



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

**“INFLUENCIA DE LA PROGESTERONA EN LA  
EXPRESIÓN DE CONEXINA 37 (CX37) DURANTE LA MADURACIÓN IN  
VITRO DE OVOCITOS DE PERRA”**

**Allison Macarena Villagra Muñoz**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médica Veterinaria  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

PROFESORA GUÍA: Dra. Mónica De los Reyes S  
Profesora Titular  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,  
Universidad de Chile

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1171670  
Santiago, Chile  
2021

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Dra. Mónica De los Reyes por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por el apoyo brindado y sobre todo por su paciencia conmigo. Gracias por cada consejo y crítica constructiva, pues no solo me ayudaron en este desafío, sino también en otros espacios del área profesional.

También darle las gracias al Dr. Jaime Palomino, por su gran disposición en todo momento, por ayudarme en las dudas, por más pequeñas que hubieran sido. También valoro su alegría, la cercanía y las historias que siempre nos contaba. Igualmente agradecer a mis profesores correctores el Dr. Victor Martinez y el Dr. Victor Parraguez, por las correcciones realizadas y su amabilidad.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Karla y Georgi por compartir sus conocimientos conmigo y ayudarme en la parte técnica, pues su ayuda fue indispensable, además de las gratas conversaciones. También a Carola, Michelle, Javiera, Ana y Adrián, por las risas y momentos compartidos y por hacer que el trabajo en el laboratorio fuera más ameno.

A personal del departamento de producción animal, especialmente a la Sra. Alma, siempre tan alegre y cercana. También a la Sra. Norma San Martin, por su amabilidad y buena disposición. También al Dr. Raúl Vizcarra y a su asistente por apoyar y facilitar la obtención de las muestras.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, partiendo por mi abuelita que a su modo me ha demostrado su amor y que ha estado junto a mí incondicionalmente, a mi mamá y mi tío, que me brindaron su apoyo desde que inicie la carrera, y estuvieron presentes cuando necesité una mano. A mi compañero Álvaro, el cual vivió todo este proceso de tesis conmigo, confió en mí, me animó a continuar y me ayudó a ver mis fortalezas. Y sin duda a mis pequeños Demian y Abril, los cuales me han motivado día a día para ser mejor y me han ayudado a levantarme con sus incontables muestras de amor.

## ÍNDICE

ABREVIACIONES	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
1. Progesterona	8
2. Maduración <i>in vitro</i> (IVM) de ovocitos caninos y progesterona (P4)	9
3. GAP junction y conexina 37 (Cx37)	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Recolección de muestras	14
2. Procesamiento de muestras, obtención de los complejos cúmulo ovocitos (COCs)	14
3. Evaluación del desarrollo meiótico	16
4. Extracción de ARN y Transcripción Reversa (RT) de COCs cultivados	17
5. RT-qPCR	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
RESULTADOS	21
1. Evaluación del desarrollo meiótico de ovocitos madurados <i>in vitro</i>	21
2. Niveles de ARNm de Cx37	25
DISCUSIÓN	26
BIBLIOGRAFÍA	31

## ABREVIACIONES

<b>ACTB</b>	$\beta$ -Actina
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>cMOS</b>	Factor de maduración de ovocitos Mos
<b>COC</b>	Complejo cúmulo ovocito
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>Cx37</b>	Conexina 37
<b>GDF-9</b>	Factor de crecimiento diferencial 9
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>IVM</b>	Maduración <i>in vitro</i>
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MI</b>	Primera metafase
<b>MII</b>	Segunda metafase
<b>MPF</b>	Factor promotor de la meiosis
<b>PGE-2</b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteína kinasa A
<b>PR</b>	Receptor nuclear de progesterona
<b>P4</b>	Progesterona
<b>Q</b>	Quantity
<b>q-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>TM</b>	Temperatura de <i>melting</i>
<b>TZP</b>	Proyecciones transzonales
<b>VG</b>	Vesícula germinal
<b>VGBD</b>	Reinicio meiótico

## RESUMEN

A nivel reproductivo la hembra canina presenta características particulares como el significativo aumento de los niveles plasmáticos de progesterona (P4) antes de la ovulación, debido a una luteinización preovulatoria de los folículos, y además, la ovulación de ovocitos detenidos aún en la profase de la primera división meiótica, alcanzando el estado de segunda metafase (MII) en el oviducto. Estos diferentes ambientes en la maduración del ovocito canino y los eventos asociados, ha presentado un problema en imitarlos para el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro*. Las altas concentraciones de P4 en la ovulación podrían tener una participación en este proceso. Por otra parte, se ha descrito que existen cambios significativos en el nivel de la expresión génica de la Cx37, presente en las uniones comunicantes entre las células del COC previo y posterior a la ovulación, por lo que el objetivo de este estudio fue conocer si las concentraciones altas de P4 estarían en concomitancia con la disminución de expresión del gen de Cx37 en los complejos cúmulo ovocitos caninos, como también su influencia sobre el desarrollo meiótico *in vitro* de estos. Se utilizaron 900 COCs caninos, provenientes de folículos antrales obtenidos de ovarios de 60 perras de diferentes etapas del ciclo estral. Los ovocitos se maduraron *in vitro* en un medio base TCM suplementando con diferentes concentraciones de progesterona 1) 0 P4 o control; 2) 50 µg/mL P4 y 3) 100 µg/mL P4). Después del cultivo se evaluó el desarrollo de los ovocitos de cada grupo, donde la clasificación del estado de desarrollo meiótico se realizó con un microscopio de epifluorescencia invertida, clasificando a los ovocitos en estados de: VG, VGBD, MI y MII. En ovocitos de los mismos grupos de maduración se les evaluó la expresión relativa del gen de Cx37 mediante RT-qPCR. Los resultados del desarrollo meiótico y de la expresión relativa del gen se evaluaron mediante ANOVA y Post test de Duncan. La adición de P4 resultó en un mayor (P <0,05) número de ovocitos que reanudaron la meiosis y mayor proporción de ovocitos que alcanzaron la etapa de MII (P <0,05). La expresión relativa del gen de Cx37 mostró una disminución (P <0,05) en los ovocitos madurados *in vitro* en relación con los que no se sometieron a maduración, pero sin diferencias significativas entre las concentraciones de P4. Estos resultados sugieren que la P4 estaría involucrada en la maduración meiótica de los ovocitos, pero no mediante la disminución de la expresión génica de la Cx37.

## ABSTRACT

Canine females present reproductive characteristics such as increased progesterone concentrations (P4) before ovulation due to pre-ovulatory luteinization of the follicles, ovulation of oocytes in the prophase of the first meiotic division, reaching the second metaphase (MII) stage in the oviduct. The different environments during the oocyte maturation *in vivo* make it difficult to mimic these conditions for *in vitro* maturation (IVM); therefore, the current IVM systems are far from optimal in terms of the percentage of mature oocytes obtained. The high P4 concentrations during the periovulatory period might play a role in oocyte maturation. On the other hand, it has been described that there are significant changes in the gene expression of Cx37 in this periovulatory period. Thus, this study aimed to know if the high P4 concentrations influence the nuclear maturation of canine oocytes matured in culture and if this influence was related to the expression of Cx37. The experimental protocol included 900 canine COCs from antral follicles obtained from 60 bitches at different estrous cycle stages. Oocytes were IVM in TCM base medium supplemented with different concentrations of progesterone 1) 0 P4 or control; 2) 50 µg/mL P4 and 3) 100 µg/mL P4). After culture, the oocytes of each group were evaluated for nuclear development, where the classification of the meiotic developmental stage was assessed with an inverted epifluorescence microscope. The nuclear development was classified into VG, VGBD, MI, and MII stages. Oocytes from the same maturation groups were evaluated for relative expression of the Cx37 gene by RT-qPCR. ANOVA and Duncan's Post-test evaluated the meiotic development and relative gene expression. Addition of P4 resulted in a higher ( $P < 0.05$ ) number of oocytes resumed meiosis and a higher proportion of oocytes reached the MII stage ( $P < 0.05$ ). Relative Cx37 gene expression showed a decrease ( $P < 0.05$ ) in oocytes matured *in vitro* compared to those that did not undergo maturation; however, there were no differences in the expression of the Cx37 gene in the progesterone-added groups. These results suggest that P4 would be involved in the meiotic maturation of canine oocytes but not in Cx37 gene expression during IVM.

## INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo de cánidos presenta aspectos particulares en comparación al de las demás especies mamíferas, donde aún son desconocidos muchos mecanismos específicos (Concannon, 2011). Una de estas características es la luteinización de los folículos preovulatorios, incluso antes del alza de la hormona luteinizante (LH), lo que implica que la P4 aumenta significativamente antes de la ovulación (Reynaud *et al.*, 2005; De los Reyes *et al.*, 2021). Adicionalmente, en esta especie los ovocitos son ovulados en un estado inmaduro, detenidos en la profase de la primera división meiótica (Renton *et al.*, 1991), etapa que corresponde a un estado de permanencia de la vesícula germinal (GV). Por lo tanto, la maduración meiótica se reinicia posterior a la ovulación a nivel del oviducto con concentraciones plasmáticas altas de P4, alcanzando así el estado de segunda metafase (MII) alrededor de las 72 horas luego de la ovulación (Reynaud *et al.*, 2005).

