

## MADURACIÓN NUCLEAR Y CITOPASMÁTICA *IN VITRO* EN OVOCITOS DE PERRA

Mónica De los Reyes S.

Unidad de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

E-mail: [mdlreyes@uchile.cl](mailto:mdlreyes@uchile.cl)

### Resumen

Las biotecnologías reproductivas en caninos están menos desarrolladas respecto a lo logrado en otros mamíferos domésticos lo que se debe principalmente a una deficiente maduración *in vitro* (IVM) de los ovocitos. La capacidad de desarrollo de los ovocitos caninos madurados *in vivo* (IVO) se adquiere bajo dos ambientes diferentes ya que el ovocito es ovulado en etapa de vesícula germinativa (GV) como ovocito primario, teniendo una primera etapa de desarrollo a nivel folicular y luego debe completar la maduración hasta segunda metafase (MII) en el oviducto, para lo cual requiere un extenso período no aún del todo definido ( $\approx$ 2-5 días). En estas condiciones, el ovocito debe experimentar la maduración nuclear y también citoplasmática para adquirir la competencia de desarrollo. El objetivo de este escrito es describir algunos eventos críticos que hemos estudiado en mi laboratorio sobre la maduración *in vitro* en ovocitos de perras, a nivel nuclear y citoplasmático.

**Palabras clave:** ovocito, maduración, canino, meiosis

### Introducción

En los últimos años se han intensificado los esfuerzos para lograr la maduración exitosa *in vitro* de los ovocitos caninos: sin embargo, la capacidad de maduración *in vitro* (IVM) de estos ovocitos ha sido mucho más baja que los madurados *in vivo* (IVO), lo que sugiere una deficiencia intrínseca de los propios ovocitos en sí o que las condiciones *in vitro* no son completamente adecuadas para promover una maduración normal, o ambos hechos pueden estar influyendo, lo que provoca una limitación en el desarrollo de las biotecnologías tanto a nivel de la investigación científica, como también su utilización en aspectos clínicos y además, su posible aplicación a especies caninas en peligro de extinción. Los embriones caninos que se han obtenido a la fecha han sido sólo bajo condiciones de recolección *ex vivo*. En cambio, los embriones de muchas especies de animales domésticos se han podido producir *in vitro* usando ovocitos madurados IVM y espermatozoides eyaculados o congelados, con el resultado de embriones cultivados *in vitro* hasta el estado de blastocistos. En caninos sin embargo, biotecnologías comparables no están rutinariamente disponibles en la actualidad, lo que se debe principalmente a problemas de maduración *in vitro* de los ovocitos.

La maduración de los ovocitos es un proceso complejo y muy bien regulado que involucra cambios a nivel nuclear y citoplasmáticos. La maduración nuclear, definida como el período del progreso desde el primer al segundo arresto meiótico, implica transformaciones cromosómicas importantes. La desintegración de la envoltura nuclear (GVBD) marca el inicio de la maduración, la cual progresa hasta la formación de la primera metafase (MI), seguida por la extrusión del primer cuerpo polar y la formación de la segunda metafase (MII) (Richard, 2007), con un segundo período de arresto meiótico, el cual se mantiene hasta la fecundación (Barros *et al.*, 1996, Eppig *et al.*, 2001).

El reinicio meiótico es caracterizado por el estado GVBD (que implica la desintegración de la envoltura nuclear), ya que es el primer signo morfológico claro que ocurre después del término de la inhibición meiótica. Sin embargo, un extenso reordenamiento de componentes citoplasmáticos, ya está ocurriendo antes de la GVBD. El proceso de maduración citoplasmática es menos claro e involucra tanto cambios morfológicos y funcionales relacionados a: 1) relocalización de organelos (Stricker *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007; De los Reyes *et al.*, 2007; 2011; de Lesegno *et al.*, 2008); 2) cambios en la expresión de proteínas celulares responsables de conducir al ovocito hacia competencias fundamentales para su desarrollo (Watson 2007; Gandelman *et al.*, 2010) y 3) modificaciones transcripcionales del mRNA (Ellederova *et al.*, 2004). Este proceso coordinado de maduración del gameto es uno de los tantos aspectos en el cual la fisiología reproductiva de la perra difiere de la de los otros mamíferos. En la mayoría de las hembras mamíferas la maduración nuclear y citoplasmática ocurre bajo el

