



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

**“EVALUACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DIFERENCIAL 9 (GDF9) EN
OVOCITOS DE PERRA DURANTE EL DESARROLLO Y SU RELACIÓN CON
LA MADURACIÓN DEL GAMETO”**

CLAUDIA JIMENA ROJAS ROJAS

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

PROFESORA GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1110265

SANTIAGO, CHILE

2013

MEMORIA DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DIFERENCIAL 9 (GDF9) EN OVOCITOS DE PERRA DURANTE EL DESARROLLO Y SU RELACIÓN CON LA MADURACIÓN DEL GAMETO”

“Evaluation of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) in bitch oocytes during the development and its connection with the maturation of the gamete”

Claudia J. Rojas R.

Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

El Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF9) cumple un rol esencial en el desarrollo ovocitario de los mamíferos, sin embargo, en ovocitos caninos se desconoce su presencia y participación durante la maduración. En este estudio, se evaluó la presencia de GDF9 en ovocitos de perra madurados *in vitro* (MIV) y su relación con la expansión del cúmulo, para lo cual complejos cúmulo ovocito (COC's) se cultivaron por 0, 48, 72 y 96 h. Posteriormente, algunos COC's fueron desprendidos del cúmulo. De este modo, ovocitos sin células del cúmulo y COC's se procesaron para su evaluación a través de Inmunofluorescencia Indirecta y Western blot con el anticuerpo anti GDF9 humano. Con ambas técnicas, la proteína se detectó principalmente en el ovocito y en menor proporción en las células del cúmulo. Además, en ambos tipos celulares, la detección de GDF9 disminuyó a medida que progresó el tiempo de cultivo. En ovocitos desnudos y COC's, se detectó una banda de ~56 kDa correspondiente a la pro-proteína en todos los tiempos de maduración. Sin embargo, sólo en COC's no madurados y MIV por 48 h se detectaron dos bandas de proteína madura de ~18 y 19 kDa. Finalmente, se observó una relación inversa entre la expansión del cúmulo durante la MIV y la detección de GDF9 por Western blot. Por consiguiente, GDF9 está presente en ovocitos de perra y tendría participación en los procesos iniciales del crecimiento y desarrollo ovocitario.

Palabra clave: Perra; Ovocito; Maduración in vitro; GDF9.

ABSTRACT

Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) plays an essential role in oocytes development in mammals, however, in canine oocytes the presence and participation of GDF9 during maturation is unknown. In this study we evaluated the presence of GDF9 in bitch oocytes matured *in vitro* (IVM) and their relationship with cumulus expansion, for which cumulus-oocytes complexes (COC's) were cultured for 0, 48, 72 and 96 h. Subsequently, some COC's were detached from the cumulus. Thus, oocytes without cumulus cells and COC's were processed for evaluation by Indirect Immunofluorescence and Western blot using antibody anti human GDF9. With both techniques, the protein was mainly detected in the oocyte with lesser amounts in the cumulus cells. Furthermore, in both cell types, GDF9 decreased during the progress of IVM. In denuded oocytes and COC's a band of ~56 kDa corresponding to the pro-protein in all the times of maturation was detected. However, only in COC's no matured and IVM for 48 h two bands of mature protein, ~18 and 19 kDa were detected. Finally, there was an inverse relationship between cumulus expansion during IVM and GDF9 detection by Western blot. Thus, GDF9 is present in bitch oocytes and cumulus cell, and would be participating in the initial processes of growth and oocyte development.

Keywords: Bitch; Oocyte; In vitro maturation; GDF9.

INTRODUCCIÓN

La comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa es esencial para el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico y para la adquisición de la competencia citoplasmática y nuclear del gameto (Eppig 2001). El ovocito regula la funcionalidad de las células de la granulosa a través de la secreción de diferentes factores, entre los cuales destaca el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF9), miembro de la Superfamilia de Factores de Crecimiento y Transformación β (TGF β), descritos en ovocitos de diversas especies de mamíferos, siendo esencial en estadios tempranos de la foliculogénesis, ya que promovería el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico y del mismo ovocito (Dong *et al.*, 1996; Bodensteiner *et al.*, 1999; Prochazka *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005).

En ovino y bovino GDF9 estimula el progreso de la foliculogénesis a partir de folículo primordial (Bodensteiner *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005) y en ratón, porcino y humano a partir de estadio primario del desarrollo ovárico (Dong *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2010). Además, el

ovocito de ratón es deficiente en la producción de colesterol, por lo cual mediante la secreción de GDF9 se estimula la síntesis de colesterol en las células del cúmulo, al favorecer la expresión de enzimas participantes en este proceso (Su *et al.*, 2008). En folículo preantral de roedores, GDF9 promueve la proliferación (Vitt *et al.*, 2000; Gilchrist *et al.*, 2004) y evita la apoptosis de las células de la granulosa (Orisaka *et al.*, 2006; 2009), favoreciendo el desarrollo de la foliculogénesis y la sobrevivencia del folículo ovárico. En el caso de las células de la teca, GDF9 estimula la proliferación y la biosíntesis de andrógenos en bovino (Spicer *et al.*, 2008) y en rata (Orisaka *et al.*, 2009). Varios estudios realizados en ratón han demostrado que GDF9 participa en la expansión de las células del cúmulo, proceso esencial para la ovulación del ovocito y su progresión a Metafase de la segunda división meiótica (MII), mediante la expresión de Hialuronan Sintetasa 2 (HAS2) y Ciclooxygenasa 2 (COX2) en el cúmulo (Elvin *et al.*, 1999; Dragovic *et al.*, 2005; Gui y Joyce, 2005).

