



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

**NIVELES DE GDF-9 Y BMP-15 INTRAFOLICULAR Y SU
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN FOLÍCULOS
ANTRALES CANINOS**

Adrián Francisco Araujo Albornoz

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA
Profesora Titular, Unidad de Reproducción
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1171670-1211285

SANTIAGO, CHILE

2022



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

**NIVELES DE GDF-9 Y BMP-15 INTRAFOLICULAR Y SU
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN FOLÍCULOS
ANTRALES CANINOS**

Adrián Francisco Araujo Albornoz

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final

Firma

Profesor(a) Guía: Dra. Mónica De Los Reyes

Profesor(a) Corrector: Dr. Óscar Peralta

Profesor(a) Corrector: Dr. Víctor Martínez

SANTIAGO, CHILE

2022

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, le debo una inmensa gratitud a la Dra. Mónica De Los Reyes, por ser una excelente profesional y persona, admiro mucho su responsabilidad y orden. Le agradezco por recibirme en su laboratorio, por dejarme conocer aún más el área de la reproducción en caninos. Además de tener una paciencia enorme conmigo, y ser muy acertada en los consejos tanto académicos como personales.

También dar las gracias al Dr. Jaime Palomino, muy cercano y amigable, muchas gracias por enseñarme la parte práctica del trabajo, siempre con una predisposición envidiable a resolver las dudas.

A mis profesores correctores, el Dr. Óscar Peralta y el Dr. Víctor Martínez, gracias por su tiempo, los consejos y críticas en cada una de las presentaciones que sin eso el trabajo no hubiese terminado como lo es ahora. Además, agradecer a la Dra. María Sol Morales y Dra. Tamara Tadich, que también formaron parte de las presentaciones y aportaron con sus conocimientos y consejos a este trabajo.

Agradecer a todos los que fueron y son partícipe de mi formación profesional, ya sea docentes, ayudantes, jefes, compañeras y compañeros de trabajo, amigas y amigos que conocí en FAVET y clínicas veterinarias. A los funcionarios de la facultad, en especial a Sra. Norma San Martín, que siempre tuvo la disposición y se preocupó de tener todo en orden, junto con la Sra. Alma, como también al Tío Luis de las salas A-D, por sus buenas vibras constantes.

Gracias a mi novia, amiga y compañera Ana Vergara, por ayudarme, aconsejarme y apoyarme en todas las decisiones que he tomado estos últimos 4 años, es mi complemento que me da fuerzas para seguir adelante. Gracias a mi mamá, mi papá, mi tata, mi ita y mi tío Marco por darme una educación integral y ser lo que soy ahora. Gracias a mi hermano, que no metía ruido para que pudiera estudiar o dormir tranquilo. Y por último a las dos estrellas que tengo en el cielo por ahora: a la Dra. Constanza Yáñez, amiga que en los turnos siempre me acuerdo de ella y le pido que sea una buena jornada; y a la única mascota que he tenido y fue la razón por la cual elegí esta linda profesión, mi gato Niño, que se fue antes de tiempo y no lo alcancé a salvar, te extraño mucho.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
Ciclo Reproductivo de la perra.....	7
Factores Paracrinos GDF-9 y BMP-15.....	8
Ciclooxigenasas.....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Obtención y Clasificación de Ovarios.....	12
Procesamiento de Muestras.....	13
ELISA para análisis de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (q-PCR).....	14
Análisis Estadístico.....	17
RESULTADOS.....	18
Niveles de concentración de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular.....	18
Niveles de expresión génica de COX-2 en células de la granulosa.....	19
Relación de la expresión relativa génica de COX-2 en células de la granulosa y la concentración de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular.....	20
DISCUSIÓN.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	24

ABREVIACIONES

ACTB	Beta Actina
BMP-15	Proteína Morfogenética Ósea 15
cDNA	Cadena de Ácido Desoxirribonucleico
CGs	Células de la Granulosa
COC	Complejo Cúmulo-Ovocito
Cox	Ciclooxigenasa
Cox-1	Ciclooxigenasa 1
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
ELISA	Ensayo de Inmuno-Absorción Ligado a Enzimas
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSHR	Receptor de la Hormona Folículo Estimulante
GDF-9	Factor de Crecimiento Diferencial 9
Has-2	Hialuronidasa Sintasa 2
hCG	Hormona Coriónica Humana
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
LH	Hormona Luteinizante
LHR	Receptor de la Hormona Luteinizante
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
q-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

P ₄	Progesterona
PBS	Buffer Fosfato Salino
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
Ptx3	Pentraxina 3
Q	<i>Quantity</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Retro Transcripción
TGF-β	Factores de Crecimiento Transformantes Beta
Tnfaip6	Factor Inductor de Necrosis Tumoral 6

RESUMEN

Durante la etapa periovulatoria en los mamíferos, tanto el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9), como la Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP-15), parecieran modular la expresión de genes que participan en la expansión del complejo cúmulo-ovocito (COC) y la ovulación, dentro de los cuales se encuentra el gen que codifica para la expresión de la enzima Ciclooxygenasa 2 (COX-2), encargada de producir la Prostaglandina E2 (PGE₂). Sin embargo, esta relación que se describe en otras especies no se ha evidenciado aún en la perra. Por lo tanto, este estudio tuvo el objetivo de determinar en la perra la relación entre las proteínas GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular con la expresión génica de *Cox-2* en las células de la granulosa (CGs) en las últimas etapas del desarrollo folicular. El líquido folicular y las CGs se obtuvieron de 20 perras en total, las cuales se encontraban en proestro (n=12) y en estro (n=8). GDF-9 y BMP-15 se evaluaron en el líquido folicular mediante la técnica de inmuno-adsorción ligado a enzimas (ELISA), mientras que la expresión génica de *Cox-2* en las CGs se determinó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR). Los resultados de expresión génica de *Cox-2* y los niveles foliculares de GDF-9 y BMP-15 en proestro y estro fueron analizados mediante *T* de *Student*. La relación entre GDF-9, BMP-15 y *Cox-2* se realizó mediante un análisis descriptivo. Se comprobó que tanto GDF-9 como BMP-15 están presentes en el líquido folicular de folículos preovulatorios caninos, y hubo expresión del gen de *Cox-2* en ambas etapas del ciclo estral. Los niveles de concentración de GDF-9 entre proestro y estro no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Sin embargo, los niveles de concentración de BMP-15 disminuyeron en la etapa de estro ($P < 0,05$). En cuanto a la expresión génica de *Cox-2*, hubo un aumento relativo en CGs de folículos antrales medianos de proestro a folículos antrales preovulatorios en estro ($P < 0,05$). Sólo se observó que BMP-15 y *Cox-2* tuvieron una relación inversa durante fines del crecimiento folicular. En conclusión, los niveles de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular están presentes en los folículos caninos en proestro y estro, y la expresión del gen que codifica para la enzima COX-2 aumenta previo a la ovulación pudiendo estar involucrada en este proceso al igual que en otras especies. La disminución de BMP-15 en folículos preovulatorios estarían inversamente relacionados con los de *Cox-2*, por lo que posiblemente haya otros

factores que estén asociadas en forma directa o indirecta en el aumento de la expresión del gen.

Palabras claves: Canino, Cox-2, factores paracrinos, folículos.

