesan la zona pelúcida y el espacio perivitelino, facilitando el paso de factores nutricios, así como de iones y segundos mensajeros de información, que como el AMPc, a través de uniones

comunicantes controlan el desarrollo meiótico de ovocito, manteniendo el estado de dictioteno (3,25,29,46,92).

Otros factores inhibidores de la maduración se localizan en el líquido folicular, tal y como se describió en investigaciones desarrolladas en conejos y porcinos, donde se identificaron *in vitro* moléculas pequeñas asociadas a este fenómeno, así como nucleósidos y bases púricas y pirimídicas (3,29).

Bajo un estímulo gonadotrópico, el AMPc incrementa su concentración en los espacios intercelulares del *cumulus*, induciendo la producción de moco, que durante el pico de LH y la ovulación provoca la expansión del ovocito signo característico del proceso madurativo, cuya función principal es facilitar el desplazamiento del gameto a través del oviducto (74,106).

El *cumulus oophorus*, es un conglomerado formado por células con numerosos ribosomas, retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi prominente, presencia de depósitos grasos y capacidad de secreción de esteroides. Estas células están dotadas de organelos desarrollados, y provistas de ácido hialurónico y glicoproteínas en su matriz (74). Su papel principal es mantener la integridad de la zona pelúcida y participar en la maduración del ovocito, conservando sus niveles de AMPc. Es de destacar que durante la maduración *in vitro* el *cumulus* incrementa su metabolismo si el medio se ha enriquecido con suero (90,93,96).

Una vez que el ovocito ha sido fertilizado, o en su defecto activado partenogénicamente, se produce la reactivación meiótica y el rompimiento de la vesícula germinal, acontecimientos inducidos por una proteína desfosforiladora aún indeterminada y facilitada por las proteínas cinasas y ciclinas (21).

El proceso de maduración del ovocito se lleva a cabo bajo un estricto control hormonal, interactuando en el microambiente del fluido folicular, el cual permanece delimitado por una red semipermeable y selectiva, y está

constituído por la secreción de las células de la granulosa y el trasudado sérico (13).

En primera instancia, la LH disminuye las concentraciones de AMPc en el ovocito y las incrementa en las células foliculares, de hecho a ella se le hace responsable de la estimulación del AMPc dependiente de una proteína cinasa (3).

Por su parte, la producción de AMPc estimula la síntesis de receptores en las células de la granulosa, activa el sistema de la adenilato ciclasa e incrementa la actividad de la 3-beta-ol-deshidrogenasa y de la aromatasa a nivel de la granulosa (45).

Ambas hormonas gonadotrópicas aumentan la producción de progesterona y glicoproteínas e induce la formación de piruvato y lactato a cargo de las células *cumulus* (90).

Se ha determinado que la maduración nuclear de ovocitos *in vitro* puede ser un proceso espontáneo, foliculo y hormonalmente independiente, siempre y cuando los gametos sean aislados y cultivados en medios apropiados (90).

Esta maduración nuclear espontánea tiene el inconveniente de no involucrar la descondensación del núcleo espermático o inducirla retardadamente, lo que detiene el desarrollo embrionario normal hasta incorporar la participación hormonal *in vitro* adicionando 17-beta-estradiol y 17-hidroxiprogesterona (3,90).

Existe por otra parte, la presencia de un factor de crecimiento del pronúcleo masculino en el citoplasma del ovocito, el cual aparece durante el rompimiento de la vesícula germinal por influencia de las hormonas esteroides (25,96).

Vale la pena aclarar que en los mamíferos, más de la mitad de los ovocitos experimentan atresia *in vivo*, particularmente en el estadio de folículos antrales, observándose vacuolización citoplásmica, núcleos picnóticos, atrofia de microvellosidades y zona pelúcida, y aumento desproporcionado en el volumen mitocondrial. Este proceso degenerativo puede ser detenido si los gametos son aislados y cultivados *in vitro*, lo que les brinda la posibilidad de reanudar su maduración (48,68).

En relación a los sistemas de maduración de ovocitos, en la práctica existen marcadas diferencias entre las técnicas empleadas, existiendo métodos en el animal *in vivo* o *in vitro*, que implican la obtención del material biológico y su cultivo en medios químicamente definidos, suplementados con algunos elementos, que varían dependiendo de la especie en cuestión y del grado de maduración de las células.

Los gametos pueden experimentar la maduración básicamente de dos maneras: una, a través de ciclos naturales de la hembra y otra por medio de ciclos inducidos, es decir, con una hiperestimulación o sincronización del animal con ayuda de productos hormonales; esto último con el fin de que el ovocito tenga una fase previa de desarrollo tal y como ocurre en un proceso natural.

Para la superovulación en diversas especies animales, tanto domésticas como silvestres se ha recurrido a tratamientos en base a productos hormonales, tales como la FSH, PMSG, LH, hCG y en su caso el uso de luteolíticos, como los análogos de la PGF₂ alfa (40,47).

Para lograr la superovulación en las perras, puede seguirse éste esquema reportado en la literatura:

- Inyectar estrona a razón de 100 a 400 mg por día, hasta obtener descarga vaginal.
- Aplicar 400 UI de eCG y 1000 UI de hCG.
- Inyectar 10 mg de estradiol a los 3 y 4 días de aplicación de la eCG y hCG respectivamente
- Suministrar 1000 UI de hCG el primer día del celo (103).

La maduración *in vitro* con ovocitos de perras ha sido abordada en los trabajos experimentales desde dos perspectivas; la primera de ellas ha utilizado la superovulación de las perras donantes, la recuperación de los ovocitos preovulatorios y su cultivo *in vitro* por 48 a 72 horas, con ello se ha podido obtener hasta un 32% de ovocitos en Metafase II (103). El otro camino ha sido la utilización de ovocitos provenientes de ovarios que se encuentran en cualquiera de las etapas del ciclo estral y su posterior cultivo por 48 a 96 horas, con lo que se ha logrado obtener desde el 12.1% de Metafase II (104) y hasta el 39% (69). En cuanto a la penetración y descondensación espermática se ha tenido mejores resultados con aquellos ovocitos que han experimentado un desarrollo preovulatorio inducido por el tratamiento hormonal en la superovulación. Cabe mencionar que aún así los resultados son insatisfactorios si se considera que apenas un 27% de los ovocitos fertilizados muestran estado de desarrollo de más de una célula y que sólo el 2% han llegado a 8 células (103). Esta baja eficiencia ha llevado a replantear la metodología para la maduración *in vitro* de los ovocitos de perra, así como posponer el objetivo de llegar a conseguir individuos viables producto de maduración y fertilización *in vitro* de sus gametas.

3. JUSTIFICACION.

Hoy en día, la pérdida irreparable de algunos recursos naturales a manos del hombre, ha logrado despertar la conciencia de la humanidad y el afán por detener esta devastadora destrucción de la riqueza ecológica.

Siendo México un país indudablemente privilegiado en cuanto a su gran variedad de ecosistemas con fauna propia, es imperativo profundizar sobre aspectos que contribuyan a su protección y preservación, dada la escasez de información generada al respecto.

En vista de que algunas de las especies en peligro de extinción pertenecen al género *Canis*, tanto en México (*Canis lupus baileyi*) (85) como en otros países del mundo (*Canis rufus*) (11), se hace indispensable investigar sobre los aspectos relacionados con el favorecimiento de la reproducción en este tipo de individuos. El perro doméstico (*Canis familiaris*) es un animal de fácil obtención y manejo, y además representa el prototipo del género *Canis*. Por ello, resulta ser la especie más apropiada para el desarrollo de los ensayos experimentales planteados.

Al mismo tiempo, el desarrollo de técnicas como la FIV puede servir para determinar los procesos fisiológicos inherentes a la fertilización, que al ser modificados permitan desarrollar métodos de control de la natalidad en el perro doméstico.

4. HIPOTESIS.

1. La técnica de aspiración más disección (AD) provee la mayor cantidad de ovocitos en perras recién sacrificadas.
2. El número de ovocitos recuperados es mayor en hembras prepúberes que en adultas.
3. El número de ovocitos recuperados es superior en hembras de mayor talla.
4. Los ovocitos caninos pueden alcanzar la maduración bajo condiciones adecuadas de cultivo *in vitro*.

5. OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERALES.

1. Determinar la técnica más apropiada para obtener un mayor número de ovocitos caninos.
2. Realizar la maduración de los ovocitos obtenidos por la mejor técnica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la eficiencia de la técnica de aspiración (A) como método para obtener ovocitos de perras recién sacrificadas.
2. Evaluar la eficiencia de la técnica de disección (D) como método para obtener ovocitos de perras recién sacrificadas.
3. Evaluar la eficiencia de la técnica de aspiración más disección (AD) como método para obtener ovocitos de perras recién sacrificadas.
4. Determinar la relación existente entre el número de ovocitos caninos recuperados con la talla y edad de la hembra donante.
5. Determinar el grado de maduración de ovocitos caninos obtenidos por la técnica más efectiva, controlando variables como tiempo y condiciones de incubación, pH, osmolaridad y suplementación de medios con estradiol, suero de perra en calor, lactato, piruvato y gentamicina.

6. MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fertilización *in vitro* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio de Manejo de Gametos y Embriones del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

La colección de material biológico tuvo lugar en el Centro de Control Canino "Dr. Alfonso Angelini de la Garza", ubicado en la calle Heroica Escuela Naval Militar s/n esquina Av. Tasqueña, Colonia San Francisco Culhuacán y en Centro de Control Canino de Iztapalapa localizado en quinta calle de Carlos Mancilla esquina Campaña del Ebano s/n, Unidad Habitacional Vicente Guerrero, en México, D.F.

6.1 OBTENCION DE OVOCITOS.

Se utilizaron ovarios de perras recién sacrificadas remitidas para tales propósitos al Centro de Control Canino de Culhuacán durante los meses de febrero a junio de 1994; dichos animales se dividieron en dos categorías según su edad: hembras prepúberes y hembras adultas. Tomando como sistema de clasificación arbitraria el tamaño y superficie de sus ovarios (superficie completamente lisa y <1cm de longitud: hembras prepúberes; superficie con alguna estructura folicular y >1cm de longitud: hembras adultas), condición dentaria (presencia de sarro dental y/o desgaste o pérdida de dientes: hembras adultas; sin presencia de sarro dental y presencia de dientes permanentes: hembras prepúberes) y condición anatómica exterior.

Cada uno de estos grupos se subdividió a su vez en dos subgrupos según la talla del animal: grandes (mayores de 35 cm de altura a la cruz) y pequeñas (menores a 35 cm de altura a la cruz), con lo cual se tuvieron en total 4 subgrupos, cada uno conformado por 15 hembras, lo que representó 30 ovarios procesados por subgrupo.

	Talla	No. de perras.	No. de ovarios.
Prepúberes	Grandes	15	30
	Pequeñas	15	30
Adultas	Grandes	15	30
	Pequeñas	15	30

Una vez sacrificados y clasificados los individuos por talla y edad se procedió a retirar e identificar sus ovarios utilizando frascos independientes para cada animal usando hilo de color para diferenciar la gónada izquierda de la derecha. Los frascos contenían solución salina fisiológica estéril de NaCl 0.9% (Baker, Mex) a 37°C y se transportaron dentro de un termo al Laboratorio de Fertilización *in vitro* del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM en un plazo no mayor de 1 hora.

Una vez en el Laboratorio fue retirada la bolsa ovárica. El ovario izquierdo y derecho de cada animal fueron asignados en un diseño completamente aleatorizado a la técnica de obtención de ovocitos por disección o por aspiración. Los que se utilizaron en la segunda técnica fueron reutilizados para la técnica que se denominó aspiración-disección.

En los ovarios destinados a la técnica de aspiración se procedió a identificar los folículos de 6 a 10 mm de diámetro; estructuras que fueron puncionadas

y aspirado su contenido con una jeringa plástica sin émbolo de goma (Air-tite, Alemania) de 5 ml con aguja calibre 18. Dicho contenido fue vaciado en una caja plástica de Petri de 2.5 cm de diámetro (Nunc, Dinamarca) y se procedió a observar al microscopio estereoscópico (Zeiss) a 12X, para la localización y conteo de los ovocitos así obtenidos.

Para la técnica de aspiración-disección se utilizaron los mismo ovarios empleados en el método anterior; se les hicieron además incisiones superficiales en sentido longitudinal y transversal a un milímetro de distancia entre ellas, en toda su superficie y fueron lavados con PBS (Baker, Méx) con un pH de 7.4 (medido con un Potenciómetro "Beckman"); colectándolo en una caja Petri de vidrio de 15x100 mm. Posteriormente se observó al microscopio estereoscópico para buscar y contar los ovocitos adicionales obtenidos.

Por último, la técnica de obtención por disección se realizó de la misma manera a la técnica anteriormente descrita, con excepción de la parte inicial de aspiración.

El análisis de datos comprendió una estadística descriptiva y una prueba de Análisis de Varianza. Para determinar diferencia significativa entre medias por grupo se utilizó la prueba de Duncan (86).

6.2 MADURACION.

Se obtuvieron ovarios de perras adultas (grandes y chicas) recién sacrificadas en el Centro de Control Canino de Iztapalapa durante los meses de Enero a Marzo de 1995. Las gónadas fueron transportados al Laboratorio de Manejo de Gametos y Embriones de la UAM-Iztapalapa en una solución salina fisiológica NaCl 0.9% (Baker, Méx) a una temperatura de 37°C con un tiempo máximo a procesamiento de 1 hora.

Una vez en el laboratorio, a cada ovario se le retiró la bolsa ovárica y se lavó 3 veces en una solución fisiológica estéril de NaCl al 0.9% (Baker, Méx) calentada a la temperatura a la cual era recibida la solución salina de transporte.

La técnica de obtención de ovocitos fué por Disección, para ello a los ovarios se les hicieron cortes longitudinales y transversales aproximadamente a 1 mm de distancia entre éstos en toda la superficie ovárica. Se lavaron constantemente con una solución estéril de : TCM-199 con sales de Hank's adicionado con L-glutamina (Gibco, EUA) y suplementado con 25mM de HEPES (Sigma Ch, EUA) y 50ug/ml de Sulfato de Gentamicina (Sigma Ch, EUA) con un pH de 7.35 y una osmolaridad de 320 mOsm/kg (medido en Osmómetro "Osmette Precision System"), calentada a la misma temperatura a la que se recibía la solución de transporte de los ovarios.

La solución se recuperó en una caja de Petri de vidrio de 15x100 mm y se observó al microscopio estereoscópico a 12x. Se seleccionaron para cultivo los ovocitos que mostraron citoplasma opaco, uniforme y estuvieron rodeados por 3 a 4 capas de células *cúmulus*.

Con ayuda de una pipeta Pasteur de punta fina se colectaron los ovocitos seleccionados y se colocaron en una caja Petri de vidrio de 15x100mm, donde se lavaron por 3 ocasiones en microgotas de 50ul de medio de maduración estéril, el cual constaba de: TCM-199 con sales de Hank's adicionado de L-glutamina (Gibco, EUA) y suplementado con 0.25mM de Piruvato de Sodio (Sigma Ch, EUA), 4.79 mM de Lactato de Sodio (Sigma Ch, EUA), 50ug/ml de Sulfato de Gentamicina (Sigma Ch, EUA) y el día de uso se suplementaba con 20ug de Estradiol (Sigma Ch, EUA) y 10% de Suero de Perra en Estro sin inactivar (Departamento de Reproducción FMVZ-UNAM) y se ajustó a 295 mOsm/kg y un pH de 7.4.

Se hicieron pruebas de tinción vital utilizando azul tripan (In Vitro, Méx) para definir el patrón de tinción mostrado por los ovocitos vivos y muertos. Cabe mencionar que para comparar el patrón de los segundos, fueron teñidos

ovocitos a los que previamente se les dió un shock térmico a 2°C durante 30 min.

Una vez lavados los ovocitos se colocaron en grupos de 10 a 15 por pozo en cajas para cultivo de tejidos de 4 pozos de poliestireno (Nunc, Dinamarca). Dichas cajas contenían microgotas de 50ul de medio de maduración inmersas en aceite mineral estéril y equilibradas previamente durante 2 horas en la incubadora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad relativa.

En dichas condiciones los ovocitos fueron cultivados por un período de 96 hs in cambio de medio de cultivo.

Transcurrido el tiempo de cultivo las cajas con ovocitos fueron sacados de la incubadora y procesadas para su tinción.

Los ovocitos se sacaron de los pozos con la pipeta Pasteur de punta alargada, procurando hacerlo con la menor cantidad de medio posible y se colocaron en portaobjetos previamente desengrasados.

Posteriormente se cubrieron con una gota de hialuronidasa al 1% (Sigma Ch, EUA) en PBS estéril (Baker, Méx) durante 15 min para que se desprendiera el total de las células *cúmulus*, lo que era facilitado por acción mecánica de la pipeta Pasteur al succionar constantemente esa solución.

Se retiró el excedente de solución de hialuronidasa y se cubrieron con solución hipotónica de NaCl al 0.5% (Baker, Mex) por 30 min; después se retiró esta solución y se cubrieron con fijador frío de Carnoy (Metanol: Acido Acético, 3:1) preparado el día de uso y se dejó hasta su completa evaporación.

Una vez seco el fijador, se cubrieron con acetorceína durante 10 min, al cabo de los cuales se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio de luz (Zeiss) con objetivos 10X, 20X, 40X y 100X, para determinar la presencia de cromosomas indicativo del progreso meiótico.

Los resultados fueron detallados a través de una estadística descriptiva, por medio de cuadros y fotografías.

7. RESULTADOS.

7.1 OBTENCION DE OVOCITOS.

La solución de transporte de ovarios se recibió en el laboratorio a una temperatura entre 28 y 34°C. No fue preciso adicionarle antibiótico dado que la obtención de las gónadas se hacía personalmente *in situ* a través de la incisión por línea media, evitando alguna situación externa de contaminación.

En cuanto a las técnicas de obtención se refiere, solamente 6 ovarios de animales adultos pudieron ser procesados mediante aspiración, debido al reducido número de folículos observables aspirables de 6-10 mm de diámetro en la mayoría de los ovarios.

Se encontraron un total de 54 folículos en los 6 ovarios aspirados, de ellos 9 (16.66%) tenían el tamaño adecuado para ser aspirados (0.6-1cm) y 42 folículos fueron menores a 5 mm (77.78%). Otros 3 folículos fueron considerados como quísticos por presentar un diámetro mayor a 1 cm (5.56%). Al realizar la aspiración solamente se obtuvieron dos ovocitos (Cuadro 2).

