



Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas

Departamento de Ciencias Veterinarias

Maestría en Ciencia Animal

**Suplementación hormonal en la maduración *in vitro* de
ovocitos caninos (*Canis familiaris*): Metaanálisis**

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

MVZ. Bianca Viviana Orozco Galindo

“Becado (a) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

Bajo la Dirección del

Dr. Andrés Quezada Casasola

Y la Codirección del

Dr. José María Carrera Chávez

Ciudad Juárez Chih., 29 de agosto 2021

APROBACIÓN DE LA TESIS

Suplementación hormonal en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos (*Canis familiaris*): Metaanálisis, reporte de investigación preparado por Bianca Viviana Orozco Galindo como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

ha sido aprobado y aceptado por:

Dr. Andrés Quezada Casasola

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José María Carrera Chávez

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Diana Marcela Beristáin Ruiz

ASESOR

PhD. Cuauhcihuatl Vital García

ASESOR

PhD. Ernesto Orozco Lucero

ASESOR

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

SUPLEMENTACIÓN HORMONAL EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS (*CANIS FAMILIARIS*): METAANÁLISIS

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

Dr. José María Carrera Chávez

COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramón Rivera Barreno

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS

C.D. Salvador David Nava Martínez

DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a las mujeres con el siguiente escrito:

El aquelarre

La belleza nativa que florece de una mujer

el hombre lo interpreta como brujería,

la incomprensión de la absoluta mujer

el hombre lo interpreta como brujería,

el sentir de su entrepierna bajo la delicada silueta de la feminidad

el hombre lo interpreta como brujería,

lo que percibe como un acto de desobediencia ante la imparcialidad

el hombre lo interpreta como brujería,

la devoción melódica a madre y la luna,

el hombre lo interpreta como brujería,

cuando las mujeres están siendo mujeres

el hombre lo interpreta como brujería.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mis directores de tesis; el Dr. Andrés Quezada Casasola y el Dr. José María Carrera Chávez por haberme guiado durante todo el periodo de investigación. De igual manera a mi comité tutorial; la Dra. Cuauhcihuatl Vital García, la Dra. Marcela Beristain Ruiz y al Dr. Ernesto Orozco Lucero, por el esfuerzo en apoyarme y en haber realizado todos juntos un increíble trabajo, especialmente al Dr. Ernesto Orozco, ya que, si no hubiese trabajado con él en la tesis de licenciatura, no sería quien soy ahora.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez y a la Coordinación de Veterinaria Juárez por la oportunidad de ser parte de la Maestría en Ciencia Animal. También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el sustento por medio de la beca nacional 2019-000037-02NACF-15066, para así llevar a cabo mis estudios e investigación científica.

De todo corazón agradezco a los docentes de la maestría por la formación y apoyo para poder ser un alumno prometedor en el campo científico, especialmente al Dr. Bojórquez quien mostró gran interés en mi aprendizaje, con una dedicación, paciencia y amabilidad que caracteriza a un gran ser humano., del mismo modo a la Dra. Gatica por el esmero y estar al pendiente de cada uno de los estudiantes y así, lograr su cometido. Agradezco a mis compañeros de la maestría: Rolando Rueda Torres, Elkin Quiroga Calderón, Valeria Sánchez Garcia y María Guadalupe Hernández por su apoyo, y un agradecimiento especial a Natalia Guerra Murcia por su gran amor y amistad que me ha brindado y Valeria Sánchez García por haber sido la única en asistir en mi defensa de tesis de licenciatura, jamás lo olvidaré.

RESUMEN

SUPLEMENTACIÓN HORMONAL EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS CANINOS (*CANIS FAMILIARIS*): METAANÁLISIS

Por:

Bianca Viviana Orozco Galindo

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos caninos (*Canis familiaris*) es una técnica que continúa con deficiencias en maduración nuclear de los ovocitos. Este metaanálisis tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la suplementación hormonal de manera individual y conjunta sobre la MIV de ovocitos caninos.

Se utilizó el software MedCalc para la estadística de los datos. Estos se evaluaron mediante la razón de momios (RM) usando un modelo de efectos fijos con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se analizaron un total de 43 datos, 27 pertenecientes a la suplementación individual de hormonas, las cuales fueron: hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P4), estradiol (E2), gonadotropina coriónica equina (eCG), gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) y somatotropina humana (hST) y 16 a la suplementación en conjunto de hormonas. En los resultados generales hubo una relación significativa en la maduración nuclear, es decir, metafase II (MII) con la suplementación individual de hormonas (RM= 1.8, IC= 1.5 a 2.3, $P < 0.001$) y en conjunto (RM= 1.8, IC= 1.3 a 2.4, $P < 0.001$). Las hormonas que tuvieron un efecto positivo en la maduración de los ovocitos fue la FSH (RM= 5.6), E2 (RM= 2.3) y hCG (RM= 2.7) en el caso del análisis de las hormonas suplementadas en conjunto fueron hCG + eCG (RM= 3.5), hCG + P4 (RM= 37.9) y hCG + P4 + E2 (RM= 7.7). Esto sugiere que la combinación de hormonas como suplementación en la MIV de ovocitos caninos tiene un efecto positivo en la maduración, siendo la combinación de hCG + P4 la que obtuvo mayor tasa de maduración y resultados en la RM.

Palabras clave: ovocitos; canino; maduración *in vitro*; suplementación; hormonas; metaanálisis.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Anatomía y fisiología reproductiva en caninos domésticos	2
2.1.1 <i>Ciclo estral</i>	3
2.1.1.1 Proestro.....	4
2.1.1.2 Estro.....	5
2.1.1.3 Diestro.....	6
2.1.1.4 Anestro.....	7
2.1.2 <i>Maduración in vivo</i>	7
2.2 Técnicas de reproducción asistida en caninos domésticos	9
2.2.1 <i>Producción de embriones in vitro</i>	10
2.2.1.1 Obtención de ovocitos.....	10
2.2.2 <i>Maduración in vitro</i>	11
2.2.1.1 Hormonas.....	15
2.2.3 <i>Fertilización in vitro</i>	17
2.2.4 <i>Cultivo in vitro</i>	17
2.2.5 <i>Transferencia nuclear de células somáticas</i>	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Bases de datos y estrategia de búsqueda	21
5.2 Criterios de inclusión	21
5.3 Criterios de exclusión	21
5.4 Selección de estudios	21

5.5 Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1 Suplementación hormonal	24
6.1.1 <i>Efectos de la suplementación individual de hormonas</i>	24
6.1.1.1 Suplementación con FSH.....	25
6.1.1.2 Suplementación con LH.....	27
6.1.1.3 Suplementación con E2.....	28
6.1.1.3 Suplementación con P4.....	30
6.1.1.3 Suplementación con hCG.....	32
6.1.1.3 Suplementación individual con otras hormonas.....	33
6.1.2 <i>Efectos de la suplementación combinada de hormonas</i>	34
6.1.2.1 Suplementación con FSH y LH.....	35
6.1.2.2 Suplementación con hCG y eCG	37
6.1.2.3 Suplementaciones con otras combinaciones.....	38
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales hormonas reproductivas y su actividad en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos.....	15
Cuadro 2. Suplementación individual de hormonas en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	24
Cuadro 3. Suplementación de FSH en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	26
Cuadro 4. Suplementación de LH en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	27
Cuadro 5. Suplementación de E2 en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	29
Cuadro 6. Suplementación de P4 en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	30
Cuadro 7. Suplementación de hCG en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	32
Cuadro 8. Suplementación individual de GH, hST y eCG en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	34
Cuadro 9. Suplementación combinada de hormonas en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	35
Cuadro 10. Suplementación combinada de FSH y LH en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	36
Cuadro 11. Suplementación combinada de hCG y eCG en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	37
Cuadro 12. Otras suplementaciones combinadas en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM).....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo esquemático de la anatomía reproductiva en la perra. Fuente: König y Liebich, (2011).....	3
Figura 2. Diagrama de flujo de la información a través de las diferentes fases de una revisión sistemática, PRISMA (2009).....	22
Figura 3. Suplementación hormonal individual en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Gráfico de bosque.....	25
Figura 4. Suplementación combinada de hormonas en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caninos: Gráfico de bosque.....	35

ABREVIATURAS

6-DMAP	6-dimetil-amino-purina
AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Suero albúmina bovina
CC	Células del cúmulus
Cdk1	Quinasa dependiente de la ciclina 1
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Cuerpo lúteo
E2	Estradiol
eGC	Gonadotropina coriónica equina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GVBD	Descomposición de la vesícula germinal
hCG	Gonadotropina coriónica humana
IA	Inseminación artificial
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
LH	Hormona luteinizante
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MPF	Factor promotor de la maduración
mSOF	Fluido oviductal sintético modificado
P4	Progesterona
PDE	Fosfodiesterasa
pFSH	Hormona folículo estimulante recombinante humana
PKA	Proteína quinasa A

pLH	Hormona luteinizante de la pituitaria
rhFSH	Hormona folículo estimulante recombinante humana
SOF	Fluido oviductal sintético
TE	Transferencia de embriones
TRA	Técnicas de reproducción asistida
PVA	Alcohol polivinílico
rhLH	Hormona luteinizante recombinante humana
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCNT	Transferencia nuclear de células somáticas
UG	Uniones gap
VG	Vesícula germinal

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* (PIV) de embriones se ha convertido en una técnica muy frecuente hablando de grandes especies como bovinos. El éxito y demanda en la PIV han aumentado considerablemente en los últimos años, no obstante, en los caninos no es frecuente y se enfrenta con el obstáculo para la obtención de embriones, tal como baja tasa en la maduración *in vitro* (MIV), ya que representa el principal factor limitante en el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida (TRA) en caninos domésticos como salvajes (Chastant *et al.*, 2012).

En la mayoría de los caninos el ovocito se ovula en la etapa de vesícula germinal (VG) de 1 a 2 días después del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH), y concluye su maduración (metafase II) en el oviducto de 48 a 72 h después de la ovulación (Suzukamo *et al.*, 2009). Esto ha dificultado la generación de un medio óptimo para la MIV de ovocitos caninos tratando de simular la fisiología reproductiva ha sido un reto y con bajos porcentajes de éxito en la maduración, siendo la reanudación meiótica el mayor obstáculo en la MIV. Se sabe que el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) tiene un rol importante en la detención y reanudación meiótica (Minelli y Bellezza, 2011). Al igual la reanudación meiótica se atribuye a la actividad hormonal, específicamente a la hormona folículo estimulante (FSH) y el pico de la LH que se genera en el ciclo estral el cual tiene acción sobre las uniones gap (UG) disminuyendo los niveles de AMPc, en condiciones *in vivo* (Albuz *et al.*, 2010; Luciano *et al.*, 2011). Los distintos niveles de AMPc activan o desactivan los componentes del factor promotor de la maduración (MPF) conduciendo a la adquisición de competencia meiótica (Rodrigues y Rodrigues, 2003). Durante el periodo de maduración del ovocito en el oviducto, se menciona que la progesterona está presente en concentraciones altas (Chastant-Maillard *et al.*, 2012). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es la recopilación y análisis de los resultados de distintos estudios sobre la suplementación hormonal de manera individual y en conjunto sobre la MIV de ovocitos caninos mediante el análisis estadístico razón de momios (RM) para determinar el cociente entre la suplementación hormonal y el control sobre la MIV de ovocitos caninos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía y fisiología reproductiva en caninos domésticos

El aparato reproductor de la hembra consta de ovarios, oviducto, cuernos uterinos, útero, cérvix, vagina, vestíbulo vaginal y vulva, ubicados en el interior y exterior del abdomen de la perra (Valera, 2016). Los ovarios se encuentran en par dentro de la bursa ovárica. Estos pueden tener forma esférica u oval y ser del tamaño de un frijol o de un haba; por su tamaño, algunas veces los folículos no se pueden apreciar a simple vista (Páramo y Balcázar, 2013). Los ovarios tienen la función de producir ovocitos y secretar hormonas (Valera, 2016). Enseguida se encuentra el oviducto, que tiene forma tubular y está dividido en tres partes: la parte proximal al ovario se llama infundíbulo, la parte media ámpula y finalmente en la parte distal al ovario se encuentra el istmo; en el caso de la perra, el oviducto se encuentra insertado en la bursa ovárica por lo que, en comparación con hembras de otras especies, es difícil de identificar (Páramo y Balcázar, 2013). El oviducto canino tiene como función principal la maduración de los ovocitos, ya que los ovocitos son ovulados por el ovario en etapa de VG (que sería la etapa inmadura del ovocito) y requiere de dos a cinco días para madurar (Pereira *et al.*, 2012). El oviducto puede proporcionar un entorno adecuado para el almacenamiento, la maduración final de los ovocitos, los espermatozoides y el transporte de gametos, así como mantener un ambiente óptimo (Lee *et al.*, 2017). Por lo tanto, los ovocitos caninos están expuestos a las secreciones oviductales y están en contacto con la mucosa oviductal durante largo tiempo, y esto puede ser crucial en la adquisición de la competencia de los ovocitos (Lange-Consiglio *et al.*, 2017). Tiempo atrás se demostró que varios componentes (células, proteínas, etc.) del líquido oviductal son importantes para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano en caninos (Hewitt y England, 1999).

El aparato reproductor de la perra posee dos cuernos uterinos, por lo que se clasifica como bicorne (Páramo y Balcázar, 2013); en los cuernos uterinos se alojan los embriones durante la gestación (Valera, 2016). Los cuernos uterinos se cierran formando el útero, que es un órgano tubular corto (Valera, 2016). En la parte distal del útero se encuentra el cérvix, el cual separa el cuerpo uterino de la vagina y lo protege del exterior (Páramo y Balcázar, 2013). La vagina es larga, se encuentra entre el cérvix y el vestíbulo vaginal, en el cual se lleva la deposición del semen durante la cópula (Valera, 2016). En la parte terminal y exterior del aparato reproductor de la perra se encuentra la vulva que está formada por dos labios vulvares (izquierdo y derecho) (Páramo y Balcázar, 2013); su función urogenital consiste en la monta y como la parte final del aparato urinario (Valera, 2016) (Figura 1).

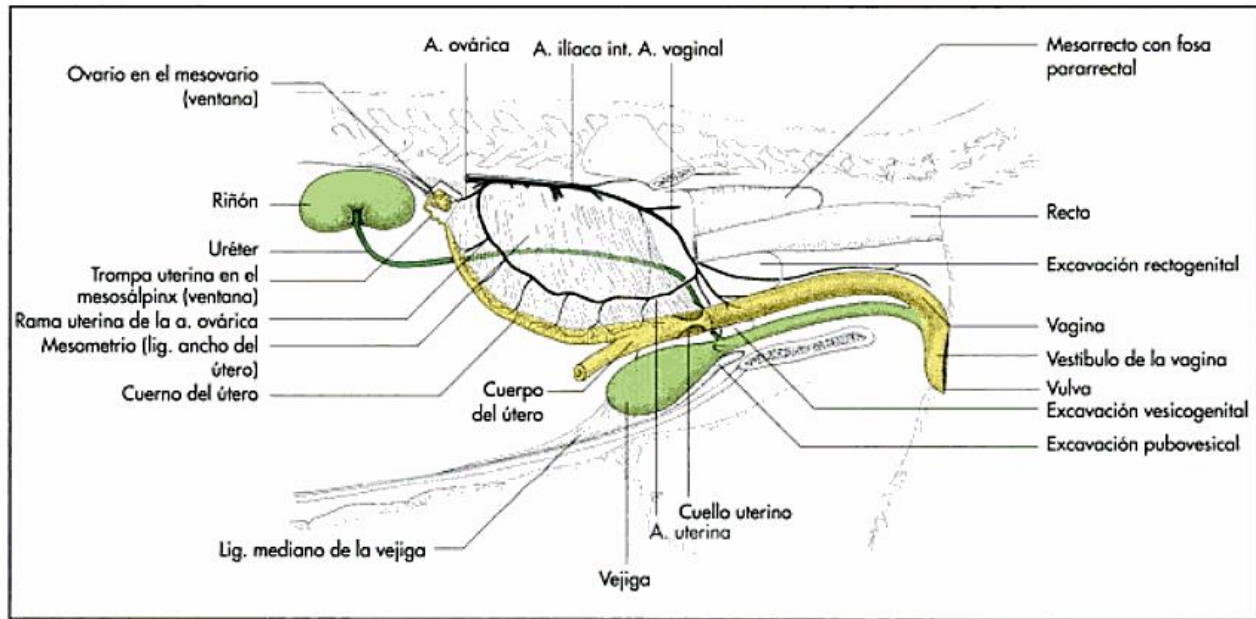


Figura 1. Dibujo esquemático de la anatomía reproductiva en la perra. Fuente: König y Liebich, 2011 ©.

2.1.1 Ciclo estral

Los caninos domésticos son monoéstricos no estacionales debido a su domesticación, sin embargo, en los caninos silvestres sigue presente la estacionalidad (Farstad, 2000). La pubertad en caninos domésticos ocurre entre los 6 y los 10 meses de edad, al igual que los coyotes (Carlson y Gese, 2007), y experimentan un nuevo ciclo ovárico cada 6 meses aproximadamente (Valera, 2016). El ciclo reproductivo está dispuesto en cuatro etapas: proestro, estro, diestro y anestro (Concannon, 2011). El control en la actividad ovárica en los mamíferos está mediada por la interacción de las hormonas producidas por el hipotálamo, la hipófisis y el ovario (Brown, 2017). El hipotálamo produce a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la cual se une a los receptores de la hipófisis para así liberar a la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas viajan por el torrente sanguíneo hasta los ovarios donde realizan las funciones específicas de cada una (Brown, 2017).

En la fase de proestro (fase folicular) la duración es de 5 a 20 días (Concannon, 2011), en la que se presenta un sangrado vulvar y la hembra atrae al macho; existe un desarrollo folicular, en el cual el folículo va aumentando de tamaño (Rodrigues y Rodrigues, 2010) a causa de la FSH y un aumento del estradiol (E2) intrafolicular (Castro, 2016). Posteriormente, el estro con una duración de 5 a 15 días (Concannon, 2011), en el cual la hembra se encuentra receptiva al macho permitiendo la monta (Soto *et al.*, 2013). En el transcurso del proestro y estro hay un aumento de las concentraciones

de P4 antes de la ovulación al igual que la liberación de la LH (Miranda *et al.*, 2018). La siguiente es la etapa de diestro (fase lútea) que es prolongada en las hembras de los caninos y se forma el cuerpo lúteo (CL) por acción de la LH (Rodrigues y Rodrigues, 2003), aumentando los niveles de progesterona (P4) proveniente del CL, el cual está presente en hembras preñadas y no preñadas (Miranda *et al.*, 2018). Como último esta la etapa de anestro con una duración de 80 a 240 días, caracterizada como la inactividad ovárica y un aumento de la secreción de LH marca el final de esta etapa reanudando así la actividad ovárica (Rodrigues y Rodrigues, 2003). La duración de las etapas del ciclo estral en caninos domésticos puede variar en su duración por el tamaño de las hembras, específicamente, las hembras de menor tamaño tienen un intervalo más corto entre estros que las hembras grandes, por lo que pueden llegar a presentar más de un estro al año (Lunardon *et al.*, 2015).

La fisiología de la perra, en comparación de otras especies de mamíferos, como ya se ha mencionado, tiene características particulares tales como: el pico de LH dura de 48 a 72 h, lo que lo hace de una duración larga, así como una luteinización preovulatoria con un aumento paulatino de P4 plasmática antes del pico de LH (Jewgenow y Songsasen, 2014). Los folículos ováricos (aproximadamente el 40%) tienen más de un ovocito, y finalmente como característica más notoria es la ovulación de un ovocito inmaduro (vesícula germinal), alcanzando la metafase II (MII) después 72 h aproximadamente, de maduración en el oviducto canino (Fahiminiya *et al.*, 2010; Steckler *et al.*, 2017).