La P4 es una hormona esteroidal que se produce esencialmente en el ovario, principalmente en el cuerpo lúteo, pero también a nivel folicular (Willingham-Rocky *et al.*, 2003). Esta hormona tiene variadas funciones en la hembra, siendo esencial para la ovulación, establecimiento y mantenimiento de la gestación, desarrollo de la glándula mamaria, así como para la expresión del comportamiento sexual (Concannon, 2011).

En el ovario de las hembras mamíferas, los ovocitos se desarrollan en un microambiente folicular donde los ovocitos se comunican bidireccionalmente con células del cúmulo a través de proyecciones citoplasmáticas conocidas como uniones gap, formando el complejo cúmulo ovocito (COC) (Li y Albertini, 2013). Una de las principales proteínas de unión en el ovario es la conexina 37 (Cx37), que comunica el ovocito con las células de la granulosa (Simon *et al.*, 1997). En ovejas, la Cx37 está involucrada en el desarrollo folicular y la ovulación, así como en el crecimiento, diferenciación y regresión del tejido lúteo (Borowczyk *et al.*, 2006).

Similar a los canales iónicos convencionales, los canales formados por uniones gap fluctúan entre estados abiertos o cerrados como respuesta a diversos estímulos celulares o extracelulares. Diversos estudios celulares y fisiológicos han implicado al receptor de progesterona (PR) (junto al receptor de estrógeno) como regulador esencial de las gap junctions intercelulares en el tejido reproductivo (Firestone y Kapadia, 2012). Esta

hormona se asocia con la disminución de la comunicación dada por las uniones gap (Petrocelli y Lye, 1993).

En la hembra canina la P4 cumple un rol importante en la maduración final del ovocito a nivel oviductal (Kim *et al.*, 2017) y existe evidencia en otras especies que esta hormona regula por medio de receptores nucleares la expresión de Cx37 (Borowczyk *et al.*, 2006), siendo esta última necesaria para la transferencia de señales entre el ovocito y las células de la granulosa, las cuales deben suprimirse para que el ovocito reanude la meiosis. Por lo tanto, en la presente memoria se plantea que las concentraciones altas de P4 exógena favorecerían el desarrollo meiótico del ovocito, probablemente deprimiendo la expresión génica de Cx37.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Progesterona**

La P4 es una hormona esterooidal derivada del colesterol que se produce a nivel ovárico, principalmente en el cuerpo lúteo (Kowalik *et al.*, 2018), pero además en los folículos (Concannon, 2011). Esta hormona también es producida en menor medida por las glándulas adrenales y en la placenta en la mayoría de las especies (Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón, 2014), aunque en la perra el aporte de P4 por la placenta es insignificante (Kowalewski *et al.*, 2012).

En la perra la luteinización folicular es preovulatoria, comenzando en proestro, aumentando la concentración de P4 previo al alza de LH (Concannon, 2011; Reynaud *et al.*, 2015; Delos Reyes *et al.*, 2021). Por lo tanto, el crecimiento final de los ovocitos en los folículos y la ovulación ocurren con niveles muy altos de P4.

La P4 cumple un rol fundamental en el crecimiento folicular, la ovulación, la luteinización, como también en la supervivencia y el desarrollo de los embriones y fetos durante la gestación (Peluso, 2006). Además de estos roles, en la perra algunos estudios han descrito una influencia directa de la P4 en la maduración de los ovocitos *in vitro* y la capacidad de desarrollo meiótico dependen de niveles altos de P4 (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2017). Sin embargo, este efecto es controvertido a la fecha, ya que

otros trabajos no han podido demostrar este efecto (Willingham-Rocky *et al.*, 2003 y Hu *et al.*, 2020)

Los efectos de esta hormona están mediados por receptores de P4 (PR), una proteína de transcripción a nivel nuclear que ejerce un control pleiotrópico sobre muchos procesos reproductivos (Lydon *et al.*, 1995). El PR regula además, la expresión de muchos genes necesarios para el éxito en la ovulación (Akison y Robker, 2012). La P4 también actúa a través de un receptor de membrana, el cual ha sido menos estudiado, pero también se expresaría en la perra (Tahir *et al.*, 2013).

## **2. Maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos caninos y progesterona (P4)**

Los ovocitos caninos se ovulan en la etapa de dictiateno de la primera profase meiótica, distinguida morfológicamente como vesícula germinal (VG) (Reynaud *et al.*, 2015) y alcanzan la segunda metafase (MII) después de 48-72 horas posterior a esta, en los oviductos (Rodriguez y Rodriguez, 2003; Reynaud *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2017).

Esto hace que en perras el sistema de maduración en cultivo sea más complejo, ya que *in vivo* sus ovocitos maduran no solamente en el ambiente folicular preovulatorio, sino también en el ambiente oviductal, lo que dificulta imitar *in vitro* a los microambientes involucrados. Esto se traduce en una menor tasa de éxito en los porcentajes de maduración de ovocitos *in vitro* en relación a lo obtenido en otras hembras domésticas (Chastant-Maillard *et al.*, 2011), alcanzando tasas de MII de un 5 - 50% de los ovocitos cultivados (De los Reyes *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2019). Por lo tanto, para poder replicar eficientemente el microambiente donde se desarrollan los ovocitos caninos y lograr un sistema exitoso de IVM se hace necesario conocer más profundamente las condiciones *in vivo* (De los Reyes *et al.*, 2005). Por lo tanto, esta baja tasa de maduración estaría relacionada con requisitos desconocidos para la maduración de ovocitos caninos que, a su vez, limitan la comprensión de los mecanismos que subyacen en el crecimiento de ovocitos en esta especie (Garcia *et al.*, 2019).

La maduración de los ovocitos caninos y la interacción con los espermatozoides se producen en presencia de concentraciones crecientes de P4 circulante (Reynaud *et al.*, 2015). A través del líquido folicular, los ovocitos preovulatorios están expuestos a niveles

de P4 tan altos como 1000 veces más que las concentraciones plasmáticas (Fahiminiya *et al.*, 2010 y De los Reyes *et al.*, 2021).

Se ha observado *in vivo* en perras Beagle, que la administración de aglepristona, que es un antagonista de los PR (Hoffman & Schuler, 2000) retrasa la reanudación de la meiosis en ovocitos ovulados e inhibe su progresión hacia metafase II (Reynaud *et al.*, 2015) lo que sugiere un papel relevante de la progesterona en el reinicio de la meiosis *in vivo*.

### **3. GAP junction y conexina 37 (Cx37)**

La comunicación efectiva entre células se da a través de uniones gap (GAP), formadas por hemicanales, los cuales están compuestos por conexones, los que a su vez están constituidos por proteínas denominadas conexinas (Gershon *et al.*, 2008). Estos canales conectan directamente el compartimento citoplasmático de células vecinas, permitiendo el intercambio rápido de iones inorgánicos y metabolitos como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y azúcares, incluidas también las moléculas de señalización tales como AMPc e inositol-3-fosfato (Firestone y Kapadia, 2012).

En el folículo ovárico se encuentran diferentes conexinas (Gershon *et al.*, 2008), principalmente la Cx43 que conecta las células de la granulosa y la Cx37, que comunica las células del cúmulo y el ovocito en las proyecciones transzonales (TZP) (Gershon *et al.*, 2008; Richard y Baltz, 2014). Esta comunicación intercelular en el COC permite el paso de iones, metabolitos, segundos mensajeros, desde y hacia las células del cúmulo al ovocito para cumplir funciones vitales (Conti *et al.*, 2012), siendo esta comunicación esencial para el reinicio meiótico y su progresión hasta la etapa de metafase II (Brambillasca *et al.*, 2013).

En ratones *knock out* para el gen Cx37, no existe transferencia de iones y metabolitos entre las células del cúmulo y el ovocito (Simon *et al.*, 1997). Por lo que los ovocitos no alcanzan el tamaño antral adecuado y no logran la competencia meiótica completa (Simon *et al.*, 1997; Carabatsos *et al.*, 2000). La deficiencia de Cx37 puede resultar en asincronía de la madurez nuclear y citoplasmática del ovocito (Carabatsos *et al.*, 2000).

Una de las funciones asignadas a las GAP en el ámbito reproductivo y probada en el ovario de ratones, es la transferencia de nucleótidos cíclicos desde las células del cúmulo

hasta el ovocito (Webb *et al.*, 2002). Los niveles altos de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC) y guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) al interior del ovocito son esenciales para el arresto meiótico, mientras que una disminución intraocitaria de estos nucleótidos cíclicos permite la reanudación de la meiosis (Shuhaibar *et al.*, 2015; Campen *et al.*, 2016). Esto se evidencia con la utilización de bloqueadores de conexinas, como la carbenoxolona que produce una disminución de AMPC al interior del ovocito, reiniciando así la meiosis (Sela-Abramovich *et al.*, 2006).