Cuadro 2. NUMERO DE FOLICULOS SEGUN TAMAÑO Y TIPO DE HEMBRA.

Ovario	Folículos 0.1-0.5cm	Folículos 0.6-1cm	Folículos >1cm
1*	5	2	0
2*	0	1	0
3*	8	0	3 (QF)
4**	7	2	0
5**	16	0	0
6**	6	4	0

* procedentes de perras del subgrupo adultas pequeñas.

** procedentes de perras del subgrupo adultas grandes.

QF : Quiste Folicular

Dado que la técnica de aspiración-disección implicó la aspiración inicial de los folículos apreciables del ovario y su posterior disección, el número de ovarios utilizados corresponde como en el caso de la técnica anterior a 6, en los cuales la disección permitió obtener otros 42 ovocitos, los que sumados a los ya obtenidos por aspiración dió un total de 44 (Cuadro 3).

En lo que respecta a la técnica de disección, se obtuvieron un total de 614 ovocitos procedentes de 60 ovarios; 133 ovocitos correspondieron al grupo de animales prepúberes y 481 al de adultos (Cuadro 3).

Cuadro 3. OVARIOS PROCESADOS Y OVOCITOS OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS DE ASPIRACION, DISECCION Y ASPIRACION-DISECCION.

Subgrupo	Técnicas de Obtención		
	Aspiración ovarios/ovocitos	Disección ovarios/ovocitos	Aspiración-Disección ovarios/ovocitos
Prepúber pequeña	0/0	15/113	0/0
Prepúber grande	0/0	15/20	0/0
Adulta pequeña	3/1	15/230	3/31
Adulta grande	3/1	15/251	3/13
Total	6/2	60/614	6/44

El promedio de ovocitos por ovario por la técnica de aspiración, disección y aspiración más disección, fue de 0.17 ± 0.14 , 10.22 ± 3.75 y 3.67 ± 0.33 respectivamente considerando todos los subgrupos trabajados (Cuadro 4). Encontrando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el subgrupo de prepúberes grandes con los de adultas tanto pequeñas como grandes.

Cuadro 4. PROMEDIO DE OVOCITOS OBTENIDOS POR OVARIO
±e.e. POR LAS TECNICAS DE ASPIRACION, DISECCION Y
ASPIRACION-DISECCION.

Subgrupo	Técnicas de Obtención		
	Aspiración	Disección	Aspiración-Disección
Prepúber pequeña	0 ± 0	7.53 ± 3.52 ^a	0 ± 0
Prepúber grande	0 ± 0	1.3 ± 1.08 ^{ab}	0 ± 0
Adulta pequeña	0.33 ± 0.27	15.33 ± 5.73 ^{ac}	10.33 ± 3.77
Adulta grande	0.33 ± 0.27	16.73 ± 4.67 ^{ac}	4.33 ± 0.67
Promedio	0.17 ± 0.14	10.22 ± 3.75	3.67 ± 1.11

^{abc} valores con diferentes literales tienen diferencia estadística significativa
P<0.05.

Existió una amplia variabilidad en el número de ovocitos obtenidos por ovario en las diferentes técnicas, encontrando rangos tan amplios como el del subgrupo de adultos pequeños que fue de 0-88 (Cuadro 5).

Cuadro 5. RANGO DE OVOCITOS OBTENIDOS POR LAS TECNICAS
DE ASPIRACION, DISECCION Y ASPIRACION-DISECCION.

Subgrupo	Técnicas de Obtención		
	Aspiración	Disección	Aspiración-Disección
Prepúber pequeña	-	0 - 47	-
Prepúber grande	-	0 - 17	-
Adulta pequeña	0 - 1	0 - 88	0 - 31
Adulta grande	0 - 1	0 - 60	2 - 8

6.2 MADURACION.

La solución de transporte de ovarios se recibió en el laboratorio con una temperatura de 30 a 34°C en un tiempo máximo de 1 hora. El tiempo promedio requerido para todo el proceso, desde la obtención de los gametos hasta su incubación, fue de 1 hora 30 minutos.

Por lo que respecta a los medios de lavado y maduración, fueron preparadas soluciones madre y guardadas hasta su uso en refrigeración. En el caso de la solución de lavado, ésta se calentaba a la misma temperatura a la que se recibían los ovarios en el laboratorio. La solución de maduración se suplementó el día de uso con estradiol y suero de perra en estro. Dicho suero, fue en un principio inactivado a 60°C durante 15 minutos, filtrado (0.44µm) y mantenido en congelación hasta su uso. Este proceso provocaba la formación de gel en el suero, lo que dificultaba considerablemente su manejo y dilución con el medio de maduración, así como su filtración al pasarlo a través de una membrana con tamaño de poro de 0.22µm (Nalgene, USA), por lo que se recurrió al uso de filtros de 0.44µm. Dadas las dificultades en la inactivación, dilución y filtración, se decidió utilizar una solución madre a la que se le suplementaba el día de uso suero de perra en calor, filtrado (0.44µm) y sin inactivar. Una vez diluido, se filtró (0.22µm) y se le adicionó estradiol.

Es de hacer notar que durante todos los cultivos efectuados, no se tuvo problema de contaminación bacteriana, lo que ayudó a obtener resultados adecuados en esta fase experimental.

Se cultivaron en total 394 ovocitos (12.31 ovocitos/pozo) en ocho experimentos (Figura 3). De éstos, 338 (85.8%) fueron teñidos por la técnica de acetorceína para conocer su situación nuclear, los otros 56 gametos (14.2%) se perdieron a lo largo del proceso de tinción.

De los 338 ovocitos teñidos, 321 (95%) pudieron ser evaluados y otros 17 (5%), no pudieron serlo debido a la gran cantidad de células *cumulus* que retuvieron aún después del tratamiento con hialuronidasa y constante pipeteo (Cuadro 6).

Cuadro 6. ETAPA DE MADURACION NUCLEAR EN OVOCITOS DE PERRA DESPUES DE 96 h DE CULTIVO *in vitro*.

Experimento	Cultivados	Evaluados	Total de Ovocitos	
			Vesícula Germinal número (%)	Prometafase I número (%)
1	60	46	32 (69.6)	14 (30.4)
2	46	31	25 (80.6)	6 (19.4)
3	50	35	24 (68.6)	11 (31.4)
4	28	22	15 (68.2)	7 (31.8)
5	39	31	21 (67.7)	10 (32.3)
6	68	63	42 (66.7)	21 (33.3)
7	53	47	33 (70.2)	14 (29.8)
8	50	46	29 (63.0)	17 (37.0)
TOTAL	394	321	221	100
		100%	68.84%	31.15%

De los gametos evaluados, 221 (68.84%) fueron identificados como ovocitos con Vesícula Germinal; mientras que los 100 gametos restantes (31.15%) presentaban cromosomas en la etapa de prometáfase, tal y como se aprecia en las Figuras 4 y 5.

Por lo que respecta al patrón de viabilidad, los ovocitos que fueron sometidos al shock térmico, absorbieron totalmente el azul tripán, desde el exterior de las células *cumulus* hasta el citoplasma (Figura 6); mientras que aquellos mantenidos en la incubadora refractaron totalmente dicho colorante desde sus células *cumulus* (Figura 7).

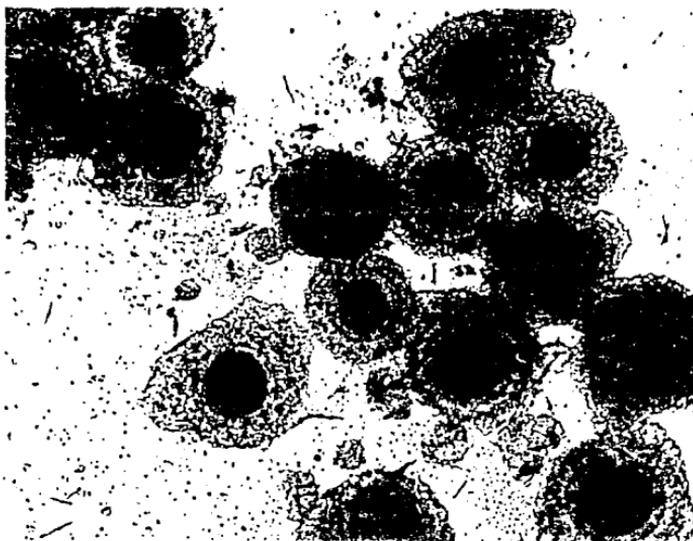


Fig. 3. Ovocitos de perra después de 96 h de cultivo *in vitro*. Nótese la expansión de las células del *cumulus*.



Fig. 4. Ovocito de perra después de 96 h de cultivo *in vitro*, tratado con hialuronidasa (1%) y solución salina hipotónica (0.5%) fijado en ácido acético-metanol (3:1 vol/vol) y teñido con acetorceína, mostrando la presencia de cromosomas, indicando el progreso de maduración.