2.1.1.1 Proestro

En los perros, el proestro se manifiesta con la hembra atrayendo al macho. Sin embargo, la hembra no permite la monta (Páramo y Balcázar, 2013). Esta etapa puede llegar a durar aproximadamente 5 a 20 días (Concannon, 2011) y se caracteriza por los signos clínicos de hinchazón de la vulva, secreciones sanguinolentas y el dominio de estrógenos (Carlson, 2008; Concannon, 2011). La secreción sanguinolenta resulta de la estimulación del crecimiento celular en el revestimiento uterino debido al aumento de estrógenos liberados de los folículos en desarrollo en el ovario (Carlson, 2008; Packard, 2018). El aumento de E2 de 5 a 15 pg /mL hasta alcanzar los 40 a 120 pg /mL durante el proestro también se ve acompañado de aumentos en la androstenediona y testosterona (Concannon, 2011). En la citología vaginal se pueden observar células epiteliales, neutrófilos, eritrocitos, células cornificadas, células escamosas intermedias e intermedias grandes (Concannon, 2011). Como estructuras ováricas los folículos comienzan a crecer (Páramo y Balcázar, 2013), dando paso a la foliculogénesis, aquí cada folículo es controlado por factores endocrinos y paracrinicos, teniendo un ciclo de desarrollo en dos fases, pre-antral y antral, y tres etapas: primordiales, primarios y secundarios. Por acción de la FSH hay un reclutamiento folicular, en el cual en la fase

pre-antral el folículo primordial crece hasta ser un folículo secundario, y en la fase antral hay una proliferación de las células de la granulosa y acumulación de líquido en el espacio antral (Songsasen *et al.*, 2017; Brown, 2017). En esta etapa ocurre el aumento de la actividad folicular, donde los ovocitos van madurando y el folículo se prepara para la ovulación (Carlson, 2008). El folículo está acompañado de las células de la teca (Fahiminiya, 2010) responsables de la secreción de E2 (Stornelli *et al.*, 2015), que tiene un efecto de retroalimentación positiva sobre la GnRH, por lo que provoca un aumento un aumento en la FSH y la liberación episódica de la LH (Evecen, 2011).

El proestro termina con el pico de LH preovulatorio y la disminución de las concentraciones de E2 (Concannon, 2011). Hormonalmente, en el proestro hay un aumento inicial en el E2 en plasma, que varía entre 10 y 20 pg/mL, y un pico de 30-50 pg/mL más adelante en esta fase (Hatoya *et al.*, 2009; Castro, 2016). El E2 elevado también sincroniza la maduración de varios ovocitos que se desarrollan en los folículos del ovario (Packard, 2018). La progesterona (P4) permanece baja, generalmente por debajo de 1 ng/mL, pero ocasionalmente aumenta a 3 ng/mL. Puede haber un aumento leve de la LH entre 9 y 24 días antes del pico de la LH preovulatorio, que ocurre durante el estro debido a la disminución del E2 por efecto de la retroalimentación positiva de esta hormona (Castro, 2016).

2.1.1.2 Estro

El estro es la etapa activa de la perra donde se encuentra receptiva hacia el macho (Concannon, 2011). En el estro, las hembras señalan la disposición a copular parándose y desviando la cola hacia un lado (Packard, 2018). Tiene una duración de 5 a 15 días aproximadamente y la vulva continua edematizada pero la secreción sanguinolenta disminuye (Valera, 2016). En la citología vaginal, se muestra una cornificación uniforme de células epiteliales con núcleos picnóticos, y la desaparición de eritrocitos y leucocitos (Carlson, 2008). La vulva suele estar blanda o inflamada en esta fase (Concannon, 2011; Haji *et al.*, 2018).

Las células de la granulosa del folículo preovulatorio producen P4 (Willingham *et al.*, 2003) y los niveles de esta comienzan a aumentar con 1 a 3 ng/mL (Concannon, 2011) y elevándose al final de la etapa con 6 ng/mL al momento de la ovulación (Tahir *et al.*, 2013), por lo que los ovocitos se encuentran expuestos a niveles altos de P4 y E2 dentro del folículo por la luteinización preovulatoria de las células murales en el folículo (Hewitt y England, 1998; Oh *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017), al igual que ocurre la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa antes del aumento de LH (Su *et al.*, 2008). Después del pico de LH, las concentraciones E2 disminuyen de 20 a 10 pg/mL, y la P4 comienza a aumentar rápidamente de 10 a 25 ng/mL (Concannon, 2011).

Hay una oleada preovulatoria de LH, esta alcanza de 5 a 15 ng/mL (Castro, 2016), durante el aumento de LH, los folículos secretores de estrógenos se transforman en cuerpos lúteos por la hipertrofia e hiperplasia de las células que secretan P4 (Carlson, 2008). Es entonces donde los cambios hormonales antes mencionados, controlan la conducta para la preparación copulatoria en las hembras, para que coincida con la ovulación (Packard, 2018). La P4 y el E2 participan en la modulación de la morfología y fisiología del oviducto, proporcionando así un ambiente óptimo para la maduración de los ovocitos, la capacitación espermática, contracciones que impulsan a los espermatozoides hacia el ovocito (Carlson, 2008), la fertilización y el transporte bidireccional de gametos y embriones (Akison y Robker, 2012). Los cilios son la manera principal para el transporte del cigoto, y los blastocistos pasan a los cuernos uterinos 10 días después de la ovulación y se implantan de 19 a 20 días después de la ovulación (Carlson, 2008). Puede haber una supresión fisiológica de la reproducción por factores de alto estrés, esto se debe a que la hormona LH en caninos responde al antagonista opioide naloxona, y por tanto, la supresión del estrés podría explicarse por los opioides endógenos que suprimen la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo, lo que resulta en una secreción deprimida de LH y, en consecuencia, en la incapacidad de ovular. También está relacionado la mala alimentación y el estado de salud del animal (Castro, 2016).

2.1.1.3 Diestro

Esta etapa se conoce como la fase lútea y en la que los ovocitos de perra requieren 48 a 72 h en el oviducto para alcanzar la MII y volverse fertilizables (Nagashima *et al.*, 2019). El tiempo que dura esta etapa se determina hasta que el cuerpo lúteo disminuya, de 50 a 80 días en perras (Concannon, 2011). Los niveles medios de P4 también son similares en las hembras preñadas y las que no. Sin embargo, los niveles elevados de P4 en plasma se mantienen invariables durante la gestación y disminuyen a niveles no detectables en el parto (Carlson, 2008).

Dos días después del aumento de LH, ovocitos en etapa de VG se ovulan en el oviducto (Carlson, 2008; Nagashima *et al.*, 2019). En la mayoría de las especies domésticas, los ovocitos en VG experimentan meiosis en las etapas finales de la maduración folicular, siendo ovulados en la MII. Sin embargo, en los caninos no sucede así (Pereira *et al.*, 2019). A las 44 h después de la ovulación, los ovocitos en VG están compuestos por una membrana nuclear y un nucléolo, el cual tiene la masa de cromatina descondensada (Rodrigues y Rodrigues, 2006a). Las células del cúmulus están apretadas y en multicapa, el ooplasma oscuro y uniforme por el alto contenido de lípidos (Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Kim *et al.*, 2005). El ovocito viaja hacia el ámpula del oviducto, la P4 regula las contracciones en la capa muscular oviductal para el transporte de ovocitos y embriones (Reynaud *et*

al., 2015). Llevando a cabo en el oviducto la reanuda de la meiosis 48 a 72 h después de la ovulación, completando la maduración (MII) (Jewgenow y Songsasen, 2014; No *et al.*, 2018). Sin embargo, la fertilización ocurre 83 h después de la ovulación y se observan los dos pronúcleos a las 92 h (Jewgenow y Songsasen, 2014).

En la formación del CL, las células lúteas se desarrollan a partir de las células de la teca y de la granulosa (Concannon, 2009). El CL sintetiza a la P4 por lo que sus concentraciones aumentan para mantener la gestación (en caso de que el ovocito haya sido fecundado), teniendo acción de retroalimentación negativa sobre la GnRH, disminuyendo las concentraciones de las gonadotropinas (FSH y LH) (Carlson, 2008; Concannon, 2009). Los signos clínicos varían si la perra ha entrado en gestación o no, es decir, el útero se prepara para la concepción del embrión o sufre una reparación histológica del endometrio en ausencia de una gestación (Concannon, 2011). En la citología vaginal hay abundantes leucocitos, así como células epiteliales, escamosas nucleadas y neutrófilos (Carlson, 2008). Se han reportado altos niveles de P4 en el líquido oviductal canino durante la etapa de diestro, esta es importante para la reanudación y la progresión de la meiosis, por lo que es un factor clave en este proceso de maduración funcional postovulatoria (Mukai *et al.*, 2020).

2.1.1.4 Anestro

Es la etapa más larga que puede llegar a durar de 80 a 240 días (Concannon, 2011), no hay signos clínicos presentes (Páramo y Balcázar, 2013). Se ha mencionado que el objetivo principal de esta etapa es aumentar la sensibilidad de la GnRH, y así facilitar la capacidad de respuesta de la corteza ovárica hacia la LH y FSH (Salavati *et al.*, 2013).

Generalmente el anestro es relacionado como la inactividad ovárica, sin embargo, en cuestiones endocrinológicas no lo es (Pereira *et al.*, 2012). En los caninos, el lapso de anestro temprano a tardío está relacionado con un aumento de las concentraciones basales de FSH (Palomino y De los Reyes, 2016), las concentraciones de E2 sérico son variables, pero generalmente bajas 7 pg/mL (Oh *et al.*, 2005) y la P4 sérica permanece por debajo de 1 ng/mL (Concannon, 2011). Estas secreciones esporádicas de gonadotropinas (FSH y LH) se relacionan con el reclutamiento folicular (Carlson, 2008). En la citología vaginal se observan células epiteliales no coronadas que tienen núcleos de distintos tamaños y leucocitos en números relativamente altos, y también hay un número escaso de células parabasales y números variables de neutrófilos (Castro, 2016).

2.1.2 *Maduración in vivo*

A diferencia de otras especies de mamíferos, el ovocito canino se ovula en la etapa de VG (Suzukamo *et al.*, 2009; Nagashima y Songsasen, 2021) y progresa a MII en el oviducto (Herrick,

2019). Durante la detención meiótica del ovocito, la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) actúa sobre la fosforilación de varios sustratos, tal como: factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto, con el fin de mantener los ovocitos bloqueados permitiendo el período de capacitación (Pereira *et al.*, 2012).

Generalmente, se ha descrito que el inicio de la maduración del ovocito es representado por la descomposición de la vesícula germinal (GVBD, por sus siglas en inglés), que es el primer cambio visible que conduce a la reanudación de la meiosis (Ramos *et al.*, 2018). Se requieren de dos a cinco días después de la primera división meiótica hasta la maduración completa del ovocito (Pereira *et al.*, 2012). La GVBD se manifiesta en la condensación de la cromatina, la aparición de cinetocoros (puntos de anclaje entre los cromosomas y los microtúbulos) y la ruptura de la membrana nuclear (Ramos *et al.*, 2018). En las próximas horas comienza la metafase I (MI), en la cual los centriolos se duplican y los cromosomas (en pares diploides), ahora están libres en el citoplasma (Ferreira *et al.*, 2009), momento en el que el ovocito primario sufre una división meiótica que conduce a la formación de dos nuevas células (Ramos *et al.*, 2018).

Posteriormente, se considera que la célula es un ovocito secundario, y los cromosomas nuevamente se alinean en el centro del huso, que es una característica principal de la MII (Ferreira *et al.*, 2009). Entonces, la progresión de la meiosis caracteriza la maduración nuclear de los ovocitos pero no asegura por sí sola un mayor desarrollo embrionario, y no menos importante la maduración citoplasmática (Ramos *et al.*, 2018), que se define por la redistribución de orgánulos citoplasmáticos, incluidas mitocondrias y gránulos corticales, la reorganización dinámica de los filamentos del citoesqueleto, incluido el desarrollo de las estructuras de la red de microtúbulos cerca del ADN condensado y la maduración molecular (Ferreira *et al.*, 2009), que ocurre en la etapa final de la maduración citoplasmática e implica el proceso de transcripción (o la detención de esta), almacenamiento y procesamiento de ARNm para preparar el ovocito para el desarrollo posterior a la fertilización (Sirard, 2001).

En la reanudación meiótica, se ha establecido que la fosforilación del factor promotor de la maduración (MPF, por sus siglas en inglés), es lo que desencadena el reinicio del ciclo meiótico, por lo que el MPF, el cual es una quinasa serina/treonina, es considerado el regulador universal del ciclo meiótico (López, 2017). Luego de la reanudación meiótica, el citoplasma del ovocito se compone esencialmente de mitocondrias y retículo endoplásmico liso (REL) de forma homogénea, aumentando la actividad metabólica. Es por esto que los cambios estructurales en el citoplasma también tienen importancia durante la maduración (Saffie, 2009). Para que el ovocito sea viable a fertilizar debe completar la maduración citoplasmática y nuclear, sin embargo, la reorganización de organelos y maduración funcional no son los únicos procesos que se llevan a cabo durante el crecimiento del

ovocito, ahora bien, previo a la ovulación, es necesario que se produzcan modificaciones en la producción de ARN y proteínas durante la foliculogénesis (López, 2017). Es por esto que la remodelación citoplasmática y procesos previos a la maduración, son igualmente uno de los factores importantes para completar y coordinar una correcta maduración (Saffie, 2009)

2.2 Técnicas de reproducción asistida en caninos domésticos

La disminución de la biodiversidad de animales salvajes, principalmente por la actividad humana, aumentó la investigación dirigida al desarrollo de estrategias en la conservación de especies en peligro de extinción, por lo que es importante que haya una comprensión de la biología reproductiva de la especie en peligro y estudios en la medicina (Borges y Pereira, 2019).

En los caninos es sorprendentemente limitada la información sobre su biología reproductiva, como los reguladores del desarrollo del folículo ovárico, la maduración de los ovocitos, la terminación del anestro y el desarrollo del embrión (Nagashima *et al.*, 2019). Las técnicas de reproducción asistida (TRA) como la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE), la criopreservación de gametos y la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés), no solo se han convertido en herramientas importantes para el mejoramiento reproductivo en especies domésticas como bovinos, equinos y ovinos, sino que también han tomado un lugar importante para preservar la biodiversidad (Luvoni, 2000; Demir *et al.*, 2019).

El desarrollo de TRA para especies de vida silvestre se ha propuesto como una forma de superar algunos de los desafíos de manejar poblaciones pequeñas y aisladas de especies con diversos grados de éxito reproductivo (Herrick, 2019); es por eso que el perro doméstico también es el modelo ideal para desarrollar TRA para la conservación de caninos salvajes en peligro de extinción. Desafortunadamente, el TRA ha sido históricamente un desafío para su desarrollo en perros domésticos debido a su biología reproductiva única (Nagashima *et al.*, 2019). Un conocimiento profundo de la fisiología reproductiva de los animales y las necesidades de una reproducción óptima es esencial antes de intentar cualquier TRA. Además, es indispensable el estudio de individuos en programas de cría en cautiverio, accesibles para observación, manejo cercano y recolección de muestras, por lo que la aplicación de biotecnología sofisticada se vuelve indispensable en la actualidad, cuando una especie en particular está cerca de la extinción o se extingue en la naturaleza (Lürders y Twink 2020).

2.2.1 Producción de embriones *in vitro*

En condiciones *in vivo*, los blastocistos caninos se forman en los días 10 y 12 después de la ovulación y eclosionan entre los días 16 y 20 (Renton, 1991; Chastant-Maillard *et al.*, 2010; Reynaud *et al.*, 2012). Los embriones de perro duran nueve días en el oviducto, relativamente largo en comparación de la vaca el cual dura cuatro días (Guimarães *et al.*, 2015). El paso de los embriones caninos al útero y su implantación es un tanto tardío en comparación a otros mamíferos (Chastant-Maillard *et al.*, 2010), si bien, el desarrollo embrionario hasta blastocisto no lo es, el cual ocurre aproximadamente en tres días después de haber llegado al útero (Rodrigues y Rodrigues, 2006a).

En la especie canina, el primer informe sobre producción de embriones en caninos fue realizado por Renton *et al.* (1991), en el cual un ovocito de perro que se desarrolló *in vitro* desde un embrión de dos células llegó hasta la etapa de mórula (Fastard, 2000). Las características particulares de la fisiología de los gametos caninos han complicado la adaptación del conocimiento biotecnológico adquirido en otras especies. Trabajar con lobos en peligro de extinción, como el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), también impone otras restricciones. Por ejemplo, el manejo de lobos mexicanos para la investigación requiere el uso de especies modelo, ya sea perros domésticos (*Canis familiaris*) o lobos grises (*Canis lupus*) (Castro, 2016).

El uso de técnicas de PIV se ve obstaculizado por la dificultad de producir *in vitro* los cambios de desarrollo que ocurren *in vivo* en los ovocitos y por ende, el posterior desarrollo embrionario (Ramos *et al.*, 2018), por lo que todavía no se han desarrollado sistemas confiables para la producción de embriones *in vitro*, y se necesitan nuevos enfoques para los perros (Demir *et al.*, 2019). Es por esto, que el progreso en la biotecnología reproductiva ha encontrado problemas importantes, particularmente en relación con los modelos *in vitro* para gametos y embriones (Castro, 2016). En comparación con los gatos, la eficiencia del desarrollo embrionario es baja en los perros (Singh *et al.*, 2019), por lo que actualmente es difícil desarrollar técnicas para superar las tasas de PIV y mejorar la calidad del embrión (Ramos *et al.*, 2018).

2.2.1.1 Obtención de ovocitos

En la especie bovina y equina, los ovarios se obtienen en los mataderos, y la recuperación de ovocitos se realiza por medio de punción folicular. Los embriones de mamíferos producidos *in vitro* por lo general se generan a partir de ovocitos recolectados de ovarios obtenidos en mataderos. Por lo tanto, generalmente toma mucho tiempo después de la recolección de los ovarios hasta su manipulación en el laboratorio, así como las condiciones inadecuadas de transporte y conservación pueden provocar la falla de la maduración y fertilización de los ovocitos (Barberino *et al.*, 2018).

En caninos, la esterilización quirúrgica de las mascotas hace posible la recolección de ovarios caninos en las clínicas veterinarias locales (Herrick, 2019). Sin embargo, a diferencia de la especie bovina, la recuperación de los ovocitos no puede ser por punción folicular debido al tamaño de los ovarios y perforar los folículos individualmente es imposible, ya que se encuentran por debajo de la superficie del ovario y estos no son evidentes sino hasta unos días antes de la ovulación (Fujii *et al.*, 2000). La maceración del ovario hace posible la liberación de los ovocitos, por lo tanto, la recolección de ovocitos caninos es mediante cortes en el ovario con escalpelo para liberar a los ovocitos, siendo este el método implementado más comúnmente (Demir *et al.*, 2019). Es así que la obtención de gametos viables sigue siendo un factor limitante significativo para desarrollar e implementar protocolos de FIV para perros domésticos, especialmente la aplicación de estos protocolos a caninos salvajes (Herrick, 2019).

2.2.2 Maduración *in vitro*

En perros domésticos, las tasas de MIV de los ovocitos son bajas 10 a 40% (Pereira *et al.*, 2019); esto implica que los procedimientos de cultivo para el desarrollo meiótico de los ovocitos siguen siendo inadecuados. Por lo tanto, se debe mejorar el conocimiento sobre el papel de las moléculas que regulan el potencial de desarrollo del ovocito canino, así como mejorar la eficiencia de la MIV (García *et al.*, 2019).