ABSTRACT

During the periovulatory period in mammals, Differential Growth Factor 9 (GDF-9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) appear to modulate the expression of genes involved in the expansion of the cumulus-oocyte complex (COC) and during ovulation, including the gene encoding the enzyme Cyclooxygenase 2 (COX-2), which stimulates Prostaglandin E2 (PGE2). However, this relationship described in other species has not yet been evidenced in the bitch. Therefore, this study aimed to determine the relationship between GDF-9 and BMP-15 in follicular fluid with Cox-2 gene expression in granulosa cells (GCs) in the late stages of follicular development. Follicular fluid and GCs were obtained from 20 bitches in proestrus (n=12) and estrus (n=8). GDF-9 and BMP-15 were assessed in the follicular fluid by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while Cox-2 gene expression in GCs was evaluated by real-time polymerase chain reaction (q-PCR). The results of Cox-2 gene expression and follicular fluid levels of GDF-9 and BMP-15 in proestrus and estrus were analyzed by the Student T test comparing the proestrus and estrus phases. The relationship between GDF-9, BMP-15, and Cox-2 was descriptively analyzed. GDF-9 and BMP-15 were found in the follicular fluid in canine pre-ovulatory follicles, and the Cox-2 gene was expressed at both phases of the estrous cycle. GDF-9 levels showed no differences ($P > 0.05$) between proestrus and estrus. However, BMP-15 levels decreased in the estrous phase ($P < 0.05$). Cox-2 expression was higher in proestrus than estrus ($P < 0.05$). Only BMP-15 and Cox-2 had an inverse relationship during the final follicular stages. In conclusion, the GDF-9 and BMP-15 levels in follicular fluid are present in canines in proestrus and estrus, and the expression of the Cox-2 gene increased before ovulation which might be involved in this process as in other species. The decrease of BMP-15 in pre-ovulatory follicles was inversely related to Cox-2; thus, other factors may be associated directly or indirectly with the increase of Cox-2 gene expression.

Keywords: Canine, Cox-2, paracrine factors, follicles.

INTRODUCCIÓN

Dentro del ambiente folicular, hay una interacción importante entre el ovocito y las células somáticas que lo rodean a través de la producción y la secreción de los esteroides ováricos, como la progesterona (P₄) y estrógenos (Cavallari *et al.*, 2016). También, las señales paracrinas parecen ser determinantes importantes del desarrollo de los folículos y de los ovocitos (Otsuka *et al.*, 2011).

Durante el desarrollo folicular, el folículo pasa de una etapa pre antral a una antral con la formación del líquido folicular, que es un fluido producido por las células de la granulosa, ovocito y transudado sanguíneo (Fahiminiya *et al.*, 2010; Iwata, 2017), donde se encuentran los factores necesarios para el desarrollo del folículo y de los ovocitos (Fahiminiya *et al.*, 2010). El contenido del líquido folicular incluye hormonas, proteínas, péptidos, aminoácidos y moléculas con capacidades antioxidantes y antiapoptóticas (Iwata, 2017). Dentro de las proteínas se ha descrito la presencia del Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15), pertenecientes a la súper familia de Factores de Crecimiento Transformantes Beta (TGF- β). Estas proteínas desempeñarían un rol fundamental en la fertilidad, de acuerdo a diversos estudios (Elvin *et al.*, 1999a; McNatty *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009) incluyendo a los caninos (García *et al.*, 2019), siendo esenciales para el crecimiento y desarrollo folicular, así como para la formación y maduración del ovocito (Cavallari *et al.*, 2016).

Se ha descrito en ratones que ambos factores, BMP-15 y GDF-9, parecieran estimular la síntesis de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), encargada de promover la síntesis de la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Elvin *et al.*, 1999b; Pangas y Matzuk, 2005), aumentando así la producción de PGE₂, lo que sugiere que estas proteínas podrían participar en la ovulación (Liu *et al.*, 2009). También, se ha demostrado en vacas que la P₄ regula la expresión de RNA mensajero (mRNA) de *Cox-2*, previo a la ovulación (Bridges *et al.*, 2006). La perra presenta niveles de P₄ preovulatorios altos, y estudios previos han demostrado que ambas proteínas, GDF-9 y BMP-15 (Fernández *et al.*, 2016), y sus genes (Palomino y De Los Reyes, 2016), disminuyen a nivel de las células de la granulosa y en el ovocito previo a la ovulación. Adicionalmente, hay estudios que señalan que PGE₂, regula el reinicio meiótico del ovocito

antes de la ovulación (Takahashi *et al.*, 2006). El ovocito canino no reinicia la meiosis previa a la ovulación, como en las otras especies, por lo que ovula un gameto inmaduro, en estado nuclear de primera profase meiótica (De Los Reyes *et al.*, 2013). La relación entre GDF-9 y BMP-15 con el gen *Cox-2* es poco conocida en perros, y considerando los aspectos diferenciales que presenta la reproducción canina, especialmente en el período preovulatorio, este trabajo plantea evaluar y relacionar los niveles de GDF-9 y BMP-15 con la expresión del mRNA de *Cox-2* hacia finales del desarrollo folicular en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ciclo Reproductivo

La hembra canina presenta un ciclo estral de tipo monoéstrico no estacional que, al compararla con otras especies domésticas de mamíferos, se aprecian algunas particularidades en su fisiología reproductiva (Concannon, 2011), como la luteinización folicular preovulatoria con el consiguiente aumento de la concentración de P₄ en el líquido folicular y en sangre (Fahiminiya *et al.*, 2010; Concannon, 2011; De Los Reyes *et al.*, 2021), expansión de las células del cúmulo tardía (De los Reyes *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2020), y la ovulación de un ovocito inmaduro, en la etapa de dictioteno de la primera profase de la meiosis, por lo que la maduración del ovocito ocurre 48–72 horas post ovulación en el oviducto (De Los Reyes *et al.*, 2013). El proceso de maduración final de los ovocitos en los oviductos depende en gran medida del período preovulatorio, debido a que la capacidad meiótica de los ovocitos se adquiere durante la foliculogénesis (Palomino y De Los Reyes, 2016). A su vez, el crecimiento folicular depende de la relación entre los componentes somáticos (células de la teca y la granulosa) y el ovocito (Cavallari *et al.*, 2016). Los factores de señalización que interactúan entre el ovocito con las células de la granulosa que lo rodean son esenciales para inducir y regular el desarrollo meiótico en mamíferos (García *et al.*, 2019), así como también, son críticos para lograr un ovocito adecuado para una fecundación normal (Lin *et al.*, 2014).

Factores Paracrinos GDF-9 y BMP-15

Dentro de los factores paracrinos presentes en los folículos de los mamíferos destacan el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15), ambos miembros de la súper familia de Factores de Crecimiento Transformantes beta (TGF- β) (Cavallari *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2016). Se ha informado en roedores que BMP-15 y GDF-9 se expresan sólo en ovocitos, sin embargo, estas proteínas también se expresan en las células del cúmulo y células de granulosa en diversas especies, incluido en caninos (Fernández *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2020).

Estas proteínas desempeñan un rol fundamental en el funcionamiento de los ovarios y son primordiales para los procesos de maduración de los ovocitos, ovulación, fecundación y luteinización en mamíferos (Cavallari *et al.*, 2016; García *et al.*, 2019). Además, están involucrados en la esteroidogénesis y la diferenciación de las células de cúmulos y granulosa (McNatty *et al.*, 2005), por lo que promueven la proliferación de las células del folículo a través de la inhibición de la apoptosis.

La proteína GDF-9 es un factor de crecimiento y diferenciación celular considerado esencial para el proceso normal de la foliculogénesis, tanto en las fases tempranas como tardías del desarrollo (Otsuka *et al.*, 2011). Actúa en las células somáticas de manera paracrina donde estimula los cambios en la morfología, la expresión génica y la producción de esteroides (Palma *et al.*, 2012).

El factor paracrino BMP-15 estimula la proliferación de las células de la granulosa, por lo que también regula la producción de hormonas esteroidales (Paulini, 2010). Además, BMP-15 inhibiría la producción de P₄ estimulada por FSH en células de granulosa a través de la inhibición de la expresión del receptor de FSH (FSHR) en ratas (Otsuka *et al.*, 2001), como también en rumiantes (McNatty *et al.*, 2005). Adicionalmente, estimula la expresión de otro factor, el Ligando Kit, el cual inhibe a su vez a BMP-15, generando una retroalimentación entre el ovocito y las células que lo rodean, lo que permite una regulación efectiva de la proliferación de las células de la granulosa y el crecimiento del ovocito (Otsuka *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que GDF-9 y BMP-15 (Fernández *et al.*, 2016), como sus genes (Palomino y De Los Reyes, 2016), se expresan en los folículos caninos a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo folicular en forma diferencial mostrando una disminución en los folículos preovulatorios, lo que también se ha comprobado a nivel del complejo cúmulo-ovocito (COC) caninos madurados *in vitro* (De Los Reyes *et al.*, 2013). Esto se ha relacionado con el patrón de mucificación tardío de las células del cúmulo y el aumento de P₄ preovulatoria, características particulares del ciclo reproductivo de la perra (Fernández *et al.*, 2016; Palomino y De Los Reyes, 2016; De Los Reyes *et al.*, 2021).