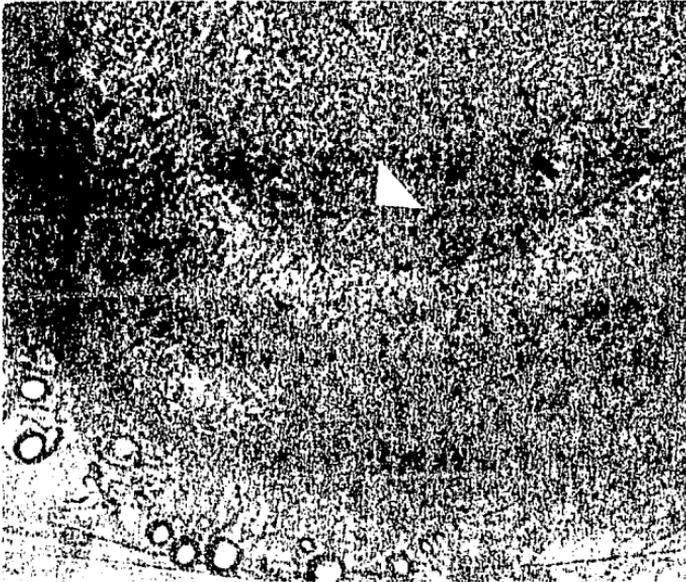


Fig. 5. Ovocito de perra después de 96 h de maduración *in vitro*, tratado de manera similar al anterior. Muestra agrupación de cromosomas en la etapa de Prometafase I.



Fig. 6. Ovocito de perra recién obtenido y sometido a shock térmico durante 30 min. a 2°C, teñido con azul tripán. El patrón mostrado para los ovocitos muertos es como éste donde el colorante se distribuye uniformemente desde las células del *cumulus* hasta el citoplasma del ovocito.



Fig. 7. Ovocito de perra recién obtenido y teñido con azul tripán. El patrón mostrado para los ovocitos vivos es similar a éste donde el colorante se acumula en la zona pelúcida sin penetrar al ovocito ni a las células del *cumulus*.

8. DISCUSION.

El desarrollar un trabajo de investigación con alguna especie de cánido y tener como modelo experimental al perro doméstico en temáticas tales como fertilización *in vitro* y maduración de gametos *in vitro*, resulta ser desventajoso cuando se compara con otras especies tales como porcinos, bovinos y equinos. Para los cánidos no existen sitios especializados para su sacrificio, y dado que los cadáveres son considerados tan sólo como desechos, no son cuidados ni procesados como lo sería una especie animal para abasto. Esto supone que los perros sean sacrificados dentro de los Centros de Control Canino, en sitios improvisados y en condiciones por lo general deficientes.

Por otro lado cabe mencionar la intransigencia de grupos humanitarios proteccionistas de la especie, que en ocasiones impiden la utilización de material biológico con fines experimentales, aún y cuando éste proceda de cadáveres que no tendrán utilidad posterior.

El personal encargado del sacrificio humanitario de los perros está adscrito a alguna de las Asociaciones Protectoras de los Animales, y utilizan para este fin principalmente el método del pistolete de émbolo oculto, y recientemente el aparato de electro-shock; por desgracia, a pesar que para esta actividad existen días y horarios establecidos, en ocasiones se presentan contratiempos, como resulta ser la carga de trabajo para este personal en los diferentes centros, la distancia entre los mismos y la asistencia del personal de apoyo de cada uno de los centros para el manejo de los animales, así como su eliminación, lo que dificulta precisar el tiempo para la obtención del material biológico.

Aunado a todo lo anterior cabe mencionar que los animales sacrificados en estos sitios son en su gran mayoría animales "callejeros" portadores de

enfermedades zoonóticas, poco adaptados al manejo, e inclusive altamente agresivos ante las condiciones estresantes a las cuales son sometidos, lo que pone de manifiesto las dificultades de trabajar con esta especie en las condiciones descritas.

Por otro lado, los trabajos de fertilización *in vitro* requieren de manera indispensable la maduración de los gametos participantes. En lo concerniente al ovocito, los investigadores relacionados con esta temática han seguido principalmente dos rutas: la maduración del ovocito *in vivo*, lo que se consigue con el monitoreo del ciclo estral vinculado con la actividad ovárica através de técnicas tales como ultrasonografía, radioinmunoanálisis y microscopía de luz. Dicho seguimiento puede hacerse más accesible si la hembra en cuestión es inducida a ciclar en el momento más oportuno, e inclusive inducida a superovular (103). Estos tratamientos presentan la gran ventaja de que el ovocito madura inmerso en un ámbito folicular propio, que le provee de una amplia gama de condiciones necesarias para su adecuada maduración. Sin embargo, el sistema requiere en contraparte el control de los animales en cuanto a su alojamiento, manutención y confort, conocimiento de sus antecedentes reproductivos, estandarización del esquema de tratamiento farmacológico y disposición de materiales necesarios para el monitoreo del ciclo, así como para la obtención de las gónadas. Este procedimiento, aunque ha sido el preferido por algunos investigadores (64,69,103), no está por el momento a nuestro alcance.

Otra ruta también ampliamente utilizada en la maduración de los ovocitos ha sido su cultivo *in vitro*. Este sistema ha representado una problemática específica pero a su vez vislumbra una serie de alternativas de interés como resultan ser: a) la utilización de hembras de elevado valor genético, imposibilitadas para la maduración de ovocitos *in vivo*; b) el caso de hembras muertas, siendo éste punto muy útil en el rescate de material genético de animales silvestres, así como c) el aprovechamiento de las gónadas con fines de producción o experimentales de aquellas hembras de especies para abasto sacrificadas en rastros (3,7,9,37,53).

En el caso particular de los cánidos se han seguido ambas rutas, aunque de manera preferencial en esta investigación se ha orientado hacia la obtención

de gónadas procedentes de animales sacrificados en los Centros de Control Canino. En estos lugares el sacrificio por electrocución es el método aprobado por las Asociaciones Protectoras de Animales. A través de este método se cumple con el exterminio de estos animales, que son en su mayoría producto de capturas realizadas en la vía pública, justificadas por el excedente de población existente, los actos de crueldad de los que son objeto y como una forma directa de control de la rabia (4).

De manera adicional al método de maduración de los ovocitos elegidos, es importante definir la forma en la cual los ovocitos serán obtenidos de su folículo. Para ello se utilizan dos técnicas: a) la aspiración, la cual implica la succión del contenido del folículo con una aguja conectada a una jeringa o a un aparato más sofisticado; es obvio que el folículo objeto de la punción debe estar desarrollado con el consecuente acúmulo de líquido folicular en el antro, y b) la disección, que implica la realización de múltiples incisiones en la superficie del ovario.

En el presente trabajo la técnica de obtención de ovocitos que resultó ser más eficiente fué la disección; con ella fue posible obtener un total de 614 ovocitos procedentes de 60 ovarios, lo que da un promedio de 10.22 ovocitos/ovario o 20.44/perra. Sin embargo, si consideramos los grupos por edad tendremos un total de 133 ovocitos con un promedio de 4.43/ovario u 8.86/perra en las hembras prepúberes; mientras que en las adultas existió un total de 481, lo que represento 16.03/ovario y 32/perra.

Al comparar el subgrupo de adultas por talla, resultó ser mejor el de las grandes con un total de 251 ovocitos y un promedio de 16.73/ovario o 33.46/perra en contra de los 230 de las pequeñas con un promedio de 15.33/ovario o 30.66/perra.

La técnica de aspiración, y en consecuencia la de aspiración-disección tuvieron serias limitaciones debido a la dificultad de encontrar ovarios con folículos aspirables apreciables. En el grupo de las hembras prepúberes, como era de esperarse, no hubo presencia de folículos observables. En el grupo de las hembras adultas, el resultado de la aspiración fue similar entre

las grandes y pequeñas, encontrando 1 ovocito de 3 ovarios aspirados por subgrupo. Sin embargo el tamaño de los folículos presentes fue principalmente de <0.5 cm, encontrando una mayor cantidad de ellos en las grandes (n=29) que en las chicas (n=13). Estos folículos presentan un problema técnico para poder ser aspirados dada su pequeña superficie y volumen. De los folículos de tamaño adecuado para la aspiración (0.6-1 cm), hubo 3 en los animales pequeños y 6 en los grandes, de los cuales fue posible obtener sólo 2 ovocitos. Al momento de disectar los 6 ovarios aspirados fue posible obtener 42 ovocitos más, lo que en promedio fue de 7.33 ovocitos/ovario, confirmando que la técnica de disección fue la más eficiente.

A pesar de la eficiencia ya explicada, existieron diferencias individuales importantes. Los rangos de obtención de ovocitos fueron amplios en cada uno de los subgrupos, encontrando ovarios con cantidades de ovocitos que fluctuaban desde 0 hasta 88. Esto es atribuido a la variabilidad en el material biológico procedente de perras de las que se desconocen los antecedentes reproductivos, la edad precisa, las condiciones en las cuales han sobrevivido y aún enfermedades padecidas. El grupo en donde hubo mayor variabilidad fue el de las hembras prepúberes.

Las investigaciones en este campo han empleado diferentes técnicas para la obtención de ovocitos de perra. Mahi y col. (64), trabajando con ovarios de 75 hembras procedentes de un centro de sacrificio, así como de una Clínica Veterinaria, puncionando con aguja todos los folículos observables y después lavándolos y colectándolos en caja Petri, reportaron la obtención de un total de 429 ovocitos, lo que equivale a 2.86 ovocitos/ovario y 5.72/perra. Esto resulta ser inferior al número de ovocitos obtenidos por disección en el presente trabajo (aunque si se consideran los procedentes de folículos es mayor). Dado que las perras estaban en diferentes etapas del ciclo estral, se entiende el reducido número de folículos encontrados.