Se han empleado distintos tipos de medios base en la MIV, tal como: TCM-199, medio SOF (fluido del oviducto sintético), KSOM (medio optimizado simple de potasio) o DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), con el fin de establecer un medio viable para la supervivencia de los ovocitos caninos (López, 2017). La mayoría de los protocolos de laboratorio de reproducción se basan en medios de cultivo utilizados en otras especies domésticas (como en bovinos). El medio de cultivo utilizado habitualmente en la maduración de ovocitos caninos es el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) (Pereira *et al.*, 2018). Generalmente los medios son suplementados con las sustancias que se encuentran en el líquido folicular, como proteínas, hormonas, antioxidantes y factores de crecimiento, con el fin de aumentar las tasas de maduración y desarrollar un entorno similar al observado en experimentos *in vivo* (Pereira *et al.*, 2018). Es por esto que, con el fin de mejorar la eficiencia de IVM canina, se han realizado varios experimentos, como la adición de células oviductales (Lee *et al.*, 2017), para producir *in vitro* las condiciones intratubáricas. Hewitt y England (1999) fueron los primeros investigadores que estudiaron el efecto de las células oviductales y SOF en el ambiente de cultivo o el cocultivo con epitelio oviductal canino aislado, en este estudio se observaron mejores resultados en la maduración con células oviductales durante 96 h (MII 9.0%) que 48 h (MII 6.0%) de maduración.

Debido a los bajos porcentajes de la MIV, se han realizado varios estudios para incrementar la tasa de MIV en los ovocitos caninos a través de la suplementación del medio compuesto con hormonas (P4, E2, FSH y LH) (De los Reyes *et al.*, 2005), líquido folicular o células oviductales (Bogliolo *et al.*, 2002), factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), sueros (BSA y FBS) (Bolamba *et al.*, 2002) y antioxidantes (vitamina E y L- carnitina) (Moawad *et al.*, 2021). Sin embargo, a pesar de las mejoras parciales, el porcentaje de ovocitos que alcanzan la segunda metafase sigue siendo bajo (10 a 40%) (García *et al.*, 2019), en comparación a la especie bovina (90%) (Farstad, 2000; Ferreira *et al.*, 2009).

Los intentos para mejorar este proceso de MIV en caninos han arrojado bajas tasas de desarrollo de MII a pesar de varias investigaciones sobre esta (Nagashima *et al.*, 2019). Se sabe que la calidad de los ovocitos, en todas las especies, es un factor importante para la fertilidad y uno de los principales desafíos para el desarrollo de biotecnologías reproductivas es comprender la naturaleza de los procesos moleculares que regulan la competencia meiótica en los ovocitos en VG (Pereira *et al.*, 2018). Los ovocitos degenerados no son aptos para la MIV, estos se muestran con una masa de cúmulus incompleta (<2 capas de células del cúmulus), vacuolas intracitoplasmáticas o una zona pelúcida dañada (Farstad, 2000).

En los caninos, los ovocitos de la etapa de anestro tienen un bajo potencial para alcanzar la etapa MII, debido a la falta de comunicación entre las células del cúmulus (CC) y el ovocito (Pereira *et al.*, 2015). La comunicación intercelular entre las CC y el ovocito es esencial para el crecimiento de los ovocitos porque permite la transferencia de nutrientes y otras moléculas pequeñas, asegurando que las estructuras moleculares y las vías bioquímicas se desarrollen en los ovocitos para apoyar el desarrollo embrionario temprano posterior a la fertilización (Ramos *et al.*, 2018). Las señales inhibitorias transmitidas a través de las uniones entre los ovocitos de mamíferos y las CC detienen los núcleos de los ovocitos en la profase I (Kim *et al.*, 2015).

La expansión de las células del cúmulus es indicador de maduración citoplasmática en mamíferos y se utiliza para determinar las tasas de maduración de ovocitos. Sin embargo, la expansión de las células del cúmulus es rara y parece ser insignificante para la MIV de los ovocitos de perro (Demir *et al.*, 2019). En los caninos, existe una dependencia metabólica de las células del cúmulus para el desarrollo de los ovocitos, lo que se puede verificar mediante la fuerte adhesión de estas células a los ovocitos en la etapa inmadura ya sea *in vivo* o *in vitro* (Pereira *et al.*, 2018). Las células del cúmulus penetran en la zona pelúcida y son responsables del transporte de moléculas, iones y otros factores reguladores importantes al ovocito como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), calcio, entre otros (Luvoni, 2000). Debido a esto se han logrado varias mejoras en la competencia de los

ovocitos en estudios centrados en la modulación de las concentraciones de AMPc durante el proceso de IVM (Ramos *et al.*, 2018).

En animales domésticos, las disminuciones en la concentración de AMPc intracelular permiten la reanudación de la meiosis, esto se debe a la liberación de ovulación preovulatoria de LH, que induce una disminución en el AMPc dentro de los ovocitos (Ramos *et al.*, 2018). La reanudación de la meiosis está influenciada por el MPF y la MAPK, MPF es uno de los principales reguladores de los cambios morfológicos que ocurren durante la maduración de los ovocitos, regulando la condensación cromosómica, la ruptura de la envoltura nuclear y la reorganización de los microtúbulos (Pereira *et al.*, 2012). La MAPK de AMPc regula la actividad de MPF (Pereira *et al.*, 2018), entonces cuando el ovocito se elimina mecánicamente del folículo antral, las concentraciones de AMPc disminuyen dentro del ovocito, y es entonces cuando comienza la reanudación meiótica (Ramos *et al.*, 2018). Las concentraciones de AMPc se controlan mediante la modulación de su síntesis por la adenililciclase (AC), la enzima ATP pirofosfatasa liasa, que convierte el trifosfato de adenosina (ATP) a AMPc y pirofosfato en el ovocito (Mayes y Sirard, 2002; Ramos *et al.*, 2018).

Se cree que diferentes vías actúan sobre los cambios en la concentración de AMPc dentro de los ovocitos a través de receptores de LH, vías intracelulares de calcio y fosfodiesterasas (PDE) (Salavati *et al.*, 2013). Las altas concentraciones del AMPc mantienen la detención de la meiosis en etapa de VG por la activación de la proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA) (Ramos *et al.*, 2018) y la fosforilación de la quinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1) y, por lo tanto, la supresión del MPF (Minelli y Bellezza, 2011). La disminución en las concentraciones del AMPc induce la activación MPF y se reanuda la meiosis (Bilodeau-Goeseels, 2011). De igual manera las variaciones en las concentraciones de AMPc impulsan a la transición de la cromatina, así como el silenciamiento de la transcripción (Ramos *et al.*, 2018) e interviniendo en la progresión del ciclo celular en la fase G2 a la M (Albuz *et al.*, 2010).

La PDEs están compuestas por un dominio catalítico el cual se conecta con otros dominios, amino y carboxilo (Mayes y Sirard, 2002). Se han identificado alrededor de 11 familias de PDEs con una estructura relacionada y la mayoría con funciones distintas (Ramos *et al.*, 2018). Y su función principal sintetizar al segundo mensajero, AMPc (Park *et al.*, 2016). Las distintas PDEs se encuentran diferencialmente ubicadas ya sea en el ovocito (PDE3) o en las células de la granulosa (PDE4) (Ramos *et al.*, 2018). Las PDEs más comunes son la PDE3 y PDE4, estas PDEs hidrolizan al AMPc y solo la PDE3 es inhibida por la GMPc (Mayes y Sirard, 2002). Por lo anterior, se ha empleado el uso de inhibidores específicos e inespecíficos de la PDE para la modulación de AMPc (Minelli y Bellezza, 2011; Ramos *et al.*, 2018).

Los inhibidores específicos más comunes son; milrinona, cilostamida (Minelli y Belleza, 2011) y cilostazol (Ramos *et al.*, 2018) inhibidores de PDE3, rolipram como inhibidor de PDE4 en las células de la granulosa (CG) y no en el ovocito (Minelli y Belleza, 2011; Ramos *et al.*, 2018). En los inhibidores inespecíficos que son empleadas con mayor frecuencia son las metilxantinas, tal como la 1,3,7-trimetilxantina (cafeína, alcaloide de origen vegetal) (Ramos *et al.*, 2018), 1,3-dimetilxantina (teofilina), 3,7-dimetilxantina (teobromina) (Albuz *et al.*, 2010) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, no actúa sobre la PDE8) (Mayes y Sirard, 2002). Otro inhibidor específico es la forskolina, la cual es una molécula diterpeno aislada de una planta india (*Coleus forskohlii*) que activa la AC para el aumento en la producción de AMPc (Ramos *et al.*, 2018). La localización de los distintos tipos de PDEs, ya sea en las células somáticas (células de la granulosa) o células germinales (ovocito) es de gran importancia para la suplementación de inhibidores de la PDE y la regulación de la meiosis (Mayes y Sirard, 2002).

En el estudio de Lange-Consiglio *et al.* (2017) se utilizaron las células epiteliales oviductales caninas (cOECs) del istmo y ámpula debido a que, *in vivo* este entorno oviductal en el perro tiene algunas cualidades únicas que son beneficiosas para extender la viabilidad de los ovocitos y apoyar su maduración, pero por el momento no se da a conocer qué factores son tan importantes y dónde se producen (Lange-Consiglio *et al.*, 2017).

Se ha mencionado que las cOECs secretan aminoácidos y algunos factores diversos que proporcionan un microambiente óptimo hacia el ovocito y el espermatozoide en el oviducto (No *et al.*, 2018). Los resultados de ese estudio mostraron que el cocultivo con células epiteliales en monocapa proporcionó una tasa de maduración (metafase II, MII) baja en comparación con el cocultivo en presencia de esferoides multicelulares (10.7% vs 20.0%), por lo que ambas condiciones de IVM fueron estadísticamente mayores que el control en medio SOF solo, sin células auxiliares (MII 8.6%) (Lange-Consiglio *et al.*, 2017). En otro estudio realizado con cocultivo de cOECs de hembras en etapa de anestro no se observó ningún efecto sobre la maduración de los ovocitos (No *et al.*, 2018). En dicho experimento la maduración *in vitro* de los ovocitos se examinó en cocultivos con fragmentos frescos de tejido oviductal (Fr), cOECs monocapa (Mo) y cOECs monocapa criopreservadas (Cr). Los resultados mostraron que el cocultivo redujo significativamente los ovocitos de perras en diestro, con mayores tasas de MII (Fr, $13.23 \pm 11.1\%$; Mo, $10.38 \pm 4.8\%$; Cr, $10.54 \pm 2.96\%$) en comparación con los controles los cuales no contenían cOECs ($2.48 \pm 2.1\%$; $p < 0.05$) (No *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Suplementación hormonal

Los medios de maduración generalmente están compuestos por una solución equilibrada de sales para regular la osmolaridad, un tampón de bicarbonato y un compuesto como fuente de energía (aminoácidos) (López, 2017). Sin embargo, estos compuestos solo dan mantenimiento a la supervivencia del ovocito en el medio, para que estos logren la maduración es necesario la suplementación de otras sustancias, tal como las hormonas, las cuales se ha documentado que la suplementación de hormonas a los medios de cultivo aumentan la proporción de ovocitos que reanudan la meiosis (Bolamba *et al.*, 2006), esto a que en el folículo preovulatorio, los ovocitos caninos están expuestos a altas concentraciones de E2, FSH y LH: en el oviducto durante el periodo post-ovulatorio es donde ocurre la maduración completa, es decir, los ovocitos alcanzan la MII (Willingham-Rocky *et al.*, 2003), esto en un ambiente dominado por la progesterona (P4) y en presencia del estradiol (E2) (Palomino *et al.*, 2021). Básicamente, la suplementación hormonal es con principalmente utilizado para simular la señalización *in vivo* durante el ciclo estral y poder obtener una reanudación de la meiosis (López, 2017) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales hormonas reproductivas y su actividad en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos

Hormona	Abreviatura	Origen	Función	Receptor
Hormona folículo estimulante	FSH	Adenohipófisis	Detención meiótica: Expansión células del cúmulus, inducción del AH. Activa los receptores de las proteínas G, activan la AC y la síntesis de AMPc (Sirard <i>et al.</i> , 2012).	FSHR
Hormona luteinizante	LH	Adenohipófisis	Reanudación meiótica: Rompe de las UG entre el ovocito y las CG, disminuye GMPc activando a la PDE y degradando al AMPc (Ramos <i>et al.</i> , 2018).	LHR
Estradiol	E2	Ovario	Detención meiótica: Movilización de Ca, estimulando la actividad de AC y la producción de AMPc (Zhang <i>et al.</i> , 2020).	ER
Progesterona	P4	Ovario	Reanudación meiótica: Inactiva de la PKA (Kempisty <i>et al.</i> , 2012). Inhibe la actividad de la PDE y modula los niveles de AMPc mediante la unión al sitio de unión de purina de PDE (Salehnia y Savareh, 2013).	PR
Gonadotropina coriónica humana	hCG	Placenta humana	Reanudación meiótica: Agonista de LH, reduce la respuesta de AMPc (Dunkel <i>et al.</i> , 1993) y mejora la glucólisis (De los Reyes <i>et al.</i> , 2005).	LH receptor
Gonadotropina coriónica equina	eCG	Placenta equina	Detención meiótica: Agonista de FSH (Murphy y Martinuik, 1991; Hoppen, 1994), provoca un aumento transitorio de AMPc (Songsasen <i>et al.</i> , 2003).	FSH receptor

AH: ácido hialurónico; AC: adenilato ciclasa; AMPc; adenosín monofosfato cíclico; UG: uniones gap; CG: células de la granulosa; GMPc: guanósín monofosfato cíclico; PDE: fosfodiesterasa; Ca: calcio; PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc.

La FSH se ha asociado con la expansión de las células del cúmulus en la suplementación *in vitro* debido que induce la actividad del ácido hialurónico (AH), el cual capacidad hidrófila para

retener agua y promover la expansión de las células de los cúmulos (Sirard *et al.*, 2012), y también a la sinergia que tiene con el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y BMP15 para la estimulación de la proliferación de las células (López, 2017). Estudios han demostrado que la suplementación con FSH participa en la detención meiótica ya que, esta hormona activa los receptores de membrana y las proteínas G, los cuales activan la adenilato ciclasa (AC) que conduce a la síntesis de AMPc (Sirard *et al.*, 2012). Así mismo, se ha mencionado que el E2 induce a la movilización de calcio, estimulando la actividad de AC y por ende, la producción de AMPc, así como la transactivación del receptor del EGF (EGFr) (Zhang *et al.*, 2020).

El ovocito y las células del cúmulo están interconectados por numerosos canales de UG por donde pasan aminoácidos, nucleótidos y azúcares para el crecimiento y desarrollo del ovocito (Otoi *et al.*, 2002). Las gonadotropinas secretadas por las células gonadotrópicas de la glándula pituitaria son la FSH y LH, de igual manera las gonadotropinas secretadas por el sincitiotrofoblasto del embrión, hCG y eCG (Kim *et al.*, 2010), estas tienen acción en la detención (Hanna *et al.*, 2008) y reanudación meiótica para la maduración de los ovocitos, principalmente causan una baja en los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y AMPc, de tal modo lo que induce a una cascada de la EGF y anulando los efectos de inhibidores meióticos (Albuz *et al.*, 2010). La meiosis se reanuda con en respuesta de la LH esto por la presencia de receptores de esta hormona (Minelli y Belleza, 2011), la suplementación en dosis altas provoca la caída en las comunicaciones extra e intraovocito, reanudando la meiosis (Luciano *et al.*, 2011), esto por la ruptura de las UG entre el ovocito y las CG, disminuyendo GMPc activando a la PDE, degradando así al AMPc disminuyendo las concentraciones intraovocito de este (Ramos *et al.*, 2018; Guimaraes *et al.*, 2015).

Las UG se encuentran como una extensa red (Mayes y Sirard, 2002), la integridad de las UG puede afectar no solo la cantidad de AMPc intraovocito sino la actividad transcripcional y la remodelación de la cromatina (Luciano *et al.*, 2011). El AMPc apoya en la transducción de señales dentro de la célula, desempeñando su función como segundo mensajero por estímulo de las gonadotropinas (Ramos *et al.*, 2018), el cual se sintetiza por receptores acoplados a proteína G (Albuz *et al.*, 2010). Las hormonas al reducir las concentraciones de AMPc activan el MPF para la promoción de la reanudación meiótica (Guimaraes *et al.*, 2015), se desfosforila el CDK1 para que se le pueda unir la ciclina B y formar el MPF (López, 2017). La P4 está involucrada en la inactivación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Kempisty *et al.*, 2012), esto inhibiendo la actividad de la PDE mediante el sitio de unión purina de esta enzima modulando los niveles de AMPc (Salehnia y Zavareh, 2013). También se ha mencionado que el pico de LH durante procesos *in vivo*, también activa la señalización por parte de EGF y su receptor (EGFr) (López, 2017), debido a esto se han hecho estudios varios años atrás, suplementando con LH (Hewitt y England, 1999). La interacción

entre el cambio en el nivel de AMPc y la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) en la maduración de ovocitos inducida por las gonadotropinas se ha descrito previamente. Sin embargo, sobre la vía de transducción de señales entre AMPc y MAPK aún no se ha publicado información al respecto (Zhang *et al.*, 2020). Se ha mencionado que la P4 está involucrada en la inactivación de PKA y la disminución de la expresión del gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Kempisty *et al.*, 2012). Al igual la FSH no solo es actúa sobre la expansión de las células del cúmulus, las cuales son responsables de las comunicaciones interna del ovocito y las células, sino también participa en la meiosis de los ovocitos, esta promueve la maduración al regular las concentraciones de AMPc (Rodrigues y Rodrigues, 2003).

En estudios anteriores, se ha suplementado no solo con gonadotropinas sino gonadotropinas coriónicas (hCG y eCG), demostrando que estas también participan en la MIV de ovocitos caninos (Yamada *et al.*, 1992; Songsasen y Wildt, 2007). Al momento de realizar una exposición breve de los ovocitos caninos a la eCG, aumenta el porcentaje de ovocitos que se desarrollan hasta o más allá de la etapa de MI. El efecto positivo de eCG sobre la maduración nuclear de los ovocitos caninos se debe a la actividad de la FSH, ya que se ha demostrado que la FSH induce la reanudación de la meiosis (Songsasen *et al.*, 2003).

2.2.3 Fertilización *in vitro*

La aplicación de un protocolo exitoso para MIV y la fertilización *in vitro* (FIV) no se ha establecido bien en caninos domésticos, por lo que la PIV no ha avanzado en los perros (Fathi *et al.*, 2018).

La FIV consiste en la introducción de espermatozoides a un medio con ovocitos; pero los espermatozoides solo penetran del 10 al 50% de los ovocitos de caninos, mientras que en los bovinos esta tasa es de 80 a 90% (Chastant *et al.*, 2010).

Es por eso que para la FIV, se requiere estimular el crecimiento de múltiples folículos para aumentar el número de ovocitos disponibles, luego los ovocitos y los espermatozoides se deben cultivar en condiciones capaces de soportar la capacitación de los espermatozoides, la fertilización, la activación de los ovocitos, la división celular y el desarrollo embrionario, incluida la activación apropiada del genoma embrionario, el metabolismo y los eventos epigenéticos, hasta el momento de la transferencia del embrión (Herrick, 2019). Solo unos pocos informes están disponibles sobre embriones derivados de FIV, su criopreservación y nacimientos vivos por transferencia de embriones en caninos domésticos (Singh *et al.*, 2019).

Los primeros estudios en 1992 por Yamada y colaboradores informaron que solo el 2% de los ovocitos fertilizados alcanzaron la etapa de 8 células (Yamada *et al.*, 1992). Se han realizado otras

técnicas, tal como la microinyección como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el perro y se observó formación de pronúcleo masculino en el 7.8% de los ovocitos, pero no se produjo una nueva segmentación (Luvoni, 2000).

2.2.4 *Cultivo in vitro*

Las técnicas de MIV, FIV y CIV de ovocitos caninos pueden proporcionar información útil para los programas de rescate de gametos y la conservación de los caninos en peligro de extinción (Kim *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a los eventos únicos de maduración y fertilización de los ovocitos en los perros, los experimentos con blastocitos no han tenido resultados favorables (Li *et al.*, 2019).