ambiente folicular antes de la ovulación (Eppig *et al.*, 2001), en los caninos sin embargo, los ovocitos son ovulados en la profase de la primera división meiótica (Renton *et al.*, 1991; Songsasen y Wildt 2007), indentificada morfológicamente como etapa de vesicular germinativa (GV); por tanto, la maduración meiótica se reinicia en el oviducto cuando el ovocito tiene un tamaño mayor a 110  $\mu\text{m}$  de diámetro (Reynaud *et al.*, 2006), requiriendo aproximadamente 2–5 días para completarla (Badiand *et al.*, 1993). La maduración citoplasmática, evaluada a través de los cambios morfológicos en la distribución organelos, ocurriría *in vivo* principalmente entre el inicio del proestro, hasta el 5 día después de la ovulación (de Lesegno *et al.*, 2008).

Ambos procesos de maduración necesitan estar estrechamente integrados y estrictamente coordinados en el tiempo para que resulte en pleno desarrollo, ya que aunque son procesos distintos, la maduración nuclear y citoplasmática son de alguna forma eventos integrados que deben ocurrir simultáneamente a determinados tiempos, incluso la programación molecular del citoplasma debe haber comenzado durante el crecimiento del ovocito. Los cambios del ovocito durante la fase folicular y oviductal son esenciales para la coordinación entre la maduración nuclear y citoplasmática y la maduración completa del ovocito es un requisito indispensable para establecer un desarrollo embrionario normal (Watson, 2007), lo que *in vitro* no ha sido exitoso en los caninos. Por tanto, un punto crítico es saber los aspectos claves que pudiesen conferir mayor potencial de desarrollo en ovocitos IVM y los mecanismos que los regulan.

### Maduración *in vitro* (IVM) en ovocitos caninos

Desde el primer reporte de IVM en ovocitos de perras, a mediados de los setenta (Mahi y Yanagimachi, 1976), se ha hecho un gran esfuerzo para desarrollar un eficiente sistema de maduración en cultivo en esta especie. Las características especiales y únicas de ovular antes de la etapa GVBD y el largo tiempo de maduración en el oviducto ha dificultado en gran medida los intentos de reproducir la maduración y la fecundación *in vitro* en los ovocitos caninos, logrando un éxito muy limitado. De hecho, nacimientos de cachorros por IVM-IVF no se han logrado hasta la fecha en los caninos, aunque paradójicamente el primer ovocito mamífero descrito fue el de perra (Ernst van Baer in 1827, Farstad, 2000). Por tanto, considerando que aun no hay suficientes antecedentes de los mecanismos que controlan la maduración del ovocito, las investigaciones se han enfocado a identificar los factores intrínsecos e intrínsecos que regulan la maduración ovocitaria de esta especie.

Los ovocitos caninos utilizados para IVM vienen de folículos de diferentes tamaños, mostrando un bajo grados de maduración en cultivo utilizando medios adaptados de técnicas de maduración desarrolladas en otras especies.

Esto ha implicado que se hayan estado estudiando diferentes factores asociados al desarrollo que pudiesen influir en una mayor tasa de maduración; edad de la perra (Nickson *et al.*, 1993; Ström Holst *et al.*, 2001), tamaño del ovocito (Hewitt y England, 1998), densidad en el cultivo (Otoi *et al.* 2007), morfología ovocitaria (Nickson *et al.*, 1993), sistemas de co-cultivo (Hewitt y England, 1999; Rodrigues y Rodrigues, 2003) suplementaciones al medio de cultivo (De los Reyes *et al.*, 2005; Bolamba *et al.*, 2006; Vannucchi *et al.*, 2009).

La influencia de los cambios endocrinos preovulatorios son importantes de considerar ya que la maduración del ovocito está influenciada por el ambiente hormonal por un periodo prolongado de tiempo, estando expuesto el gameto a condiciones fluctuantes que incluyen modificaciones del medio (Songsasen y Wildt, 2007). Algunas tentativas de IVM han tratado de imitar el ambiente cambiante luego del alza de LH, que induce el incremento de AMPc, producción de progesterona e inicio meiótico. Dentro de estas, están los estudios efectuados en nuestro laboratorio, mediante el uso de cultivos secuenciales. En nuestro estudios, el cultivar ovocitos de perra con hCG (con actividad similar a la LH) durante 48 h para luego transferirlos a un medio sin este aporte, aumentó en forma significativa los porcentajes de maduración nuclear (De los Reyes *et al.*, 2005). La LH promueve la luteinización folicular previo a la ovulación en las perras (Onclin *et al.*, 2002). Se sabe que la adquisición de la competencia meiótica es un proceso de dos etapas; primero el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la meiosis y posteriormente llega a ser progresivamente más capaz de completar la meiosis hasta MII (Downs, 1993); probablemente en un período inicial de cultivo, el ovocito a través de las células del cúmulo puede ser más dependiente del estímulo de LH en comparación a etapas posteriores; por tanto, el aporte de LH no sería requerido durante todo el periodo. Los cambios hormonales son significativos *in vivo* para el desarrollo y podrían explicar en parte, las diferencias de la maduración *in vitro* e *in vivo*.