En la mayoría de los mamíferos, el aumento de LH desencadena la reanudación meiótica, ya que poco antes de la ovulación las conexinas entre las células de la granulosa y el ovocito disminuyen su expresión (Winterhager y Kidder, 2015), asociado a la separación física entre el ovocito y las células foliculares de la granulosa parietal, bloqueando el paso de nucleótidos cíclicos, por lo que la pérdida de comunicación entre las células del cúmulo y el ovocito es un requisito previo para la reanudación de la meiosis (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Sin embargo, en la perra esto no sucede y la comunicación entre el ovocito y sus células del cúmulo se mantiene, permaneciendo estas últimas unidas al ovocito durante varios días después del peak de LH (Reynaud *et al.*, 2006a).

En caninos a través de estudios de microscopía electrónica se ha observado la comunicación entre los ovocitos y las células del cúmulo antes de la ovulación, y 72 horas después de esta, los ovocitos maduros se separan completamente de sus células del cúmulo (Viaris de Lesegno *et al.*, 2007). Además, mediante análisis de inmunofluorescencia se ha descrito recientemente que la Cx37 permanece alta en el ovocito y en la zona pelúcida de folículos preovulatorios a través de las TPZ, pero disminuye notablemente luego de la ovulación, esto asociado al descenso de la expresión génica de esta conexina en los COCs ovulados (De los Reyes *et al.*, 2020).

Diferentes estudios han demostrado que los esteroides, entre ellos la P4, pueden regular la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de los tejidos mamarios, ováricos y endometriales, a través de la expresión, modificación y estabilidad de las conexinas, las cuales permiten la comunicación celular (Piersanti y Lye, 1995; Firestone y Kapadia, 2012). Se describe que los receptores de hormonas nucleares regulan la dinámica de las interacciones celulares a través de señales transcripcionales y no transcripcionales

(Firestone y Kapadia, 2012). En ovinos se ha evidenciado que existe una relación inversa entre los niveles de P4 y los niveles de ARNm de Cx37 (Borowczyk *et al.*, 2006), lo que podría ocurrir también en la perra (De los Reyes *et al.*, 2020). Se plantea por lo tanto, conocer los efectos de la P4 en la expresión de Cx37 y en el desarrollo meiótico de COCs de perra cultivados *in vitro*.

## **HIPÓTESIS**

Las concentraciones crecientes de progesterona exógena durante la maduración *in vitro* de los ovocitos caninos disminuirán la expresión de *Cx37* en los complejos cúmulo ovocitos (COCs) asociado al desarrollo meiótico de los ovocitos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer el efecto de la progesterona en la expresión del gen de *Cx37* en los complejos cúmulo ovocitos caninos y la influencia de esta hormona sobre el desarrollo meiótico *in vitro* de los ovocitos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de la progesterona exógena sobre el desarrollo meiótico en ovocitos de perras madurados en cultivo.
2. Establecer la influencia de la progesterona sobre la expresión de *Cx37* en los COCs caninos madurados *in vitro*.
3. Estimar la relación entre la maduración meiótica de los ovocitos y la expresión del gen de *Cx37*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Las muestras fueron procesadas y obtenidas según el protocolo aprobado por los comités de bioética de FONDECYT y FAVET, con el consentimiento informado de los dueños de las perras donantes.

### **1. Recolección de muestras**

Los ovarios para este estudio se recolectaron de 60 perras entre 6 meses a 4 años de edad, no preñadas, clínicamente sanas en diferentes estados del ciclo estral, luego de ovariectomía de rutina, realizadas en los Centro de Atención primaria Santo Tomás y centro de Salud Veterinaria El Roble, Universidad de Chile. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina 0,9% NaCl suplementada con 50 µg/mL de estreptomina, 100 UI de penicilina G sódica (De los Reyes *et al.*, 2012) en un termo a 38 °C.

En el laboratorio los ovarios se lavaron y se mantuvieron en solución buffer fosfato salina (PBS) (KCl 0.02%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.142%, NaCl 0.9%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024% en agua MILLI-Q) a un pH entre 7,2 – 7,4. Se seleccionaron los ovarios que no presentaron alteraciones visibles como quistes, tumores o malformaciones de cualquier índole y las muestras fueron procesadas en un tiempo menor a dos horas desde la cirugía.

### **2. Procesamiento de muestras, obtención de los complejos cúmulo ovocitos (COCs)**

Los ovarios -120 en total- se depositaron en placas Petri (#351008, Falcon, USA) desechables en solución PBS, donde se realizaron pequeños cortes superficiales con un bisturí para visualizar los folículos; se obtuvieron ovocitos con sus células del cúmulo (COCs) sólo de folículos antrales (≈ 0.2 – 6 mm). Los COCs se seleccionaron mediante una lupa estereoscópica (Motic SMZ-171B, Hong Kong, China) en base a criterios morfológicos descritos (De los Reyes *et al.*, 2005): citoplasma oscuro y homogéneo, con un diámetro del ovocito mayor a 100 µm y con tres o más capas de las células del cúmulo rodeando al ovocito.

Los COCs recolectados se transfirieron con una pipeta pasteur de punta fina a nuevas placas Petri (Falcon) con medio de cultivo tisular TCM 199: sal de Earle, tamponada con

25 mM HEPES) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 0,25 mM de piruvato (Sigma, St. Louis, MO, USA), previamente entibiado a 38 °C y calibrado a 7,4 de pH. De esta forma los ovocitos se llevaron a la sala de cultivo bajo ambiente de esterilidad.

En la sala de cultivo, bajo la cámara de flujo laminar horizontal (Quimis, Diadema, Brasil), utilizando una lupa estereoscópica (Meiji Techno SKT, Miyoshi, Iruma Japón) los COCs se lavaron dos veces, utilizando una pipeta preparada para ovocitos, en placas de cultivo (Falcon, 3008) con un medio base constituido por TCM 199: sal de Earle, 25 mM HEPES, suplementado con Suero Fetal Bovino 10% (FCS) (Sigma), 0,25 mM de piruvato (Sigma), 10 UI/mL de hCG (Sigma), 100 UI/mL de penicilina (Sigma), 20 mg/mL de estreptomicina (Sigma) y 2 ug/mL de estradiol (Sigma) (De los Reyes *et al.*, 2021). El medio fue previamente filtrado con membrana de 0,22 µm (Biofil Syringe Filter, Hong kong, China) se dispuso en la estufa de cultivo (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA) por 2 horas a 38 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y máxima humedad.

Por cada réplica experimental se usaron un máximo de 10 COCs por gota de 100 µL del medio de cultivo, utilizando 3 grupos bajo las siguientes condiciones:

- Medio Control: Medio base TCM-199 suplementado, mencionado anteriormente.
- Medio base TCM-199 suplementado más 50 µg/mL de Progesterona (P7556, Sigma).
- Medio base TCM-199 suplementado más 100 µg/mL de Progesterona.

Las dosis de P4 se establecieron en base a estudios realizados en el laboratorio (De los Reyes *et al.*, 2021), donde se observó que la concentración de esta hormona en el líquido folicular en etapa de estro alcanzó un promedio de 33,2 µg/mL.

Las gotas de cada placa de cultivo se cubrieron con aceite mineral estéril (M5904, Sigma, St. Louis, MO, USA) y se incubaron en la estufa por 72 horas a 38 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y máxima humedad de acuerdo con los protocolos establecidos previamente en el laboratorio (De los Reyes *et al.*, 2021).

Posterior a las 72 horas de cultivo, se dividieron los ovocitos en 2 grupos, el primero para evaluación del desarrollo meiótico y el segundo para análisis de la expresión génica de Cx37.

Bajo lupa estereoscópica, se extrajeron los COCs con una pipeta de punta fina y se depositaron en placas desechables (Falcon, USA) con PBS, para ser lavados y posteriormente fueron desnudados por remoción mecánica de sus células del cúmulo pipeteando suavemente con una pipeta de vidrio de calibre fino, bajo la lupa estereoscópica. Para la evaluación de la expresión del gen de Cx37, se depositaron en RNAlater® (Invitrogen TM Eugene, OR, EE.UU) para preservar la integridad del ARN y se mantuvieron en -20°C, hasta recolectar 50 ovocitos por cada réplica para la realización del RT-qPCR.

### **3. Evaluación del desarrollo meiótico**

Los ovocitos desnudados se fijaron en solución de paraformaldehído (4% en PBS) por 20 minutos y luego se depositaron en placas Petri con una pequeña cantidad de PBS, para ser lavados por 5 minutos cada vez. Posterior a los lavados, los ovocitos se incubaron en una solución 1 µg/mL 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) por 5 minutos, bajo oscuridad. Lavándose posteriormente en solución PBS por 5 minutos dos veces, para retirar el excedente de la tinción. Finalmente, los ovocitos se depositaron en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia Vectashield® (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) y se dispusieron cuatro puntos de una mezcla de parafina con vaselina a su alrededor, todo esto se cubrió con un cubreobjeto.

Los ovocitos se evaluaron en el microscopio de epifluorescencia de luz invertida (Olympus IX71, Japón) (UV emission 480 nm), equipado con una lámpara IX2-RFA y una cámara ProgRes-Capture Pro (Alympus, Tokyo, Japan) del Laboratorio de Reproducción animal. Los ovocitos se clasificaron según el estado de desarrollo meiótico descrito previamente (De Los Reyes *et al.*, 2011):

- Vesícula germinal (VG) cuando la vesícula está claramente visible.
- Reanudación meiótica (GVBD), cuando la cromatina está dispersa e iniciando la condensación.
- Metafase (MI) a telofase de la primera división meiótica, cuando los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial.