Generalmente, los medios tradicionales *in vitro* no se asemejan del todo a los entornos fisiológicos donde se desarrollan las células y pueden provocar alteraciones morfológicas y funcionales en los ovocitos y embriones (Colombo *et al.*, 2021). Los embriones caninos son sensibles a la acumulación de productos resultantes del metabolismo de descomposición y requieren un ambiente con poco oxígeno para reducir la toxicidad por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), afectando el desarrollo embrionario (Li *et al.*, 2019). In vivo, los ovocitos y los embriones están rodeados por un medio complejo compuesto por proteínas estructurales, proteoglicanos, glicoproteínas y otras moléculas (Colombo *et al.*, 2021).

Se han investigado numerosas variaciones en las condiciones de un sistema de CIV y se ha intentado adaptar el modelo bovino para el CIV, como el tipo y concentración de suero, temperatura, composición de gases en la incubadora y factores de crecimiento (Willingham-Rocky *et al.*, 2003), tal como mantener el pH entre 7.2 y 7.4, que es el pH fisiológico en unas condiciones controladas de cultivo, y generalmente en una atmósfera con un 5% de CO₂ (López, 2017). De tal forma, en condiciones *in vitro*, las células pueden percibir las diferencias en la geometría del medio, la rugosidad y la rigidez que proporcionan las placas de cultivo convencional (Colombo *et al.*, 2021). Esto convierte el crear un medio óptimo en el principal obstáculo en el establecimiento de un sistema de CIV canino eficaz (Li *et al.*, 2019).

2.2.5 *Transferencia nuclear de células somáticas*

Un caso muy significativo sobre la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés) fue el caso de la oveja Dolly, el primer mamífero clonado (Ock *et al.*, 2019). La SCNT sigue siendo una técnica única, ya sea para la preservación de especies o la producción de animales de élite (Ock *et al.*, 2019). En varias especies de mamíferos la técnica de SCNT ha producido embriones que se desarrollan hasta la etapa de blastocito mediante CIV optimizado (Kim *et al.*, 2010).

Los perros domésticos juegan un papel importante en la clonación por transferencia nuclear de caninos en peligro de extinción (Oh *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2019). Lo que permite la producción de descendientes de células somáticas de individuos genéticamente valiosos, incluidos los individuos donde los gametos viables ya no están disponibles (Herrick *et al.*, 2019). La FIV y las técnicas de SCNT en caninos se han establecido recientemente, pero los investigadores no han podido evaluar la calidad de los embriones producidos mediante FIV y SCNT como sistemas efectivos de cultivo de embriones para caninos (Li *et al.*, 2020).

Hay varios medios de cultivo para SCNT. Sin embargo, solo dos medios han sido óptimos, tal como el medio de fluido oviductal sintético modificado (mSOF), usado comúnmente en bovinos y ovinos (Kim *et al.*, 2015); este contiene suero albúmina bovina (BSA), también usado en la clonación de perros (Oh *et al.*, 2016). Los embriones caninos clonados desarrollados con este medio han llegado hasta la etapa de seis células y mórula, esto quiere decir que sigue siendo deficiente (Kim *et al.*, 2010). El segundo es el medio de cigoto porcino (PZM-5), este es definido con un polímero sintético, es decir, alcohol polivinílico (PVA) (Oh *et al.*, 2016); este medio se ha utilizado para cultivar embriones porcinos, desde cigoto hasta etapa de blastocisto (Kim *et al.*, 2015).

Se sabe que la ionomicina se emplea para aumentar los niveles de Ca^{2+} dentro de la célula de ovocitos activados partenogénicamente, así como el 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), que es un inhibidor de la proteína serina/treonina quinasa que contribuye a la síntesis de AND. Es por esto que la combinación de la ionomicina y 6-DMAP son usados para la producción de embriones clonados (Oh *et al.*, 2005). La clonación por transferencia nuclear se usa para clonar fenotipos deseables (Singh *et al.*, 2019). Sin embargo, hay factores importantes que deben tomarse en cuenta antes de que la SCNT pueda implementarse en programas de manejo de población para especies en peligro de extinción, esto se refiere a que la producción de embriones por SCNT requiere un gran número de ovocitos que no están disponibles en especies en peligro (Herrick *et al.*, 2019).

3. HIPÓTESIS

Existe evidencia científica suficiente que demuestra que la suplementación individual y combinada de hormonas tiene un efecto positivo incrementando la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de caninos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Realizar un metaanálisis de los resultados reportados de estudios seleccionados mediante una revisión sistemática sobre la suplementación hormonal en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos.

4.1.1 *Objetivos específicos:*

Evaluar los resultados del tratamiento y control reportados en los estudios sobre la maduración *in vitro* de ovocitos caninos con suplementación individual de hormonas mediante un análisis de razón de momios sobre los resultados.

Evaluar los resultados del tratamiento y control reportados en los estudios sobre la maduración *in vitro* de ovocitos caninos suplementación combinada de hormonas mediante un análisis de razón de momios.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bases de datos y estrategia de búsqueda

El metaanálisis, incluido una revisión sistemática sobre la suplementación hormonal de manera individual y combinada, se realizó con las bases de datos PubMed, ResearchGate, Science Direct y Google Académico.

En la búsqueda, las palabras clave incluidas en las bases de datos fueron: “canine”, “dog”, “oocyte”, “*in vitro* maturation”, “hormone” y “supplementation”. En el caso de la base de datos alterna se usaron las palabras claves en inglés y español latino: “perro”, “canino”, “ovocito”, “suplementación” y “hormona”. Estas palabras se introdujeron en distintas combinaciones para la búsqueda.

5.2 Criterios de inclusión

Esta investigación se realizó tomando en cuenta los parámetros (o items) y diagrama de flujo que establece la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis) (Urrútia y Bonfill, 2010) para la selección de los estudios para el análisis del metaanálisis.

Los estudios se seleccionaron conforme a los siguientes criterios de inclusión: (1) perras, (2) maduración *in vitro* (3) suplementación hormonal, ya sea individualmente o en conjunto y (4) evaluación de la maduración nuclear (metafase II o MII). Esto sin restricción por ciclo estral, raza y edad de las perras, así como del idioma, año y país del estudio.

5.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los estudios duplicados, estudios incompletos o que no se pudo obtener el texto completo (ya sea por restricción del estudio o falta de respuesta del autor), como estudios resumidos y de casos. De igual manera estudios en los que se utilizó suplemento hormonal en combinación a otro tratamiento no hormonal, experimentos en otras especies.

5.4 Selección de estudios

La selección se realizó conforme a las tres fases del diagrama de flujo de PRISMA (Figura 2). La primera fase de identificación fue tomando en cuenta todos los estudios encontrados en las bases de datos, se eliminaron los estudios duplicados encontrados durante la búsqueda así como los estudios eliminados no correspondiente a la especie (caninos domésticos).

En la fase de examinados, los estudios se examinaron desde el resumen detectando criterios de selección no indicados en el título, de forma que se descartaron los estudios ajenos a la suplementación hormonal. Finalmente, en la fase tres de los incluidos, los estudios fueron seleccionados de forma más específica a los criterios de inclusión, en el cual se tomó en cuenta la suplementación únicamente de hormonas, que se realizara la maduración de los ovocitos, así como la evaluación de la maduración nuclear (MII); seleccionando los estudios incluidos a la revisión de literatura y los estudios para el análisis de los datos.

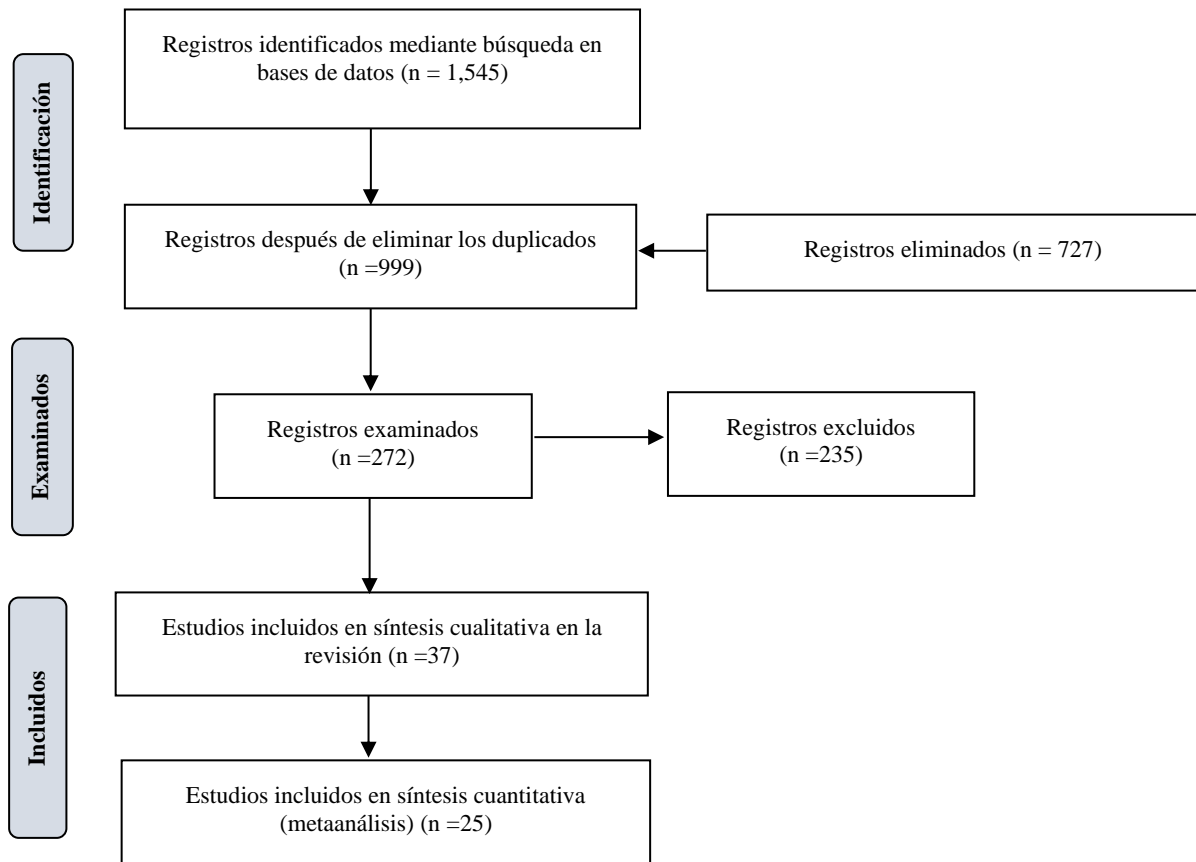


Figura 2. Diagrama de flujo de la información a través de las diferentes fases de una revisión sistemática, traducido y modificado de PRISMA 2009.

5.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software MedCalc (MedCalc Software Ltd., Bélgica), las variables dicotómicas fueron el número de ovocitos positivos, es decir, que completaron la maduración nuclear (metafase II) con el tratamiento hormonal de manera individual o en combinación. Se realizó un análisis previo de heterogeneidad con la prueba de Q (Cochran), y el estadístico I^2 (inconsistencia) la cual se estimó con las variaciones en puntos: <40% bajo, <60%

moderado y >60% alta heterogeneidad, comparando tratamientos y evaluando la igualdad de proporciones (Shelby y Vaske, 2008).

Estos datos fueron evaluados por el estadístico de razón de momios (RM), las estimaciones de intervalo por intervalo de confianza (IC) fueron del 95% y se realizó un gráfico de bosque (Forest plot).

Se analizaron un total 43 estudios (25 referencias), tomando los datos del número total de ovocitos expuestos al tratamiento hormonal, así como el control, y el número de positivos al tratamiento hormonal y control para el análisis estadístico y se realizaron dos análisis:

(1) Suplementación hormonal de manera individual: 27 estudios, y las hormonas suplementadas fueron FSH, LH, P4, E2, eCG, (hCG), hormona del crecimiento (HC) y somatotropina humana (hST).

(2) Suplementación combinada de hormonas: 16 estudios, y las hormonas que se suplementaron fueron FSH, LH, P4, E2, eCG y hCG, en distintas combinaciones.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Suplementación hormonal

Se sabe que, en la suplementación del medio de maduración, varios agentes como las hormonas gonadotrópicas, prostaglandinas, las ováricas y los factores de crecimiento, influyen en la maduración de los ovocitos caninos (Palomino *et al.*, 2021), sin embargo, debido a las condiciones deficientes del medio de cultivo en la maduración MIV de ovocitos caninos dificultan la capacidad de los ovocitos para reanudar la meiosis (Moawad *et al.*, 2021).

En este trabajo se obtuvo una heterogeneidad en el análisis de hormonas en suplementación individual con la prueba de $Q = 49.0$ y $I^2 = 53.1\%$, en la suplementación combinada de hormonas fue de $Q = 34.4$ y $I^2 = 56.4\%$. Debido a que los resultados mostraron heterogeneidad estadística moderada se utilizó un modelo de efectos fijos para el metaanálisis. El sesgo de publicación se evaluó mediante la prueba de regresión lineal de Egger (Egger *et al.*, 1997) y la prueba de correlación de rangos de Begg, lo que arrojó un intercepto de 0.88 y un Tau de Kendall de 0.26 en el análisis de la suplementación individual de hormonas y en análisis de la combinación hormonal fue un intercepto de 0.30 y un Tau de Kendall de 0.08.

6.1.1 Efectos de la suplementación individual de hormonas

En el resultado general de la suplementación hormonal individual (FSH, LH, P4, E2, hST, eCG, hCG y GH) se obtuvo un efecto nulo de que los ovocitos maduren con un tratamiento individual de hormonas (IC= 1.5 a 2.3, $P < 0.001$) en comparación al control, sugiriendo una independencia entre las variables (Cuadro 2). Es decir, la maduración nuclear de los ovocitos caninos no se asocia a la suplementación individual de hormonas. En el gráfico de bosque se pudo observar la mayoría de los estudios en el plano de riesgo, es decir, efecto del tratamiento (>1) en comparación al control (Figura 3).

Cuadro 2. Suplementación individual de hormonas en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Hormonas	RM total	IC	P	Heterogeneidad
		95%		(%)
FSH, LH, E2, P4, eCG, hCG, GH, hST	1.8	1.5 a 2.3	<0.001	53.1%

FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante; E2: estradiol; P4: progesterona; hCG: gonadotropina coriónica humana; eCG: gonadotropina coriónica equina; GH: hormona del crecimiento, por sus siglas en inglés; hST: somatotropina humana; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

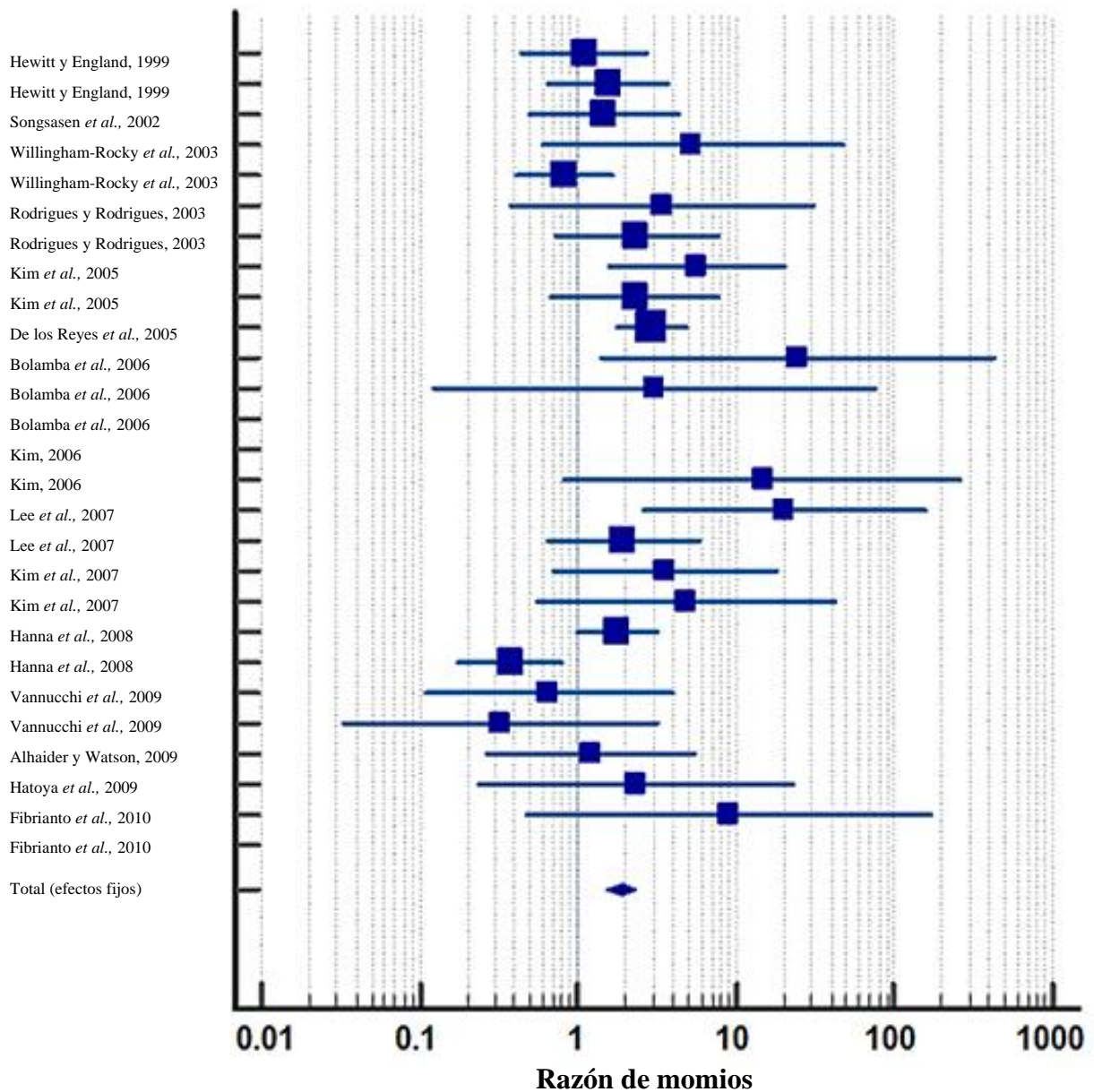


Figura 3. Suplementación hormonal individual en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Gráfico de bosque.