El aporte hormonal al medio es probablemente a través de las células del cúmulo expandidas, ya que la disociación de las uniones entre las células del cúmulo se ha asociado con el reinicio meiótico en los caninos (Haenisch-Woeh *et al.*, 2003; Otoi *et al.*, 2007). Nosotros hemos observado pocos ovocitos con las células del cúmulo expandidas a las 24 h de IVM; pero después de las 48 h de cultivo, se ha visto una proporción mayor de ovocitos con mucificación, especialmente en aquellos cultivados con hCG (De los Reyes *et al.*, 2005).

Esto coincidiría con estudios *in vivo* en zorros; donde las unions gap desaparecerían después de 2–3 días del alza de LH (Hyttel *et al.*, 1990). Por tanto, la comunicación entre las células del cúmulo ooforo está regulando la maduración y desarrollo del ovocito también en los caninos. Estudios recientes en ratones han encontrado que la Proteína Kinasa activadora mitogenica (MAPK), que es regulada por las células del cúmulo, puede mediar la maduración del ovocito estimulada por la LH interrumpiendo las comunicaciones célula-célula, regulando la organización espacial y la función del huso meiótico por un mecanismo dependiente de actina (Kim *et al.*, 1996; Saint-Dizier *et al.*, 2004; Barrett y Albertini, 2010).

La mayoría de los estudios de IVM, han evaluado tradicionalmente el desarrollo nuclear como indicador de la maduración del ovocito (Farstad *et al.*, 2000; Luvoni *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2005; Songsasen and Wild, 2007); no obstante, algunos ovocitos pueden completar la maduración nuclear pero no son capaces de lograr desarrollo embrionario hasta blastocisto, lo que puede ser indicativo de una maduración citoplasmática ineficiente (Eppig *et al.*, 1994).

### Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática involucra un proceso altamente complejo, regulado por una serie de eventos moleculares secuenciales con una amplia gama de modificaciones metabólicas y estructurales, incluyendo eventos que aseguran la progresión meiótica, fecundación normal y la activación de las vías requeridas para el desarrollo embrionario (Sirard *et al.*, 2006). Así, algunas posibilidades que pueden influir en el limitado éxito de la IVM de ovocitos caninos son: condiciones de cultivo que no son capaces de sustentar la expresión de factores intrínsecos del desarrollo del ovocito; los sistemas actuales de IVM en caninos pueden inducir una asincronía en el progreso de la maduración nuclear y citoplasmática; o el ovocito no tiene uno o más de los componentes necesarios para la maduración nuclear y citoplasmática. En nuestro laboratorio hemos evaluamos en ovocitos de perra la Zona Pelúcida (ZP), las Mitocondrias, Gránulos Corticales (GC), Retículo Endoplasmático (RE) y Aparato de Golgi (AG), como también la capacidad decondensante del núcleo espermático por parte de los ovocitos, analizando los cambios en estas estructuras y capacidades a través del tiempo de cultivo y su comparación con aquellos ovocitos no madurados como control negativo y los madurados *in vivo* como control positivo. Existen muchos cambios morfológicos y de redistribución a nivel de organelos citoplasmáticos durante la maduración del ovocito. En nuestras investigaciones recientes, respecto a la maduración citoplasmática, hemos podido estudiar algunos de estos cambios. El análisis con microscopia de fluorescencia y confocal nos ha revelado que durante el cultivo se logra movimiento de organelos como los Gránulos corticales (GC) (De los Reyes *et al.*, 2007; 2010), Golgi y Retículo endoplasmático (ER) (Moreno *et al.*, 2010) y distribución mitocondrial (De los Reyes *et al.*, 2011). Sin embargo, se encontraron signos de inmadurez citoplasmática, como una menor cantidad de mitocondrias distribuidas a través del citoplasma en comparación a ovocitos ovulados. Una distribución cortical de los GC similar a lo observado *in vivo*, pero también con una menor cantidad y con una clara descoordinación con el desarrollo nuclear (De los Reyes *et al.*, 2010), lo que podría explicar en parte la mayor tasa de poliespermia observada en la fecundación *in vitro* de estos ovocitos.