Se han evidenciado en estudios *in vitro* utilizando suplementación con GDF-9 y BMP-15 recombinante, que ambas proteínas influyen en el desarrollo meiótico y embrionario en el ratón (Yeo *et al.*, 2008), en bovinos (Hussein *et al.*, 2005), y también en caninos (García *et al.*, 2019). Por otro lado, la supresión de estos factores provoca una reducción significativa en los niveles de mRNA de *Cox-2*, Pentraxina 3 (*Ptx3*), Factor inductor de necrosis tumoral 6 (*Tnfaip6*) y Hialuronidasa sintasa 2 (*Has2*) en cerdas (Lin *et al.*, 2014) y ratón (Elvin *et al.*, 1999b); involucrados en la expansión de las células del cúmulo, considerado un fenómeno necesario para el reinicio meiótico (Takahashi *et al.*, 2006). En humanos, niveles bajos de estas proteínas se han asociado además con subfertilidad, daño a la ovulación o insuficiencia ovárica (Inagaki y Shimasaki, 2010).

Estudios en otras especies indican que tanto GDF-9 como BMP-15 inhiben la secreción de P₄ estimulada por gonadotropinas (Gode *et al.*, 2011). La perra presenta una luteinización folicular previo a la ovulación, por lo que existe un aumento en los niveles de P₄ durante las últimas fases del desarrollo folicular (Concannon, 2011); que se ha asociado a la disminución de los niveles de GDF-9 y BMP-15 en las células foliculares caninas (De Los Reyes *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2016).

Ciclooxigenasas

Las ciclooxigenasas (COX) o prostaglandina-endoperóxido sintasa (Ptgs) son enzimas que catalizan la síntesis de las prostaglandinas (PGs), a través de la oxidación del ácido araquidónico (Alexanian y Sorokin, 2017). Existen dos formas de COX: la ciclooxigenasa 1 (COX-1), que se expresa de forma constitutiva; y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que es

inducida por factores de crecimiento, citoquinas y estímulos proinflamatorios (Cabrera *et al.*, 2006; Alexanian y Sorokin, 2017).

Se ha comprobado que las enzimas COX-1 y COX-2 se encuentran presentes en el ovario de los mamíferos (Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios en roedores, indican que COX-1 presenta niveles casi nulos cercano a la ovulación (Cabrera *et al.*, 2006). En cambio, en etapas preovulatorias, la expresión de *Cox-2* aumenta considerablemente en respuesta al alza de gonadotropinas en las células de la granulosa y del cúmulo (Alexanian y Sorokin, 2017). Debido al aumento de COX-2 y sus factores asociados, la ovulación se ha considerado como una reacción inflamatoria autocontrolada, que implicaría un aumento en la producción de PGs (Liu *et al.*, 2009). Además, esta enzima está involucrada en la expansión del cúmulo en folículos de bovino, equino y ratón (Cabrera *et al.*, 2006). En ratones se describe que COX-2 cumple un rol fundamental en la ovulación, ya que se ha demostrado que las hembras deficientes de esta enzima son infértiles por la falta de ovulación (Liu *et al.*, 2009).

En roedores, GDF-9 y BMP-15 participarían en la expresión de *Cox-2* cercano a la ovulación (Elvin *et al.*, 1999; Pangas y Matzuk, 2005). En bovinos, se ha descrito que la P₄ también regula el mRNA de *Cox-2* a través de su receptor (Bridges *et al.*, 2006). En caninos estos mecanismos regulatorios son poco conocidos. Estudios recientes han demostrado en perras que la adición de GDF-9 y BMP-15 recombinante al cultivo de ovocitos y células del cúmulo, incrementan significativamente la expresión génica de *Cox-2* (De Los Reyes *et al.*, 2021). El incremento de la P₄ antes de la ovulación junto con la disminución de GDF-9 y BMP-15 a nivel folicular podrían estar asociadas a los cambios en los niveles de esta enzima, fundamental para la ovulación y los mecanismos involucrados en el reinicio y desarrollo meiótico.

HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular canino entre proestro y estro, estarán asociados con los cambios en la expresión génica de *Cox-2* en las células foliculares.

OBJETIVO GENERAL

Determinar en folículos ováricos caninos en las últimas etapas de desarrollo folicular, los niveles de expresión génica de *Cox-2* y las concentraciones de factores paracrinicos GDF-9 y BMP-15, y su posible asociación en las últimas etapas de desarrollo folicular previo a la ovulación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia y posibles variaciones en los niveles de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular de perras comparando las etapas de proestro y estro.
2. Determinar los niveles de expresión génica de *Cox-2* hacia el final del desarrollo folicular en caninos y su variación previa a la ovulación.
3. Evaluar el posible cambio de los transcritos de *Cox-2* en células foliculares en relación con los niveles de BMP-15 y GDF-9 en el líquido folicular canino en las últimas etapas del desarrollo folicular.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), y en el laboratorio de Fisiología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile. Las muestras fueron obtenidas y procesadas de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Bioética del Fondo de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) y por el Comité de Bioética de FAVET.

1. Obtención y clasificación de ovarios

Se utilizaron ovarios de 20 perras adultas, no gestantes y clínicamente sanas. Los ovarios fueron extraídos mediante ovariectomía de rutina realizadas en el Centro de atención primaria de mascotas Santo Tomás y en el Centro de Atención Primaria para Mascotas Pablo de Rokha, en la comuna de La Pintana, Santiago de Chile. Los ovarios se transportaron al laboratorio de Reproducción Animal de FAVET en solución salina 0,9% NaCl, suplementada con 100 UI de penicilina G sódica (Sigma #K5021, ST. Louis, MO, USA) y 50 µg/mL de estreptomina (Sigma #S-9137), pH 7,4 y 37 °C, donde fueron procesados en un tiempo menor a dos horas desde la cirugía.

En el laboratorio, los ovarios se desprendieron del tejido conectivo con una tijera, y luego fueron colocados en una placa petri (5058541, Normax, Vimaroni, Santiago, Chile) con solución buffer fosfato salino (PBS) (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO 1mM, KH₂PO, pH 7,4) previamente entibiado. Las muestras fueron enumeradas, fotografiadas (Canon Power Shot G15, Canadá) y registradas para su posterior seguimiento.

Para este estudio, se utilizaron ovarios sin signos de degeneración ni patologías visibles macroscópicamente. La etapa del ciclo estral de cada ovario se determinó mediante el análisis de las estructuras en la superficie ovárica. Los ovarios en las etapas de proestro y estro fueron seleccionados para el estudio. Se calificó como proestro cuando en el ovario predominaron los folículos antrales medianos (0,4 mm – 3,9 mm de diámetro), y estro cuando predominaron los folículos antrales grandes o preovulatorios (4 mm – 1 cm de diámetro) (Fernández *et al.*,

2016). Además, se obtuvo una muestra de 2 mL de sangre de cada hembra canina, mediante canulación durante la cirugía, para medir posteriormente en el laboratorio las concentraciones de P₄ plasmática (Prog ELISA Kit; MyBioSource, San Diego, CA, USA), y así corroborar el estado del ciclo estral de la donante, de acuerdo a lo descrito por el fabricante.

2. Procesamiento de muestras

2.1 Recolección líquido folicular para análisis de GDF-9 y BMP-15

Los ovarios de perras en etapa de proestro (24) y estro (16) fueron depositados separadamente en placas Petri bajo una lupa estereoscópica (SMZ-171B, Motic, Hong Kong, Knowloon, China) y, sosteniendo el ovario con una pinza anatómica se efectuó la aspiración de líquido folicular desde los folículos antrales (previamente categorizados en el párrafo anterior) utilizando una pipeta pasteur de punta fina, depositando el líquido folicular a un tubo eppendorf de 1,5 mL, el que se centrifugó a 2.300 rpm por 5 minutos (Centrifugate 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Luego, las muestras del sobrenadante se congelaron en *pooles* separadamente de acuerdo a su estado del ciclo de proestro y estro a -20 °C hasta su uso.