En caninos el desarrollo de las biotecnologías reproductivas está menos

desarrollada respecto a otros mamíferos domésticos debido principalmente a la deficiencia de la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, dada las características reproductivas especiales en esta especie (Saint-Dizier, 2004; Otoi, *et al.*, 2007; De los Reyes *et al.*, 2005; 2007; 2011). En la mayoría de los mamíferos el alza preovulatoria de la Hormona Luteinizante (LH) conlleva a la ruptura de las uniones entre las células del cúmulo y el ovocito, estimulando el reinicio meiótico (Reynaud *et al.*, 2006). En los caninos la expansión del cúmulo ocurre poco después del alza de LH, sin embargo, de dos a tres capas internas de las células del cúmulo, principalmente la corona radiada, permanecen en estrecho contacto con el ovocito y se expanden dos a tres días después de ocurrida la ovulación, lo cual se ha asociado con el retardo en el reinicio meiótico (Reynaud *et al.*, 2005; 2009; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008). A nivel nuclear, el ovocito es ovulado en Profase de la primera división meiótica, en estado de Vesícula Germinativa (VG) y la progresión a MII ocurre en el oviducto aproximadamente 48 a 72 h luego de haber sido ovulado (Reynaud *et al.*, 2005; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008).

En caninos, como en otras especies de mamíferos, se ha estudiado la acción de dos proteínas quinasas, el Factor Promotor de la Maduración (MPF) y la Proteína Kinasa Activadora Mitogénica (MAPK), ya que estimulan el reinicio de la meiosis a través de la condensación de la cromatina y la polimerización de microtúbulos (Naito y Toyoda, 1991; Choi *et al.*, 1991; Saint-Dizier *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de las características reproductivas especiales en la perra, ambas proteínas quinasas se comportan de manera similar a lo observado en otros mamíferos, incrementando su acción en el estado nuclear de MI y MII (Naito y Toyoda, 1991; Choi *et al.*, 1991; Saint-Dizier *et al.*, 2004; Suzukamo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Además, se ha estudiado que la vía de activación de la MAPK participa en el proceso de mucificación del cúmulo y que es necesaria para que GDF9 desarrolle su vía de señalización y por consiguiente, ejerza su acción en las células de la granulosa (Su *et al.*, 2002; 2003; Sasseville *et al.*, 2010).

Pocos estudios se han enfocado en la investigación de las causas del retraso en el reinicio de la meiosis en ovocitos

caninos y los factores que desencadenan su progreso, sin conocerse hasta hoy los mecanismos asociados a éstos.

Considerando que la mucificación del cúmulo como el reinicio de la meiosis en caninos sigue una dinámica distinta a lo observado en otras especies de mamíferos, y dado que GDF9 está relacionado al proceso de mucificación en otras especies animales, como en su participación en la vía de la MAPK, en el presente estudio se hipotetizó que GDF9 es una proteína que está también presente en ovocitos caninos influenciando el crecimiento ovocitario y su presencia durante la maduración está relacionada con la expansión de las células del cúmulo, evento clave en el desarrollo gamético, lo que influirá directamente en el desarrollo meiótico. Para responder la hipótesis se planteó el siguiente objetivo: estudiar la presencia de GDF9 durante el desarrollo del ovocito de perra y su relación con la expansión de las células del cúmulo y la maduración meiótica del gameto, tanto *in vitro* como *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo del trabajo experimental, se

llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El protocolo utilizado cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de esta universidad y de la Comisión Asesora de Bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico de Chile (FONDECYT).

A menos que se especifiquen otras fuentes, los productos químicos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Obtención y procesamiento de los ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos de perras clínicamente sanas (n=160), de 1 a 6 años de edad, de distintas razas y en diferentes estadios del ciclo estral, mediante ovariectomía, en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la Ilustre Municipalidad de la Pintana.

Los ovarios y oviductos fueron transportados al laboratorio en solución salina (NaCl 0,9%) suplementada con 100 UI de penicilina/mL y 50 µg de estreptomicina/mL, a 37 °C, los cuales se

procesaron dentro de un máximo de 2 h desde la cirugía, de acuerdo a lo descrito previamente por De los Reyes *et al.*, (2007).

Los COC's se obtuvieron a través de cortes finos de la corteza ovárica y se suspendieron en buffer fosfato salino (PBS) a 30-35°C. Se seleccionaron los COC's con características de citoplasma ovocitario oscuro y homogéneo, diámetro mayor a 100 µm y rodeado de al menos 3 capas de células del cúmulo, según lo señalado por De los Reyes *et al.*, (2005; 2011). Luego de lavados en PBS, los COC's fueron inmediatamente procesados como no madurados y madurados *in vitro* (MIV) por diferentes periodos.

Maduración *in vitro* de ovocitos

Los COC's se depositaron en gotas de 100 µL (10-15 ovocitos) del medio de maduración TCM-199 (Earle's salt, tamponada con 25 mM de Hepes; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0,25 mM de piruvato, 10 UI/mL de gonadotrofina coriónica humana (hCG), 100 UI/mL de penicilina y 30

µg/mL de estreptomina, completamente cubiertas con aceite mineral estéril y llevados a estufa de cultivo (Forma Scientific, USA) por periodos de 48, 72 y 96 h, bajo condiciones de 98% de humedad, 38°C de temperatura y 5% de CO₂, de acuerdo a lo descrito por De los Reyes *et al.*, (2005).

Maduración *in vivo* de ovocitos

Los ovocitos ovulados se consideraron como control positivo y se obtuvieron del oviducto de perras entre 48 y 72 h después de la ovulación, según lo señalado por De los Reyes *et al.*, (2012).

El tiempo de ovulación fue estimado antes de la cirugía a través del seguimiento de las perras en la etapa de proestro por frotis seriados de la citología vaginal, la medición de las concentraciones séricas de Progesterona, a través del kit comercial de ELISA semi-cuantitativo (Bio Veto Test; Ovulation® Test La Seyne-Sur-Mer, Francia) y por radioinmunoensayo en fase sólida (RIA; Coat-a-count, Siemens, Health Care Diagnostics, LA, CA, USA). Además, el crecimiento folicular hasta la ovulación, se evaluó con un equipo de

ultrasonografía con Doppler color (Sonosite® serie M-Turbo®; Sonosite Inc., Bothell, WA, USA).

Para la recolección de los ovocitos, se aisló y canuló el oviducto para realizar posteriormente lavados con 15 mL de PBS a 37°C (De los Reyes *et al.*, 2011).