Por otra parte Yamada y cols. (103), utilizaron una técnica similar a la de Mahi y col. (64), con ovarios de 16 perras Beagle de 1 a 7 años de edad en estro, las cuales recibieron previamente un tratamiento superovulatorio, obtuvieron en promedio 60 ovocitos/perra (30 ovocitos/ovario) lo que resulta ser superior a lo encontrado en este trabajo de tesis, sin embargo, en la

investigación de Yamada y cols. se utilizaron perras de raza y talla homogénea y además la colección fue producto de un tratamiento superovulatorio. Cabe mencionar que dichos autores reportaron también una variabilidad en la respuesta individual en la colección, lo que implicó encontrar desde 18 ovocitos hasta 164/perra.

Farstad y cols. (34), utilizando como modelo experimental al zorro silvestre encontraron que los ovocitos pueden ser colectados y procesados con éxito con la técnica de maduración aún a 6-8 horas de muerta la hembra donante.

Nickson y cols. (69), utilizaron ovarios procedentes de perras sometidas a cirugías en clínicas veterinarias en cualquier etapa del ciclo estral y colectaron ovocitos por disección. Las perras utilizadas (n=14) fueron clasificadas de acuerdo a la etapa del ciclo estral en que se encontraban (exclusivamente por hallazgos ováricos). En las prepuberales pudieron colectar 15.5 ovocitos/perra, en las de fase folicular 62/perra, las de metaestro 46/perra, las de anestro temprano 85/perra y finalmente las de anestro tardío 104/perra. Estas cantidades resultan ser mucho más elevadas a lo encontrado en el presente trabajo de tesis utilizando la misma técnica de obtención, sin embargo, debe considerarse la condición corporal de los animales que acuden a una Clínica Veterinaria para la práctica de una cirugía comparada con la de los animales que llegan a un Centro de Control Canino. Es evidente la mayor disponibilidad de ovocitos por medio de la técnica de disección procedentes de ovarios de perras adultas tanto en el trabajo de Nickson y cols., como en este trabajo. Cabe hacer mención que de los ovocitos obtenidos por Nickson y cols., el número de ovocitos degenerados fue de 55% en perras prepuberales, el 8.1% en las de fase folicular, el 13.0% en las de metaestro, el 15.9% en las de anestro temprano y el 14.4% en las de anestro tardío, lo que pone de manifiesto la potencialidad para el cultivo de ovocito de las perras adultas. Los ovocitos seleccionados para su cultivo por los mismos investigadores, bajo el criterio de forma y color del citoplasma, así como presencia de un mínimo de dos capas integrales de células *cumulus* fueron 0%, 19.4%, 22.5%, 15.3% y 24.0% respectivamente, para las perras en diferentes estadios reproductivos, lo que reafirma la preferencia de utilización de ovocitos procedentes de ovarios de perras adultas para este tipo de estudios. Con el estudio de Nickson y cols. fue posible precisar que las hembras en anestro tardío poseen el mayor número de ovocitos disponibles,

mientras que una reducida cantidad fue obtenida de aquellas con tejido lúteo funcional. Es conocido que durante el diestro se producen oleadas de crecimiento folicular, en las especies domésticas, pero no progresan a un estado preovulatorio debido al mecanismo de retroalimentación negativa de la progesterona proveniente del tejido lúteo sobre el hipotálamo e hipófisis; así mismo los autores señalan la importancia del papel de las células *cumulus* para la maduración del ovocito y desarrollo temprano del embrión *in vivo*, recalcando su importancia en la transferencia de nutrientes desde la granulosa. Cabe señalar que las células *cumulus*, en el caso de la perra, permanecen unidas al embrión hasta el estado de mórula (64).

En cuanto al patrón de tinción vital se refiere, con la utilización del azul tripán se encontró un esquema diferencial para los ovocitos vivos y muertos. En el caso de los vivos el colorante se acumuló alrededor de la zona pelúcida sin penetrar al ovocito o células *cumulus*. En los muertos el colorante se distribuyó de manera uniforme en las células *cumulus*, zona pelúcida y ovocito.

Por otra parte se ha señalado la particularidad que presenta el perro doméstico en cuanto a la maduración de sus ovocitos. La ovulación en esta especie puede ocurrir en cualquier momento dentro de un período comprendido desde 2 días antes y hasta 7 días después de iniciada la conducta estral (69,103); así pues los ovocitos son ovulados en un estado temprano de madurez, poseen en ese momento una vesícula germinal y completan la primera división meiótica hasta al menos 48 horas después de la ovulación en el oviducto, y pueden permanecer fértiles en este sitio durante 108 horas aproximadamente (69,103).

La técnica de procesamiento y cultivo de los ovocitos de perra, una vez obtenidos es similar entre los investigadores en el campo (64,69,103). Inicialmente existe un lavado por pasos secuenciales en una caja Petri, la cual contiene microgotas del medio de maduración. En el presente trabajo se utilizaron microgotas de 50 μ l, sin embargo, otros investigadores prefieren volúmenes mayores de 0.4 ml (103) o de 0.5 ml (64), de ahí los ovocitos son colocados en una cantidad similar del medio fresco en otra caja Petri bajo aceite mineral para su cultivo.

En la presente investigación se colocaron en promedio 12.31 ovocitos/microgota de 50 μ l lo que difiere a lo utilizado por Yamada y cols. (103), los cuales colocaron de 15-20 ovocitos/microgota de 0.4ml.

Los medios de cultivo utilizados varían considerablemente entre investigadores. Yamada y cols.(103), utilizan el medio TYH modificado, al cual se le sustituyó la BSA (albúmina sérica bovina) y penicilina-estreptomicina por 10% de FCS (suero fetal bovino) inactivado y 30 mg/l de sulfato de gentamicina. Mahi y col. (64), utilizaron el TCM-199 al 80% (Sales Hank's) y 20% de FCS inactivado adicionado de 2 mg/ml de NaHCO_3 , 100 UI/ml penicilina G-K y 50 μ g/ml de sulfato de genamicina. Farstad y cols. (34), utilizaron para cultivar ovocitos de zorra el TCM-199 con 25 mM de Hepes y suplementaron con 10 UI/ml de hCG. Por su parte Krogenæs y cols. (58), al trabajar de igual manera con ovocitos de zorra utilizaron TCM-199 con 10% de FCS y de manera opcional suplementaron con 2.5 μ g/ml de FSH dado que en sus resultados no hubo diferencias cuando se le adicionó esta hormona o no.

Las fases foliculares de maduración en la mayoría de las especies domésticas tienen lugar en un ambiente con estrógenos plasmáticos circulantes y el fluido folicular que rodea al ovocito tiene una alta concentración de estradiol. En la perra la situación es diferente, la progesterona está presente desde antes de la ovulación y continúa durante la misma, además, la participación de los estrógenos es importante cuando el corpúsculo polar ha sido expulsado (69). Por lo que otros investigadores han utilizado de manera preferencial la suplementación del medio con suero de perra en estro así como estradiol (69), tal y como se suplementó en el presente trabajo de tesis.

Las condiciones de incubación fueron similares a las utilizadas por otros investigadores: temperatura 37°C, atmósfera 5% de CO_2 y 95% de aire (64,103). Sin embargo, otros prefirieron usar 39°C así como el reemplazo de la mitad del medio de cultivo cada 24 horas durante todo el periodo de incubación (69).

Las células *cumulus* fueron retiradas de manera accesible con la solución de hialuronidasa al 1%, sin embargo, Mahi y cols. (64), encontraron que no tenía acción alguna y prefirieron utilizar el pipeteo para desnudarlos, ésta misma técnica siguieron Yamada y cols. (103).

Dado que los mecanismos involucrados en la secuencia de maduración en la perra aún no están determinados, en consecuencia los tiempos de cultivo para alcanzar esta condición varían ampliamente entre los investigadores desde 24 hasta 144 horas. En el presente trabajo se utilizó un período de cultivo de 96 horas debido a la particularidad del pobre desarrollo de los ovocitos recuperados por disección y a que su vida media es más amplia que este período. Krogenaes y cols. (58), reportaron que el cultivo de ovocitos hasta 96 horas proveía mejores resultados en cuanto al rompimiento de la vesícula germinal y expansión de las células *cumulus* en ovocitos de zorra comparados con aquellos cultivados por 72 horas.

Una vez transcurrido el período de incubación los ovocitos se fijaron durante el tiempo necesario para la evaporación del fijador ácido acético:etanol (1:3 vol/vol), lo que ocurría en aproximadamente 2-3 min. Dado que el ovocito resulta ser particularmente oscuro debido a la gran cantidad de corpúsculos grasos que posee, algunos investigadores para clarificarlo y evidenciar el material nuclear que existe en su citoplasma han utilizado la fijación por tiempos más prolongados, como por ejemplo 12 horas o inclusive la participación de otro fijador como el ácido acético:etanol:cloroformo (3:6:1 vol/vol/vol) durante 2-3 min. y posteriormente ácido acético etanol por 24 horas a 4°C (104). Finalmente los ovocitos se tiñen con acetorceína y se observan al microscopio.

En el presente trabajo se cultivaron 394 ovocitos de los cuales pudieron ser evaluados 321 (85.1%). Krogenaes y cols. (58), reportaron que en 573 ovocitos cultivados de zorra únicamente pudieron ser evaluados 325 (56.71%), debido a la dificultad ocasionada por el exceso de corpúsculos grasos del ovocito y a la presencia de células *cúmulus*.