2.2 Obtención de células de la granulosa para análisis de mRNA de *Cox-2*

Los ovarios en cada réplica experimental se depositaron en unas placas petri y a través de la visualización con una lupa estereoscópica se les realizaron cortes finos en la corteza ovárica utilizando una hoja de bisturí N°21 para la localización de los folículos en proestro. En entro, se determinaron directamente desde la superficie ovárica los folículos preovulatorios. La obtención de las células de la granulosa se realizó utilizando una jeringa de tuberculina de 29 gauge (Nipro Corporation, Miami, FL, Estados Unidos) de 1 mL, para luego trasladar las células con una pipeta pasteur de punta fina a un tubo eppendorf de 0,5 mL. Luego, la suspensión de células fue centrifugada a 2.600 rpm por 5 minutos. Posteriormente el pellet se resuspendió en una solución de RNAlater (Ambion Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos). El sobrenadante, correspondiente al líquido folicular, se utilizó para la determinación de los factores GDF-9 y BMP-15, guardándose el *pool* de acuerdo a la etapa del ciclo (proestro o estro) a -20 °C.

3. Test de Inmuno-Absorción Ligado a Enzimas (ELISA) para análisis de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular

Para este análisis se dispuso de un kit ELISA para GDF-9 canino y un kit ELISA para BMP-15 canino (MyBioSource, San Diego, California, USA). En este estudio se utilizaron las muestras de líquido folicular previamente almacenadas, provenientes de las diferentes perras, agrupándolas en proestro y estro. Cada *pool* fue de 300 uL.

El protocolo que se utilizó en las mediciones de ambas proteínas fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MyBioSource, San Diego, California, USA). En breve, ambos kits ELISA contaban de una placa con 48 pocillos, en la que se dispuso de 1 pocillo control con solución diluyente, 6 pocillos con solución estándar y 6 pocillos con sus respectivas muestras. Tanto las muestras, como el control y los estándares fueron en duplicado. De acuerdo con las etapas del protocolo, se realizaron dos incubaciones a 37°C, la primera incubación con una duración de 60 minutos luego de añadir HRP (Peroxidasa de rábano picante, el cual es el conjugado de reactivo que incluyen los ensayos) conjugado a cada pocillo. La segunda incubación con una duración de 15 minutos luego de añadir la solución que contiene el cromógeno A y la solución que incluye el cromógeno B, permitiendo que cambie la tonalidad de los pocillos de acuerdo a los niveles de la proteína que se estaba evaluando.

Finalmente, la lectura de la densidad óptica se realizó con un lector de ELISA modelo ELx800 (BioTek, Winooski, Vermont, USA) en el laboratorio de Fisiología de la Universidad Católica de Chile.

4. Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (q-PCR)

4.1 Extracción de RNA y Retro Transcripción (RT) (síntesis de cDNA)

A partir de más de 6 réplicas biológicas se hicieron 2 *pooles* de muestras de células de la granulosa para proestro y 2 para estro, las que fueron almacenadas en RNAlater. La extracción del RNA se hizo de acuerdo a lo descrito previamente en el laboratorio (Palomino y De Los Reyes, 2016), utilizando una columna de afinidad del GeneJET RNA Purification Kit (Fermentas LifeSciences, Budapest, Hungría) siguiendo las instrucciones del fabricante,

bajo una campana de flujo laminar HFsafe-1200TE (Heal Force, Shanghai, China) y en condiciones ausentes de RNAsas. El RNA extraído se cuantificó mediante fluorometría a través del aparato Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) mediante el Kit Qubit RNA Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría). Las muestras de RNA fueron posteriormente preservadas a -80°C hasta la obtención de DNA complementario (cDNA).

El RNA aislado fue tratado con DNasa 1 para eliminar el DNA genómico de las muestras y garantizar sólo el uso de RNA contemplado base y dar mayor especificidad a la reacción de RT que se realizó utilizando el conjugado enzimático SuperScript, First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Finalmente, el cDNA obtenido fue cuantificado utilizando el Kit de Qubit ssDNA Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría), para ser posteriormente almacenado a -20°C hasta su evaluación.

4.2 Diseño de Partidores

Los partidores para *Cox-2* que se utilizaron fueron diseñados por Integrated DNA Technologies Company, Coralville, Iowa, USA (Kowalewski *et al.*, 2014).

Partidor	Secuencia	Amplicón (bp)	Referencia
<i>ACTB</i>	F: 5'-ATTGTCATGGACTCTGGGGATG-3' R: 5'-TCCTTGATGTCACGCACGAT-3'	191	Palomino y De Los Reyes, 2016
<i>COX-2</i>	F: 5'-GGAGCATAACAGAGTGTGTGATGTG-3' R: 5'-AAGTATTAGCCTGCTCGTCTGGAAT-3'	87	Kowalewski <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1: Secuencias de partidores que se utilizaron en el análisis de q-PCR.

Además, se realizó la curva de calibrado para determinar la concentración óptima de los partidores para *Cox-2*. El gen de referencia que se usó para este trabajo fue β -actina, ya estandarizado en el laboratorio (Palomino y De Los Reyes, 2016).

4.3 q-PCR

La evaluación de la expresión génica de *Cox-2* se realizó mediante q-PCR en dos muestras biológicas de *pools* de muestras de cDNA de células de la granulosa provenientes de folículos en proestro, y dos muestras biológicas de *pools* de muestras de cDNA de células de la granulosa de folículos en la etapa de estro. Las amplificaciones de los genes se realizaron por q-PCR, con el kit Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), respetando las cantidades por reacción indicadas por el fabricante. El volumen de cada pocillo con cDNA de proestro y estro de la reacción fue de 12,5 uL compuesta por: 6,56 uL de Máxima SYBR Green/Fluorescein q-PCR Master Mix (2x), 0,78 uL del partidor Forward y 0,78 del partidor Reverse. La concentración de cDNA fue de 10 ng y el volumen diferencial fue (4 a 8 uL) completado con agua libre de nucleasas. Se utilizaron placas (Ecoplate 48, Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido) de 48 pocillos, éstas fueron selladas con un lámina adhesiva óptica (Proseal48, Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido) y utilizando un termociclador Illumina Eco Real Time PCR System Model EC-100-1001 (San Diego, CA, Estados Unidos) del laboratorio, se procedió a la amplificación con el siguiente protocolo: etapa inicial de desnaturalización del cDNA durante 10 minutos a 95°C, posteriormente se realizaron a 40 ciclos de amplificación: desnaturalización por 15 segundos a 95°C, alineamiento por 30 segundos a 60°C y extensión por 30 segundos a 72°C. Además, en la placa fue incluido un control negativo que fue la muestra control sin partidores y otro control con el partidor de β -actina.

4.4. Cuantificación Relativa

Los niveles de expresión génica se registraron como valores Ct, que representan al número de ciclos de detección de amplificación, por fluorometría, sobre un valor umbral. Los valores Cts promedios pertenecientes a cada réplica se calcularon y transformaron en valores relativos llamados *Quantify* (Q) a través del Método $\Delta\Delta Ct$. La cuantificación relativa en la

expresión de *Cox-2* se estimó con el cociente entre el valor de Q y un factor de normalización (NF), que fue calculado en base a la media genómica de los valores de Q de los genes de referencia.

5. Análisis Estadístico

La comparación en los niveles de expresión relativa del gen *Cox-2* entre proestro y estro, y la evaluación de los niveles de GDF-9 y BMP-15 entre ambas etapas del desarrollo fue evaluado por la prueba de *T* de *Student*.

En todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $P \leq 0,05$.

La relación entre la expresión del gen de *Cox-2* y la concentración de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular de folículos antrales se hizo mediante análisis descriptivo.