Los ovocitos no madurados, los MIV (48, 72 y 96 h) y ovocitos madurados *in vivo*, se dividieron cada uno en dos grupos: ovocitos sin células del cúmulo, los que fueron desnudados de sus células mediante pipeteos sucesivos con una pipeta angosta de vidrio, y ovocitos con sus células del cúmulo (COC's). En ambos grupos, los ovocitos madurados *in vitro* como los no madurados y los ovulados, se procesaron para Inmunofluorescencia Indirecta y Western blot, utilizando el anticuerpo primario policlonal anti GDF9 humano (C-18) (Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA).

Evaluación del cúmulo oosfero

Los COC's no madurados, MIV y ovulados fueron evaluados según el grado de expansión del cúmulo de acuerdo a lo descrito por Prochazka *et al.*, (2004). Este

autor establece 5 categorías, de acuerdo a lo siguiente: 0, no expandido; 1, mínima expansión; 2, expansión de las capas más externas; 3, expansión de todas las capas del COC's excepto la corona radiada; 4, expansión de todas las capas.

Para la evaluación de la mucificación del cúmulo se utilizó un microscopio de luz invertida equipado con contraste de fase (Nikon, Model TMS N° 301953, Tokio, Japón).

Inmunofluorescencia Indirecta

Se realizaron 3 réplicas experimentales y en cada una de éstas, se utilizaron aproximadamente de 13 a 16 ovocitos sin células del cúmulo y 14 a 16 COC's, en los grupos no madurados, MIV (48, 72 y 96 h) y los ovulados, los cuales se fijaron en Paraformaldehído 4% en PBS (pH 8,2) por 20 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados en PBS (pH 8,2) por 5 min.

Las muestras se permeabilizaron en 1% de Tritón X-100 en PBS (pH 8,2) por un periodo de 10 min. y se lavaron en PBS (pH 8,2). A continuación, los ovocitos se dispusieron en solución de bloqueo al 0,2% de BSA (albúmina sérica bovina) en

PBS (pH 8,2), por una hora y se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti GDF9 humano, preparado en cabra (C-18) (Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA) en dilución de 1/100, durante toda la noche y a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 0,05% de Tween-20 en PBS (PBS-T) (pH 8,2), cada uno de 10 min. y se incubó con el anticuerpo secundario anti cabra conjugado con FITC (Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA) en dilución de 1/500, por una hora y a temperatura ambiente. Luego de realizar tres lavados en PBS-T, los ovocitos se tiñeron en una solución de 1 µg/mL de 4-6 diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA) en PBS (pH 8,2) por 20 min., para la observación del estado nuclear, ya que esta tinción forma complejos fluorescentes azules con la doble hebra de DNA. A continuación, se realizaron tres lavados en PBS-T.

Finalmente, se procedió al montaje de los ovocitos en portaobjetos con medio Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), para luego ser almacenados a 4°C antes de su evaluación. Como control negativo de la

Inmunofluorescencia Indirecta, se utilizaron ovocitos no incubados con el primer anticuerpo.

Para la evaluación de las muestras se utilizó un microscopio de luz invertida equipado con epifluorescencia, Olympus IX71 (emisión 480 nm UV) (Tokio, Japón) y equipado con una lámpara IX2-RFA y una cámara ProgRes-Capture Pro 2.5 (Tokio, Japón).

La presencia de GDF9 se evaluó de acuerdo a la fluorescencia emitida en alta, media y baja. Para objetivizar esta medición las imágenes digitalizadas se analizaron con el software Image J versión 1,45s (Wayne Rasban, NIH, USA). Las imágenes se transformaron a escala de grises y la fluorescencia celular total corregida (FCTC), fue calculada restando la media de la fluorescencia del *background* a la densidad integrada de cada ovocito. Se consideró fluorescencia alta valores superiores de FCTC 10×10^6 , fluorescencia media con valores de FCTC entre 5 y 10×10^6 , y fluorescencia baja con valores de FCTC menores a 5×10^6 .

Los estados de maduración nuclear se clasificaron según lo descrito por De los

Reyes *et al.*, (2011) en: Vesícula Germinal (VG), donde la cromatina se encontró dispersa en el núcleo del ovocito y es nítida la vesícula; Reinicio Meiótico (VGBD), la cromatina se encuentra dispersa y comienza a condensarse; Primera Metafase (MI), los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica; y Segunda Metafase (MII), en la cual los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica acompañados de la expulsión del primer corpúsculo polar. Los ovocitos con distribución irregular de la cromatina o cromatina anormal, se consideraron degenerados y fueron descartados del estudio.

Electroforesis y Western blot

Se realizaron 3 réplicas experimentales, y en cada una de éstas se utilizaron 80 ovocitos sin células del cúmulo y 80 COC's de los grupos no madurados y MIV (48, 72 y 96 h), los que fueron resuspendidos en 20 μ L de buffer de carga y homogeneizados mecánicamente con una micropipeta, para ser sometidos a 100°C por 5 min. para la desnaturalización de las proteínas. Para el procedimiento de separación de las

proteínas y la transferencia de ellas se utilizó una cámara de electroforesis vertical (Mini-Vertical Slab Gel/Blotting System, DCX-700, C.B.S Scientific Company, Inc., Del Mar, CA, USA), con una fuente de poder (Power supply EPS-300 II, C.B.S Scientific Company, Inc., Del Mar, CA, USA).

Las proteínas fueron corridas en el gel de poliacrilamida al 12% con SDS (dodecil sulfato sódico), según el método de Laemmli (1970), a 120 volt, amperaje variable y en una solución de corrida al 1% (TRIS 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% y 900 mL de agua destilada; Winkler Ltda., Santiago, Chile). La transferencia de las proteínas se realizó según el método descrito por Towbin *et al.*, (1979), utilizando una membrana de PVDF (Immobilon[®]-P membrane, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) y en solución de transferencia TBS (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% y SDS 0,04%, pH: 8,3; Winkler Ltda., Santiago, Chile) a 350 mA y voltaje variable, por un periodo de 2 h.

Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados incubando la membrana en TBS-Tween al 0,1% con 5% de leche

descremada, por una hora a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario policlonal anti GDF9 humano, preparado en cabra (C-18) (SC-12244, Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA), en dilución de 1/250, durante toda la noche a 4°C y agitación constante. Luego de realizar tres lavados en TBS-Tween 0,1%, se incubó con el segundo anticuerpo anti-cabra conjugado con fosfatasa alcalina (SC-2771, Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA), en dilución de 1/500, por una hora y a temperatura ambiente. A continuación de esta incubación, se realizaron tres lavados en TBS-Tween 0,1%.