De los 321 ovocitos evaluados 221 (68.84%), permanecieron en estado de vesícula germinal y 100 (31.15%) iniciaron la Prometafase al cabo de 96 horas de cultivo (Ver figuras 4 y 5).

Los ovocitos preovulatorios recién obtenidos y teñidos se encuentran invariablemente en estado de vesícula germinal, la cual puede permanecer durante varios días más. Mahi y col. (64), tiñeron ovocitos inmediatamente después de su colección y encontraron que el 98.9% tenía vesícula germinal, la cual permaneció en el 52.5% de los ovocitos aún después de cultivarlos por 72 horas. Yamada y cols. (103), reportaron la presencia de vesícula germinal en el 88.6% de ovocitos preovulatorios a 24 horas de cultivo, en el 68.2% a 48 horas y en 62.6% a 72 horas por lo que se considera que lo encontrado en el presente trabajo de tesis concuerda con lo reportado por dichos autores. Por su parte Farstad y cols. (34), reportaron que en ovocitos de zorra el rompimiento de la vesícula germinal es temprano 91% a 24 horas de cultivo y del 100% a 48 horas de cultivo. Krogenaes y col. (58), coinciden en que el rompimiento de la vesícula germinal de ovocitos de zorra inicia a las 24 horas de cultivo, lo que se incrementa hasta las 96 horas y que la Metafase II se inicia a 48 horas de cultivo y se incrementa hasta las 96 horas. Yamada y cols. (104), comparando el desarrollo en cultivo de ovocitos provenientes de perras superovuladas y testigos (no superovuladas) encontraron que en el primer grupo la permanencia de la vesícula germinal a las 96 horas fue de 67% y alcanzaron Metafase II el 28%, en el segundo grupo la permanencia de vesícula germinal a 144 horas de cultivo fue 91% y los que mostraron Metafase II apenas el 9%. A 72 horas de cultivo los mismos autores reportan un máximo de 31.9% de ovocitos que alcanzan Metafase II, los cuales sumados a otros que presentaron alguna fase de la primera división meiótica representaron en total un 38.2%. Mahi y cols. (64), con el mismo tiempo de cultivo obtuvieron 25.4% de ovocitos con Metafase I y II, cabe hacer mención que en ese trabajo se clasificaron indistintamente en Metafase I y II, señalando que el corpúsculo polar es fácil de perderse durante el proceso de fijación lo que dificulta diferenciar las etapas aunque la reducción cromosómica puede tomarse como criterio para una determinación certera. Sugieren además que la mejor visualización del corpúsculo polar ocurre cuando la corona radiada no es removida completamente.

En el presente trabajo se encontraron cromosomas en el 31.15% de los ovocitos cultivados evaluados; mismos que tuvieron una disposición de Prometafase según la clasificación empleada por Yamada y cols. (103). El valor absoluto de maduración encontrado en el presente estudio coincide con lo reportado por Mahi y cols. (64) y Yamada y cols. (103); sin embargo, el estado de desarrollo no lo es, lo que obliga a realizar más experimentos en este sentido para verificar a distintos tiempos de cultivo el estado auténtico de la situación nuclear.

9. CONCLUSIONES.

9.1 El tener como modelo experimental al perro doméstico en cualquier proceso de la técnica de fertilización *in vitro* resulta problemático, debido a la insuficiente accesibilidad de material biológico, esto es, variabilidad en cuanto a la cantidad y calidad de las hembras sacrificadas en los centros de control canino, y a la incierta anamnesis con énfasis en aspectos reproductivos de los animales ahí remitidos.

9.2 Al ser la perra monoéstrica estacional, el número de ovarios que presentan folículos apreciables aspirables (0,6 a 1 cm de diámetro) se reduce a cierta temporalidad, lo cual resulta ser un factor limitante para la obtención de ovocitos por la técnica de aspiración.

9.3 El método de disección permite obtener un mayor número de gametos, en comparación con la aspiración; sin embargo, existe gran variabilidad individual, encontrando así ovarios con cero ovocitos y hasta de 88.

9.4 A pesar de que no existir una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el subgrupo de prepúberes pequeñas y adultas grandes y pequeñas, en cuanto al número de ovocitos obtenidos, se pudo apreciar que en valores absolutos se obtuvieron una mayor cantidad de ovocitos procedentes de perras adultas. Mientras que el subgrupo de prepúberes grandes sí presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), en relación a los subgrupos de animales adultos.

9.5 El uso de antibióticos en la solución de transporte no fue necesario debido al tiempo tan breve de traslado del centro de control canino al laboratorio y los cuidados de las gónadas durante todo el proceso de obtención a considerar por la ausencia de contaminación microbiana en los cultivos.

9.6 La tinción con azul tripan fue concluyente, ya que permite observar rápidamente la viabilidad de los gametos.

9.7 La técnica de tinción a base de solución hipotónica, alcohol ácido y acetorceína, es un proceso muy práctico, ya que permite observar perfectamente el interior del citoplasma separando las células cúmulus; en comparación con técnicas basadas solamente en una fijación con alcohol ácido de 12 a 24 horas y más tarde la tinción con acetorceína, donde el color y la cantidad aún persistente de células cúmulus dificultan observar con claridad.

9.8 La suplementación del medio TCM 199 adicionado con L-glutamina, piruvato, lactato y sulfato de gentamicina, con el 10% de suero de perra en calor y $\mu\text{g/ml}$ de estradiol, resultó adecuado para obtener 31.5% de maduración.

9.9 Aún con todos los cuidados y selección de ovocitos para el cultivo un 68.84% de ellos conservaron la vesícula germinal hasta las 96 horas de cultivo.

10. RECOMENDACIONES.

10.1 Los resultados del presente trabajo sugieren la utilización de material biológico procedente de animales con una historia clínica bien conocida y una homogeneidad en cuanto a raza, talla y edad.

10.2 Se sugiere probar la obtención de ovocitos através de la inmersión de la gónada en un medio de cultivo y puncionar ahí los folículos observables, tal y como lo describe Mahi y cols. (64).

10.3 Correlacionar la técnica de obtención de ovocitos con la etapa del ciclo estral en la cual se encuentren las hembras donantes, así como el comportamiento de los ovocitos con referencia a su grado de maduración en cultivo.

10.4 Se recomienda correlacionar la técnica de tinción vital de azul tripan con un patrón morfológico para conocer el grado de degeneración que presentan los ovocitos colectados, lo que llevaría a una mejor selección de los ovocitos para cultivo.

10.5 Es importante realizar tinciones periódicas de los ovocitos en cultivo iniciando desde las primeras 24 horas, y durante todo el proceso que dure la maduración.

10.6 Existe controversia en la literatura en relación a la suplementación del medio de cultivo. Sin embargo, considerando el ambiente hormonal que tiene el ovocito *in vivo* durante su proceso de maduración resulta conveniente la utilización del suero de perra en calor, así como la adición de estrógenos.

11. LITERATURA CITADA.

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J.D.: Molecular Biology of the Cell. Cap.14. Edit. Garland Publishing, Inc. New York and London, USA. (1992).
2. ALLEN, E.W.: Fertilidad y Obstetricia Canina. Edit. Acribia. Zaragoza, España. (1992).
3. AMBRIZ, G.D.: Fertilización *in vitro* de ovocitos de cerdo madurados *in vitro*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. (1993).
4. ANDERSON, D.G.: The control of pet overpopulation. *Vet. Tech.*, 13(2): 119-123 (1992).
5. ARBEITER, K., DOBRETSBERGER, M., MULLER, E. and HOLZMANN, A.: Ein indirekter Nachweis der Ovulation and Fertilisation beim Hund durch Progesteronverlaufsuntersuchungen. *J.Vet.Med.*, 38: 696-701 (1991).
6. BASRUR, P.K., LIPTRAP, R.M. and STUBBINGS, R.B.: The assessment of follicular parameters for the selection of oocytes recovered from superovulated heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 23: 181-195 (1990).
7. BEZARD, J., COGNIE, Y., CROZET, N., DUCHAMP, G., GUERIN, Y., MAGISTRINI, M., PALMER, E. and POULIN, N.: *In vitro* fertilization in ovine, caprine and equine species. *Ann. Zootech.*, 41: 353-359 (1992).
8. BIGGERS, J.D., YOUNIS, A.I., ALBERTINI, D., BECKER, R. and SEGHAL, P.: *In vitro* meiotic development and maturation of oocytes are related to their preantral follicle size in the rhesus monkeys. *Theriogenology*, 39: 188 (1993).