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron 40 ovarios provenientes de 20 hembras caninas, los cuales se encontraban en las etapas de proestro (n=12) y estro (n=8) del ciclo estral.

1. Niveles de concentración de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular de folículos antrales

En proestro, se determinó que la concentración de BMP-15 fue mayor a la concentración de GDF-9 ($P < 0,05$), como lo demuestra el gráfico A de la figura 1. Sin embargo, en estro no hubo diferencias estadísticas en la concentración de los factores de crecimiento ($P > 0,05$), como se presenta en el gráfico B de la figura 1.

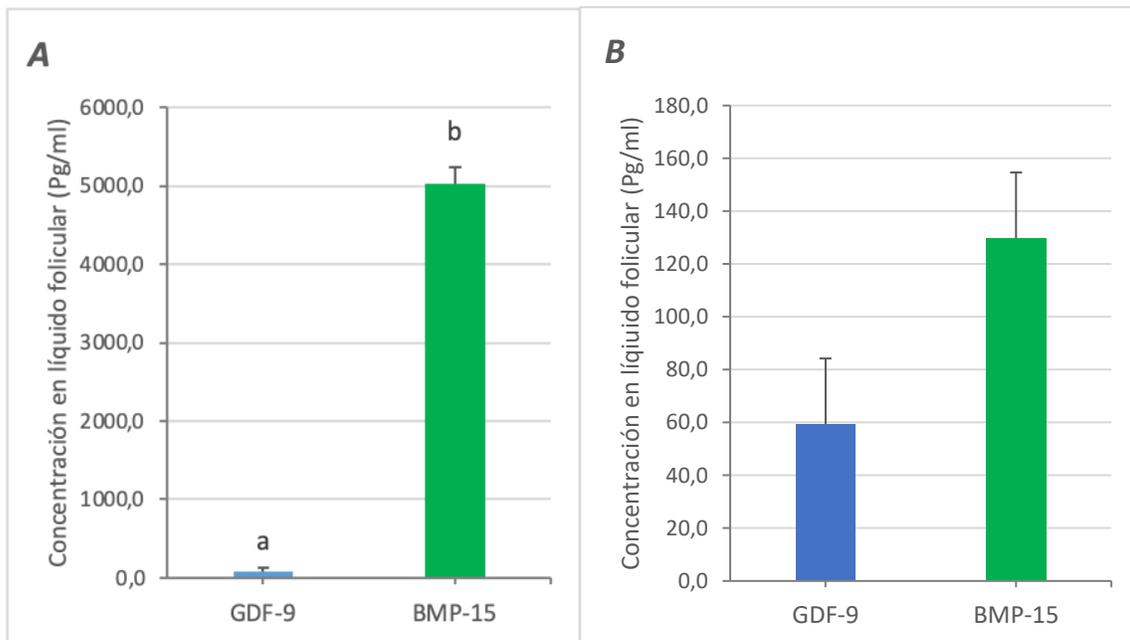


Figura 1: Niveles de concentración en Pg/mL de los factores paracrinos GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular de ovarios caninos en etapa de proestro (A) y estro (B). Letras distintas sobre las barras indican una diferencia significativa ($P < 0,05$).

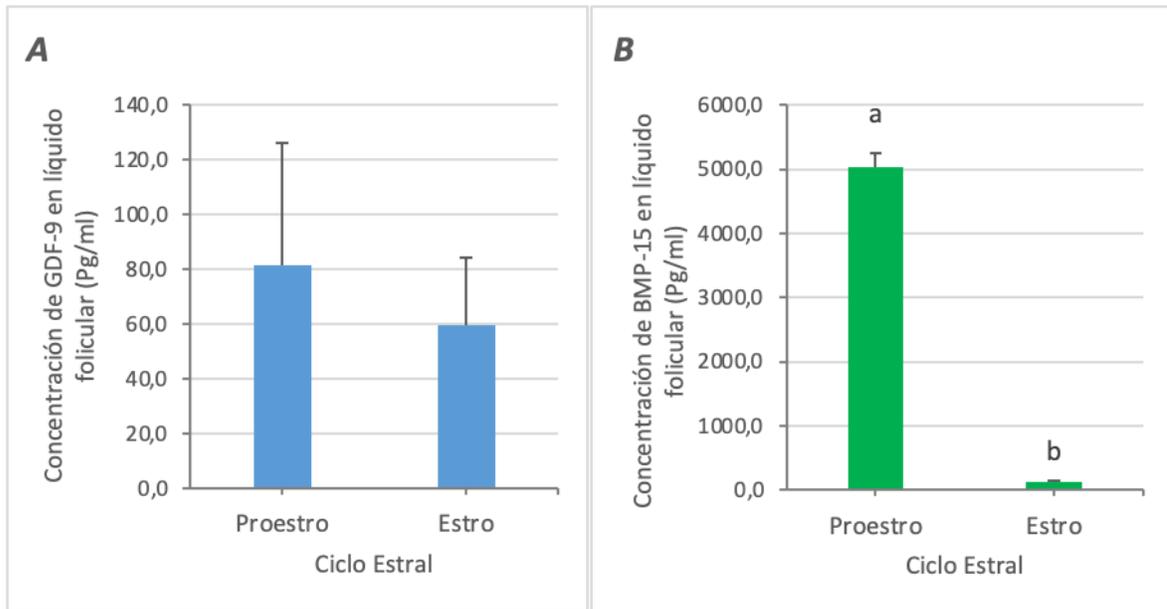


Figura 2: Comparación de los niveles de concentración en Pg/mL de GDF-9 (A) y BMP-15 (B) en líquido folicular de ovarios caninos en proestro y estro. Letras diferentes sobre las barras indican una diferencia significativa ($P < 0,05$).

Al comparar la concentración de GDF-9 en proestro y estro en la Fig. 2A, no se observa diferencia estadística ($P > 0,05$). Por otro lado, BMP-15 se encontró en mayores niveles en el líquido folicular de proestro, mientras que en estro sus niveles de concentración disminuyeron ($P < 0,05$), Fig. 2B.

2. Niveles de expresión génica de *Cox-2* en células de la granulosa de folículos antrales

El análisis de la expresión relativa del gen *Cox-2* fue expresado en relación al gen de referencia β -Actina. Se muestra en la Fig. 3.

Se determinó que, tanto en proestro como en estro hay expresión del gen de *Cox-2*, registrándose un aumento significativo de la expresión de *Cox-2* en las células de la granulosa en folículos antrales preovulatorios de ovarios en etapa de estro, en comparación al proestro ($P < 0,05$); por lo que la expresión de este gen aumenta notoriamente hacia el final del desarrollo folicular en caninos.