Las bandas de la proteína fueron visualizadas utilizando el método enzimático Fosfatasa Alcalina, en una solución de BCIP/NBT (Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA). El control de carga se realizó incubando la membrana con el anticuerpo anti β -actina (Goat policlonal IgG Actin, SC-1615, Santa Cruz Biotech., Inc., CA, USA), en una dilución de 1/250, y el peso molecular de las proteínas separadas se calculó por comparación con la posición de corrida en paralelo del estándar de peso

molecular.

Análisis estadístico

Para la evaluación de Inmunofluorescencia Indirecta, se utilizaron un total de 419 ovocitos a través de tres réplicas experimentales, de los cuales 209 ovocitos fueron utilizados sin las células del cúmulo y 210 ovocitos rodeados del cúmulo o COC's. En el caso de ovocitos desprovistos de sus células se evaluaron 47 ovocitos no madurados, 146 ovocitos MIV (48, 72 y 96 h) y 16 ovocitos obtenidos del oviducto (ovulados). En los COC's se evaluaron 45 ovocitos no madurados, 149 ovocitos MIV (48, 72 y 96 h) y 16 ovocitos ovulados.

Los resultados obtenidos según la intensidad de la fluorescencia emitida (alta, media y baja) a través del programa Image J versión 1,45 s (Wayne Rasban, NIH, USA), se evaluaron mediante ANOVA y las diferencias significativas entre los diferentes grupos se obtuvieron por la prueba de Duncan. El efecto del tiempo de cultivo sobre la presencia de la proteína, fue evaluado mediante regresión logarítmica (Statistical Analysis System,

SAS Institute, Cary, NC, USA, 2006).

En el caso de la técnica de Western blot, se utilizaron un total de 1920 ovocitos a través de tres réplicas experimentales, de los cuales 960 ovocitos fueron desnudados del cúmulo y 960 ovocitos fueron procesados con las células del cúmulo. En cada grupo estudiado, ovocitos desnudados y ovocitos con las células del cúmulo, se evaluaron un total de 240 ovocitos no madurados y 720 ovocitos MIV (240 ovocitos para cada tiempo de cultivo).

Los inmunoblots de cada réplica experimental fueron escaneados usando un scanner Epson Perfection 1260 (Seiko Epson Corp., Nagano, Japón). La cuantificación de las bandas del Western blot se realizó a través del análisis por densitometría utilizando el programa GEL-PRO ANALYZER V3.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Springs, MD, USA), de acuerdo a lo descrito por De los Reyes *et al.*, (2009), el cual automáticamente identifica los carriles y las bandas, y grafica la densidad óptica. La cantidad de píxeles oscuros (densidad óptica) en una misma área para cada banda fue determinada y expresada como

una densidad óptica integrada y el resultado se presentó como una media de 3 réplicas. Los valores absolutos de densidad se evaluaron mediante ANOVA y las diferencias significativas entre las medias fueron establecidas por la prueba de Duncan. El efecto del tiempo de cultivo sobre la presencia de la proteína, fue evaluado mediante regresión logarítmica (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2006).

Para determinar la asociación entre la proteína GDF9 evaluada por Western Blot y el grado 4 de mucificación del cúmulo en ovocitos no madurados y MIV (48, 72 y 96 h), se realizó la prueba de correlación de Pearson. Para la realización de este análisis, los datos de expansión 4 del cúmulo fueron transformados a arcoseno.

Para todos los análisis, las diferencias con $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

Se evaluó la localización y la intensidad de la inmunexpresión de GDF9 en un total de 419 ovocitos, de los cuales 92 correspondían a ovocitos no madurados,

295 MIV y 32 ovocitos madurados *in vivo*, a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. GDF9 se localizó en el citoplasma de ovocitos desprovistos del cúmulo y en las células del cúmulo (COC's). La intensidad de la fluorescencia varió en los ovocitos (Figura 1a, b, c) y en las células del cúmulo (Figura 1d, e, f), distinguiéndose tres intensidades de fluorescencia emitida: alta, media y baja.

La inmunodetección de GDF9 en el ovocito se observó a través de una

fluorescencia homogénea en todo el citoplasma y estuvo relacionada con el tiempo de cultivo (Anexo 1; Figura 2). La intensidad alta de fluorescencia se presentó en un 6,7% del total de ovocitos evaluados y sólo en aquellos que no fueron sometidos a maduración *in vitro*, representando un 29,8% de éstos (Anexo 1). No obstante, la mayoría de estos ovocitos no madurados presentó la intensidad media de la fluorescencia (70,2%). La intensidad media en los ovocitos cultivados, disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) conforme