- Metafase de la segunda división meiótica (MII), presencia de cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito, con el primer cuerpo polar.

Los ovocitos con una distribución de cromatina irregular o cromatina anormal, o que se observaron degenerados y no fue posible evaluar su desarrollo no se consideraron para este estudio (De Los Reyes *et al.*, 2011).

#### **4. Extracción de ARN y Transcripción Reversa (RT) de COCs cultivados**

Se realizó RT-qPCR para evaluar la expresión del gen de *Cx37* en los complejos cúmulo ovocitos de perra. Para ello se utilizaron 600 COCs, los cuales se distribuyeron en 4 grupos de 150 COCs :1) sin maduración *in vitro*, 2) control, 3) P4 50 µg/mL y 4) P4 100 µg/mL. Para cada condición se realizaron 3 pools de muestras por grupo, cada pool con 50 COCs. Todos los procedimientos fueron realizados bajo una campana de flujo vertical y con superficies y elementos ausentes de ARNasas.

Se extrajo el ARN total de los COCs, utilizando el Kit de Purificación GeneJET ARN (# K0731, Invitrogen Thermo Fisher Scientific, <sup>TM</sup>, Eugene, OR, USA), mediante columnas de afinidad, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm obtenido se cuantificó mediante fluorometría, usando el Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen<sup>TM</sup> Eugene, OR, USA), utilizando el Kit Qubit ARN Assay ( Invitrogen<sup>TM</sup>), bajo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron rotuladas y guardadas a -80°C. Posteriormente desde el ARN extraído, se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante la reacción de transcripción reversa (RT), utilizando el SuperScript, First- Strand Synthesis System (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADNc se determinó utilizando el Kit de cuantificación Qubit® ssDNA Assay (Molecular Probes® Invitrogen<sup>TM</sup>). Una vez obtenido el ADNc, éste fue almacenado a -20 °C.

Los partidores para Cx37 que se utilizaron fueron diseñados en el laboratorio en base al genoma canino con datos obtenidos del GenBank (De los Reyes *et al.*, 2020).

**Tabla 1:** Secuencias de partidores utilizados en análisis de PCR.

Gen	Secuencia (5'- 3')	Amplicón	Referencia
Cx37	F: ACTGTCGTGGGCAAGATCTG R: GCCGAGACAGGTAGATGACG	222 pb	De los Reyes <i>et al.</i> , 2020
ACTB	F: ATTGTCATGGACTCTGGGGATG R: GCCGAGACAGGTAGATGACG	191 pb	Palomino y De los Reyes, 2016

Cx37, conexina 37; ACTB,  $\beta$ -actina; F, forward; R, reverse.

Además, se realizó la curva de calibrado para determinar la concentración óptima de los partidores para Cx37. El gen de referencia que se utilizó fue  $\beta$ -actina, ya previamente estandarizado en el laboratorio (Palomino y De los Reyes, 2016).

## 5. RT-qPCR

Se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master mix Kit (Thermo Fisher Scientific <sup>TM</sup>, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó: 6,25  $\mu$ L del Máxima SYBR Green, 0,75  $\mu$ L del partidador Forward y 0,75  $\mu$ L del partidador Reverse. La concentración de ADNc para cada muestra fue de 10 ng y se completó el volumen diferencial con agua libre de nucleasas que incluye el kit, siguiendo las indicaciones del fabricante. Todo esto fue depositado en ecoplates (Bibby Scientific Ltd. Stone, Staffordshire, Reino Unido) procurando una óptima homogeneización.

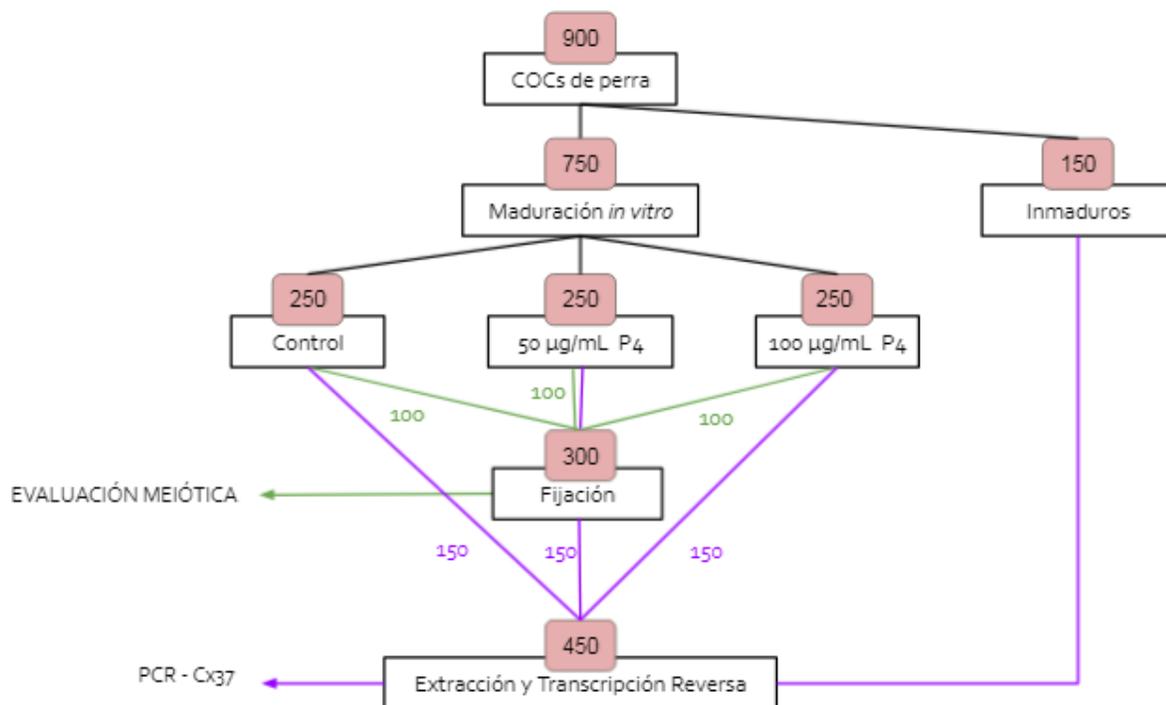
Las placas se sellaron, protegiéndolas de la luz, se centrifugaron y se dispusieron en el termociclador, utilizando el protocolo de amplificación en 3 etapas formando un ciclo, con un total 40 ciclos: la primera etapa es la desnaturalización del ADNc, que dura 15 min a 95 °C, la segunda etapa es hibridación por 30 segundos aproximadamente a 55°C (dependiendo en el Tm específico de cada par de partidador) y la etapa final es la extensión que dura 30 segundos a 72°C, mediante el uso del termociclador Illumina Eco Real Time PCR System (EC-100-1001 San Diego, CA, USA).

Los niveles de expresión génica fueron registrados como valores Ct, que corresponde al número de ciclos donde la señal de fluorescencia puede ser detectada sobre

un valor umbral. Los valores Cts promedios de cada réplica fueron calculados y transformados a valores Quantity (Q) a través del Método  $\Delta\Delta C_t$  (Wigglesworth *et al.*, 2013). Luego, la cuantificación de la expresión relativa de Cx37 fue estimada como el cociente entre el valor Q del gen analizado y el Q del gen de referencia.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental constó de 2 grupos como se muestra en la Figura 1. De un total de 900 COCs recolectados de 60 perras, 750 COCs se sometieron a maduración *in vitro* y 150 COCs se dispusieron como COCs no-madurados para evaluar la expresión del gen de Cx37 mediante PCR. De los COCs cultivados para maduración, se distribuyeron en tres grupos de 250 cada uno, de acuerdo a la suplementación con P4. Finalmente, estos grupos de 250 se dividieron en 100 COCs para evaluación del desarrollo meiótico (VG, GVBD, MI y MII) y 150 COCs para evaluación de la expresión génica de Cx37, a través de 3 réplicas en RT-qPCR, cada una con un pool aproximado de 50 COCs proveniente de un mínimo de 8 perras diferentes, en las diferentes etapas del ciclo.



**Figura 1.** Distribución de los COCs recolectados

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se recolectaron 100 COCs por cada condición a través de al menos tres réplicas experimentales para evaluar su desarrollo meiótico (VG, GVBD, MI-MII). Los porcentajes obtenidos en el desarrollo meiótico fueron transformados mediante arcoseno y las posibles diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante ANOVA y Test de Duncan, utilizando como variable la concentración de P4. Para el análisis de la expresión del gen de *Cx37* se recolectaron 150 COCs por cada condición además de contar con 150 COCs sin madurar, se realizaron 3 réplicas experimentales para el q-PCR de COCs por cada una y se utilizaron 50 COCs por cada réplica. Las diferencias en los niveles de expresión relativa del gen provenientes de los COCs no madurados y madurados *in vitro* fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) y posterior prueba de Duncan.