6.1.1.1 Suplementación con FSH

El ovocito se encuentra expuesto a distintas concentraciones de FSH y LH en el folículo (Hewitt y England, 1999); la secreción de FSH estimula expansión de las células del cúmulus (Hasegan *et al.*, 2010) y la maduración nuclear de los ovocitos caninos *in vivo* (Bukowska *et al.*, 2012). Por lo tanto, se realizó un análisis con los resultados de los estudios en los cuales se suplementaron únicamente con FSH, resultando un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos (RM= 5.6, IC= 1.3 a 24.0, P= 0.02) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Suplementación de FSH en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Concentración	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	µg/mL	hr	(%)	(%)			95%	
Hewitt y England, (1999)	1.0	96	14/47 (29.7)	12/43 (28.0)	-	1.0	0.4 a 2.7	
Bolamba <i>et al.</i> (2006)	0.5	66	10/72 (13.8)	0/72 (0.0)	0.071	24.3	1.3 a 424.1	
Lee <i>et al.</i> (2007)	0.5	72	14/94 (14.8)	1/116 (0.9)	<0.05	20.1	2.5 a 156.1	
Kim <i>et al.</i> (2007)	1.0	72	6/94 (6.2)	2/106 (1.8)	<0.05	3.5	0.6 a 18.0	
Fibrianto <i>et al.</i> (2010)	0.5	72	4/119 (3.3)	0/166 (0.0)	<0.05	12.9	0.6 a 243.3	
Total (efectos aleatorios)			48/426	15/503		5.6	1.3 a 24.0	0.02

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

De los primeros estudios con gonadotropinas fueron de Hewitt y England, (1999) que suplementaron de manera individual FSH con una concentración de 1 µg/mL durante 96 h, en el cual no hubo diferencias significativas en el porcentaje de maduración del tratamiento (MII 29.7%) al control (MII 28.0%) según el estadístico de X^2 y la prueba exacta de Fisher que realizaron, resultados similares a este análisis (RM= 1.0, IC = 0.4 a 2.7, 95%), lo que indicó un efecto nulo de la suplementación de FSH a 1 µg/mL. En el estudio de Bolamba *et al.* (2006) la suplementación con 0.5 µg/mL de FSH durante 66 h aumentó la tasa de ovocitos que reanudaron la meiosis y completaron la maduración (tratamiento MII 13.8% y control MII 0.0%, P= 0.071), siendo un tratamiento con mayor efectividad que el control (RM= 24.3, IC= 1.3 a 424.1, 95%). Sin embargo, al no haber un efecto del control en la maduración, el rango del IC es muy grande. Datos similares a Lee *et al.* (2007) que suplementaron de igual manera con 0.5 µg/mL de FSH durante 72 h, y pudieron observar un efecto sobre la expansión de los cúmulos, pero la tasa de maduración nuclear todavía era baja (MII 14.8%, P <0.05) en comparación a otras especies domésticas (ejemplo, bovinos 89.3%, Cajas *et al.*, 2020), no obstante, en este estudio la suplementación de FSH tiene más veces de posibilidades de madurar los ovocitos en comparación al control (RM= 20.1, IC= 2.5 a 156.1, 95%). Ese mismo año, Kim *et al.* (2007) suplementaron con 1.0 µg/mL de FSH, con un incremento numérico en la tasa de maduración en este análisis (RM = 3.5, IC= 0.6 a 18.0, 95%), sin embargo, a pesar de ser ovocitos colectados en etapa de estro, lo cual ya se ha demostrado el efecto de la etapa estral en la MIV, los porcentajes de maduración son bajos (tratamiento MII 6.2% y el control 1.8%, P <0.05). Las diferencias y similitudes no abarcaron solo a la concentración de FSH que emplearon estos estudios, sino otros componentes que adicionaron en el medio de maduración que pudieron influir en los resultados, como en este caso, la adición de suero. Hewitt y England (1999) agregaron 0.3% de suero albúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés), la cual actúa incrementando la cantidad de factor de

crecimiento epidérmico (EGF) unido a la proteína y la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el medio (Rodrigues y Rodrigues, 2003; Cui *et al.*, 2006). El estudio más reciente que suplementó FSH fue Fribrianto *et al.*, (2010) a una concentración de 0.5 µg/mL durante 72h; los resultados mostraron un porcentaje superior en la maduración (MII 3.3%, P <0.05) en comparación al control (MII 0.0%), de igual manera en este análisis (RM = 9.0, IC = 0.4 a 170.5, 95%), no obstante, el rango del IC en los resultados es muy grande. Se ha mencionado que la FSH aparentemente promueve la maduración de los ovocitos al regular las concentraciones del AMPc (Rodrigues y Rodrigues, 2003), posiblemente al inducir la expansión de las células del cúmulus, disminuyendo los niveles de AMPc (Lee *et al.*, 2007).

Se mostró que la concentración 0.5 µg/mL fue mejor que 1.0 µg/mL de FSH sobre la maduración de los ovocitos de estos estudios en independencia del tiempo, tal como se ha mencionado, la maduración nuclear es estimulada por la FSH de una manera dependiente de la dosis (Sha *et al.*, 2010). Por lo que, al realizar un análisis de RM sobre los estudios similares en concentración y periodo de maduración (Lee *et al.*, 2007 y Fribrianto *et al.*, 2010), el resultado fue de 17.6 (IC 95% = 3.3 a 94.3, P 0.001) veces más de que los ovocitos maduren con 0.5 µg/mL durante 72 h de FSH en comparación al control. Sin embargo, también se obtuvo un rango de IC muy grande por las diferencias en los porcentajes (tratamiento y control) de los distintos estudios.

6.1.1.2 Suplementación con LH

Recordando que la LH desempeña un rol muy importante en la reproducción de los mamíferos, ya que durante el ciclo reproductivo al llegar a un pico de su concentración (conocido como el “pico de LH”) provoca la liberación de los ovocitos (Luvoni, 2000); sin embargo, en caninos no ocurre de manera similar, ya que la ovulación ocurre de 1 a 2 días después del pico de LH, siendo ovulados en etapa inmadura (Farstad, 2000; Kim *et al.*, 2005), y la exposición a FSH y LH puede ser necesaria para la adquisición de competencia en la maduración (Bolamba *et al.*, 2006).

En el análisis de los datos reportados, la suplementación individual de LH tuvo un efecto nulo sobre la maduración de los ovocitos caninos (RM= 1.7, IC= 0.8 a 3.3, P= 0.101), no solo por la variabilidad de los tratamientos, sino que individualmente la mayoría de los estudios tuvieron un efecto nulo en la maduración (Cuadro 4).

De tal forma que Hewitt y England (1999) suplementaron con 1.0 µg/mL de LH durante 96 h, al igual que en su estudio anterior con FSH, no encontraron diferencias significativas tanto en la suplementación con FSH (MII 23.8%) ni con LH (MII 35.7%). A pesar de esto, en el análisis la suplementación con LH en el estudio de estos autores tuvo resultados similares (RM= 1.5, IC= 0.6 a 3.6).

Cuadro 4. Suplementación de LH en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Concentración µg/mL	Periodo hr	Tratamiento (%)	Control (%)	P	RM	IC	P
							95%	
Hewitt y England (1999)	1.0	96	21/56 (35.7)	12/43 (28.0)	-	1.5	0.6 a 3.6	
Bolamba <i>et al.</i> (2006)	5.0	66	1/72 (1.3)	0/72 (0)	0.071	3.0	0.1 a 75.9	
Lee <i>et al.</i> (2007)	50.0	72	10/116 (8.6)	5/108 (4.6)	< 0.05	1.9	0.6 a 5.8	
Fibrianto <i>et al.</i> (2010)	0.4	72	0/128 (0)	0/166 (0)	< 0.05	-		
Total (efectos fijos)			32/372	17/389		1.7	0.8 a 3.3	0.101

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

Bolamba *et al.* (2006) suplementaron con 5.0 µg/mL de LH durante 66 h, dosis mayor que los autores anteriores: esta suplementación no tuvo diferencias significativas (tratamiento MII 1.3% y control MII 0.0%, P= 0.071), aunque numéricamente se muestre un efecto positivo del tratamiento en este análisis (RM= de 3.0, IC= 0.1 a 75.9) en comparación al control. Por otro lado, Lee *et al.* (2007) emplearon una dosis aún más elevada, con 50 µg/mL de LH en el medio durante 72 h, teniendo el doble de ovocitos que maduraron con el tratamiento (MII 8.6%, P <0.05) en comparación al control (MII 4.6%), es decir, casi dos veces más de posibilidades según este estudio (RM= 1.9, IC= 0.6 a 5.8). Fibrianto *et al.* (2010) suplementaron con una dosis de 0.4 µg/mL durante 72 h, ningún ovocito maduró al tratamiento y el control, posiblemente debido a la dosis baja de LH, ya que se ha descrito que la competencia meiótica de los ovocitos se controla mediante la comunicación entre las células del cúmulus y el ovocito (Rodrigues y Rodrigues, 2003), interconectados por numerosos canales llamados UG, por los cuales pasan nucleótidos, aminoácidos y azúcares del exterior hacia el ovocito para su crecimiento y desarrollo (Otoi *et al.*, 2002). Durante el pico de LH, esta hormona aumenta las concentraciones de Ca²⁺ en las células del cúmulus aumentando MPF y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Willingham-Rocky *et al.*, 2003), por lo cual se sospecha que este proceso provoca una detención meiótica, ya que luego de esto las UG son interrumpidas e impiden el paso de AMPc hacia el ovocito reanudando la meiosis (Chastant-Maillard *et al.*, 2011). Sin embargo, tomando en cuenta los porcentajes de MII repostados por los autores, así como los resultados de este análisis, se muestra un efecto deficiente en la suplementación de LH. En contraste, se puede sospechar aún más en la relación de la expansión de las células del cúmulus y el progreso de la meiosis, tal como se ha visto en la suplementación de FSH y según lo reportado por algunos autores (Bolamba *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2007 y Fibrianto *et al.*, 2010). Por lo tanto, es probable que *in vivo* la acción de la LH sea eficiente solamente para el desarrollo del folículo y la preparación del ovocito para reanudar la meiosis dentro del folículo, y en el oviducto sea diferente (Alhaider y Watson, 2009).

6.1.1.3 Suplementación con E2

Los receptores nucleares de estradiol (ER) participan en la expansión del cúmulus y señalización en factores de crecimiento (Zhang *et al.*, 2020), por lo que se cree que el E2 favorece la maduración nuclear de ovocitos de caninos (Kempisty *et al.*, 2012). Razón por la cual en la evaluación de la suplementación de E2 se observó el doble de posibilidades en comparación al control, según este análisis, un efecto positivo con la suplementación de E2 en la maduración de los ovocitos caninos (RM= 2.3, IC= 1.5 a 3.7, P <0.001) numéricamente hablando (Cuadro 5).

Cuadro 5. Suplementación de E2 en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Concentración	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	µg/mL	hr	(%)	(%)			95%	
Rodrigues y Rodrigues (2003)	20.0	72	4/96 (4.1)	1/80 (1.3)	< 0.05	3.4	0.3 a 31.3	
Kim <i>et al.</i> (2005)	2.0	72	15/102 (14.7)	3/102 (2.9)	< 0.05	5.6	1.5 a 20.3	
Bolamba <i>et al.</i> (2006)	1.0	66	0/72 (0)	0/72 (0)	-	-	-	
Kim (2006)	1.0	72	6/106 (5.6)	0/112 (0)	0.05	14.5	0.8 a 261.5	
Hanna <i>et al.</i> (2008)	0.002	72	29/115 (25.0)	29/183 (15.6)	< 0.05	1.7	1.0 a 3.1	
Vannucchi <i>et al.</i> (2009)	20.0	96	2/120 (1.6)	3/120 (2.0)	< 0.05	0.6	0.1 a 4.0	
Hatoya <i>et al.</i> (2009)	1.0	72	3/133 (2.2)	1/103 (1.2)	< 0.05	2.3	0.2 a 22.9	
Total (efectos fijos)			59/744	37/772		2.3	1.5 a 3.7	<0.001

RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

Rodrigues y Rodrigues (2003) realizaron un estudio suplementando con 20 µg/mL de E2 durante 72 h, el tratamiento (MII 4.1%, P <0.05) no tuvo un efecto significativo y relación entre variables al someterlos a un análisis de X², considerando el grupo control (MII 1.3%); ahora bien, en el análisis de RM la suplementación con E2 se obtuvo tres veces más de posibilidades en la maduración con este tratamiento en comparación al control (RM= 3.4, IC= 0.3 a 31.3, 95%).

Kim *et al.* (2005) realizaron un experimento con E2 a una concentración de 2 µg/mL durante 72 h tomando en cuenta las distintas fases del ciclo estral, este estudio obtuvo más ovocitos que completaron su maduración en la fase folicular (tratamiento MII 14.7% y control 2.9% MII P <0.05) según el análisis de varianza (ANOVA), equiparable al análisis de RM en el cual se mostró un efecto positivo del tratamiento en comparación al control (RM= 5.6, IC= 1.5 a 20.3). En el estudio de Bolamba *et al.* (2006) no se encontró efecto en la maduración de los ovocitos con la suplementación con 1.0 µg/mL de E2 y el control con el medio convencional, estos resultados no pueden atribuirse a la concentración de E2, ya que Kim (2006) suplementó E2 con la misma concentración (1.0 µg/mL)

durante 72 h, y a lo contrario de Bolamba *et al.* (2006), este tratamiento si tuvo un efecto positivo (MII 5.6%, $P= 0.05$), además, la relación entre la maduración de los ovocitos y el tratamiento en comparación al control fue positiva (RM= 14.5, IC= 0.8 a 261.5). Hanna *et al.* (2008) suplementaron con 0.002 $\mu\text{g/mL}$ de E2 durante 72 h, estos autores no se enfocaron principalmente en la maduración de los ovocitos, sino en el efecto que ejerce el E2 en la detención meiótica y que a su vez sea reversible. El porcentaje de ovocitos en VG (62.3%) no fue mayor al control (68.7%), no obstante, en la tasa de maduración, el tratamiento fue superior (MII 25.0%, $P < 0.05$) al control (MII 15.6%), lo cual se ve relacionado en este análisis (RM= 1.7, IC= 1 a 3.1), lo que refleja la posibilidad de que el E2 no tenga un efecto significativo en la detención meiótica, pero si en la maduración de los ovocitos. Tal como Vannucchi *et al.* (2009), los cuales suplementaron con 20.0 $\mu\text{g/mL}$ en el que se obtuvo un efecto negativo sobre la tasa de maduración nuclear en la aplicación de este tratamiento (MII 1.6%, $P < 0.05$) en comparación al control (MII 2.0%), asimismo en el análisis de RM (RM= 0.6, IC= 0.1 a 4.0), incluso los autores encontraron un aumento en la degeneración de los ovocitos con este tratamiento, asumiendo un efecto deletéreo de la MIV. Ese mismo año Hatoya *et al.* (2009) realizaron un estudio con E2 a una concentración similar a Bolamba *et al.* (2006) y Kim (2006) con 1.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h, sin ninguna similitud en los resultados, ya que Hatoya *et al.* (2009) no obtuvieron diferencias significativas en la tasa de maduración (MII 2.2%, $P < 0.05$) y el control (MII 1.2%). Y en este análisis, numéricamente tiene el doble de posibilidades de madurar a los ovocitos que el control (RM= 2.3, IC= 0.2 a 22.9). Esta variabilidad en los resultados podría deberse a que, a pesar de que en un estudio se detectaron receptores de estradiol (ERa y ERb) en los ovocitos y en las células del cúmulus durante todas las etapas del ciclo estral, el ERb no se observó en la etapa de diestro (Goncalves *et al.*, 2009), etapa en el ovocito concluye la maduración en el oviducto, lo cual representa una ausencia de efecto en la suplementación de E2 en ovocitos colectados en esa etapa. En el análisis de los estudios similares en los cuales se suplementó E2 1.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h (Kim, 2006 y Hatoya *et al.*, 2009) se observó un efecto positivo con este tratamiento (RM= 5.9, IC= 1.0 a 32.6, $P= 0.041$). Sin embargo, en el análisis de los estudios de Kim, 2006 y Hatoya *et al.*, 2009, el IC resultó grande y por lo tanto, el efecto con este tratamiento puede variar.

6.1.1.4 Suplementación con P4

Se ha documentado que la reanudación meiótica de los ovocitos caninos ocurre en presencia de altas concentraciones de P4 y E2 en el oviducto (Chastant-Maillard *et al.*, 2011). En el análisis de la suplementación individual de P4 se observó un efecto nulo en la maduración de los ovocitos en comparación al control (RM= 1.1, IC= 0.6 a 3.1). Sin embargo, estos datos no muestran significancia estadística ($P= 0.651$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Suplementación de P4 en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Concentración	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	µg/mL	hr	(%)	(%)			95%	
Willingham-Rocky <i>et al.</i> (2003)	2.0	48	5/68 (8.6)	1/68 (1.9)	< 0.05	5.3	0.6 a 46.7	
Willingham-Rocky <i>et al.</i> (2003)	0.2	48	16/201 (10.7)	19/196 (14.7)	< 0.05	0.8	0.4 a 1.6	
Kim <i>et al.</i> (2005)	2.0	72	9/83 (10.8)	4/80 (3.7)	< 0.05	2.3	0.6 a 7.8	
Vannucchi <i>et al.</i> (2009)	20.0	96	1/120 (0.8)	3/120 (2.0)	< 0.05	0.3	0.0 a 3.1	
Total (efectos fijos)			31/472	27/464		1.1	0.6 a 1.9	0.651

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

Si bien, el resultado total de la suplementación con P4 no es significativo, esto se puede adjudicar a la variabilidad de los tratamientos de cada estudio. Como en el estudio de Willingham-Rocky *et al.* (2003) en el que se suplementó P4 en distintas concentraciones; con la suplementación de 2.0 µg/mL durante 48 h, este primer tratamiento si mostró una relación significativa con la maduración de los ovocitos (MII 8.6%, P <0.05) según el análisis de X² que realizaron los autores, del mismo modo en este análisis se observó un efecto positivo del tratamiento con comparación al control (RM= 5.3, IC= 0.6 a 46.7). No obstante, en el segundo experimento con una concentración de 0.2 µg/mL resultó como un tratamiento no significativo (MII 10.7%, P <0.05), teniendo una tasa de maduración más alta con el control (MII 14.7%), por lo que este tratamiento tuvo un efecto negativo (RM= 0.8, IC= 0.4 a 1.6, 95%), posiblemente a la baja concentración de P4. Asimismo, el estudio de Kim *et al.* (2005) en el cual emplearon P4 como suplementación en el medio de MIV a una concentración de 2.0 µg/mL durante 72 h, se produjo mayor tasa de maduración (MII 10.8%, P <0.05) en comparación al control (MII 3.7%), siendo un tratamiento con un efecto positivo en la maduración de los ovocitos (RM= 5.6, IC= 1.5 a 20.3). Vannucchi *et al.* (2009) suplementaron con 20.0 µg/mL de P4 durante 96 h, concentraciones superiores a los estudios anteriores, y no hubo diferencias significativas entre las distintas etapas de maduración así como el tratamiento (MII 0.8%, P <0.05) y el control (MII 2.0%), y tuvo un efecto negativo sobre la maduración de los ovocitos (RM= 0.3, IC= 0.0 a 3.1), resultados poco favorables. Otros autores mencionan que esta hormona no tiene una contribución fundamental para la maduración nuclear de los ovocitos (Akison y Robker, 2012), a pesar de que en condiciones *in vivo* los ovocitos están expuestos a niveles relativamente altos de P4 y E2 en el folículo antes del pico preovulatorio (Kim *et al.*, 2017). Sin embargo, la maduración de los ovocitos caninos a diferencia de otras especies ocurre en el oviducto en un ambiente donde la progesterona es dominante (Concannon, 2009), tal como lo muestra un estudio reciente donde se evaluó la expresión génica del receptor nuclear de progesterona (PR) en los oviductos, dando como

resultado una mayor expresión en la etapa de diestro, es decir, cuando el ovocito se localiza en el oviducto (Palomino *et al.*, 2021). Esto puede variar en el efecto de la suplementación con P4 si fueron ovocitos colectados en otras etapas del ciclo estral de las perras, lo cual pudiera coincidir con los resultados de la RM y los porcentajes de maduración reportados por los autores.