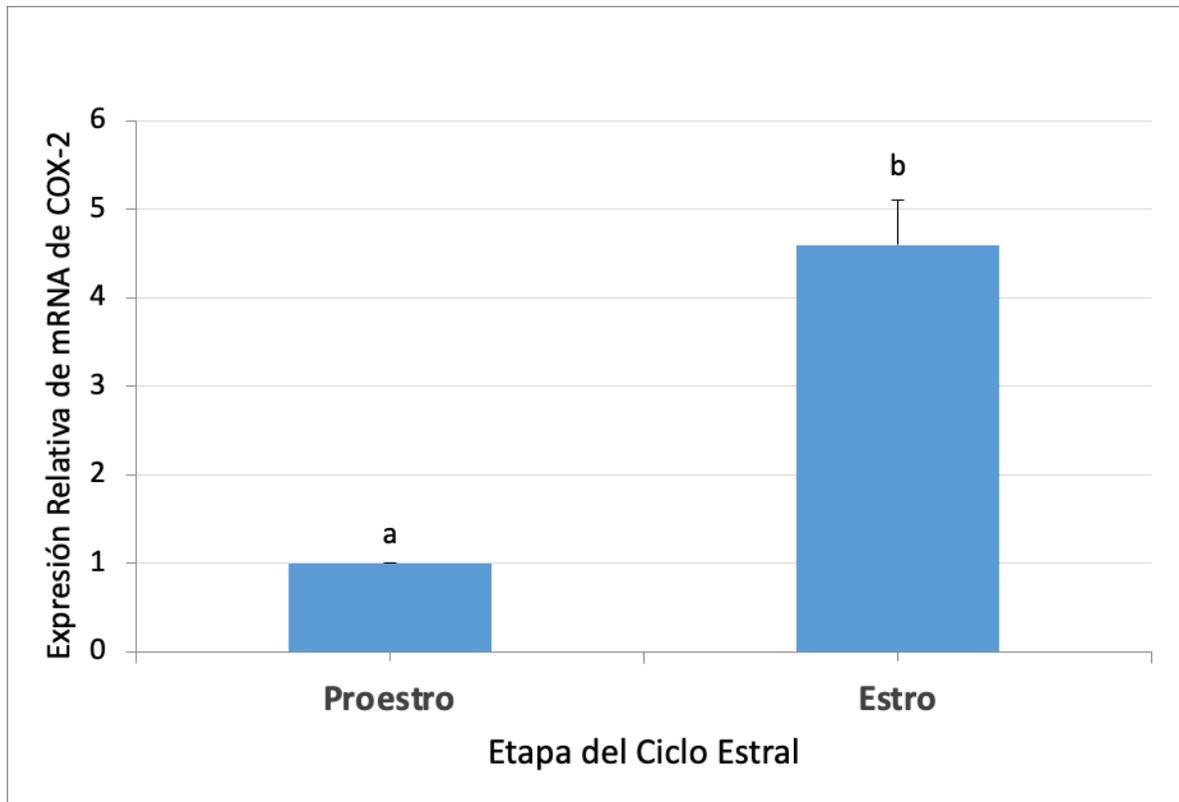


Figura 3: Diferencias de la expresión relativa del gen de *Cox-2* en células de la granulosa de folículos antrales provenientes de ovarios en la etapa de proestro y estro del ciclo estral canino. Letras distintas sobre las barras indican una diferencia significativa ($P < 0,05$).

3. Relación de la expresión relativa génica de *Cox-2* en células de la granulosa y la concentración de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular de folículos antrales en fase de proestro y estro canino.

En base a los resultados de la expresión relativa de los transcritos de *Cox-2* en las células de la granulosa de folículos antrales en fase de proestro y estro obtenidos por medio de técnica q-PCR; y los niveles de concentración de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular de folículos antrales en proestro y estro recopilados a través de la técnica de ELISA se pudo establecer que hubo una relación inversa en los niveles de expresión génica de *Cox-2* con los niveles de BMP-15 en el líquido folicular. Respecto a GDF-9, no se observó una relación al final de la etapa de desarrollo folicular, ya que no hubo diferencias significativas en los niveles de GDF-9 entre proestro y estro a diferencia de lo observado en los transcritos de *Cox-2*.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, los factores de crecimiento como GDF-9 y BMP-15 se han estudiado en diferentes especies de mamíferos domésticos (Elvin *et al.*, 1999b; McNatty *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2020) y silvestres (Duffy, 2003), debido a su importancia para el desarrollo folicular y la maduración del ovocito (Elvin *et al.*, 1999b; Yoshino *et al.*, 2006; Sanfins *et al.*, 2018). En el presente estudio, se determinaron por primera vez en perras las concentraciones de GDF-9 y BMP-15 en el líquido folicular de folículos en fases finales del desarrollo, como así mismo la expresión génica folicular de una enzima relevante en el desarrollo del folículo y ovocito como *Cox-2* previo a la ovulación.

Los niveles de BMP-15 mostraron una disminución en el líquido folicular desde proestro a estro, coincidentes con lo observado en investigaciones realizadas previamente en caninos a nivel de la expresión del gen de este factor en ovocitos y células foliculares (Palomino y De Los Reyes, 2016), como de la proteína (Fernández *et al.*, 2016) en las células de folículos en etapas finales del desarrollo folicular. En otras especies como en roedores (Gueripel *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010), porcinos (Sun *et al.*, 2010), primates (Duffy, 2003) y humanos (Wu *et al.*, 2007; Gode *et al.*, 2011), estos factores de crecimiento aumentan luego del *peak* de la hormona luteinizante (LH) o posterior a la adición de la hormona coriónica humana (hCG), sugiriéndose que GDF-9 y BMP-15 en folículos pre-ovulatorios coordinan en parte la mucificación de las células del cúmulo, regulando la expresión de genes asociados a este fenómeno (Sanfins *et al.*, 2018). Sin embargo, en caninos, la expansión del cúmulo se observa antes de la ovulación, pero la capa de células más adyacentes al ovocito permanece unida fuertemente durante este proceso a través de las uniones GAP (Viaris de Lesegno *et al.*, 2008; De Los Reyes *et al.*, 2020), lo que sugiere una relación con el retardo meiótico observado en caninos (De Los Reyes *et al.*, 2020). Además, en humanos, la disminución de los niveles de BMP-15 provocada por el aumento preovulatorio de LH, permite posiblemente, que la luteinización progrese en el folículo, ya que BMP-15 al parecer suprime la expresión génica del receptor de la hormona luteinizante (LHR) y la proteína StAR en las células de la granulosa humana (Yoshino *et al.*, 2011). Por lo tanto, es probable que el alza de LH que separa las etapas de proestro y estro en el ciclo estral de la perra (Fernández *et al.*, 2016), haya contribuido en este cambio de concentración de BMP-15.

A diferencia de BMP-15, los niveles de GDF-9 intrafolicular no mostraron diferencias significativas entre proestro y estro previo a la ovulación, lo que podría estar asociado al rol de esta proteína en la maduración del ovocito, ya que se ha descrito que anticuerpos contra GDF-9 adicionados a cultivos *in vitro* impide la maduración final de los ovocitos para alcanzar la etapa de segunda Metafase (García *et al.*, 2019), coincidente con lo que ocurre en ovocitos de ratón, donde hay mayor expresión del mRNA de GDF-9 en comparación con BMP-15 (Crawford y McNatty, 2011). Sin embargo, tanto GDF-9 como BMP-15, serían importantes para el desarrollo meiótico de los ovocitos caninos (García *et al.*, 2019). Adicionalmente, ambas proteínas están relacionadas al estímulo de enzimas como la *Has-2* y COX-2 (Varani *et al.*, 2002; Yoshino *et al.*, 2006), involucradas en la expansión de las células del cúmulo. El no aumento de estos factores en los caninos podrían relacionarse a una mucificación incompleta en los ovocitos de esta especie (Ramírez *et al.*, 2020).

En el presente estudio se evaluaron en las células foliculares la expresión del gen que codifica para la enzima COX-2 en las etapas finales de crecimiento folicular. Se observó un aumento significativo en la etapa de estro en relación a los niveles de proestro. Este incremento podría relacionarse a que en estro, las células foliculares caninas recolectadas estuvieron previamente expuestas al *peak* de LH endógeno, ya que entre ambas etapas del ciclo ocurre este *peak* preovulatorio de LH. El alza de LH desencadena una serie de procesos de señalización en las células foliculares, como la regulación de esteroides, prostaglandinas, proteasas y factores de crecimientos (Berisha *et al.*, 2019), y permiten la maduración final del folículo y del ovocito (Tsafriri y Reich, 1999; Duffy y Stouffer, 2001). Los resultados del presente estudio coinciden con aquellos en roedores (Joyce *et al.*, 2001; Segi *et al.*, 2002; Duffy *et al.*, 2010), primates (Duffy y Stouffer, 2001), y humanos (Fang *et al.*, 2013), que muestran que tanto los niveles del transcripto, *Cox-2*, como también las prostaglandinas, estarían bajos o indetectables en el folículo previo al *peak* de LH o de la adición de hCG, pero luego de este estímulo, los niveles se incrementan. Esto está asociado a que la enzima COX-2 sintetiza prostaglandinas que permiten la ruptura del folículo permitiendo la ovulación de los ovocitos (Madzuk y Li, 2013). Además, COX-2 promueve la expansión de las células del cúmulo, junto con otros factores (Tsafriri y Reich, 1999; Takahashi *et al.*, 2006). Animales que presentan alteraciones en la síntesis de prostaglandinas, han

evidenciado fallas en la mucificación y posterior ovulación, (Lim *et al.*, 1997; Duffy y Stouffer, 2002).