Se utilizó el programa InfoStat versión profesional, 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se consideró un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Evaluación del desarrollo meiótico de ovocitos madurados *in vitro*

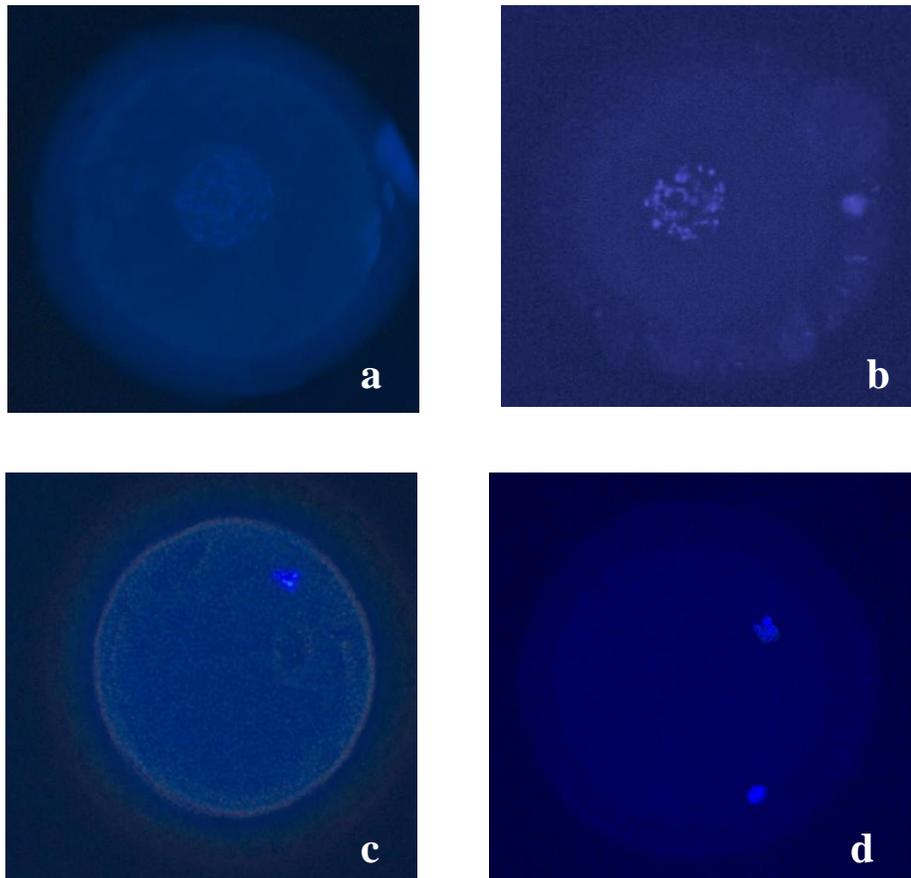
Los porcentajes de desarrollo meiótico obtenidos de acuerdo con las diferentes concentraciones de P4 a la que fueron sometidos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Porcentaje de desarrollo meiótico de ovocitos caninos madurados *in vitro* sometidos a diferentes concentraciones de progesterona.

VG, vesícula germinal; VGBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase; N°, número de ovocitos; P4, progesterona.

Tratamiento	Desarrollo Meiótico (%)				Ovocitos (N)
	VG	VGBD	MI	MII	
Control	13 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	97
50 µg/mL P4	2 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	99
100 µg/mL P4	3 <sup>b</sup>	51 <sup>c</sup>	28 <sup>c</sup>	14 <sup>b</sup>	96

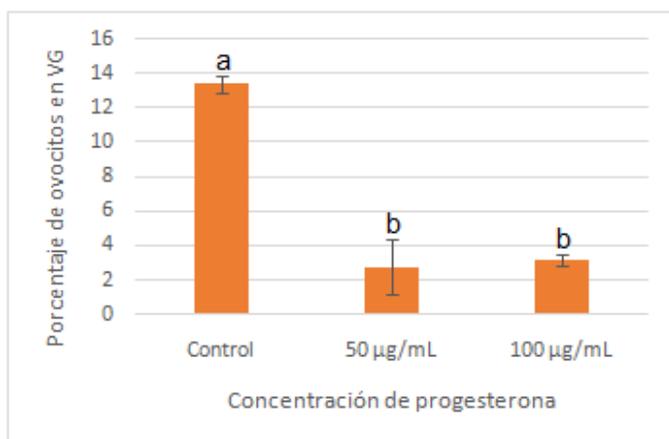
<sup>a, b, c</sup> Valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Microfotografías del desarrollo meiótico de ovocitos antrales caninos madurados *in vitro* sometidos a diferentes concentraciones de P4 teñidos con DAPI. **a**, Vesícula Germinal (VG); **b**, reanudación meiótica (VGBD); **c**, Primera metafase (MI); **d**, Segunda metafase (MII).

Se observó que luego de la maduración en cultivo y posterior evaluación de los ovocitos, estos mostraron diferencias significativas en su capacidad de reanudar la meiosis y alcanzar la segunda metafase en las diferentes condiciones.

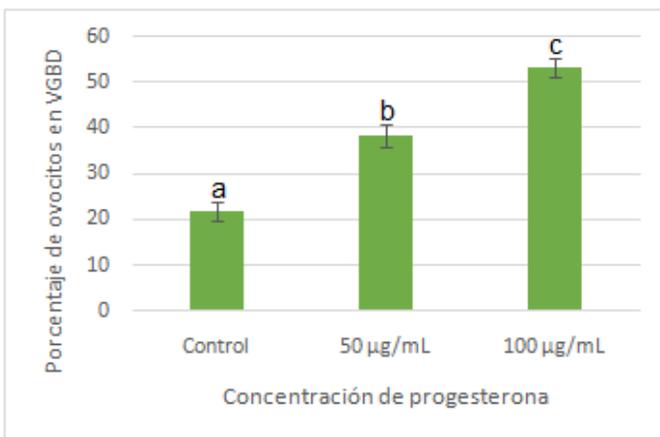
En la Figura 3 muestra el porcentaje de ovocitos que permanecieron en la etapa de vesícula germinal. El mayor porcentaje de estos se observa en la condición de control con un promedio de  $13 \pm 0,49$ . Mientras que en las dos condiciones con suplementación de progesterona este porcentaje fue menor y sin diferencias significativas, promedio P4 50  $\mu\text{g/mL}$   $2 \pm 1,58$  y P4 100  $\mu\text{g/mL}$   $3 \pm 0,29$ .



**Figura 3:** Porcentaje de ovocitos detenidos en vesícula germinal luego del cultivo con diferentes concentraciones de progesterona. VG, vesícula germinal; P4, progesterona.

<sup>a-b</sup>: Las barras con diferente letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

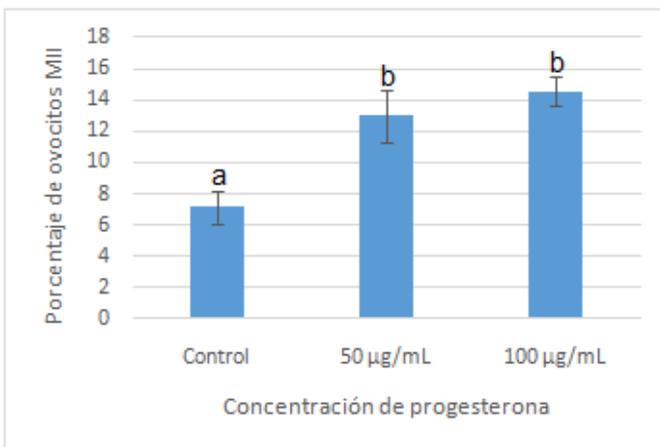
En la Figura 4, se muestra el porcentaje de ovocitos que lograron reiniciar la meiosis permaneciendo en etapa de GVBD. La menor tasa se observó en los ovocitos cultivados bajo la condición control con un promedio de  $21 \pm 2,05$  ovocitos. La media de ovocitos con 50  $\mu\text{g/mL}$  fue de  $37 \pm 2,45$  y el mayor porcentaje de reinicio meiótico se logró con la concentración de progesterona más alta, promediando de  $51 \pm 1,87$  ovocitos.



**Figura 4:** Porcentaje de ovocitos que reanudaron la meiosis luego de ser madurados en las diferentes concentraciones de progesterona. VGBD, reinicio meiótico; P4, progesterona. <sup>a-c:</sup> Las barras con diferente letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

En la Figura 5 se observa el porcentaje de ovocitos que alcanzó la etapa de segunda metafase. El menor porcentaje se observó en el control con un promedio de  $7 \pm 1,02$  ovocitos. Los mayores porcentajes se observaron en las dos condiciones de adición de P4, con medias de  $13 \pm 1,65$  para 50 µg/mL y  $14 \pm 0,94$  para 100 µg/mL, sin diferencias significativas entre ambas ( $P > 0,05$ ).

**Figura N° 5:** Porcentaje de ovocitos madurados que lograron la etapa de segunda metafase en las diferentes concentraciones de progesterona. MII, segunda metafase; P4, progesterona.