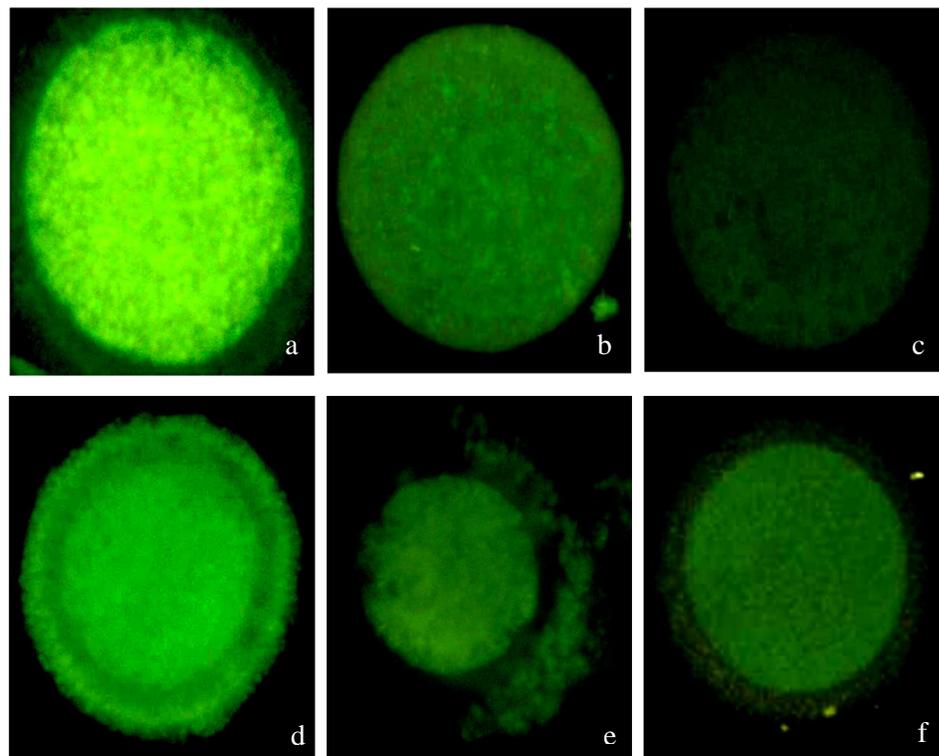


Figura1. Intensidad de la fluorescencia en el citoplasma ovocitario (a, b y c) y en las células del cúmulo (d, e y f) de ovocitos de perra incubados con el anticuerpo policlonal anti-GDF9 humano (C-18). Intensidad alta (a, d), media (b, e) y baja (c, f). Microscopio de epifluorescencia.

aumentó el tiempo de maduración (41,3, 12,5 y 7,7% a las 48, 72 y 96 h, respectivamente). Además, la intensidad media representó el 29,7% del total de ovocitos evaluados. Con respecto a la intensidad baja de la fluorescencia en los ovocitos MIV y en aquellos madurados *in vivo*, se observó en un 63,6% del total de ovocitos evaluados. Además, hubo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de los ovocitos con la intensidad baja de la fluorescencia a medida que progresó el tiempo, representando el 58,7, 87,5 y

92,3% de los ovocitos madurados por 48, 72 y 96 h, respectivamente (Anexo 1).

En los ovocitos desprovistos del cúmulo se evaluó en paralelo el desarrollo meiótico (Figura 3), el cual estuvo relacionado con el tiempo de cultivo (Anexo 1), y la inmunodetección de GDF9. La intensidad alta de la fluorescencia se presentó principalmente en ovocitos en VG (92,9%), sin embargo, en este estado nuclear predominó la intensidad media de la fluorescencia (66,7%) (Anexo 1). Además, los ovocitos en estado de VG sólo se observaron en el grupo que no fue MIV. La intensidad media de la fluorescencia en ovocitos en estado de VGBD y en MI, se presentó en una misma proporción (29%). En el estado de VGBD, predominó la intensidad media en ovocitos no madurados (28%) y alcanzó su mayor proporción a las 48 h (40%). Los ovocitos con intensidad baja de la fluorescencia, sólo se encontraron en aquellos MIV, observándose un bajo porcentaje en el estado de VGBD (4,1%), y por el contrario, en una mayor proporción en estado de MI (83,5%) y MII (100%). Además, los ovocitos en MI con intensidad baja de la fluorescencia,

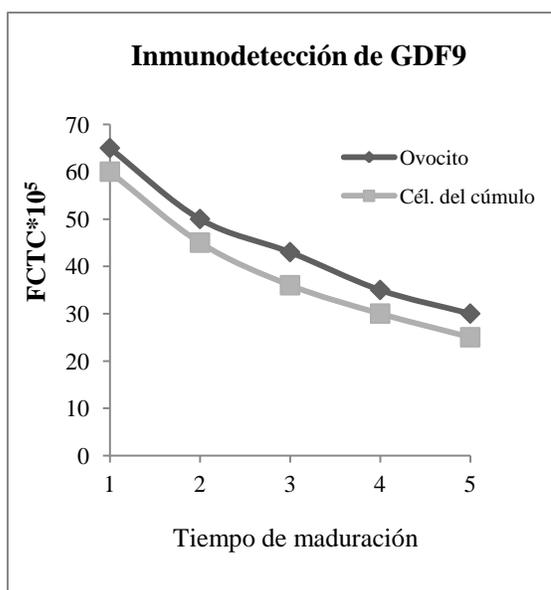


Figura 2. Inmunodetección de GDF9 en el citoplasma ovocitario y en las células del cúmulo a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. Tiempo 1, no madurados; 2, 48 h; 3, 72 h; 4, 96 h; 5, ovulados. Medición a través de la determinación de la Fluorescencia Celular Total Corregida (FCTC).

incrementó significativamente su presentación con el tiempo de cultivo ($p \leq 0,05$), detectándose a las 96 h un 71,2%. Los ovocitos en estado de MII se encontraron a partir de las 48 h de cultivo (4,3%) y predominaron en los madurados por 96 h (19,2%). En los ovocitos obtenidos del oviducto, sólo se observó el estado nuclear de MII y con intensidad baja de la fluorescencia (Anexo 1).

La inmunodetección de GDF9 en las células del cúmulo se evaluó en los COC's y estuvo relacionada con el tiempo de cultivo (Anexo 2; Figura 2). La intensidad alta se observó solamente en ovocitos no madurados, sin embargo, ésta se presentó en una menor proporción respecto a la intensidad media (11,1 y 82,2%, respectivamente). El mayor porcentaje de fluorescencia media (p

$\leq 0,05$) se encontró en ovocitos no madurados (61,7%) y en una menor proporción en ovocitos madurados por 48 h (38,3%). Con respecto a la fluorescencia baja en las células del cúmulo, hubo un menor porcentaje en el grupo de ovocitos no madurados (2,1%), y por el contrario, en ovocitos MIV fue incrementando su presentación, observándose el 100% de los ovocitos con intensidad baja en los cultivados por 72 y 96 h, como también en los ovulados.