9. BONDIOLI, R.K. and WRIGHT, R.W.: Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. **J. Anim. Sci.**, **53**(3): 702-729 (1981).
10. BOUCHARD, G.F., SOLORZANO, N., CONCANNON, P.W., YOUNGQUIST, R.S. and BIRSCHWALL, C.J.: Determination of ovulation time in the bitch based on teasing, vaginal cytology and ELISA for progesterone. **Theriogenology**, **35**(3): 603-611 (1990).
11. CHADWICK, D.H.: Dead or live: The endangered species act. **National Geographic**, **187**(3): 5-41 (1995).
12. CHAKRABORTY, P.K.: Reproductive hormone concentrations during estrus, pregnancy, and pseudopregnancy in the labrador bitch. **Theriogenology**, **27**(6): 827-837 (1987).
13. CHANG, S., RYAN, R., KUANG, Y. and ANDERSEN, W.: Some observation on the development and function of ovarian follicles. Control of reproduction of the cow. **Comission of the European Communities Directorate General of Agriculture**. Luxemburgo, Bruselas. Cap. 1 pp 3-24 (1978).
14. CHAUDHURI, J.P. and YANAGIMACHI, R.: An improved method to visualize human sperm chromosomes using zona-free hamster eggs. **Gam.Res.**, **10**: 233-239 (1984).
15. CHENG, W.T.K., MOOR, R.M. and POLGE, C.: *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, **25**(1): 146 (1986).
16. CHRISTIANSEN, J.: Reproduction in the Dog and Cat. **Baillere Tindall**. London, England (1984).
17. CONCANNON, P., HANSEL, W. and MCENTEE, K.: Changes in Lh, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biol.Reprod.**, **17**: 604-613 (1977).

18. CONCANNON, P.W.: Canine pregnancy and parturition. The Veterinary Clinics of North American. **J.Small Anim.Pract.**, 16(3): 453-465 (1986).
19. CONCANNON, P.W., Mc CANN, J. and TEMPLE, M.: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fert. Suppl.**39: 103-113 (1989).
20. CONCANNON, P.W. and YEAGER, A.E.: Endocrine, ultrasonographic, radiographic and clinical changes during pregnancy, parturition and lactation in the dog. **Primer Curso Internacional de Reproducción Canina**. México, D.F. 1992 pp 23-49 AIBIR México, D.F. (1992).
21. CRAN, D. and MOOR, R.: Programming the oocyte for fertilization. Fertilization in mammals. Cap 4. **Edt. Plenum Press**. New York, USA pp 35-48 (1990).
22. CROZET, N., De SMEDT, V., AHMED-ALI and SEVELLEC: Normal development following *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the goat. **Theriogenology**, 39: 206 (1993).
23. CRITSER, E.S., PARRISH, J. and FIRST, N.: *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, 31(1): 61-74
24. DEL CAMPO, M.R., DONOSO, M.X., GINTHER, O.J. and PARRISH, J.J.: *In vitro* fertilization of *in vitro* matured equine oocytes. **Equ.Vet.Sci.**, 10(1): 18-22 (1990).
25. DING, J. and FOXCROFT, G.: Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. **Biol. Reprod.**, 47: 648-655 (1992).
26. DONOGHUE, A.M., JOHNSON, L.A., SEAL, U.S., ARMSTRONG, D.L., TILSON, R.L., WOLF, P., PETRINI, K., SIMMONS, L.G., GROSS, T. and WILDT, D.E.: *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Phantera tigris*). **Biol. Reprod.**, 43: 733-744 (1990).

27. DONOGHUE, A.M., JOHNSON, L.A., SEAL, U.S., ARMSTRONG, D.L., SIMMONS, L.G., GROSS, T., TILSON, R.L. and WILDT, D.E.: Ability of thawed tiger (*Phantera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cats eggs *in vitro*. **J.Reprod.Fert.**, **96**: 555-564 (1992).
28. DONOGHUE, A.M., HOWARD, J.G., BYERS, A.P., GOODROWE, K.L., BUSH, M., BLUMER, E., LUKAS, J., STOVER, J., SNODGRASS, K. and WILDT, D.E.: Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Aciononyx jubatus*). **Biol.Reprod.**, **46**: 1047-1056 (1992).
29. DOWNS, S.: The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. Fertilization in mammals. Cap. 1. Plenum Press. New York, USA. pp 5-16 (1990).
30. ENGLAND, G.C.W.: Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in breeding management of bitches. **J. Small Anim.Pract.**, **33**: 577-582 (1992).
31. ENGLAND, G.C.W. and ANDERTON, D.J.: Determination of progesterone concentrations in the vaginal fluid of bitches in oestrus. **Vet.Rec.**, **130**: 143-144 (1992).
32. EVANS, J.M.: Oestrus control in the bitch. **J. Small Anim. Pract.**, **29**: 535-541 (1988).
33. FARSTAD, W., MONDAIN-MONVAL, M., HYTTEL, A. and MARKENG, D.: Periovaratory endocrinology and oocyte maturation in unmated mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). **Ac.Vet.Scan.**, **30**: 313-319 (1989).
34. FARSTAD, W., HYTTLEL, P., GRONDAHL, C., KROGENAES, A., MONDAIN-MONVAL, M. and HAFNE, A.: Fertilization *in vitro* of oocytes matured *in vivo* in the blue fox (*Alopex lagopus*). **J. Reprod. Fert., Suppl.** **47**: 219-226 (1993).

35. FELDMAN, E.C. y NELSON, R.W.: Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Edit. Intermédica. Buenos Aires, Argentina (1991).
36. FENG, H.L., QIN, P.C. and LIU, J.M.: *In vitro* maturation of follicular oocytes of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonides gray*). **Theriogenology**, **37**(1): 279 (1992).
37. FIRST, N.L., HOSHI, M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. and SAEKI, K.: *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biol. Reprod.**, **44**: 256-260 (1991).
38. FUKUI, Y., Mc GOWAN, L.T., JAMES, R.W., ASHER, G.W. and TERVIT, H.R.: Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on *in vitro* maturation and fertilization of red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. **Theriogenology**, **35**(3): 499-512 (1991).
39. FUNAHASHI, H., ONIHARA, T. and TAKEDA, T.: Development capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, **36**(3): 427-434 (1991).
40. GALINA, H.C., SALTIEL, A., VALENCIA, J., BECERRIL, J., CALDERON, A., DUCHATEAU, A., FERNANDEZ, S., OLGUIN, A., PARAMO, R. y ZARCO, L.: Reproducción de Animales Domésticos. Edit. Limusa. Cap. 3 y 27. México D.F. (1991).
41. GOODROWE, K.L., HOWARD, J.G., SCHMIDT, P.M. and WILDT, D.E.: Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and *in vitro* fertilization. **J.Reprod.Fert. Suppl.**39: 73-90 (1989).
42. GOODROWE, K.L., MILLER, A.M. and WILDT, D.E.: *In vitro* fertilization of gonadotropin-stimulated leopard cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. **J. Experim. Zoo.**, **252**: 89-95 (1989).
43. GOTO, K.: *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. **J. Anim. Sci.**, **67**: 2181-2185 (1989).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

44. GRAF, K.J.: Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. **J.Reprod.Fert.** **52:** 9-14 (1978).
45. GREENWALD, G. and TERRANOVA, P.: The physiology of reproduction. Raven Press. New York, USA. pp 387-415 (1988).
46. GWATKIN, R.: Fertilization mechanisms in man and mammals. Plenum Press. New York, USA. (1977).
47. HAFEZ, E.S.E.: Reproduction in farm animals. 6th edition. Edt. Lea and Febiger. USA. (1993).
48. HAY, M., GRAN, D. and DOTT, H.: Regeneration of atresic sheep ovarian follicles *in vitro*. **J.Reprod.Fert.**, **55:** 195-207 (1979).
49. HAYER, P., GUNZEL-APEL, A.R., LUERSSEN, D. and HOPPEN, H.O.: Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and early luteal phase in the bitch. **J.Reprod.Fert., Suppl.47:** 93-100 (1992).
50. HEGSTAD, R.L., JOHNSON, L.A. and PASTERNAK: Concentrations and pulse analyses of adrenocorticotrophin and luteinizing hormone in plasma from dogs in pro-oestrus, oestrus, dioestrus and anoestrus. **J.Reprod.Fert., Suppl.47:** 77-84 (1993).
51. HIRAO, Y., MIYANO, T. and KATO, S.: Fertilization of *in vitro* grown mouse oocytes. **Theriogenology**, **34(6):** 1071-1077 (1990).
52. HOFFMANN, B. and SCHNEIDER, S.: Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog. **J.Reprod.Fert., Suppl.47:** 85-91 (1993).
53. IRITANI, A., KATO, H. and UTSUMI, K.: Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, **35(4):** 695-703
54. JAN LANGMAN, M.: Embriología Médica: desarrollo humano normal y anormal. 3a. edición. Edit. Interamericana. México, D.F. (1976).

55. JEFFCOATE, I.A.: Endocrinology of anoestrus bitches. **J.Reprod.Fert. Suppl.**47: 69-76 (1993).
56. JOHNSON, L.A., DONOGUE, A., O'BRIAN, S. and WILDT, D.: Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. **J.Reprod.Fert.**, 92: 377-382 (1991).
57. JONES, E.D. y JOSHUA, J.O.: Problemas clínicos de la reproducción canina. **Edt. El Manual Moderno**. México, D.F. (1984).
58. KROGENAES, A., NAGYOVA, E., FARSTAD, W. and HAFNE, A.: *In vitro* maturation of blue fox oocytes and cAMP production in oocyte-cumulus cell complexes. **Theriogenology**, 39: 250 (1993).
59. LAROCCA, C., KMAID, S. and CALVO, J.: Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation fertilization and development of the bovine oocyte *in vitro*. **Theriogenology**, 39: 250 (1993).
60. LEE, M.A. and BAYARD, T.S.: Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, 34: 349-356 (1986).
61. LINDSAY, F.E.: The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. **J. Small Anim. Pract.**, 24: 1-15 (1983).
62. LYNN, R.F.: Mouse sperm capacitation assessed by kinetics and morphology of fertilization *in vitro*. **J.Reprod.Fert.**, 69: 419-428 (1983).
63. MAHI, C.A. and YANAHIMACHI, R.: Capacitation acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. **Gam.Res.**, 1: 101-109 (1978).
64. MAHI, C.A. and YANAHIMACHI, R.: Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **J.Experim.Zoo.**, 196: 189-196 (1976).