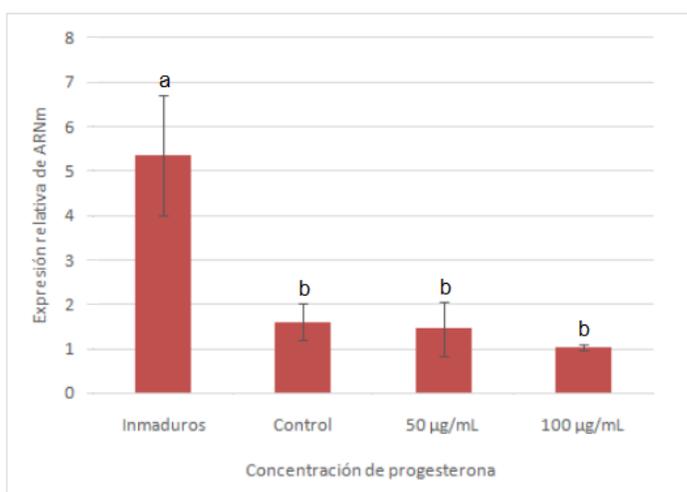


<sup>a-b:</sup> Las barras con diferente letra son significativamente diferentes.  $P < 0.05$

## 2. Niveles de ARNm de Cx37

Los niveles de expresión relativa del ARNm de *Cx37* en los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*, se muestra en la Figura 6.

Se observó una disminución ( $P < 0,05$ ) en los niveles de ARNm de *Cx37* en los ovocitos madurados *in vitro* en relación con los inmaduros, donde se evidenció una mayor expresión del gen. Bajo las diferentes condiciones de cultivo no hubo diferencias significativas.



**Figura 6:** Expresión relativa del gen de *Cx37* en los complejos cúmulo-ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* sometidos a diferentes concentraciones de P4. *Cx37*, conexina 37; P4, progesterona.

<sup>a-b</sup>: Las barras con diferente letra son significativamente diferentes.  $P < 0,05$

## DISCUSIÓN

Los folículos y ovocitos preovulatorios caninos son expuestos a altas concentraciones de P4, la que está presente en el ambiente pre y post ovulatorio (Willingham-Rocky *et al.* 2003; De los Reyes *et al.* 2021), siendo esto una de las características notables en el ciclo reproductivo canino. En el presente estudio se maduraron ovocitos caninos *in vitro* con la adición exógena de dos diferentes concentraciones de P4, basándose en los niveles intrafoliculares de esta hormona descritos recientemente (De los Reyes *et al.*, 2021) y se compararon con una condición control sin suplementación de P4. Se encontró que luego de la adición de esta hormona a los cultivos hubo un mayor porcentaje de ovocitos que reanudaron la meiosis respecto al control y, además, lograron alcanzar mayores porcentajes de MII.

Trabajos previos han mostrado resultados contradictorios en relación con la adición de P4 y la maduración de los ovocitos caninos. Algunos estudios han demostrado un efecto positivo de la adición de la hormona (Kim *et al.*, 2005; Evecen *et al.*, 2011); en cambio, otros no han logrado un mayor porcentaje de maduración (Willingham-Rocky *et al.*, 2003, Vannucchi *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2020). La P4 ha sido la hormona más comúnmente mencionada en la activación del factor promotor de la maduración, que a su vez promueve la degradación de las vesículas germinales (GVBD) en los vertebrados inferiores (Hammes, 2004). El líquido folicular con un nivel de P4 alto proporciona un microambiente óptimo para la proliferación y diferenciación de las células somáticas de la granulosa y células de la teca (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2017). Además, a través del líquido folicular los ovocitos preovulatorios están expuestos a altos niveles de P4, con concentraciones plasmáticas también elevadas (De los Reyes *et al.*, 2021).

En este estudio, el porcentaje de ovocitos que quedaron detenidos en VG, fueron predominantemente aquellos del grupo control y los que menos permanecieron en este estado fueron los que estaban expuestos a P4. Del mismo modo, los ovocitos que pudieron reanudar la meiosis y los ovocitos que alcanzaron el estado de segunda metafase, indicativo de maduración, fueron más en los grupos con P4 exógena, sugiriendo que la capacidad de reinicio meiótico y de alcanzar la etapa de MII estaría influenciada por la P4 presente en el medio al que estos son sometidos. Las menores tasas de ovocitos detenidos en etapa de VG

se obtuvieron con la adición de P4, independiente de las dosis. Esto concuerda con estudios previos (Evecen *et al.*, 2011), donde con dosis menores de P4 de las utilizadas en este estudio, igualmente se obtuvo un menor porcentaje de ovocitos detenidos en VG. Resultados similares en la maduración meiótica reportaron Apparicio *et al.*,(2014).

En relación con el reinicio meiótico, este fue mayor con la mayor concentración de P4, coincidente a lo reportado por Vannucchi *et al.*,(2009). Se ha sugerido que la alta concentración de P4 dentro del folículo podría promover la competencia meiótica del ovocito (Hu *et al.*, 2020), posiblemente a través de los receptores nucleares de P4 presente en las células del cúmulo en las etapas de proestro y estro (Gonçalves *et al.*, 2009), etapas del ciclo estral canino donde las concentraciones de P4 aumentan tanto a nivel sanguíneo como folicular (De los Reyes *et al.*, 2021), existiendo una correlación directa entre ambas y siendo considerablemente más alta a nivel folicular, sugiriendo la participación de esta hormona en la maduración del ovocito y en su reinicio meiótico.

Este papel de la P4 en la reanudación meiótica de los ovocitos también se ha estudiado en otras especies, como en ratones, donde la adición de esta hormona también ha demostrado mejorar el desarrollo meiótico de ovocitos (Bazdar y Azadbakht, 2018), y es coincidente con lo observado en porcinos por Shimada y Terada (2002), con COCs cultivados con aminoglutetimida, inhibidor de la producción de P4, observándose un aumento en la proporción de ovocitos detenido en la etapa VG, donde este efecto inhibitor sobre el reinicio meiótico es superado por la adición de P4a. Además, se ha descrito que esta hormona juega un papel positivo en la inducción de del reinicio meiótico (GVBD) en los ovocitos porcinos (Yamashita *et al.*, 2003) y el cultivo de COCs con mifepristona, antagonista de la P4, disminuye el número de ovocitos que alcanza la etapa de MII (Nagyova *et al.*, 2014).

No obstante lo anterior y aunque se ha demostrado que la inhibición de la expresión de los receptores nucleares  $\alpha$  y  $\beta$  de P4 frena la reanudación meiótica y la expansión de las células del cúmulo en cerdos (Shimada *et al.*, 2004), el papel de esta hormona y sus receptores en la maduración de los ovocitos aún no está del todo claro. La producción de P4 por las células de la granulosa del folículo preovulatorio en perra aumenta notablemente antes y durante el peak de LH (Willingham *et al.*, 2003), esto hace que la relación

estradiol/progesterona disminuya a través del proestro/estro (Concannon, 2011), coincidiendo con la reanudación de la meiosis y la maduración del ovocito, sugiriendo un papel de la P4 en este proceso (Apparicio *et al.*, 2011). Sin embargo, también se ha sugerido que el aumento pre-ovulatorio de P4 intrafolicular inducida por la LH, participa en la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) en los folículos caninos (De los Reyes *et al.*, 2021). Esta enzima cataliza la oxidación de ácido araquidónico a prostaglandina PGE-2, la que podría retrasar el reinicio meiótico y en trabajos recientes se ha demostrado un incremento significativo de COX-2 preovulatorio en folículos caninos (De los Reyes *et al.*, 2021).

En este estudio los ovocitos en cada grupo de maduración se cultivaron con niveles constantes de P4, dando como resultado una mayor tasa de MII en aquellos cultivados con esta hormona. Estudios en ovocitos caninos suplementados con P4 en medios bifásicos, indican que los ovocitos alcanzan porcentajes similares de MII en comparación con los expuestos a sistemas tradicionales (Apparicio *et al.* 2014). En el oviducto, también se ha descrito la presencia de receptores nucleares de P4, registrándose un aumento del gen de este receptor después de la ovulación (Palomino *et al.*, 2021), lo que sugiere una posible relación entre la P4 a través de sus receptores en el oviducto y la maduración del ovocito canino (Tahir *et al.*, 2013). Se ha descrito en caninos que la mayor proporción de ovocitos maduros se recolectó cuando las concentraciones de P4 en el plasma sanguíneo fueron de 40 a 50 ng/mL (Kim *et al.*, 2017), momento en que los ovocitos ya se encuentran en el oviducto, pudiendo la P4 estimular este proceso de maduración de los ovocitos caninos.