Mediante el análisis de Western blot (Figura 4 y 5) utilizando el anticuerpo policlonal anti GDF9 humano (C-18), se detectó tanto la pro-proteína como la proteína madura. Se visualizó una banda de ~56 kDa correspondiente a la pro-proteína y dos bandas de bajo peso molecular, ~18 y 19 kDa, correspondientes a la proteína madura. La

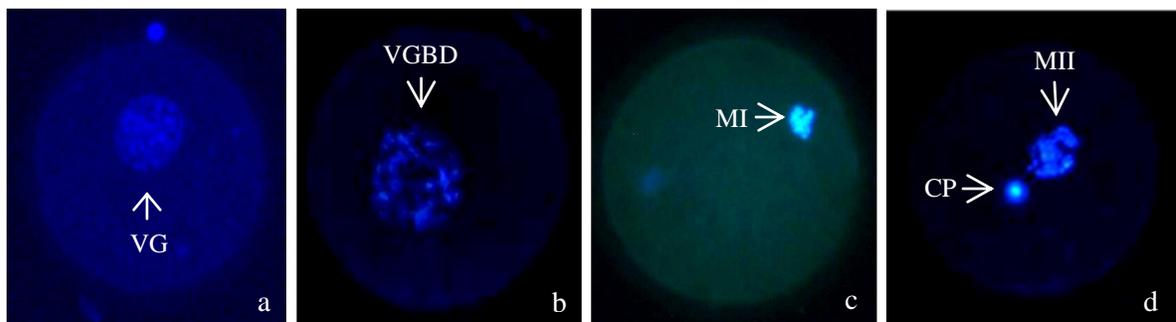


Figura 3. Configuración de la cromatina en ovocitos de perra teñidos con DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) y visualizados bajo luz UV. (a) Vesícula Germinal (VG); (b) Reinicio Meiótico (VGBD); (c) Primera Metafase; (d) Segunda Metafase (MII) con su corpúsculo polar (CP).

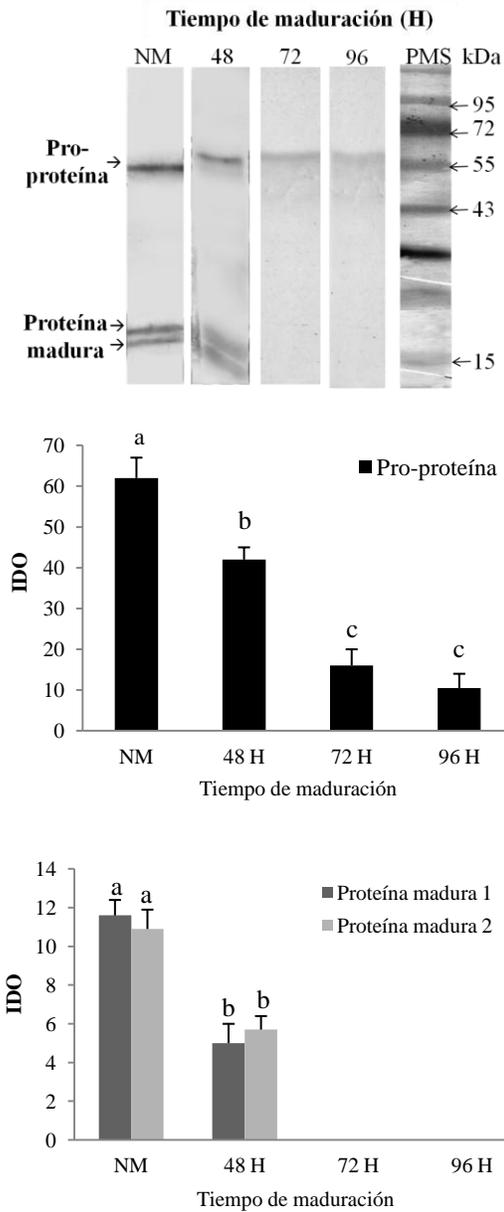


Figura 4. Western blot en COC's de perra incubados con el anticuerpo anti-GDF9 humano (C-18) en el grupo no madurados (NM) y madurados *in vitro* (MIV) por 48, 72 y 96 h. El peso molecular de la pro-proteína y la proteína madura se estimó de acuerdo a la posición del peso molecular estándar (PMS). Intensidad de la densidad óptica (IDO) de cada banda según el tiempo de cultivo. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias ($p \leq 0,05$).

proteína madura se detectó únicamente en el grupo de COC's, principalmente en ovocitos no madurados y en menor proporción en los cultivados por 48 h, sin encontrarse a las 72 ni 96 h de cultivo. La densidad óptica de la banda correspondiente a la pro-proteína fue mayor en COC's que en ovocitos desprovistos del cúmulo ($p \leq 0,05$). En ambos tipos de ovocitos, con y sin células del cúmulo, la densidad óptica de la pro-proteína fue mayor en los no madurados, y disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) conforme aumentó el tiempo de maduración.

Se evaluó el proceso de mucificación en COC's de todos los grupos evaluados (Anexo 3). Los ovocitos que no fueron MIV, sus células del cúmulo se encontraron fuertemente adheridas al ovocito y no presentaron signos de mucificación. La expansión del cúmulo se detectó en los ovocitos MIV y en los ovulados (Anexo 3). En aquellos madurados por 48 h, predominó la expansión de las capas más externas de las células del cúmulo (puntuación 2: 47,2%) y se detectó en menor proporción la expansión grado 3 y 4 (34,5 y 14,1%, respectivamente) (Anexo 3). A medida

que progresó el cultivo se intensificó el proceso de expansión celular, alcanzándose a las 72 h un 54,7% de ovocitos con mucificación 3 y un 38,1% de mucificación 4 (Anexo 3). A las 96 h,