Además, GDF-9 y BMP-15 promueven la síntesis de COX-2 (Su *et al.*, 2004). De hecho, se ha probado en ratones (Elvin *et al.*, 1999b; Yoshino *et al.*, 2006) y recientemente en caninos (De Los Reyes *et al.*, 2021) que la adición de GDF-9 y BMP-15 en células foliculares en cultivo induce un aumento de casi el triple en los niveles de expresión de mRNA de *Cox-2*. La acción de los factores paracrinos en la expresión génica podría darse a través de la fosforilación de proteínas SMAD en las células foliculares (Fang *et al.*, 2014), ya que esta señal intracelular regula la expresión de diferentes genes, entre ellos *Cox-2* (Dragovic *et al.*, 2007; Myers y Pangas, 2010; Sanfins *et al.*, 2018). Sin embargo, en este estudio se encontró que la relación entre BMP-15 presente en el líquido folicular y la expresión de *Cox-2* en el folículo fue inversa o no hubo relación para GDF-9. Probablemente, y a diferencia de la adición de estas proteínas exógenas *in vitro*, en el ambiente folicular *in vivo* en la perra los niveles de GDF-9 y BMP-15 podrían no ser determinantes en el control de la expresión del gen de *Cox-2* previo a ovulación.

Se ha visto que la P₄ se relaciona con la expresión de *Cox-2* en distintas especies (Elvin *et al.*, 2000; Bridges *et al.*, 2006). *Cox-2* aumentó sus niveles en estro coincidiendo con la mayor concentración de P₄ en el líquido folicular observada en caninos (De los Reyes *et al.*, 2021). En la perra los niveles séricos de P₄ comienzan a aumentar de proestro tardío, debido a que los folículos se luteinizan antes de la ovulación (Chastant-Maillard *et al.*, 2011; Concannon, 2011). El alza de LH, el cual separa la etapa de proestro a estro, induce la síntesis de P₄ en las células foliculares a través de su receptor nuclear regulando posiblemente la abundancia relativa de *Cox-2* (De los Reyes *et al.*, 2021). Posiblemente la P₄ sea un factor que colabore en modificar la expresión de *Cox-2* en caninos.

En conclusión, los niveles de GDF-9 previo a la ovulación no se relacionaría, al menos directamente, con el aumento observado en la expresión de *Cox-2*, pero la disminución de BMP-15 en el líquido folicular estaría incluso inversamente relacionados con el incremento significativo de la expresión génica de *Cox-2* previo a la ovulación, por lo que posiblemente haya otros factores más relevantes en este proceso, como la P₄.

BIBLIOGRAFÍA

ALEXANIAN, A.; SOROKIN, A. 2017. Cyclooxygenase 2: Protein-Protein Interactions and Posttranslational Modifications. *Physiol Genomics* 49:667-681.

BERISHA, B.; RODLER, D.; SCHAMS, D.; SINOWATZ, F.; PFAFFL, M. 2019. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. *Front Endocrinol* 10:467.

BRIDGES, P.; KOMAR, C.; FORTUNE, J. 2006. Gonadotropin-Induced Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Cyclooxygenase-2 and Production of Prostaglandins E and F₂ α in Bovine Preovulatory Follicles are Regulated by the Progesterone Receptor. *Endocrinology* 147:4713-4722.

CABRERA, R.; DOZIER, B.; DUFFY, D. 2006. Prostaglandin-Endoperoxide Synthase (PTGS1 and PTGS2) Expression and Prostaglandin Production by Normal Monkey Ovarian Surface Epithelium. *Fertil Steril* 86:1088-1096.

CAVALLARI, F.; COELHO, M.; VERDE, C. 2016. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility - A Review. *Asian Australas J Anim Sci* 29:1065-1074.

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.

CONCANNON, P. 2011. Reproductive Cycles of the Domestic Bitch. *Anim Reprod Sci* 124:200-210.

CRAWFORD, J.; MCNATTY, K. 2011. The Ratio of Growth Differentiation Factor 9: Bone Morphogenetic Protein 15 mRNA Expression is Tightly Co-regulated and Differs Between Species Over a Wide Range of Ovulation Rates. *Mol Cell Endocrinol* 348: 339-343.

DE LOS REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUEZ, V.; PALOMINO, J. 2013. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) During *in Vitro* Maturation in Canine Oocytes. *Theriogenology* 80:587-596.

DE LOS REYES, M.; PALOMINO, P.; ARAUJO, A.; FLORES, J.; RAMIREZ, G.; PARRAGUEZ, V.H.; ASPEE, K. 2021. Cyclooxygenase 2 Messenger RNA Levels in Canine Follicular Cells: Interrelationship With GDF-9, BMP-15, and Progesterone. *Domest Anim Endocrinol* 74.

DRAGOVIC, R.; RITTER, L.; SCHULZ, S.; AMATO, F.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, D.; GILCHRIST, R. 2007. Oocyte-Secreted Factor Activation of SMAD 2/3 Signaling Enables Initiation of Mouse Cumulus Cell Expansion. *Biol Reprod* 76:848-857.

DUFFY, D.; STOUFFER, R. 2001. The Ovulatory Gonadotrophin Surge Stimulates Cyclooxygenase Expression and Prostaglandin Production by the Monkey Follicle. *Mol Hum Reprod* 7:731-739.

DUFFY, D.; STOUFFER, R. 2002. Follicular Administration of a Cyclooxygenase Inhibitor can Prevent Oocyte Release without Alteration of Normal Luteal Function in Rhesus Monkeys. *Hum reprod* 17:2825-2831.

DUFFY, D. 2003. Growth Differentiation Factor-9 is Expressed by the Primate Follicle Throughout the Periovulatory Interval. *Biol Reprod* 69:725-732.

DUFFY, D.; MCGINNIS, L.; VANDEVOORT, C.; CHRISTENSON, L. 2010. Mammalian Oocytes are Targets for Prostaglandin E2 (PGE2) Action. *Reprod Biol Endocrin* 8:131.

ELVIN, J.; YAN, CH.; WANG, P.; NISHIMORI, K.; MATZUK, M. 1999a. Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary. *Mol Endo* 13:1018-1034.

ELVIN, J.; CLARK, A.; WANG, P.; WOLFMAN, N.; MATZUK, M. 1999b. Paracrine Actions of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. *Mol Endo* 13:1035-1048.

ELVIN, J.; YAN, CH.; MATZUK, M. 2000. Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Progesterone Synthesis in Granulosa Cells Via a Prostaglandin E2/EP2 Receptor Pathway. *Proc Natl Acad Sci* 97:10288-10293.

FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GERARD, N. 2010. Steroid Hormones Content and Proteomic Analysis of Canine Follicular Fluid during the Preovulatory Period. *Reprod Biol Endocrin* 2010:14 pp.

FANG, L.; CHENG, J.; CHANG, H.; SUN, Y.; LEUNG, P. 2013. EGF-Like Growth Factors Induce COX-2-Derived PGE2 Production Through ERK1/2 in Human Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 98:4932-4941.

FANG, L.; CHANG, H.; CHENG, J.; LEUNG, P.; SUN, Y. 2014. TGF- β 1 Induces COX-2 Expression and PGE2 Production in Human Granulosa Cells Through Smad Signaling Pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 99:1217-1226.

FERNANDEZ, T.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; PERALTA, O.; DE LOS REYES, M. 2016. Differential Expression of GDF-9 and BMP-15 during Follicular Development in Canine Ovaries Evaluated by Flowcytometry. *Anim Reprod Sci* 167:59-67

GARCIA, P.; ASPEE, K.; RAMIREZ, 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. *Reprod Dom Anim* 00:1-8.