La ZP es una estructura de gran trascendencia que se forma durante las primeras etapas del desarrollo del ovocito desde folículos primarios, (Blackmore *et al.*, 2004; Songsasen y Wild, 2007). Esta estructura es una cubierta extracelular que rodea al ovocito por fuera del espacio perivitelino y está compuesta por glicoproteínas sulfatadas que juegan un rol fundamental durante la foliculogénesis, ovulación, fecundación y transporte embrionario (Wassarman *et al.*, 1999; Sánchez y De los Reyes, 2004). Se ha visto en algunas especies en sistemas *in vitro*, que la disposición del trabeculado que forma la ZP cambia en los ovocitos madurados *in vitro* en relación a los ovocitos inmaduros, lo que podría afectar la capacidad de unión del espermatozoide durante la interacción de los gametos. Utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) hemos evaluado la ZP en ovocitos caninos con diferente grado de maduración *in vitro* e *in vivo* (De los Reyes *et al.*, 2009). En la mayoría de los ovocitos, independiente de su estado de maduración, fue posible observar un trabeculado típico descrito previamente en otros estudios (Ström-Holts *et al.*, 2000) mostrando una red fibrosa con niveles variables de compactación, en la que pudimos observar orificios de diferentes diámetros entre los ovocitos en los diferentes estados de maduración. Este cambio significativo de la estructura de la ZP durante la maduración del ovocito podría relacionarse a una mayor capacidad de interacción con el espermatozoide, considerando que esta matriz glicoproteína tiene funciones fundamentales durante la interacción gamética. Estudios con ovocitos de cabra han sugerido que la estructura de la ZP dada por este trabeculado durante la maduración, facilitaría la orientación del espermatozoide para atravesar esta cubierta y fecundar al ovocito (Villamediana *et al.* 1999). Durante la maduración del ovocito existen cambios importantes a nivel nuclear, citoplasmático y de las envolturas (Saint-Dizier *et al.*, 2004; Luvoni *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2007; 2009a; 2011), y mucho de estos cambios están asociados a favorecer la fecundación. La expansión de las células del cúmulo es un signo de maduración de los ovocitos que facilita la capacitación y reacción acrosómica como también la penetración de los espermatozoides (Otoi *et al.*, 2007). De hecho, *in vivo*, se ha descrito que los espermatozoides sólo fecundan ovocitos en etapa de MII. Así, por tanto, el citoplasma y el núcleo no funcionan como dos unidades independientes. Cambios citoplasmáticos influyen en el progreso meiótico (Ferreira *et al.*, 2009). Si la

coordinación de la maduración nuclear y citoplasmática se desarrolla bajo un patrón determinado, es algo que debe establecerse, siendo un área de investigación que cobra especial importancia en los caninos.