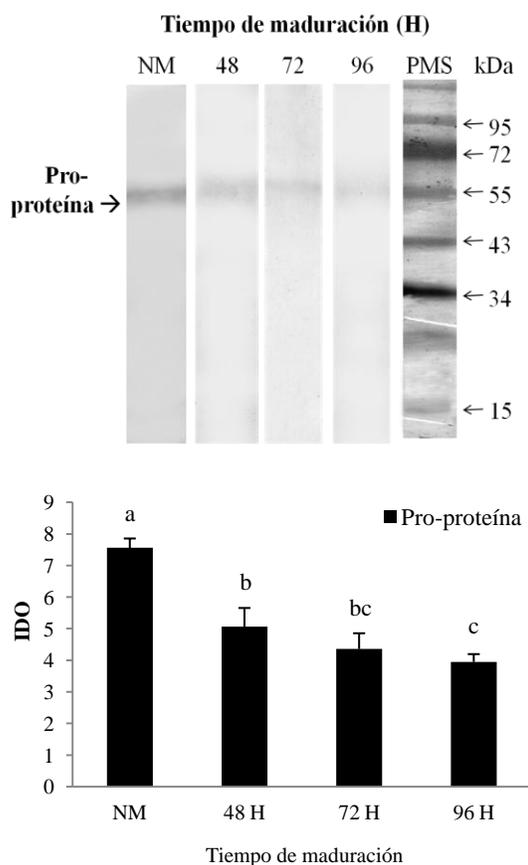


Figura 5. Western blot en ovocitos de perra sin células del cúmulo incubados con el anticuerpo policlonal anti-GDF9 humano (C-18) en el grupo no madurados (NM) y madurados *in vitro* (MIV) por 48, 72 y 96 h. El peso molecular de la pro-proteína se estimó de acuerdo a la posición del peso molecular estándar (PMS). Intensidad de la densidad óptica (IDO) de cada banda según el tiempo de cultivo. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias ($p \leq 0,05$).

incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) la puntuación 4, observándose en un 52,1% y en menor proporción la puntuación 3 (43,1%). En ovocitos ovulados, hubo un mayor porcentaje de puntuación 4 (75%) que lo detectado en ovocitos MIV, y una menor cantidad de puntuación 3 (25%) (Anexo 3). Los ovocitos obtenidos *in vivo*, además de presentar una mayor tasa de expansión 4 del cúmulo, se observó un 100% de estado nuclear de MII.

Se realizó el análisis de la correlación de Pearson para evaluar la inmunodetección de la pro-proteína en los Western blots de COC's y la máxima expansión observada en ovocitos no madurados y MIV por 48, 72 y 96 h, donde se observó que GDF9 se relacionó alta y negativamente ($r = -0,97$, $p \leq 0,05$) con el proceso de mucificación del cúmulo.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se detectó por primera vez la proteína de GDF9 en ovocitos y células del cúmulo de perra a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y Western blot.

Se identificó GDF9 principalmente en los ovocitos y en menor proporción en las células del cúmulo en los distintos grupos evaluados, lo que concuerda con lo observado en ovocitos de cerdas (Prochazka *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008) y vacas (Hosoe *et al.*, 2011), al ser una proteína secretada específicamente por el ovocito, la cual es primero procesada enzimáticamente para ejercer su acción en las células de la granulosa (Vitt *et al.*, 2000; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004). La detección de la proteína en ambos tipos celulares, en el grupo no madurados, madurados *in vitro* e *in vivo* evaluada como intensidad de la fluorescencia y coincidente con los resultados obtenidos por Western blot en los no madurados y MIV, demostró que existe una asociación con el tiempo de maduración, observándose a las 96 h prácticamente la totalidad de ovocitos con una baja inmunodetección de GDF9, similar a lo presentado en ovocitos ovulados (control positivo). Además, la mayor concentración de la proteína en los no madurados, reflejada en la detección de la fluorescencia alta y la mayor proporción de fluorescencia media, indica que los ovocitos obtenidos desde los ovarios presentaban distintos niveles de

GDF9, y que por lo tanto, aquellos gametos con mayor concentración de este factor corresponderían a estadios más tempranos del desarrollo dentro de los no madurados, ya que la intensidad alta no se encontraron durante el cultivo *in vitro*. Lo anterior, indica que GDF9 principalmente estaría actuando a nivel de los folículos preantrales.

De la misma manera, GDF9 también se relacionó con el desarrollo nuclear del ovocito, detectándose principalmente en estado de VG, y en menor proporción en estado de MII. La participación de este factor durante la maduración de ovocitos de perra podría vincularse con lo descrito previamente en ratones (Elvin *et al.*, 1999; 2000), ovejas (Juengel *et al.*, 2002; McNatty *et al.*, 2007), mujeres (Sun *et al.*, 2010), cabras (Silva *et al.*, 2005) y en vacas (Juengel *et al.*, 2009), en los cuales evita que ocurra una luteinización prematura del folículo ovárico, a través de suprimir la expresión de receptores para LH. Sin embargo, en los caninos existe una luteinización preovulatoria y la maduración citoplasmática y nuclear del ovocito ocurre con concentraciones elevadas de Progesterona, la cual comienza a aumentar a partir de la etapa

de Proestro del ciclo estral (Reynaud *et al.*, 2009; Concannon 2011). Por lo tanto, pudiese ser que GDF9 en la perra esté expresado en un nivel menor respecto a otras especies animales, lo cual pudiese explicar la existencia de una luteinización preovulatoria del folículo ovárico. Cabe destacar que hasta el momento no se han realizado estudios que describan la funcionalidad de GDF9 durante la maduración de ovocitos de perra.

La dinámica de presentación de GDF9 durante la maduración de ovocitos caninos sigue una tendencia similar a lo descrito previamente en cerdas (Prochazka *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Jackowska *et al.*, 2013), roedores (Sánchez *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2012), ovejas (Bebbere *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012), vacas (Lonergan *et al.*, 2003) y mujeres (Assou *et al.*, 2006), a través de Inmunofluorescencia Indirecta, Western blot o RT-PCR. Por lo anterior, pareciera ser que este factor ovocitario correspondería a una proteína altamente conservada en los gametos femeninos de distintos mamíferos, ya que independiente de las características fisiológicas propias de cada especie, la presentación de GDF9 en caninos, es

similar a lo descrito en otros animales.

De acuerdo a lo observado a través de la fluorescencia como la densidad óptica de las bandas detectadas por Western blot, se puede inferir que los cambios en la secreción de la proteína de GDF9 en ovocitos caninos, estarían relacionados con el estado de maduración ovocitaria, indicándose que la mayor síntesis de GDF9 comenzaría a nivel del folículo ovárico, principalmente en estadios más tempranos del desarrollo folicular, y que disminuiría conforme progresa el proceso de maduración del gameto.