6.1.1.5 Suplementación con hCG

La hCG tiene funciones similares a su homóloga LH, la cual participa en el desarrollo folicular, al igual que se relaciona con la señalización para la maduración (Betancur *et al.*, 2011). Dado esto, al evaluar los resultados de la suplementación con hCG se obtuvo un efecto positivo sobre la maduración (RM= 2.7, IC= 1.7 a 4.3, P <0.001) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Suplementación de hCG en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Concentración	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	µg/mL	hr	(%)	(%)			95%	
De los Reyes <i>et al.</i> (2005)	4.0	96	137/315 (43.4)	26/125 (20.7)	< 0.05	2.9	1.8 a 4.7	
Kim (2006)	0.4	72	0/112 (0.0)	0/112 (0.0)	-	-	-	
Kim <i>et al.</i> (2007)	0.4	72	5/71 (7.0)	1/65 (1.5)	< 0.05	4.8	0.5 a 42.6	
Alhaider y Watson (2009)	8.0	96	4/117 (4.6)	3/105 (3.5)	< 0.05	1.2	0.2 a 5.5	
Total (efectos fijos)			146/615	30/407		2.7	1.7 a 4.3	<0.001

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

De los Reyes *et al.* (2005) demostraron la eficacia de la suplementación con 4.0 µg/mL de hCG durante una exposición por 24 h con 96 h de MIV, ya que en este tratamiento se observó la expansión de las células del cúmulus las primeras 24 h y al extender el tiempo de maduración a 96 h el porcentaje de MII fue significativamente mayor porcentualmente (MII 43.4%, P <0.05) y en comparación al control (MII 20.7%), teniendo un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos (RM= 2.3, IC= 1.8 a 4.7) en este análisis. En contraste, Kim (2006) al suplementar con 0.4 µg/mL de hCG ningún ovocito alcanzó la maduración, ya sea con el tratamiento o el control, por lo que los autores discuten un mayor efecto de otras hormonas, por la dominancia de los estrógenos en la ovulación y el desarrollo de los ovocitos. Kim *et al.* (2007) suplementaron de igual manera con 0.4 µg/mL durante 72 h, observaron una tasa de maduración más alta con el tratamiento (MII 7.0%, P <0.05) en comparación al control (MII 1.5%), resultando en este análisis como un tratamiento positivo (RM= 4.8, IC= 0.5 a 42.6). El efecto de la concentración en la maduración de los ovocitos se contrasta aún más con los resultados de Alhaider y Watson (2009) ya que la suplementación de hCG con 8.0 µg/mL durante 96 h no tuvo diferencias significativas en la tasa de maduración (MII 4.6%, P <0.05)

comparado con el control (MII 3.5%) según el estadístico de X^2 , resultados similares en este análisis, en el cual tratamiento tuvo un efecto nulo en la maduración (RM= 1.2, IC= 0.2 a 5.5), con el tratamiento de estos autores. Sin embargo, notaron que la degeneración de los ovocitos se redujo considerablemente con la suplementación de hCG.

Solo dos de los estudios analizados tuvieron un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos. La mayoría de los autores refieren a la hCG por su actividad similar a la LH, mejorando la glucólisis y la oxidación de la glucosa mitocondrial en el ovocito (De los Reyes et al., 2005). Incluso se mencionó una actividad menor a la FSH en cuestiones de la expansión de las células del cúmulus (Alhaider y Watson, 2009). Por lo tanto, se cree que no se ha llegado a una concentración adecuada de las gonadotropinas, lo cual puede estar relacionado con los resultados obtenidos con esta suplementación.

6.1.1.6 Suplementación individual con otras hormonas

Generalmente, la GH es utilizada en el cultivo de folículos por su función en la proliferación celular (Serafim *et al.*, 2013; Nagashima *et al.*, 2019). Por lo tanto, Songsasen *et al.* (2002) experimentaron el aplicar GH en el medio de MIV de ovocitos caninos a una concentración de 10.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Pero este tratamiento no obtuvo diferencias significativas en la maduración (MII 11.5%, $P < 0.05$) tratamiento y control (MII 8.1%), pero si un efecto positivo en la maduración (RM= 1.47, IC= 0.49 a 4.37). El tratamiento mejoró la expansión de las células del cúmulus, sin embargo, en la maduración nuclear no hubo diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos que completaron la maduración. Igualmente, Rodrigues y Rodrigues (2003) suplementaron con hST a una concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h, y no hubo diferencias significativas entre el tratamiento (MII 5.6% y el control MII 2.5%, $P = 0.213$) con el análisis de X^2 pero en este análisis, numéricamente tuvo el doble de veces de posibilidades (RM= 2.3, IC= 0.7 a 7.6). Otro estudio posterior, en el cual emplearon hST en combinación con ácido hialurónico (AH), debido a que se ha mencionado su efecto sobre la expansión del cúmulus y la sinergia con la LH en la maduración nuclear, sin embargo, no tuvieron resultados favorables en la maduración de los ovocitos (2.7 y 3.0% MII) (Rodrigues *et al.*, 2006b). Lo cual concuerda con algunos autores de que la hST si tiene una influencia positiva en la meiosis, probablemente a lo que se ha mencionado sobre la función similar que tiene con la bST sobre las células del cúmulus (Rodrigues y Rodrigues, 2003).

Un estudio demostró que la exposición de eCG por menos de 4 h sobre los ovocitos caninos lleva más allá de la MI (MII 19.4%). Sin embargo, esto fue con relación a la sinergia a la detención meiótica controlada por la adición de AMPc a una exposición con 5.0 mM durante 24 h, resultando un 64.8% de ovocitos en etapa de VG, esto en comparación del grupo control con 23.8% en VG

(Songsasen *et al.*, 2003). Esto se confirma con el estudio de Hanna *et al.* (2008) con la suplementación de 0.4 µg/mL de eCG durante 72h, en el cual se obtuvo un alto porcentaje en la detención meiótica (VG 81.7%), no obstante, la tasa de maduración fue inferior (MII 7.0%, P <0.05) en comparación al control (MII 15.6%), por lo tanto, el tratamiento tuvo un efecto negativo en la maduración (RM= 0.3, IC= 1.0 a 3.1).

Solo el estudio de la suplementación con hST tuvo un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos, en términos numéricos. No obstante, en los porcentajes de maduración no hay diferencias significativas y son muy bajos, por lo que sigue en duda la eficiencia de este tratamiento.

Debido al poco éxito en la MIV de ovocitos caninos, se ha intentado suplementar con otras hormonas no antes empleadas para la MIV de ovocitos caninos. Sin embargo, sin éxito aparente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Suplementación individual de GH, hST y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Hormona	Concentración	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC
		µg/mL	hr	(%)	(%)			95%
Songsasen <i>et al.</i> (2002)	GH	10.0	48	9/78 (11.5)	6/74 (8.1)	< 0.05	1.4	0.4 a 4.3
Rodrigues y Rodrigues (2003)	hST	1.0	72	10/178 (5.6)	4/163 (2.5)	0.213	2.3	0.7 a 7.6
Hanna <i>et al.</i> (2008)	eCG	0.4	72	10/151 (7.0)	29/183 (15.6)	< 0.05	0.3	0.1 a 0.8

GH: hormona del crecimiento; hST: somatotropina humana; eCG: gonadotropina coriónica equina; hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

6.1.2 Efectos de la suplementación combinada de hormonas

Se han realizado distintos estudios suplementando en combinación hormonas de manera estratégica, ya sea estrógenos y progesterona, gonadotropinas, hormonas del crecimiento y factores de crecimiento, o una combinación de estas hormonas (Songsasen y Wildt, 2007).

En el análisis sobre los estudios donde se suplementó con hormonas de manera combinada se observó un efecto nulo combinando hormonas para la maduración de los ovocitos (RM= 1.8 IC= 1.3 a 2.4, P <0.001), esto por la variabilidad de los tratamientos de los distintos estudios, presentando una heterogeneidad moderada (Cuadro 9). En el gráfico se observaron más de la mitad de los estudios posicionados <1 teniendo estos tratamientos un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos (Figura 4).

Cuadro 9. Suplementación combinada de hormonas en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Hormonas combinadas	RM total	IC 95%	P	Heterogeneidad (%)
FSH + LH, E2 + hST				
FSH + LH + E2				
E2 + eCG				
hCG + eCG	1.8	1.3 a 2.4	<0.001	56.4%
E2 + P4				
hCG + P4 + E2				
FSH + P4 + E2				
Secuencial				

FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante; E2: estradiol; P4: progesterona; hCG: gonadotropina coriónica humana; eCG: gonadotropina coriónica equina; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

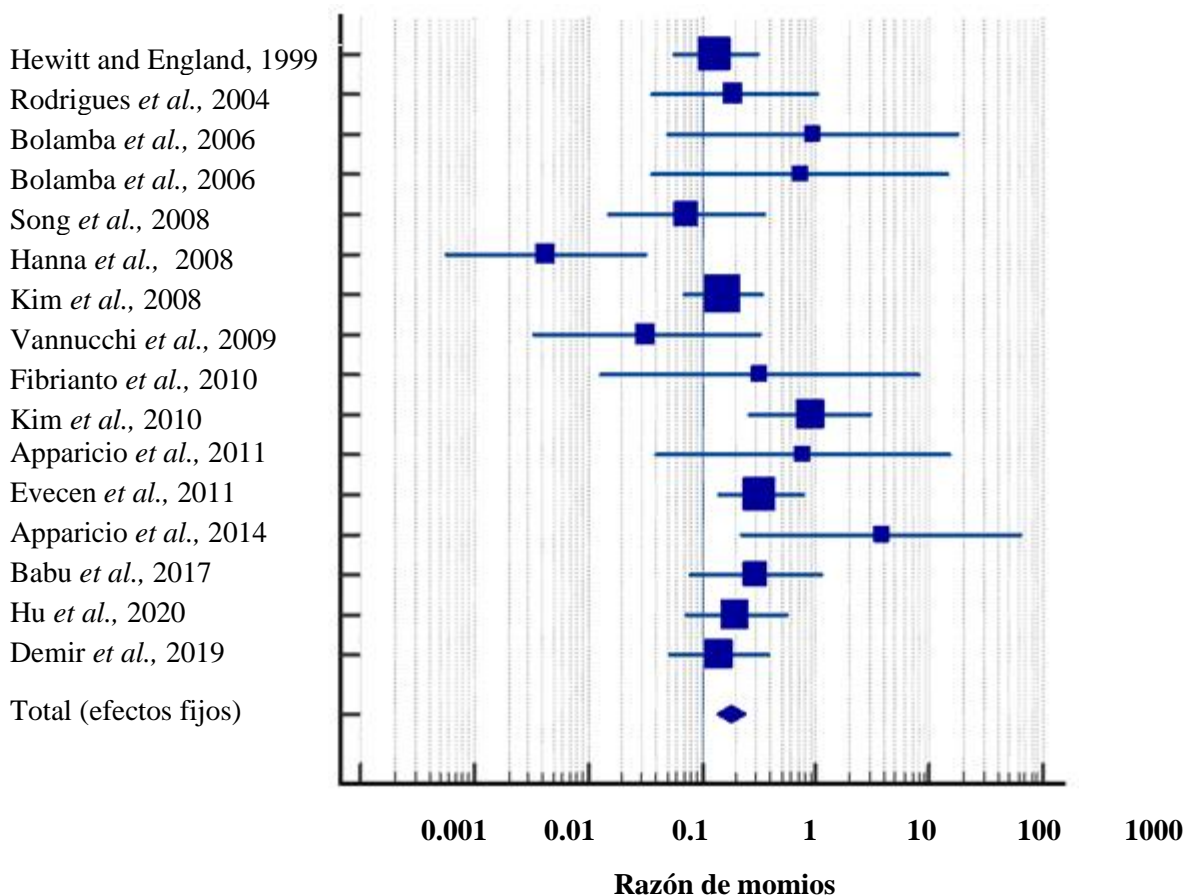


Figura 4. Suplementación combinada de hormonas en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Gráfico de bosque.

6.1.2.1 Suplementación con FSH y LH

La evaluación general de la suplementación combinada de FSH y LH no mostró un efecto positivo en la maduración (RM= 1.4, IC= 0.8 a 2.6) en comparación al control, y no hay significancia estadística en el tratamiento (P= 0.164) debido a la variabilidad de los estudios y sus resultados (Cuadro 10).

Cuadro 10. Suplementación combinada de FSH y LH en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Hormonas	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	(concentración)	hr					95%	
Hewitt y England (1999)	FSH (1.0 µg/mL) y LH (1.0 µg/mL)	96	20/59 (33.8)	12/43 (27.9)	-	1.3	0.5 a 3.1	
Bolamba <i>et al.</i> (2006)	FSH (0.5 µg/mL) y LH (5.0 µg/mL)	66	4/72 (5.5)	0/72 (0.0)	0.089	9.5	0.5 a 180.2	
Song <i>et al.</i> (2007)	FSH (10.0 µg/mL) y LH (10.0 µg/mL)	72	3/50 (6.0)	4/50 (8.0)	<0.05	0.7	0.1 a 3.4	
Fibrianto <i>et al.</i> (2010)	FSH (0.007 µg/mL) y LH (0.4 µg/mL)	72	1/108 (0.9)	0/116 (0.0)	<0.05	3.2	0.1 a 80.6	
Demir <i>et al.</i> (2019)	FSHp (0.007 µg/mL) y pLH (0.005 µg/mL)	96	10/166 (6.0)	7/165 (4.0)	<0.05	1.4	0.5 a 3.8	
Total (efectos fijos)			38/455	23/446		1.4	0.8 a 2.6	0.164

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

Hewitt y England (1999) llevaron a cabo un experimento al que suplementaron de manera conjunta FSH y LH en la misma concentración (1.0 µg/mL, durante 96 h) con el fin de asemejar el ambiente folicular, según mencionan. Esta suplementación no mostró diferencia estadística del tratamiento (MII 33.9%) y el control, (MII 27.9%), de igual modo en los resultados de este análisis no se observó un efecto significativo del tratamiento (RM= 1.3, IC= 0.5 a 3.1). En otro estudio similar, Bolamba *et al.* (2006) emplearon la misma combinación hormonal en distintas concentraciones (FSH 0.5 µg/mL y LH 5.0 µg/mL, durante 66 h) lo que resultó con efecto solamente del tratamiento (MII 5.55%, P = 0.089) y ningún efecto en el control, lo cual, numéricamente dio un resultado elevado en este análisis (RM= 9.52, IC= 0.50 a 180.25), lo mostró una significancia de efecto con estas concentraciones sobre la maduración nuclear de los ovocitos caninos, sin embargo, un rango del IC muy alto.

Posteriormente Song *et al.* (2007) aumentaron las concentraciones de la FSH y LH a 10.0 µg/mL por igual en ambas hormonas, durante 72 h, en un intento por asemejar el pico gonadotrópico al que se exponen los ovocitos dentro del folículo durante la etapa de estro de las perras (Concannon, 2011), sin embargo, el tratamiento no incrementó la tasa de maduración (MII 6.0%, P<0.05), por lo que tuvo una asociación negativa en la maduración en comparación al control (RM= 0.7, IC= 0.1 a 3.4), teniendo un efecto opuesto a lo esperado, siendo el control más eficiente al momento de madurar los ovocitos. Los autores lo relacionan al 10.0% SFB adicionado al medio y su efecto antioxidante, por lo que, durante el periodo de incubación a una concentración del 20.0% de O₂, la tensión de ROS aumentó, afectando la integridad de los ovocitos (Li *et al.*, 2019) y sin efecto del SFB relacionándolo a la dosis más baja que otros autores (20.0% SFB, Kim *et al.*, 2007). Fibrianto *et al.* 2010, emplearon la combinación hormonal de FSH 0.007 µg/mL y LH 0.4 µg/mL lo que resultó de un solo ovocito madurado (MII 0.9%, P<0.05) y ninguno al control, estos resultados dieron numéricamente tres veces más de posibilidades en este análisis (RM= 3.2, IC= 0.1 a 80.6). Los autores Demir *et al.*, (2019) realizaron un estudio comparativo

entre gonadotropinas de la pituitaria (pFSH y pLH) y recombinante humana (rhFSH y rhLH) en distintas concentraciones, el experimento con las gonadotropinas pituitarias resultó ser más eficiente en la maduración que las hormonas recombinantes; sin embargo, no hubo diferencia estadística entre el tratamiento (MII 6.0%) y el control (MII 4.0%, $P < 0.05$), con efecto nulo en este análisis (RM de 1.4, IC= 0.5 a 3.8).

En general, la suplementación de FSH y LH tuvo un efecto nulo en la MIV de ovocitos caninos, lo cual pudiera estar relacionado con la variabilidad de los tratamientos. Sin embargo, individualmente, numéricamente solo dos estudios tuvieron un efecto positivo en la maduración, ya que los porcentajes de maduración son muy bajos. Se ha mencionado que en condiciones *in vivo*, los ovocitos caninos que maduran en el oviducto completan la maduración en ausencia de LH y FSH (De los Reyes *et al.*, 2005).

6.1.2.2 Suplementación con hCG y eCG

En la evaluación de los estudios de Kim *et al.*, 2008 y Kim *et al.*, 2010 con la suplementación de hCG 4.0 $\mu\text{g/mL}$ y eCG 2.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h se observó, numéricamente un efecto positivo de este tratamiento sobre la maduración de los ovocitos (RM= 3.5, IC= 0.6 a 20.5, $P = 0.164$). Sin embargo, se registró un intervalo de confianza grande, y tomando en cuenta el valor de P, no hay significancia estadística en el tratamiento (Cuadro 11).

Cuadro 11. Suplementación combinada de hCG y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Hormonas	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC	P
	(concentración)	hr					95%	
Kim <i>et al.</i> (2008)	hCG (4.0 $\mu\text{g/mL}$) y eCG (2.0 $\mu\text{g/mL}$)	48 h	18/122 (14.7)	11/109 (10.0)	< 0.05	1.5	0.6 a 3.4	
Kim <i>et al.</i> (2010)	hCG (4.0 $\mu\text{g/mL}$) y eCG (2.0 $\mu\text{g/mL}$)	48 h	28/181 (15.5)	3/150 (2.0)	< 0.05	8.9	2.6 a 30.1	
Total (efectos aleatorios)			46/303	14/259		3.5	0.6 a 20.5	0.164

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza.

Kim y colaboradores, realizaron dos estudios similares suplementando hCG 4.0 $\mu\text{g/mL}$ y eCG 2.0 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. En el estudio del 2008 los autores mencionan que en los porcentajes de maduración del tratamiento (MII 14.7%, $P < 0.05$) y el control (MII 10.0%) fueron bajos, al igual que en este análisis, el tratamiento tuvo un efecto nulo en la maduración (RM= 1.5, IC= 0.6 a 3.4, $P = 0.164$). En el estudio del 2010, esta suplementación mostró una tasa de maduración relativamente alta (MII 15.5%, $P < 0.05$) tal como lo destacan los autores, y en este análisis se observó un efecto positivo y más veces de posibilidades de maduración en comparación al control (RM= 8.9, IC= 2.6 a 30.1, $P = 0.164$). Estos estudios emplearon una metodología similar en la MIV, así como los reactivos en los medios, lo

que puede generar esta diferencia en los resultados de estos dos estudios puede ser a la etapa estral en los que se encontraban los ovocitos, ya que en los dos estudios se usaron ovarios de perras en ciclo estral aleatorio (Rodrigues y Rodrigues, 2003). Sin embargo, uno de los estudios mostró un efecto nulo en la maduración, y la ser muy pocos estudios analizados, no es posible determinar si hay un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos con esta suplementación.

6.1.2.3 Suplementaciones con otras combinaciones

Se han intentado otras estrategias de suplementación hormonal, incluso con las de dos hormonas y en distintas horas de exposición. En el estudio de Rodrigues *et al.* (2004) adicionaron E2 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ en combinación con 100 $\mu\text{g/mL}$ hST, se observó una mejora en la expansión de las células del cúmulus y sin diferencia estadística en la tasa de maduración con el tratamiento (MII 3.5%, $P < 0.05$) en comparación al control (MII 1.8%), así como un efecto nulo en este análisis (RM= 1.9, IC= 0.3 a 10.1, 95%), de tal modo que el tratamiento tiene más posibilidades de que maduren los ovocitos a diferencia del control. Sin embargo, en un estudio anterior de estos autores (Rodrigues y Rodrigues, 2003), se evaluó el E2 y hST de manera individual arrojó resultados superiores (E2: RM= 3.4, IC= 0.3 a 31.3, 95% y hST: RM= 2.3, IC= 0.7 a 7.6, 95%), lo cual cuestiona la sinergia de estas dos hormonas. Bolamba *et al.* (2006) realizaron un experimento combinando FSH 0.5 $\mu\text{g/mL}$, LH 5.0 $\mu\text{g/mL}$ y E2 1.0 $\mu\text{g/mL}$, no solo simulando la presencia de FSH y LH en el folículo, sino agregando E2 tal como se encuentra en el folículo previo a ser luteinizado. El E2 tiene funciones de mediador de varios eventos como la movilización de Ca^{2+} , AC y la producción de AMPc (Zhang *et al.*, 2020).