En bovinos la adición de P4 al cultivo promueve el crecimiento de ovocitos de folículos antrales y aumenta los niveles de ARNm del factor de maduración de ovocitos (cMos) (Bezerra *et al.*, 2020), el cual se ha descrito que regula positivamente la actividad del factor promotor de maduración (MPF) (Hanai *et al.*, 1997). Además, en otro estudio en esta misma especie se ha observado que la P4 aumenta los niveles de ARNm para el factor de crecimiento diferencial 9 (GDF9) y ciclina B1 en ovocitos madurados *in vitro* (Paulino *et al.*, 2020). Por lo tanto, el rol de la P4 en el reinicio meiótico podría atribuirse a su efecto sobre la proteína quinasa MOS y/o a su efecto sobre el GDF9 y ciclina B1, ya que ellos

pueden ser importantes para la adquisición de su competencia, dado que GDF-9 se ha probado en caninos que favorecería la maduración meiótica *in vitro* (García *et al.*, 2019)

Otro mecanismo por el cual la P4 podría estar mediando la maduración de los ovocitos es a través de la adenilato ciclasa, ya que esta es inhibida por la P4 (Wang *et al.*, 2014). Cuando se activa la adenilato ciclasa, esta cataliza la formación de AMPc a partir de ATP, lo que conduce a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (Clemens *et al.*, 2009). El AMPc es un segundo mensajero involucrado en muchas funciones celulares (Russell *et al.*, 2016). En ovocitos de mamíferos, el AMPc mantiene el arresto meiótico mediante la inactivación del factor promotor de maduración y la estimulación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) (Russell *et al.*, 2016). Por lo tanto, la P4 indirectamente reduciría los niveles intracelulares de AMPc, a través de la inhibición de la adenilato ciclasa, que luego conduciría a la maduración meiótica de los ovocitos (Zabihi, *et al.*, 2021).

El presente estudio también evaluó el posible efecto de la P4 exógena durante la maduración *in vitro* sobre la expresión del gen que codifica para la Cx37. Las comunicaciones tipo gap-junctions mediadas por Cx37 en los COCs son esenciales ya que participan como reguladoras en el arresto meiótico, la maduración citoplasmática y el reinicio meiótico del ovocito (Zhang *et al.*, 2010). Se observó una menor expresión del gen de Cx37 en los COCs sometidos a maduración *in vitro* en comparación a aquellos no sometidos a cultivo. La menor expresión génica de Cx37 de los COCs cultivados es concordante con los resultados *in vivo* en esta especie (De los Reyes *et al.*, 2020), donde los ovocitos caninos ovulados mostraron menor expresión del gen de Cx37 en relación con los pre-ovulados, lo que coincidiría con el reinicio meiótico tardío en la perra.

Estudios por microscopía electrónica de transmisión han descrito que a los tres días posterior a la ovulación disminuye la comunicación ovocito-células del cúmulo canino en ovocitos que alcanzaron MII (Viaris de Lesegno *et al.*, 2007) y el análisis del gen de Cx37 mediante PCR en COCs caninos también ha mostrado una disminución luego de la ovulación asociado a una disminución en la abundancia de Cx37 en las proyecciones transzonales de COCs ovulados (De los Reyes *et al.*, 2020). Estos datos de expresión sugieren que la pérdida de conexión entre el ovocito y sus células del cúmulo comienza con

una reducción de Cx37 en los COCs ovulados. Por lo tanto, esto implicaría una disminución de los niveles de AMPc en los ovocitos, lo que conduciría al desarrollo meiótico a nivel oviductal, esto porque se produce la retracción de las TZP antes de la etapa de degradación de la vesícula germinal ( Lei *et al.*, 2018).

*In vitro* no se encontraron diferencias en la expresión del gen de Cx37 en los COCs madurados con la adición de P4, observándose una baja expresión de la Cx37 en los tres grupos experimentales luego del cultivo, siendo significativamente menor en relación con los COCs no sometidos a maduración. Si bien existe evidencia en otras especies de que la P4 puede modificar la expresión génica de conexinas (Petrocelli y Lye, 1993), en este estudio no se observó un efecto directo de la adición de P4 en la expresión de la Cx37.

En células de la granulosa canina obtenidas de folículos antrales de perras en diferentes etapas del ciclo estral y cultivadas *in vitro* con P4, se presenta una disminución de la expresión del gen de la Cx37 sólo en la etapa de anestro (datos no publicados), lo que podría indicar una regulación de esta hormona en forma diferencial, lo que no se determinó en este trabajo.

La IVM con la adición de P4 mejoró los porcentajes de MII de los ovocitos y hubo una disminución importante de los niveles de expresión génica de Cx37 posterior al cultivo, por lo que se sugiere que los mayores porcentajes de MII alcanzados podrían relacionarse con los menores niveles de expresión del gen de Cx37, ya que al disminuir esta proteína se altera la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo, lo que permitiría la consiguiente disminución del flujo de GMPc hacia el ovocito, y por lo tanto, la activación de la fosfodiesterasa, que a su vez disminuiría los altos niveles de AMPc que mantienen el arresto meiótico. No obstante, la disminución de la expresión de este gen no estaría directamente influenciada por la adición de la P4 exógena a los cultivos.

En conclusión, la P4 podría estar contribuyendo a la maduración nuclear de los ovocitos caninos por vías independientes a Cx37. Además, la maduración *in vitro* disminuye la expresión génica de esta conexina.

## BIBLIOGRAFÍA

- **AKISON, L.; ROBKER, R.** 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.
- **APPARICIO, M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, LC.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T.** 2011. Expression, regulation and function of genomic and non-genomic progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* 84, 910–921.
- **APPARICIO, M.; MOSTACHIO, G.; MOTHEO, T.; ALVES, A.; PADILHA, L.; PIRES-BUTLER, E.; SAVI, P.; USCATEGUI, R.; LUVONI, G.** 2014. Distribution of cortical granules and meiotic maturation of canine oocytes in bi-phasic systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 27 (7): 1082-7.
- **BAZDAR, A.; AZADBAKHT, M.** 2018. Effect of progesterone on survival, *in vitro* growth and *in vitro* maturation of follicle derived from mouse polycystic ovary. *Acta Endocrinol*, 14(3): 307–314.
- **BEZERRA, F.; PAULINO, L.; SILVA, B.; SILVA, A.; SOUZA, A.; SILVA, J.** 2020. Effects of epidermal growth factor and progesterone on oocyte meiotic resumption and the expression of maturation-related transcripts during prematuration of oocytes from small and medium-sized bovine antral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, 32 (14): 1190-1199.
- **BOROWCZYK, E; JOHNSON, M; BILSKI, J; BOROWICZ, P; REDMER, D; REYNOLDS, L; GRAZUL-BILSKA, A.** 2006. Gap junctional connexin 37 is expressed in sheep ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 30:223–230.
- **BRAMBILLASCA, F.; GUGLIELMO, M.; COTICCHIO, G.; RENZINI, M.; DAL CANTO, M.; FADINI, R.** 2013. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30 pp. 1531-1539.
- **CAMPEN, K.; CLARK, Z.; OLDS, M.; MCNATTY, K.; PITMAN, J.** 2016. The *in vitro* effects of cAMP and cGMP modulators on inter-cellular dye transfer and gene

expression levels in rat cumulus cell-oocyte complexes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 420, pp. 46-56

- **CARABATSOS, M.; SELBITTO, C.; GOODENOUGH, D.; ALBERTINI, D.** 2000. Oocyte granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology*, 226, 167–179.
- **CHASTANT-MAILLARD, S.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; MEYLHEUC, T.; FONTBONNE, A.; CHODKIEWICZ, M.; SAINT-DIZIER, M.; REYNAUD, K.** 2011. The canine oocyte: uncommon features of *in vivo* and *in vitro* maturation. *Reprod Fert Develop* 23: 391–402.
- **CLEMENS, D.; LEE, BY.; HORWITZ, M.** 2009. *Francisella tularensis* Phagosomal Escape Does Not Require Acidification of the Phagosome. *Infection and Immunity*, 77(5): 1757–1773.
- **CONCANNON, P.** 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124: 200 – 210.
- **CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A.; OH, J.** 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356 (1–2), 65–73.
- **DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, J.; BARROS, C.** 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 64:1-11.
- **DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; HIDALGO, M.; SAFFIE, P.** 2011. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 75: 346 – 353.
- **DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; VERGARA, J.** 2012. Sperm nuclear decondensation after *in vitro* and *in vivo* maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 98-101.
- **DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; GALLEGOS, C.; ESPINOZA, R.; DETTLEFF, P.; PERALTA, O.; PARRAGUEZ, V.; RAMIREZ, G.** 2020. Gene and

protein expression of connexins 37 and 43 in cumulus oocytes complexes throughout the canine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(11) 976-987.