**Agradecimientos:** FONDECYT 1110265

#### Referencia Bibliográfica

- Badiand, F., Fontbonne, A., Marel, C., Siliart, B. 1993. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J. Reprod. Fertil.* 47(Suppl.): 63–67.
- Barrett, S.L., Albertini, D.F. 2010. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27: 29–39.
- Barros, C., Crosby, J.A., Moreno, R.D. 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol. Int.* 20:33–391.
- Blackmore, D.G., Baillie, L.R., Holt, J.E., Dierckx, L., Aitken, R.J., McLaughlin, E.A. 2004. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* 72: 661–668.
- Bolamba, D., Russ, K.D., Harper, S.A., Sandler, J.L., Durrant, B.S. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 65:1037–1047.
- Brevini, T.A.L., Cillo, F., Antonini, S., Gandolfi, F. 2007. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 98:23–38.
- De Lesegno, C.V., Reynaud, K., Pechoux, C., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S. 2008. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 115–125.
- De los Reyes, M., de Lange, J., Miranda, P., Palomino, J., Barros, C. 2005. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 64: 1–11.
- De los Reyes, M., Palomino, J., Moreno, R., Parraguez, V., Barros, C. 2007. Evaluation of cortical granules and viability evaluation during *in vitro* maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. *Vet Rec.* 160: 196–198.
- De los Reyes, M., de Lange, J., Anguita, C., Palomino, J., Barros, C. 2009a. *In vitro* sperm penetration through the zona pellucida of immature and *in vitro* mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 37 – 45.
- De los Reyes, M., Hetz, J., Palomino, J. 2009b. Ultrastructural study of the canine zona pellucida surface during *in vitro* maturation. *Reprod. Dom. Anim.* 44 (Suppl. 2): 247–250.
- De los Reyes, M., Luna, D., Palomino, J. 2010. Meiotic development and cortical granules distribution in canine oocytes during *in vitro* maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 324–325.
- De los Reyes, M., Palomino, J., Pamela, S. 2011. Mitochondrial distribution and meiotic development in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology* 75: 346–353.
- Downs, S.M. 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39:65–79.
- Ellederova, Z., Halada, P., Man, P., Kubelka, M., Motlik, J., Kovarova, H. 2004. Protein Patterns of Pig Oocytes During *In Vitro* Maturation. *Biol. Reprod.* 71: 1533–1539.
- Eppig, J.J., Schultz, R.M., O'Brien, M., Chesnel, F. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 164:1–9.
- Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829–838.
- Farstad, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:375–387.
- Haenisch-Woeh, A., Kölle, S., Neumüller, C., Sinowatz, F., Braun, J. 2003. Morphology of Canine Cumulus–Oocyte Complexes in Pre-pubertal Bitches. *Anat. Histol. Embryol.* 32: 373–377.
- Hewitt, D.A., England, G.C. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49: 957–966.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 55:63–75.
- Hyttel, P., Farstad, W., Mondain-Monval, M., Bakke, K., Smith, A.J. 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anat. Embryol.* 181:325–31.
- Kim, M.K., Fibrianto, Y.H., Oh, H.J., Jang, G., Kim, H.J., Lee, K.S., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. 2004. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. *J. Vet. Sci.* 5: 253–258.
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2005. Factors involved in *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63:41–59.
- Mahi, C.A., Yanagimachi, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. 1976. *J. Exp. Zool.* 196:189–196.

- Moreno, R.D., Palomino, J., De los Reyes, M. 2010. Golgi apparatus distribution in canine oocyte. *XVI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria*, p. 172. Concepción 18- 20 Noviembre, 2010.
- Nickson, D.A., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J.A., Renton, J.P. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 47 (Suppl): 231–240.
- Onclin, K., Murphy, B., Versteegen, J.P. 2002. Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology* 57: 1957–72.
- Otoi, T., Shin, T., Kraemer, D.C., Westhusin, M.E. 2007. Role of cumulus cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 184–189.
- Renton, J.P., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J., Mullaney, J., Perry, B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.* 93(1): 221–31.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., de Lesegno, V.C., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S. 2006. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology* 66: 1685–1693.
- Richard, F.J. 2007. Regulation of meiotic maturation. *J. Anim. Sci.* 85:E4-E6.
- Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. 2003. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod. Dom. Anim.* 38:58–62.
- Saint-Dizier, M., Reynaud, K., Chastant-Maillard, S. 2004. Chromatin, microtubules and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 205-212.
- Sánchez, A., De los Reyes, M. 2004. Zona pellucida: an extracellular matrix with applications in the study of immunocontraception in domestic carnivores. *Rev. Cient. FCV-LUZ* 5: 67-73.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P. and Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126–136.
- Songsasen, N., Wildt, D.E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 2-22.
- Stricker, S.A. 2006. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem. Cell Dev. Biol.* 17: 303–13.
- Strom-Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of store canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 119: 77-83..
- Ström-Holst, B., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H., Lagerstedt, A.S., Linde-Forsberg, C. 2001. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J. Vet. Med. and Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48:587–592.
- Vannucchi, C.I., Faustino, M., Marques, M.G., Nichi, M., Ortiz D'Ávila, M.E., Visintin, J.A. 2009. Effects of gonadotropin-exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol-17b on *in vitro* maturation of canine oocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 45: 328–333.
- Villamediana, P., Ruttlan, J., Lopez-Bejar, M.A., Vidal, F., Paramio, M.T. 1999. Changes in zona pellucida surface after *in vivo* and *in vitro* maturation of caprine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 34: 417-421.
- Watson, A.J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 85: E1-E3.
- Wassarman, P.M., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., Williams, Z. 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J. Exp. Zool.* 285: 251-258.