Este experimento mostró tener efectos en la maduración con el tratamiento (MII 4.1%, $P = 0.115$) y sin resultado en el control, de tal forma que en este análisis, el tratamiento tuvo un efecto positivo numéricamente en la maduración (RM= 7.3, IC= 0.3 a 143.9). En el estudio de Hanna *et al.* (2008) se combinaron E2 0.002 $\mu\text{g/mL}$ y eCG 2 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h de MIV, dando como resultado una tasa de maduración mayor con el control (MII 15.8%) en comparación al tratamiento (MII 0.7%, $P < 0.05$), esto refleja una asociación negativa de esta la combinación de E2 y eCG en la maduración (RM= 0.0, IC= 0.0 a 0.3), debido a que mencionan los autores una mayor actividad en la detención meiótica (VG= 80.0%) de estas hormonas y no en la reanudación meiótica. Debido a que la P4 y el E2 se encuentran presentes en el oviducto al momento de la reanudación meiótica del ovocito (Concannon, 2012), un estudio en el que se evaluó la aplicación de estas hormonas, Vannucchi *et al.* (2009) suplementaron con 20.0 $\mu\text{g/mL}$ de E2 y P4 cada una durante 96 h. Sin embargo, este tratamiento no tuvo una tasa mayor (MII 0.8%, $P < 0.05$) al control (MII 2.5%), con una asociación negativa del tratamiento y la maduración (RM= 0.3, IC= 0.0 a 3.1, 95%), resultados nada favorables ya que los ovocitos tienen más veces posibilidades de madurar con el control que el tratamiento. Otro estudio alternando gonadotropinas y

hormonas ováricas, fue Apparicio *et al.* (2011) suplementando hCG 4.0 µg/mL, P4 1.0 µg/mL y E2 1.0 µg/mL durante 72 h, resultando más efectivo el tratamiento (MII 10.0%, $P < 0.01$) ya que el control no tuvo efecto alguno, de tal forma que la combinación de hCG, P4 y E2 tuvo un efecto positivo en la maduración (RM= 7.7, IC= 0.4 a 149.9), lo cual se explica con el hecho de que fueron ovocitos en fase folicular.

Se ha discutido el poco éxito en la suplementación hormonal, la sinergia de las hormonas presentes en el ciclo estral en el periodo específico de la maduración de los ovocitos caninos, determinando que la simulación del microambiente ovocitario es la respuesta, es por esto que se estableció una técnica de maduración fisiológica simulada de ovocitos (SPOM, Simulated physiological oocyte maturation) empleada en bovinos (Guimarães *et al.*, 2015). De modo similar, Evecen *et al.* (2011) implementaron un tratamiento secuencial, asemejando lo más posible el microambiente hormonal en el que se encuentra el ovocito canino durante su proceso de maduración. El tratamiento consistió en la suplementación hormonal en distintas horas y concentraciones (0–24 h: 2.0 µg/mL FSH, 20.0 µg/mL E2; 24–48 h: 2.0 µg/mL FSH, 20 µg/mL E2, 1.0 µg/mL LH; 48–72 h: 10.0 µg/mL FSH, 5.0 µg/mL E2, 10.0 µg/mL LH, 4.0 µg/mL P4; 72–96 h: 2.0 µg/mL FSH, 2.0 µg/mL P4), y se obtuvo una tasa mayor con el tratamiento (MII 5.4%, $P < 0.0001$) al control (MII 1.7%). Sin embargo, no fue un porcentaje tan alto. Debido a esto, en este análisis se mostró un efecto positivo en la maduración numéricamente (RM= 3.2, IC= 1.3 a 7.6). Posteriormente, Apparicio *et al.* (2014) suplementaron con hCG 10.0 µg/mL durante 48 h, P4 1.0 µg/mL las primeras 24h, distintas concentraciones y horas de exposición al estudio anterior (hCG 4.0 µg/mL, P4 1.0 µg/mL y E2 1.0 µg/mL durante 72 h, Apparicio *et al.*, 2011), esta estrategia de suplementación dio (MII 20.0%) tratamiento y ninguno al control (RM= 37.9, IC= 2.2 a 640.5, 95%), estos resultados a diferencia del estudio pasado (Apparicio *et al.*, 2011) podría deberse a un posible efecto de detención meiótica irreversible del E2, tal como lo reportan algunos autores (Hanna *et al.*, 2008 y Vannucchi *et al.*, 2009), también se debe tomar en cuenta la acción de la hCG análogo en los receptores de LH interviniendo en las UG, lo cual está acorde a lo que marca la literatura (Alhaider *et al.*, 2009), regulando la red de señalización multifacética, así como la actividad de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), las cuales son esenciales para la reanudación de la meiosis, la expansión de las células del cúmulus y ovulación (Zhang *et al.*, 2020). Así mismo, años después Babu *et al.* (2017) adoptaron esta técnica alternando las concentraciones y tiempos de las hormonas (0–24 h: 2.0 µg/mL FSH, 20.0 µg/mL E2; 24–48 h: 2.0 µg/mL FSH, 20 µg/mL E2, 1.0 µg/mL LH; 48–72 h: 10.0 µg/mL FSH, 5.0 µg/mL E2, 10.0 µg/mL LH, 4.0 µg/mL P4; 72–96 h: 2.0 µg/mL FSH, 2.0 µg/mL P4), dando resultados más bajos (MII 4.0%, $P < 0.05$) que Evecen *et al.* (2011), aun así, se observó un efecto positivo del tratamiento en la maduración (RM= 3.0, IC= 0.8 a 11.3).

Hu *et al.* (2020) suplementaron en combinación las hormonas, FSH 0.2 µg/mL, P4 1.0 µg/mL y E2 1.0 µg/mL durante 96 h, resultando una tasa de maduración mayor con el tratamiento (MII 17.6%, P <0.05.) en comparación al control (MII 9.6%), de igual manera, se obtuvieron dos veces más de posibilidades de que los ovocitos maduren con la combinación de FSH, P4 y estradiol (RM= 2.0, IC= 0.7 a 5.4, 95%), el haber suplementado con FSH tuvo un impacto positivo en la maduración de los ovocitos, específicamente a la atribución que se le da en la expansión de la células del cúmulus (Lee *et al.*, 2007).

En general, más de la mitad de los estudios, numéricamente un efecto positivo en la maduración de los ovocitos caninos. Tomando en cuenta ellos resultados de la RM y el porcentaje de maduración reportado por los autores, la mejor suplementación combinada fue la de Apparicio *et al.* (2011), suplementando con hCG, P4 y E2. Sin embargo, el IC de es demasiado grande debido a que no hubo ningún ovocito madurado con el control. De igual manera, otro estudio de los mismos autores tuvo un efecto positivo, en el cual Apparicio *et al.* (2014) combinaron solamente hCG y P4, pudiéndose observar nuevamente un IC muy grande. Finalmente, el estudio de Hu *et al.* (2020) tuvo un efecto positivo, combinando FSH, P4 y E2 (Cuadro 12).

Cuadro 12. Otras suplementaciones combinadas en la maduración *in vitro* de ovocitos caninos: Análisis de razón de momios (RM)

Estudio	Hormonas	Periodo	Tratamiento	Control	P	RM	IC
	(concentración)	hr					95%
Rodrigues <i>et al.</i> (2004)	E2 (2000 µg/mL) + hST (100 µg/mL)	72 h	5/142 (3.5)	2/108 (1.9)	< 0.05	1.9	0.3 a 10.1
Bolamba <i>et al.</i> (2006)	FSH (0.5 µg/mL) + LH (5.0 µg/mL) + E2 (1.0 µg/mL)	66 h	3/72 (4.0)	0/72 (0.0)	0.115	7.3	0.3 a 143.9
Hanna <i>et al.</i> (2008)	E2 (0.002 µg/mL) + eCG (2.0 µg/mL)	72	1/126 (0.7)	29/183 (15.6)	< 0.05	0.0	0.0 a 0.3
Vannucchi <i>et al.</i> (2009)	E2 (20.0 µg/mL) + P4 (20.0 µg/mL)	96	1/120 (0.7)	3/120 (2.0)	< 0.05	0.3	0.03 a 3.1
Apparicio <i>et al.</i> (2011)	hCG (4.0 µg/mL) + P4 (1.0 µg/mL) + E2 (1.0 µg/mL)	72	4/40 (10.0)	0/31 (0.0)	< 0.01	7.7	0.4 a 149.9
Evecen <i>et al.</i> (2011)	Secuencial	96 h	24/439 (5.5)	7/404 (1.7)	< 0.0001	3.2	1.3 a 7.6
Apparicio <i>et al.</i> (2014)	hCG (10.0 µg/mL) + P4 (1.0 µg/mL)	48 y 24 h	19/95 (20.0)	0/74 (0.0)	< 0.05	37.9	2.2 a 640.5
Babu <i>et al.</i> (2017)	Secuencial	96 h	9/222 (4.0)	3/219 (1.4)	< 0.05	3.0	0.8 a 11.3
Hu <i>et al.</i> (2020)	FSH (0.2 µg/mL) + P4 (1.0 µg/mL) + E2 (1.0 µg/mL)	96 h	15/85 (18.5)	6/62 (9.6)	< 0.05	2.0	0.7 a 5.4

hr: hora; RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza; secuencial: 0–24 h: 2.0 µg/mL FSH, 20.0 µg/mL E2; 24–48 h: 2.0 µg/mL FSH, 20 µg/mL E2, 1.0 µg/mL LH; 48–72 h: 10.0 µg/mL FSH, 5.0 µg/mL E2, 10.0 µg/mL LH, 4.0 µg/mL P4; 72–96 h: 2.0 µg/mL FSH, 2.0 µg/mL P4.

7. CONCLUSIONES

Este el análisis general de la suplementación individual de hormonas no se observó un efecto significativo en la maduración. De igual manera, con resultados similares en el análisis de la suplementación combinada de hormonas debido a la variabilidad de los tratamientos en los estudio. Sin embargo, al realizar otros análisis separando por tratamientos similares, y según los resultados de la RM, las hormonas suplementadas individualmente que tuvieron un efecto positivo con la maduración de los ovocitos caninos fueron: FSH, E2 y hCG. Y el tratamiento combinado de hormonas fue: hCG y eCG; hCG y P4; hCG, P4 y E2.

Considerando la función de cada hormona, los resultados de cada estudio (porcentaje de MII) y de este análisis de RM, se podría considerar un cultivo *in vitro* bifásico para imitar los eventos *in vivo* de inducción gonadotrópica y transición oviductal, incluyendo la importancia que tiene la detención meiótica prologada para permitir que el ovocito madure citoplasmáticamente, así como el factor primordial de que los ovocitos reanuden la meiosis y completen la maduración. Se sugiere la combinación de hCG y P4, por la actividad de la hCG sobre las UG impidiendo el paso de agentes involucrados en la detención meiótica (AMPC), así como la presencia P4 en el oviducto durante la reanudación de la meiosis, tal como lo menciona la literatura, esto en busca de un medio eficiente para la maduración *in vitro* de ovocitos caninos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akison, L. K. y R.L. Robker. 2012. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:288–296. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02088.x.
- Alam, M. H., J. Lee y T. Miyano. 2018. Inhibition of PDE3A sustains meiotic arrest and gap junction of bovine growing oocytes *in vitro* growth culture. *Theriogenology*. 118:110-118. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.028.
- Albuz, F. K., M. Sasseville, M. Lane, D. T. Armstrong, J. G. Thompson y R. B. Gilchrist. 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*. 25:2999–3011. doi:10.1093/humrep/deq246.
- Alhaider, A. K. y P. F. Watson. 2009. The effects of hCG and growth factors on *in vitro* nuclear maturation of dog oocytes obtained during anestrus. *Reproduction, Fertility and Development*. 21:538–548. doi: 10.1071/RD08167.
- Apparicio, M., A. E. Alves, E. A. Pires-Butler, A. P. C. Ribeiro, G. J. Covizzi y W. R. R. Vicente. 2011. Effects of hormonal supplementation on nuclear maturation and cortical granules distribution of canine oocytes during various reproductive stages. *Reproduction in Domestic Animals*. 46:896–903. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01761.x.
- Apparicio, M., G. Q. Mostachio, T. F. Motheo, A. E. Alves, L. Padilha, E. A. Pires-Butler, P. P. A. Savi, R. A. R. Uscategui, G. C. Luvoni y W. R. R. Vicente. 2014. Distribution of cortical granules and meiotic maturation of canine oocytes in bi-phasic systems. *Reproduction, Fertility and Development*. 27:1082-1087. doi.org/10.1071/RD14022.
- Babu, T. R., K. R. C. Reddy, K. C. S. Reddy, V. G. Kumar, R. Amin, G. Arunakumari y A. Teja. 2017. Evaluation of effective approach for *in vitro* maturation of canine oocytes with sequential addition of hormones. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 38:24-27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.004.
- Barberino, R. S., J. R. V. Silva, J. R. Figueiredo y M. H. T. Matos. 2018. Transport of domestic and wild animal ovaries: a review of the effects of medium, temperature, and periods of storage on follicular viability. *Biopreservation and Biobanking*. 17 (1): 84-90. doi: 10.1089/bio.2018.0057.
- Bekoff, M. 1977. *Canis latrans*. *American Society of Mammalogists*. 79:1-9.
- Betancur, G. R., Jo. G. Oquendo y N. V. Araque. 2011. Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenido por aspiración folicular. *Revista Politécnica ISSN 1900-2351*. 13:1-6.

- Bilodeau-Goeseels, S. 2011. Cows are not mice: the role of cyclic amp, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction & Development*. 78 (10-11): 734–743. doi:10.1002/mrd.21337.
- Borges, A. A. y Pereira F. A. 2019. Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote* 27 (3): 111–117. doi: 10.1017/S0967199419000170.
- Bogliolo, L., M. T. Zedda, S. Ledda, G. Leoni, S. Naitana y S. Pau. 2002. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction, Nutrition and Development*. 42 (3): 265–273. doi: 10.1051 / rnd: 2002024.
- Bolamba, D, K. D. Russ, S. A. Harper, J. L. Sandler y B. S. Durrant. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 65 (6): 1037-1047. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.06.017.
- Brown, J. L. 2017. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. *Theriogenology*. 109: 2-13. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.004.
- Cajas, Y. N., K. Cañón-Beltrán, M. Ladrón de Guevara, M. G. Millán de la Blanca, , P. Ramos-Ibeas, A. Gutiérrez-Adán, D. Rizos y E. M. González. 2020. Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(15): 5340. doi.org/10.3390/ijms21155340.
- Carlson, D. A. 2008. Reproductive biology of the Coyote (*Canis latrans*): Integration of behavior and physiology. *Journal of Mammalogy*. 89:654-664.
- Carlson, D. A. y E. M. Gese. 2007. Relaxin as a diagnostic tool for pregnancy in the coyote (*Canis latrans*). *Animal Reproduction Science*. 101: 304-312. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.07.011.
- Castro, S. V. L. A. M. 2016. Mexican gray wolf courtship and mating –behavior & basic endocrinology during breeding season. *Lisboa*. 26:1-115.
- Chastant-Maillard, S., C. V. De Lesegno, M. Chebrou, S. Thoumire, T. Meylheuc, A. Fontbonne, M. Chodkiewicz, M. Saint-Dizier y K. Reynaud. 2011. The canine oocyte: uncommon features of *in vivo* and *in vitro* maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 391–402. doi: 10.1071/RD10064.
- Chastant-Maillard, S., M. Saint-Dizier, B. Grimard, M. Chebrou, S. Thoumire y K. Reynaud. 2012. Are Oocytes from the Anestrous Bitch Competent for Meiosis? *Reproduction in Domestic Animals*. 47:74–79. doi: 10.1111 / rda.12007.
- Chastant-Maillard, S., M. Chebrou, S. Thoumire, M. Saint-Dizier, M. Chodkiewicz y K. Reynaud. 2010. Embryo biotechnology in the dog: A review. *Reproduction Fertility and Development*, 22:1049–1056. doi: 10.1071/RD09270.

- Colombo, M., I. M. Alkali, S. Prochowska, G. C. Luvoni. 2021. Fighting Like Cats and Dogs: Challenges in Domestic Carnivore Oocyte Development and Promises of Innovative Culture Systems. *Animals (Basel)*. 11(7):2135. doi: 10.3390/ani11072135.
- Concannon, P. W. 2002. Research challenges in endocrine aspects of canine ovarian cycles. *Reproduction in Domestic Animals*. 47:6–12. doi: 10.1111/rda.12121.
- Concannon, P. W. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*. 44:3-15. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x.
- Concannon, P. W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124:200-210. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.028.
- Cui, X. S., Y. X. Jin, X. H. Shen, J. Y. Lee, H. S. Lee, X. J. Yin, I. K. Kong y N. H. Kim. 2006. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology*. 66 (2): 267-74. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.11.011.
- De los Reyes, M., J. Lange, P. Miranda, J. Palominos y C. Barros. 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 64:1-11. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.008.
- Demir, K., M. Evecen, R. Arici, S. Yağcıoğlu, N. Ersoy, N. Çoşkun, H. Atalla, K. Ak, S. Birler y S. Pabuccuoğlu. 2019. *In vitro* effect of recombinant human gonadotropins on meiotic competence of dog oocytes. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 43: 469-473. doi:10.3906/vet-1812-53.
- Dunkel, L., X. C. Jia, K. Nishimori, I. Boime y A. J. W. Hsueh. 1993. Deglycosylated human chorionic gonadotropin (hCG) antagonizes hCG stimulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation through a noncompetitive interaction with recombinant human luteinizing hormone receptors. *Endocrinology*. 132 (2):763-9. doi: 10.1210/endo.132.2.8381073. PMID: 8381073.
- Evecen, M., U. Cirit, K. Demir, A. I. Hamzaoglu, G. Bakırer, S. Pabuccuoglu y S. Birler. 2011. Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dog oocytes. *Theriogenology*. 75:1647–1651. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.004.
- Fastard, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 60-61:175-183. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00250-2.
- Fathi, M., A. Salama y M. R. Badr. 2018. Improvement of the developmental competence of canine oocyte using caffeine supplementation during IVM at different maturation time. *Zygote*, 26:162-167. doi: 10.1017/S0967199418000059.
- Ferreira, E. M., A. A. Vireque, P. R. Adona, F. V. Meirelles, R. A. Ferriani y P. A. A. S. Navarro. 2009. Fahiminiya, S., K. Reynaud, V. Labas, S. Batard, S. Chastant-Maillard y N. Gérard. 2010. Steroid

- hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:132. doi: 10.1186 / 1477-7827-8-132.
- Ferreira, E. M., A. A. Vireque, P. R. Adona, F. V. Meirelles, R. A. Ferriani y P. A. A. S. Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71 (5): 836-848. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023.
- Fibrianto, Y. H., A. Hanna, T. W. Pangestningsih, P. Y. Wibowo y C. M. Airin. 2010. Maturation of oocytes of dog (*Canis familiaris*) at diestrus and anestrus in maturation media with 10% bovine follicular fluid and the addition of luteotropic hormone dan follicle stimulating hormone. *Jurnal sain veteriner (Journal of veterinary science)*. 28:1-10.
- Fujii, M., T. Otoi, M. Murakami, M. Takana, S. Une y T. Suzuki. 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *Journal of Veterinary Medicine*. 62(3):305–307. doi: 10.1292/jvms.62.305.
- Garcia, P., K. Aspee, G. Ramirez, P. Dettleff, J. Palomino, O. A. Peralta, V. H. Parraguez y M. De los Reyes. 2019. Influence of growth differentiation factor 9 (gdf-9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp-15) on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 54 (2): 373-380. doi: 10.1111/rda.13371.
- Garg, A. X., D. Hackam y M. Tonelli. 2008. Systematic review and meta-analysis: when one study is just not enough. *Clinical Journal of The American Society of Nephrology*. 3 (1): 253–260. doi: 10.2215/CJN.01430307.
- Glass, G. V. 1976. Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educational Researcher*. 5:3–8.
- Glass, G. V. 1982. Meta-analysis: An approach to the synthesis of research results. *Journal of Research in Science Teaching*. 93–112.
- Gobello, C. y Y. Corrada. 2003. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Analecta Veterinarian*. 23,1:30-37.
- Goncharov, B. F. y M. N. Skoblina. 2014. [Nonhormonal stimulation *in vitro* of oocyte maturation in sturgeons]. *Ontogenez*. 45:102-11. PMID: 25720268.
- Guimarães, A. L. S., S. A. Pereira, L. O. Leme y M. A. N. Dode. 2015. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 83,1:52-57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.042.
- Hanna, C., M. Suzanne, K. Duane y C. R. Long. 2008. Synchronization of canine germinal vesicle stage oocytes prior to *in vitro* maturation alters the kinetics of nuclear progression during subsequent resumption of meiosis. *Reproduction, Fertility and Development*. 20 (5): 606–614. doi: 10.1071 / rd07227.