- **DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; ARAUJO, A.; FLORES, J.; RAMIREZ, G.; PARRAGUEZ, V.; ASPEE, K.** 2021. Cyclooxygenase 2 messenger RNA levels in canine follicular cells: interrelationship with GDF-9, BMP-15, and progesterone. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106529.
- **EVECEN, M.; CIRIT, U.; DEMIR, K.; HAMZAOGLU, A.; BAKIRER, G.; PABUCCUOGLU, S.; BIRLER, S.** 2011. Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dog oocytes. *Theriogenology* 75, 1647–1651.
- **FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GÉRARD, N.** 2010. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8: p. 1.
- **FIRESTONE, G.; KAPADIA, B.** 2012. Minireview: regulation of gap junction dynamics by nuclear hormone receptors and their ligands. *Molecular Endocrinology*, 26(11):1798-807.
- **GARCIA, P.; ASPEE, K.; RAMÍREZ, G.; DETTLEFF, P.; PALOMINO, J.; PERALTA, O.; PARRAGUEZ, V.; DE LOS REYES, M.** 2019. Influence of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, Volume 54, Issue 2, pp. 373-380.
- **GERSHON, E; PLAKS, V; DEKEL, N.** 2008. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282: 18–25.
- **GONÇALVES, J.; VANNUCCHI, C.; BRAGA, F.; PAULA-LOPES, F.; MILAZZOTTO, M.; ASSUMPÇÃO, M.; VISINTIN, J.** 2009. Oestrogen and Progesterone Receptor Gene Expression in Canine Oocytes and Cumulus Cells Throughout the Oestrous Cycle. *Reproduction in Domestic Animals* 44 (Suppl. 2), 239–242.
- **HAMMES, S.** 2004. Steroids and oocyte maturation—a new look at an old story. *Molecular Endocrinology* Volume 18, Issue 4, April 2004, Pages 769-775.

- **HANAI, K.; SUGANUMA, N.; KIKKAWA, F.; FURUHASHI, M.; TOMODA, Y.**1997. Effects of Gonadotropin, Estrogen, and Progesterone on *c-mos* Gene Expression in Mouse Oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Obstetrics and Gynecology Research*. Volume 23, Issue 4, 389-397.
- **HOFFMAN, B.; SCHULER, H.** 2000. Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 61, 295– 312.
- **HU, M.; DU, Z.; ZHOU, Z.; LONG, H.; NI, Q.** 2020. Effects of serum and follicular fluid on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 143, 10-17.
- **KIM M, FIBRIANTO, Y.; JU-OH, H.; JANG, G.; KIM, H.; LEE, K.; KANG, S.; LEE, B.; HWANG, W.** 2005. Effects of estradiol-17b and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63, 1342–1353.
- **KIM, J.; PARK, K.; CHOI, E.; HYUN, S.; KIM, N.; JEONG, Y.; HWANG, W.** 2017. Relationship between time post-ovulation and progesterone on oocyte maturation and pregnancy in canine cloning. *Animal Reproduction Science*, volume 185, pages 75-82
- **KOWALEWSKI, M.** 2012. Endocrine and Molecular Control of Luteal and Placental Function in Dogs: A Review. *Reproduction in Domestic Animals*. Volume 47, Issue s6, 19-24.
- **KOWALIK, M.; REKAWIECKI, R.; KOTWICA, J.** 2018. Expression of membrane progestin receptors (mPRs) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and first trimester of pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology* 63: 69-76.
- **LEI, R.; BAI, X.; CHANG, Y.; LI, J.; QIN, Y.; CHEN, K.; GU, W.; XIA, S.; ZHANG, J.; WANG, Z.; XING, G.** 2018. Effects of fullereneol nanoparticles on rat oocyte meiosis resumption. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 699.

- **LI, R.; ALBERTINI, D.** 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and selforganization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (3), 141–152.
- **LYDON, J.; DEMAYO, F.; FUNK, C.; MANI, S.; HUGHES, A.; MONTGOMERY, C.; SHYAMALA, G.; CONNEELY, O.; O'MALLEY, B.** 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 15;9(18):2266-78.
- **NADEEM, L.; SHYNLOVA, O.; MESIANO, S.; LYE, S.** 2017. Progesterone Via its Type-A Receptor Promotes Myometrial Gap Junction Coupling. *Nature Research*, 7: 13357.
- **NAGYOVA' E.; SCSUKOVA, S.; KALOUS, J.; MLYNARCIKOVA, A.** 2014. Effects of RU486 and indomethacin on meiotic maturation, formation of extracellular matrix, and progesterone production by porcine oocyte-cumulus complexes. *Domestic Animal Endocrinology*, 48: 7-14.
- **PALOMINO, J; DE LOS REYES, M.** 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*, 86: 1541–1549.
- **PALOMINO, J.; FLORES, J.; RAMIREZ, G.; PARRAGUEZ, V.; DE LOS REYES, M.** 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* 11, 454.
- **PAULINO, L.; BARROSO, P.; SILVA, A.; SOUZA, A.; BEZERRA, F.; SILVA B.; DONATO, M.; PEIXOTO, C.; SILVA, J.** 2020. Effects of epidermal growth factor and progesterone on development, ultrastructure and gene expression of bovine secondary follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, Issue 142, 284-290.
- **PELUSO, J.** 2006: Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biology of Reproduction*, 75, 2–8.
- **PETROCELLI, T.; LYE, S.** 1993.Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology*, 133(1):284-90.

- **PIERSANTI, M.; LYE, S.** 1995. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology*, 136: 3571–3578.
- **RENTON, J.; BOYD, J.; ECKERSALL, P.; FERGUSON, J.; HARVEY, M.; MULLANEY, J.; PERRY, B.** 1991: Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 93, 221– 231.
- **REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*. 130:193–201.
- **REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; VIARIS DE LESEGNO, C.; SAINT- DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2006a. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology* 66:1685–1693.
- **REYNAUD, K.; SAINT-DIZIER, M.; TAHIR, M.; HAVARD, T.; HARICHAUX, G.; LABAS, V.; THOUMIRE, S.; FONTBONNE, A.; GRIMARD, B.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2015. Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilization. *Biology of Reproduction*, 93(4):87.
- **RICHARD, S.; BALTZ, J.** 2014. Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biology of Reproduction*, 90(6):137.
- **RODRÍGUEZ-CORTÉS, Y.; MENDIETA-ZERÓNA, H.** 2014. Placenta like endocrine share organ and it action in normoevolutive pregnancy. *Revista de medicina e investigación*, 2(1):28-34.
- **RODRIGES B., RODRIGUES J.** 2003. Influence of Reproductive Status on in vitro Oocyte Maturation in dogs. *Theriogenology* 60: 59 – 66.

- **RUSSELL, D.; GILCHRIST, R.; BROWN, H.; THOMPSON, J.** 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players?. *Theriogenology*. 86(1):62-68.
- **SELA-ABRAMOVICH, S.; EDRY, I.; GALIANI, D.; NEVO, N.; DEKEL, N.** 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 147, 2280–2286.
- **SHIMADA, M.; TERADA, T.** 2002. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Molecular Human Reproduction*, Volume 8, Issue 7, Pages 612–618.
- **SHIMADA, M.; NIHSIBORI, M.; YAMASHITA, Y.; ITO, J.; MORI, T.; RICHARDS, JS.** 2004: Downregulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondinlike repeats-1 by progesterone receptor is associated with impaired expression of porcine cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology* 145, 4603–461
- **SHUHAIBAR, L.; EGBERT, J.; NORRIS, R.; LAMPE, P.; NIKOLAEV, V.; THUNEMANN, M.; WEN, L.; FEIL, R.; JAFFE, L.** 2015. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(17): 5527-5532.
- **SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A.; LI, E.; PAUL, D.L.** 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385, 525–529.
- **TAHIR, M.; REYNAUD, K.; GRIMARD, B.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; SAINT-DIZIER, M.** 2013. Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 1065–1076.
- **VANNUCCHI, C.; FAUSTINO, M.; GROKE-MARQUES, M.; NICHI, M.; D'ÁVILA, M.; VISINTIN, J.** 2009. Effects of gonadotropin-exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on *in vitro* maturation of canine oocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 45:328–333.

- **VERGARA, A.** 2021. Efecto de la progesterona y factores paracrinos GDF-9 y BMP-15 en la expresión de Cx37 y Cx43 en células de la granulosa canina. Memoria de Título. Departamento de Fomento de la Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
- **VIARIS DE LESEGNO, C; REYNAUD, K; PECHOUX, C; THOUMIRE, S; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2007. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 52: 310-318.
- **WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G.** 2013. Beneficial effect of resveratrol of bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, Volume 101, Issue 2; P577-586.
- **WEBB, R.; BAINS, H.; CRUTTWELL, C.; CARROL, J.** 2002. Gap-junctional communication in mouse cumulus–oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction* 123, 41–52.
- **WIGGLESWORTH, K.; LEE, K.; O'BRIEN, M.; PENG, J.; MATZUK, M.; EPPIG, J.** 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceeding of the national academy of sciences* 110: E3723-E3729.
- **WILLINGHAM-ROCKY L., WESTHUSIN M., KRAEMER D.** 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 126: 501 – 508.
- **WINTERHAGER, E.; KIDDER, G.** 2015. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum. Reprod* 21: 340–352.
- **YAMASHITA, Y.; SHIMADA, M.; OKAZAKI, T.; MAEDA, T.; TERADA, T.** 2003. Production of Progesterone from De Novo-Synthesized Cholesterol in Cumulus Cells and Its Physiological Role During Meiotic Resumption of Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction*, Volume 68, Issue 4: 1193–1198.

- **ZABIHI, A.; SHABANKAREH, H.; HAJARIAN, H.; FOROUTANIFAR, S.** 2021. In vitro maturation medium supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental competence of Sanjabi sheep oocytes. *Livestock Science*, Volume 243.
- **ZHANG, M.; SU, YQ.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J.** 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. 330(6002):366-369.