GODE, F.; GULEKLI, B.; DOGAN, E.; KORHAN, P.; DOGAN, S.; BIGE, O.; CIMRIN, D.; ATABEY, N. 2011. Influence of Follicular Fluid GDF9 and BMP15 on Embryo Quality. *Fertil Steril* 95:2274-2278.

GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. 2006. Oocyte Bone Morphogenetic Protein 15, but not Growth Differentiation Factor 9, is Increased During Gonadotropin-Induced Follicular Development in the Immature Mouse and is Associated with Cumulus Oophorus Expansion. *Biol Reprod* 75:836-843.

HUSSEIN, T.; FROILAND, D.; AMATO, F.; THOMPSON, J.; GILCHRIST R. 2005. Oocyte Prevent Cumulus Cell Apoptosis by Maintaining a Morphogenic Paracrine Gradient of Bone Morphogenetic Proteins. *J Cell Sci* 118:5257-5268.

INAGAKI, K.; SHIMASAKI, S. 2010. Impaired Production of BMP-15 and GDF-9 Mature Proteins Derived from Proprotein with Mutations in the Proregion. *Mol Cell Endocrin* 328:1-7.

IWATA, H. 2017. Age-Associated Changes in Granulosa Cells and Follicular Fluid in Cows. *J Reprod Develop* 63:339-345.

JOYCE, I.; PENDOLA, F.; O'BRIEN, M.; EPIG, J. 2001. Regulation of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Mouse Granulosa Cells During Ovulation. *Endocrin* 142:3187-3197.

KOWALEWSKI, M.; KAUTZ, E.; HÖGGER, E.; HOFFMANN, B.; BOOS, A. 2014. Interplacental Uterine Expression of Genes Involved in Prostaglandin Synthesis During Canine Pregnancy and at Induced Prepartum Luteolysis/Abortion. *Reprod Biol Endocrin* 2014:12-46.

LIM, H.; PARIJA, B.; DAS, S.; DINCHUK, J.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J.; DEY, S. 1997. Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2-Deficient Mice. *Cell* 91:197-208.

LIN, Z.; LI, Y.; XU, Y.; WANG, Q.; NAMGOONG, S.; CUI, X.; KIM, N. 2014. Effects of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 on the *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes. *Reprod Dom Anim* 49:219-227.

LIU, J.; PARK, E.; JO, M. 2009. Runt-Related Transcription Factor 1 Regulates Luteinized Hormone-Induced Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Expression in Rat Periovarian Granulosa Cells. *Endocrinology* 150:3291-3300.

MATZUK, M.; LI, Q. 2013. How the Oocyte Influences Follicular Cell Function and Why. *Oogenesis* 75-92.

MCNATTY, K.; MOORE, L.; HUDSON, N.; QUIRKE, L.; LAWRENCE, S.; READER, K.; HANRAHAN, J.; SMITH, P.; GROOME, M.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. 2004. The Oocyte and its Role in Regulating Ovulation Rate: A New Paradigm in Reproductive Biology. *Reprod* 128:379-386.

MCNATTY, K.; JUENGEL, J.; READER, K.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.; MOTTERSHEAD, D.; GROOME, N.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. 2005. Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 Co-operate to Regulate Granulosa Cell Function. *Reprod* 129:473-480.

MYERS, M.; PANGAS, S. 2010. Regulatory Roles of Transforming Growth Factor Beta Family Members in Folliculogenesis. *WIREs Syst Biol Med* 2:117–125.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S. 2001. Bone Morphogenetic Protein 15 Inhibits Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. *J Biol Chem* 276:11387-11392.

OTSUKA, F. MCTAVISH, K.; SHIMASAKI, S. 2011. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol Reprod Dev* 78:9-21.

PALMA, G.; ARGANÁRAZ, M.; BARRERA, A.; RODLER, D.; MUTTO, A.; SINOWATZ, F. 2012. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *Scientific World Journal* 2012:1-14.

PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M. 2016. Temporal Expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in Canine Ovarian Follicles. *Theriogenology* 86:1541-1549.

PANGAS, S.; MATZUK, M. 2005. The Art and Artifact of GDF9 Activity: Cumulus Expansion and the Cumulus Expansion-Enabling Factor. *Biol Reprod* 73:582-585.

PAULINI, F. 2010. Expression of Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and their Effect on *In Vitro* Luteinization of Bovine Granulosa Cells. Masters Dissertation. Brasilia, Brazil. School of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia. 118 pp.

RAMÍREZ, G.; PALOMINO, J.; ASPEE, K.; DE LOS REYES, M. 2020. GDF-9 and BMP-15 mRNA Levels in Canine Cumulus Cells Related to Cumulus Expansion and the Maturation Process. *Animals* 10: 462.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. 2005. In Vivo Meiotic Resumption, Fertilization and Early Embryonic Development in the Bitch. *Reprod* 130:193-201.

SANFINS, A.; RODRIGUES, P.; ALBERTINI, D. 2018. GDF-9 and BMP-15 Direct the Follicle Symphony. *J Assist Reprod Genet* 35:1741-1750.

SEGI, E.; HARAGUCHI, K.; SUGIMOTO, Y.; TSUJI, M.; TSUNEKAWA, H.; TAMBA, S.; TSUBOI, K.; TANAKA, S.; ICHIKAWA, A. 2002. Expression of Messenger RNA for Prostaglandin E Receptor Subtypes EP4/EP2 and Cyclooxygenase Isozymes in Mouse Periovarian Follicles and Oviducts During Superovulation. *Biol Reprod* 68:804-811.

SU, Y.; WU, X.; O'BRIEN, M.; PENDOLA, F.; DENEGRE, J.; MATZUK, M.; EPPIG, J. 2004. Synergistic Roles of BMP15 and GDF9 in the Development and Function of the Oocyte-Cumulus Cell Complex in Mice: Genetic Evidence for an Oocyte-Granulosa Cell Regulatory Loop. *Dev Biol* 276:64-73.

SUN, R.; LEI, L.; CHENG, L.; JIN, F.; ZU, S.; SHAN, Z.; WANG, Z.; ZHANG, J.; LIU, Z. 2010. Expression of GDF-9, BMP.15 and their Receptors in Mammalian Ovary Follicles. *J Mol Hist* 41:325-332.

TAKAHASHI, T.; MORROW, J.; WANG, H.; DEY, S. 2006. Cyclooxygenase-2-derived Prostaglandin E2 Directs Oocyte Maturation by Differentially Influencing Multiple Signaling Pathways. *J Biol Chem* 281:37117-37129.

TSAFRIRI, A.; REICH, R. 1999. Molecular Aspect of Mammalian Ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:1-11.

VARANI, S.; ELVIN, J.; YAN, C.; DE MAYO, J.; DE MAYO, F.; HORTON, H.; BYRNE, M.; MATZUK, M. 2002. Knockout of Pentraxin 3 a Downstream Target of Growth Differentiation Factor-9, Causes Female Subfertility. *Mol Endocrinol* 16:1154-1167.

VIARIS DE LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. 2008. Ultrastructure of Canine Oocytes During *in Vivo* Maturation. *Mol Reprod Dev* 75:115-125.

WU, Y.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.; XU, J.; ZHU, X.; LUO, Q.; HUANG, H. 2007. High Bone Morphogenetic Protein-15 Level in Follicular Fluid is Associated with Quality Oocyte and Subsequent Embryonic Development. *Hum Reprod* 22:1526-1531.

YEO, C.; GILCHRIST, R.; THOMSON, J.; LANE, M. 2008. Exogenous Growth Differentiation Factor 9 in Oocyte Maturation Media Enhances Subsequent Embryo Development and Fetal Viability in Mice. *Hum Reprod* 23:67-73.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. 2006. A Unique Preovulatory Expression Pattern Plays a Key Role in the Physiological Functions of BMP-15 in the Mouse. *PNAS* 103:10678-10683.

YOSHINO, O.; SHI, J.; OSUGA, Y.; HARADA, M.; NISHII, O.; YANO, T.; TAKETANI, Y. 2011. The Function of Bone Morphogenetic Proteins in the Human Ovary. *Reprod Med Biol* 10:1-7.