- Hatoya, S., Y. Sugiyama, H. Nishida, T. Okuno, R. Torii, K. Sugiura, K. Kida, N. Kawate, H. Tamada y T. Inaba. 2009. Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*, 71 (4): 560–567. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.013.
- Haji, M. M., F. A. Ahmed, K. Lalrintluanga, D. J. Talukdar, P. J. Doley, S. K. Behera y K. Sarma. 2018. The role of estrogen and progesterone hormone on vaginal cytology in bitch. *International Journal of Livestock Research*. 8:2277-1964. doi.org/10.5455/ijlr.20171117025427.
- Herrick, J. R. 2019. Assisted Reproductive Technologies for Endangered Species Conservation: Developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms. *Biology of Reproduction*. 100:1158–1170. doi: 10.1093/biolre/ioz025.
- Hewitt, D. A., P. F. Watson y G. C. W. England. 1998. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*. 49:1083-1101. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00058-2.
- Hewitt, D. A. y G. C. W. England. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 144 (1): 63-75. doi: 10.1016 / s0378-4320 (98) 00162-6.
- Hoppen, H. O. 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin - an overview. *Experimental and Clinical Endocrinology*. 102 (3): 235-43. doi: 10.1055/s-0029-1211287. PMID: 7995345.
- Hu, M., Z. Du, Z. Zhou, H. Long y Q. Ni. 2020. Effects of serum and follicular fluid on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 143: 10-17. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.040.
- Jewgenow, K. y N. Songsasen. 2014. Reproduction and Advances in Reproductive Studies in Carnivores. *Reproductive Sciences in Animal Conservation, Advances in Experimental Medicine and Biology* 753: 205-39. doi: 10.1007/978-1-4939-0820-2_10.
- Kempisty, B., M. Woźna, H. Piotrowska, D. Bukowska, M. Jackowska, P. Antosik, J. M. Jaśkowski y K. P. Brüssow. 2012. The expression of genes encoding zona pellucida glycoproteins in canine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro* in media supplemented with progesterone and estradiol. *Theriogenology*. 77 (3): 684-93. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.008.
- Kim, M. J., H. J. Oh, J. E. Park, S. G. Hong, J. T. Kang, O. J. Koo, S. K. Kang, G. Jang y B. C. Lee. 2010. Influence of oocyte donor and embryo recipient conditions on cloning efficiency in dogs. *Theriogenology*. 74:473-478. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.03.001.
- Kim, B. S., S. Lee, B. H. Hyun, M. J. Shin, D. H. Yoo, S. Lee, Park Y S., J. H. Ja y Z. Y. Ryoo. 2010. Effects of Gonadotropins on *in vitro* maturation and of electrical Stimulation on parthenogenesis

- of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (1): 13-18. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01128.x.
- Kim, C. H. 2006. Effects of hormone and Na-Pyruvate on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction and Development Biology*. 30 (1): 7-11.
- Kim, M. K., H. J. Oh, G. Jang, S. G. Hong, J. E. Park, H. J. Kim, H. S. Lee, S. C. Kim, S. K. Kang y B. C. Lee. 2007. Effects of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction and Development Biology*. 30:7-13.
- Kim, B. S., D. H. Yoo, M. J. Shin, H. J. Kim, D. S. Lee, B. H. Hyun, S. Lee, Y S. Park, J. H. Ha y Z. Y. Ryoo. 2008. Effect of various caffeine concentrations and fertilization time *in vitro* fertilization of canine oocytes. *Reproduction and Development Biology*. 32 (4): 217-222.
- Kim, M. K., Y. H. Fibrianto, H. J. Oh, G. Jang, H. J. Kim, K. S. Lee, S. K. Kang, B. C. Lee y W. S. Hwang. 2005. Effects of estradiol-17b and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63 (5): 1342–1353. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.019.
- Kim, Y. G., D. H. Kim, S. H. Song, K. L. Lee, B. C. Yang, J. S. Oh, S. R. Lee y I. K. Kong. 2015. Wee1B depletion promotes nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 83 (4): 546-552. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.017.
- Kim, J. J., K. B. Park, E. J. Choi, S. H. Hyun, N. H. Kim, Y. W. Jeong y W. S. Hwang. 2017. Relationship between time post-ovulation and progesterone on oocyte maturation and pregnancy in canine cloning. *Animal Reproduction Science*. 185:75-82. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.004.
- Lange-Consiglio, A., C. Perrini, G. Albin, S. Modena, V. Lodde, E. Orsini, P. Esposti y F. Cremonesi. 2017. Oviductal microvesicles and their effect on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction*. 154 (2): 167–180. doi: 10.1530/REP-17-0117.
- Li, W., H. Xu, Y. Yin, W. Shen, Q. Y. Sun y M. Zhao. 2019. *In vitro* production of canine blastocysts. *Theriogenology*. 135:164-168. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.016.
- Li, X., D. Liao, G. Sun y H. Chu. 2020. Odontogenesis and neuronal differentiation characteristics of periodontal ligament stem cells from beagle dog. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24 (9): 1-6. doi: 10.1111/jcmm.15158.
- Lee, H. S., Y. I. Seo, X. J. Yin, S. G. Cho, S. S. Lee, N. H. Kim, S. K. Cho y I. K. Kong. 2007. Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on cumulus cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42 (6): 561-5. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00818.x.
- Lee, S. H., H. J. Oh, M. J. Kim, G. A. Kim, Y. B. Choi, Y. K. Jo, E. M. N. Setyawan y B. C. Lee. 2017. Effect of co-culture canine cumulus and oviduct cells with porcine oocytes during maturation and

- subsequent embryo development of parthenotes *in vitro*. *Theriogenology*. 106:108-116. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.015.
- López, A. P. C. 2017. Función del sistema cannabinoide en maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario en mamíferos. Universidad complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. 1-210.
- Luciano, A. M., F. Franciosi, S. C. Modina y V. Lodde. 2011. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through camp-dependent mechanism. *Biology of Reproduction*. 85 (6): 1252–1259. doi: 10.1095/biolreprod.111.092858.
- Lüders, I. y W.R. Twink Allen. 2020. Managed wildlife breeding- an undervalued conservation tool? *Theriogenology*. 150:48-54. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.058.
- Lunardon, N.T., K. S. Santos, R. C. Justino, G. T. Dessunti, M. M. Seneda y M. I. M. Martins. 2015. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multioocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology*. 83 (6): 1015-1020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.002.
- Luvoni, G. C. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reproduction Nutrition Development*. 40 (5): 505–512. doi: 10.1051/rnd:2000114.
- Maalouf, W. E., J. H. Lee y K. H. Campbell. 2009. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology*. 71 (7): 1083-92. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.001.
- Mayes, M. A. y M. A. Sirard. 2002. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biology of Reproduction*. 66 (1): 180–184. doi: 10.1095 / biolreprod66.1.180.
- Minelli, A. y I. Bellezza. 2011. Methylxanthines and reproduction. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 200:349-72.
- Miranda, S., N. Carolino, H. Vilhena, R. Payan-Carreira y R. M. N. L. Pereira. 2018. Early embryo development, number, quality, and location and the relationship with plasma progesterone in dogs. *Animal Reproduction Science*. 198:238-245. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.10.001.
- Moawad, A. R., A. Salama, M. R. Badr y Fathi M. 2021. Beneficial effects of L-carnitine supplementation during IVM of canine oocytes on their nuclear maturation and development *in vitro*. *Animals (Basel)*. 11:581. doi.org/10.3390/ani11020581.
- Mukai, C., J. L. Nelson, S. H. Cheong, M. D. Amorim y A. J. Travis. 2020. Impacts of oocyte/zygote timing for *in vitro* fertilization and gene editing in the dog. *Theriogenology*. 150:347-352. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.003.

- Murphy, B. D. y S. D. Martinuk. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*. 2 (1): 1-18. doi:0163-769X/91/1201-0027\$03.00/0
- Nagashima, J. B., A. J. Travis y N. Songsasen. 2019. The domestic dog embryo: *in vitro* fertilization, culture, and transfer. *Comparative Embryo Culture*. 2006:247-267. doi: 10.1007/978-1-4939-9566-0_18.
- Nagashima, J. B. y N. Songsasen. 2021. Canid Reproductive Biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*. 11 (1): 653. doi.org/10.3390/ani11030653
- No, J., M. Zao, S. Lee, S. A. Ock, Y. Nam y T. Y. Hur. 2018. Enhanced *in vitro* maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*. 105:66-74. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.002.
- Oh, H. J., J. Choi, M. J. Kim, G. A. Kim, Y. K. Jo, Y. B. Choi y B. C. Lee. 2016. Propagation of elite rescue dogs by somatic cell nuclear transfer. *Animal Science Journal*. 87 (1): 21–26. doi: 10.1111/asj.12402.
- Oh, H. J., Y. H. Fibrianto, M. K. Kim, G. Jang, M. S. Hossein, H. J. Kim, S. K. Kang, B. C. Lee y W. S. Hwang. 2005. Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Zygote*. 13 (3): 227–232. doi: 10.1017/s0967199405003242.
- Ock, S. A., I. Choi y J. G. Yoo. 2019. Whole blood transcriptome analysis for lifelong monitoring in elite sniffer dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Cellular Reprogramming*. 21 (6): 301-313. doi: 10.1089/cell.2019.0056.
- Palomino, J. y M. De los Reyes 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*. 86 (6): 1541-1549. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.013.
- Palomino, J., J. Flores, G. Ramírez, V. H. Parraguez y M. De Los Reyes. 2021. Expression profiles of the progesterone receptor, cyclooxygenase-2, growth differentiation factor 9, and bone morphogenetic protein 15 transcripts in the canine oviducts during the oestrous cycle. *Animals (Basel)*. 11 (2): 454. doi: 10.3390 / ani11020454.
- Páramo, R. M. y Balcázar J. A. S. 2013. *Manual de Prácticas de Manejo Reproductivo en caninos*. Ciudad de México: UNAM. 1-129.
- Packard, J. M. 2018. Wolves. *Encyclopedia of Animal Behavior* 2nd edition. doi.org/10.1016/B978-0-12-813251-7.90078-6.
- Pereira, L. M. C., S. D. Bicudo y M. D. Lopes. 2012. Oocyte maturation in bitches. *Animal Reproduction*. 9:205-209.

- Pereira, L. M. C., P. R. O. Bersano y M. D. Lopes. 2015. Effect of transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes collected in different stages of the estrous cycle. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 52 (1-2): 158-166. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.03.004.
- Pereira, L. M. C., P. R. O. Bersano, D. D. Rocha y M. D. Lopes. 2018. Effect of EGF on expression and localization of maturation-promoting factor, mitogen-activated protein kinase, p34cdc2 and cyclin B during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 54 (2): 325-341. doi: 10.1111/rda.13365.
- Pereira, L. M. C., P. R. O. Bersano, A. F. M. Lima, J. C. F. Pantoja y M. D. Lopes. 2015. Influence of anestrus and diestrus stages of oocyte on meiotic competence in bitches. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 52 (3): 266-272. doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v52i3p266-272
- Pereira, L. M. C., P. R. O. Bersano, A. A. Moura y M. D. Lopes. 2019. First proteomic analysis of diestrus and anestrus canine oocytes at the germinal vesicle reveals candidate proteins involved in oocyte meiotic competence. *Reproduction in Domestic Animals*. 54 (12): 1532-1542. doi: 10.1111/rda.13560.
- Packard, J. M. 2003. Wolf behavior: reproductive, social and intelligent. *Wolves: behavior, ecology and conservation*. 35-65.
- Ramos, L. G., C. A. S. Monteiro, J. M. G. Souza-Fabjan, C. O. P. Basconcelos, L. A. G. Nogueira, A. M. R. Ferreira y R. V. Serapião. 2018. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 199:1-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.11.002.
- Renton, J. P., P. D. Eckersall, J. M. Ferguson, M. J. A. Harvey, J. Mullaney y B. Perry. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Reproduction and Fertility*. 93 (1): 221-231. doi: 10.1530/jrf.0.0930221.
- Reynaud, K., U. Fontbonne, M. Saint-Dizier, S. Thoumire, C. Marnier, M. Z. Tahir, T. Meylheuc y Chaissant-Maillard. 2012. Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*. 47:66–69. doi: 10.1111/rda.12055.
- Reynaud, K., M. Saint-Dizier, M. Z. Tahir, T. Havard, G. Harichaux, V. Labas, S. Thoumire, A. Fontbonne, B. Grimard y S. Chastant-Maillard. 2015. Progesterone Plays a Critical Role in Canine Oocyte Maturation and Fertilization. *Biology of Reproduction*. 93 (4): 1–9. doi: 10.1095/biolreprod.115.130955.
- Rodrigues, B. A. y J. L. Rodrigues. 2003. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*. 60 (1): 59-66. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01301-8.

- Rodrigues, B. A. y J. L. Rodrigues. 2003. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*. 38 (1): 58-62. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00404.x.
- Rodrigues, B. A., L. C. Dos Santos y J. L. Rodrigues. 2004. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 67 (2): 215-23. doi: 10.1002/mrd.10394.
- Rodrigues, B. A. y J. L. Rodrigues. 2010. *In vitro* maturation of canine oocytes: a unique conundrum. *Animal Reproduction*. 7:3-15.
- Rodrigues, B. A. y J. L. Rodrigues. 2006a. Responses of canine oocytes to *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization outcome. *Theriogenology*. 66 (6-7): 1667- 1672. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.02.017.
- Rodrigues, B.A., L. C. dos Santos y J. L. Rodrigues. 2006b. The effect of hyaluronan concentrations in hST-supplemented TCM 199 on *in vitro* nuclear maturation of bitch cumulus–oocyte complexes. *Theriogenology*. 6 (6-7): 1673–6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.015
- Salavati, M., F. Ghafari, T. Zhang y A. A. Fouladi-Nashta. 2013. Influence of caffeine pretreatment on biphasic *in vitro* maturation of dog oocytes. *Theriogenology*. 80 (7): 784-792. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.020.
- Salehnia, M., y S. Zavareh. 2013. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *International Journal of Fertility & Sterility*. 7 (2): 74-81.
- Saffie, P. C. V. 2000. Evaluación de la distribución mitocondrial en ovocitos de perra: inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo*. Universidad de Chile. 1-55.
- Sha, W., B. Z. Xu, M. Li, D. Liu, H. L. Feng y Q. Y. Sun. 2010. Effect of gonadotropins on oocyte maturation *in vitro*: an animal model. *Fertility and sterility*. 93 (5): 1-12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.003.
- Singh, B., G. Mal, S. K. Gautam y M. Mukesh. 2019. Assisted reproduction in dogs. *Advances in Animal Biotechnology*. 205-214. doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_18.
- Sirard, M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 55 (6): 1241-1254. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00480-0.
- Sirard, M. A., S. Desrosier y M. Assidi. 2007. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*. 68: 71-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.053.
- Sirard, M. A. 2012. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reproduction in domestic animals*. 47: 148–155. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02069.x.

- Soto, M. A., C. Vázquez, X. Ramos, M. L. Yáñez L. y M. A. Armella. 2013. Presence of a double annual estrus in a Mexican wolf female (*Canis lupus baileyi*) in captivity. *Therya*, 4:13-148.
- Steckler, D., K. G. M. De Cramer y J. O. Nöthling. 2017. Estimated impact of multiple conceptuses per follicle on fecundity in the bitch. *Theriogenology*. 102:108-115. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.006.
- Stornelli, M. C., M. C. G. Mitacek, R. G. Praderio, R. N. Favre, R. L. De la Sota y M. A. Stornelli. 2015. Prolactin, androstenedione and igf1 serum concentrations during induced follicular growth by eCG administration in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*. 51 (1): 130–134. doi: 10.1111/rda.12656.
- Songsasen, N., I. Yu, y S. P. Leibo. 2002. Nuclear Maturation of Canine Oocytes Cultured in Protein-Free Media. *Molecular Reproduction and Development*. 62 (3): 407–415. doi: 10.1002/mrd.10130.
- Songsasen, N., I. Yu, M. Gomez y S. P. Leibo. 2003. Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 65 (4): 435–445. doi: 10.1002 / mrd.10321.
- Songsasen, N., J. Nagashima y C. Thongkittidilok. 2017. Endocrine and paracrine controls of canine follicular development and function. *Reproduction in Domestic Animals*. 2:29-34. doi: 10.1111/rda.12858.
- Songsasen, N. y D.E. Wildt. 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*. 98 (1-2): 2–22. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.004.
- Song, H. J., E. J. Kang, S. A. Ock, B. Y. Jeon, G. J. Rho y S. Y. Choe. 2007. Influences of LH, FSH and cysteine on *in vitro* canine oocyte maturation. *Reproduction and Development Biology*. 91 (3): 169-174. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.09.003.
- Suzukamo, C., M. Hoshina, H. Moriya, N. Hishiyama, S. Nakamura, F. Kawai, H. Sato, M. Ariga, J. Ito y N. Kashiwazaki. 2009. Kinetics of nuclear status and kinase activities during *in vitro* maturation of canine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 55 (2): 20-116. doi: 10.1262/jrd.20106.
- Tahir, M. Z., K. Reynaud, B. Grimard, S. Thoumire, S. Chastant-Maillard y M. Saint-Dizier. 2013. Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reproduction, Fertility and Development*. 91 (7): 1065-1076. doi: 10.1071/RD12108.
- Valera, M. Á. 2016. Reproducción canina. Madrid: Policlínica Veterinaria Centauro.

- Vannucchi, C. I., M. Faustino, M. G. Marques, M. Nichi, M. E. O. D'Á. Assumpção y J. A. Visintin. 2009. Effects of gonadotropin-exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol-17 β on *in vitro* maturation of canine oocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 45 (7): 328-33. doi: 10.1007/s11626-009-9185-6.
- Willingham-Rocky, L. A., K. Hinrichs, M. E. Westhusin y D. C. Kraemer. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 126 (4): 501–508. doi: 10.1530/rep.0.1260501.
- Yamada, S., Y. Shimazu, H. Kawaji, M. Nakazawa, K. Naito y Y. Toyoda. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biology of reproduction*. 46 (5): 853-858. doi: 10.1095/biolreprod46.5.853.
- Zhang, H., S. Lu¹, R. Xu, Y. Tang, J. Liu, C. Li, J. Wei, R. Yao, X. Zhao, Q. Wei¹ y B. Ma. 2020. Mechanisms of estradiol-induced EGF-like factor expression and oocyte maturation via G protein-coupled estrogen receptor. *Endocrinology*. 161 (12): bqaa190. doi: 10.1210/endocr/bqaa190.