65. MANGIA, F. and CANIPANI, R.: Biochemistry of growth and maturation of mammalian oocytes. In *Development in mammals*. Vol.2. Edt. Elsevier. New York, USA. pp 1-18 (1977).
66. Mc DONALD, L.E.: *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4a edición. Edit. Interamericana. México,D.F. (1991).
67. MILLER, A.M., ROELKE, M., GOODROWE, K., HOWARD, J. and WILDT, D.: Oocyte recovery, maturation and fertilization *in vitro* in the puma (*Felis concolor*). *J.Reprod.Fert.*, **88**: 249-258 (1990).
68. MOTLIK, J. and FULKA, J.: Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, **25**(1): 87-97 (1986).
69. NICKSON, D.A., BOYD, J., ECKERSALL, P., FERGUSON, J., HARVEY and RENTON: Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *J.Reprod.Fert., Suppl.***47**: 231-240 (1993).
70. OETTL, E.E., BERTSCHINGER, H., BOTHA, A. and MARAIS, A.: Luteolysis in early diestrous beagle bitches. *Theriogenology*, **29**(3): 756-763 (1988).
71. OLSON, P.N., BOWEN, R., BEHRENDT, M., OLSON, J. and NETT, T.: Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and oestrus. *Biol.Reprod.*, **27**: 1196-1206 (1982).
72. OLSON, P.N., HUSTED, V., ALLEN, T. and NETT, T.: Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *The Veterinary Clinics of North American. J. Small Anim. Pract.*, **14**(4): 927-947 (1984).
73. PHEMISTER, R.D.: Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol.Reprod.*, **8**: 74-82 (1973).
74. PHILLIPS, D., VANAJA, R. and PEROTT, M.: Structure of the cumulus oophorus on the time of fertilization. *Cell Tissue Research*, **261**: 249-259 (1990).

75. PIETERSE, M.C., VOS, P., KRUIP, A., WURTH, Y., VAN BENEDEEN, H., WILLEMSE, A. and TAVERNE, M.: Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, **35**(1): 19-24 (1991).
76. ROMO, G.S.: Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. **Vet.Méx.**, **24**(3): 177-184 (1993).
77. ROSADO, A. y ROSALES, A.: Maduración folicular en el mamífero y determinantes bioquímicos. **Ciencia**, **42**(1): 81-97 (1991).
78. SAI MA, M.D., DAGMAR, K.K., CHRISTO, Z.M., BASIL, H.Y., VICTOR, G. and YOUNG, S.M.: Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize *in vitro*. **Fert.Steril.**, **51**(6): 992-997 (1989).
79. SAMPER, J.C., BEHNKE, E., BYERS, A., HUNTER, A. and CRABO, B.: In vitro capacitation of stallion spermatozoa in calcium-free tyrode's medium and penetration of zona-free hamster eggs. **Theriogenology**, **31**(4): 875-884 (1989).
80. SHILLE, V.M., THATCHER, M., LLOYD, M., MILLER, D., SEYFERT, D. and SHERROD, J.: Gonadotropic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. **J.Reprod.Fert.**, **39**: 103-113 (1989).
81. SHIRLEY, J.L. and LONGO, F.J.: Examination of living and fixed gametes and early embryos stained with supravital fluorochromes (Hoechst 33342 and 3,3'-Dihexyloxacarlocyanine Iodide). **Gam.Res.**, **15**: 267-283 (1986).
82. SHOTTERER, A.: Beitrag zur Feststellung der Einzahl in verschiedenen Altersperioden bei der Hundin. **Anat. Anzeiger**, **65**(11-13): 177-192 (1928).
83. SOBAJIMA, T., AOKI, F. and KOHMOTO, K.: Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. **J.Reprod.Fert.**, **97**: 389-394 (1993).

84. SODENBERG, S.F.: Canine breeding management. The Veterinary Clinics of North America. **J. Small Anim. Pract.**, 16(3): 419-425 (1986).

85. STARKER, L.A.: Fauna silvestre de México. Ediciones del Instituto Mexicano de Revisiones Naturales Renovables. 2a edición. México, D.F. (1977).

86. STEEL, D.R. y TORRIE, H.J.: Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2a. edición. Edt. McGraw-Hill. México, D.F. (1992).

87. STEPTOE, P. and EDWARDS, R.: Birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, 2: 366 (1978).

88. SUSUKI, T., SINGLA, S.K., SUJATA, J. and MADAN, M.L.: *In vitro* fertilization of water buffalo follicular oocytes and their ability to cleave in vitro. **Theriogenology**, 38: 1187-1194 (1992).

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

90. THIBAUT, C.: Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?. **J.Reprod.Fert.**, 51: 1-15 (1977).

91. TOLOSA, J. y OCHOA, V.: Morfología Veterinaria. Tomo 1: Citología y embriología general. UNAM. México, D.F. (1984).

92. TOYODA, Y. and NAITO, K.: IVF in domestic animals. Fertilization in mammals. Cap. 24. Edt. Plenum Press. New York, USA. pp 335-347 (1990).

93. TSAFIRI, A. and CHANNING, R.: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. **Endocrinology**, 96: 922-927 (1975).

94. TSUTSUI, T.: Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **J.Reprod.Fert., Suppl.**39: 269-275 (1985).

95. VALTONEN, M. and JALKANEN, L.: Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **J.Reprod.Fert., Suppl. 47:** 133-137 (1992).
96. VANDERHYDEN, B. and ARMSTRONG, A.: Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocyte. **Biol.Reprod., 40:** 720-728 (1989).
97. VILLE, C.A.: *Biología*. 7a edición. Cap. 26. Edt. Interamericana. México, D.F. (1985).
98. WALLANCE, S.S., MAHAFFEY, M., MILLER, D., THOMPSON, F. and CHAKRABORTY, P.: Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the oestrus cycle. **Am.J.Vet.Res., 53(2):** 209-215 (1992).
99. WANG, Z.K., WEI, P., LEI, C. and LOU, M.: Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. **Theriogenology, 37:**733-739 (1992).
100. WILDT, D.E., CHAKRABORTY, P., PANKO, W. and SEAGER, S.: Relationship of reproductive behaviour, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. **Biol.Reprod., 18:** 561-570 (1978).
101. WILDT, D.E., SEAGER, S. and CHAKRABORTY, P.: Behavioral, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. **J.Anim.Sci., 53(1):** 182-191 (1981).
102. WILDT, D.E.: Potential application of IVF technology for species conservation. Fertilization in mammals. Cap. 25. Edt. Plenum Press. New York, USA. pp 349-364 (1990).
103. YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K. and TOYODA, Y.: Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. **Biol.Reprod., 46:** 853-858 (1992).

104. YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWANO, Y., NAKASAWA, M., NAITO, K. and TOYODA, Y.: *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **J.Reprod.Fert., Suppl.47**: 227-229 (1993).

105. YOSHIDA, M.: *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. **Jap.J.Vet.Sci.**, 49(4): 711-718 (1987).

106. YOUNIS, A., BRACKETT, B. and FRAGES, M.: Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and IVF. **Gam.Res.**, 23: 189-201 (1989).

107. ZARCO, Q.L.: Características reproductivas de la hembra canina. **Primer Curso Internacional de Reproducción Canina**. México, D.F. 1992 pp 1-6 AIBIR México, D.F. (1992).

ANEXOS

MEDIO DE MADURACION.

Componente:

Medio 199 (Sales Hank's) adicionado con L-glutamina
0.25 mM Piruvato de Sodio
4.79 mM Lactato de Sodio
50 ug/ml Sulfato de Gentamicina

NOTAS:

- Ajustar la osmolaridad a 280-290 mOsm con NaCl.
- Ajustar el pH a 7.3-7.4 con NaCl.
- Filtrar en un frasco estéril.
- Suplementar el día de uso con:
20 ug estradiol.
10% suero de perra en estro filtrado.

Fuente: Nickson, D.A. y cols., 1993.

MEDIO DE LAVADO.

Componente:

Medio 199 (Sales Hank's) adicionado con L-glutamina
25 mM HEPES
50 ug/ml Sulfato de Gentamicina

NOTAS:

- Ajustar la osmolaridad a 280-290 mOsm con NaCl.
- Ajustar el pH a 7.3-7.4 con NaOH.
- Filtrar en un frasco estéril.

Fuente: Nickson, D.A. y cols., 1993.

SOLUCIONES CONCENTRADAS.

- Solución Salina isotónica.
0.9% NaCl por 1 litro de agua bidestilada.
- 17-beta-estradiol.
1mg por ml de etanol. Almacenar en congelación.
- Sulfato de Gentamicina.
50ug por ml de NaCl 0.9% estéril.
- Hialuronidasa al 1%.
1mg por ml de PBS estéril.
- Solución Buffer de Fosfatos (PBS).
7.4g NaCl; 0.9532g NaHPO₄; 0.5566g NaH₂PO₄ por lt de agua destilada.
- Alcohol ácido (Sol. de Carnoy).
Acido acético-etanol (1:3). Preparar justo antes de usarlo.
- Orceína acética.
Al 1% peso/volumen. El solvente es 60/40 (agua/ácido acético). Filtrar antes de usar.