A través de la técnica de Western blot se pudo identificar y comparar los niveles de la pro-proteína y la proteína madura de GDF9 en ovocitos de perra no madurados y MIV. Se detectó una banda de ~56 kDa y dos bandas de ~18 y 19 kDa que corresponderían, de acuerdo a lo descrito previamente en primates (Duffy 2003), cerdas (Li *et al.*, 2008), ovejas (Lin *et al.*, 2012), roedores (Elvin *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999; Gilchrist *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2012) y búfalos (Jain *et al.*, 2012), a la pro-proteína y la proteína madura de GDF9 respectivamente, ya que este factor es sintetizado como una

prepro-proteína con un péptido señal, un prodominio y un dominio maduro (McNatty *et al.*, 2004).

La pro-proteína se presentó en los ovocitos con las células del cúmulo y en aquellos desprovistos de éstas, en el grupo no madurados y en aquellos cultivados por 48, 72 y 96 h. Además, la pro-proteína se encontró en mayor proporción en los COC's, indicando un efecto acumulativo entre el ovocito y las células del cúmulo. Por lo anterior, pareciera ser que las células del cúmulo de perra estarían expresando GDF9, lo que también se ha descrito en bovinos (Hosoe *et al.*, 2011), porcinos (Prochazka *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008), caprinos (Silva *et al.*, 2005) y en humanos (Zhao *et al.*, 2010). Respecto al rol de este precursor de la proteína, aún no se conoce, sin embargo, un estudio reciente realizado en ratón (McIntosh *et al.*, 2012), demostró que la pro-proteína tendría la función de aumentar la tasa de ovulación y por consiguiente el tamaño de la camada, por lo cual pareciera ser más significativa su participación en especies poliovulares, como es el caso de los caninos. En relación a la proteína madura, sólo se detectó en ovocitos con células

del cúmulo del grupo no madurados y en los cultivados por 48 h, indicando que la forma activa de GDF9 ejercería su acción en las células del cúmulo, similar a lo descrito previamente en otros animales en que se ha visto que participaría en la síntesis de ácido hialurónico durante la expansión del cúmulo (Dragovic *et al.*, 2005; 2007; Yeo *et al.*, 2008) y estimularía la proliferación de las células de la granulosa (Vitt *et al.*, 2000; McNatty *et al.*; 2005), entre otras funciones.

La presentación de la pro-proteína como la proteína madura en ovocitos caninos, sigue un patrón similar a lo observado durante la MIV de ovocitos de cerdas (Li *et al.*, 2008), donde ambas formas de GDF9 disminuyen a medida que progresa el cultivo y la proteína madura sólo es detectada tempranamente. La menor participación de este factor durante etapas tardías del desarrollo ovocitario se ha confirmado en ovejas (Juengel *et al.*, 2002), en el cual al neutralizar la función de GDF9 *in vivo*, la ovulación se desarrolla normalmente. Durante la maduración de los gametos de perra la proteína madura sólo estaría participando en etapas tempranas del desarrollo

ovocitario.

A diferencia de lo descrito en cerdas (Prochazka *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008), ovejas (Silva *et al.*, 2005), vacas (Hosoe *et al.*, 2011) y roedores (Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2005), en el que se han detectado solamente una proteína madura de GDF9, en el presente estudio se observaron dos bandas correspondientes a la proteína madura en ovocitos de perra, lo que concuerda con las dos variantes de este factor descritas recientemente en ovarios caninos a través de la técnica de RT-PCR (Hashimoto *et al.*, 2012). Pareciera ser que los ovocitos caninos serían, hasta ahora, la única especie en presentar dos variantes de GDF9, lo que pudiese estar relacionado con el retraso meiótico, considerando que este factor en los roedores estimula la expansión del cúmulo y el proceso de maduración ovocitaria posterior al alza de LH (Elvin *et al.*, 1999; 2000; Su *et al.*, 2004), y además, podría relacionarse con la ausencia de la detección de la proteína madura a las 72 y 96 h de cultivo, indicando una menor expresión de GDF9 en perra respecto a otros mamíferos.

Dado que GDF9 en ratón se ha visto

involucrado en el proceso de mucificación del cúmulo (Elvin *et al.*, 1999; Dragovic *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2013), en este estudio se evaluó primeramente el desarrollo de la expansión del cúmulo durante la maduración de ovocitos *in vitro* e *in vivo* y posteriormente se relacionó con la presencia de la proteína detectada por Western blot. A partir de las 48 h de cultivo las células del cúmulo se expandieron y, a medida que progresó el tiempo de maduración, hubo un incremento en el nivel de expansión celular, lo que concuerda con estudios previos realizados en gametos de perra MIV (De los Reyes *et al.*, 2005; Bolamba *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2011). A las 48 h de cultivo predominó la expansión de las capas más externas del cúmulo, y en el caso de ovocitos madurados por 72 y 96 h predominó la expansión con excepción de la corona radiada y la expansión completa del cúmulo respectivamente, lo que se vio reflejado, al igual que lo determinado por Reynaud *et al.*, (2004) y Lee *et al.*, (2007), en una mayor dificultad en la obtención de ovocitos sin células del cúmulo, para su posterior evaluación nuclear. Lo anterior puede ser explicado

debido a que en esta especie las capas del cúmulo más cercanas al ovocito emiten fuertes proyecciones que atraviesan la zona pelúcida y que permanecen posterior a la ovulación, lográndose así una fuerte adhesión entre ambos tipos celulares (Reynaud *et al.*, 2005; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008).

Debido a que la pérdida de las uniones entre el ovocito y el cúmulo son responsables del reinicio meiótico en la mayoría de los mamíferos (Sirard 2001; Edry *et al.*, 2006), se evaluó el desarrollo nuclear de los ovocitos caninos cultivados *in vitro*. En todos los tiempos de cultivo predominó el estado nuclear de MI y hubo una baja tasa de ovocitos con desarrollo de MII, característica común en otros estudios, debido a la dificultad de replicar las condiciones de MIV (Saint-Dizier *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2007; 2011; 2012). Otoi *et al.*, (2007) y Chebrout *et al.*, (2009) determinaron que la pérdida de la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo durante el proceso de expansión pudiese estar relacionada con la maduración nuclear. Sin embargo, Rodrigues *et al.*, (2007), indican que el grado de expansión celular no es un parámetro confiable en esta

especie para determinar desarrollo meiótico completo, como también de su competencia, lo que también se observó en nuestro estudio, ya que a pesar de tener más del 50% de los ovocitos con máxima expansión celular, hubo una baja tasa de MII. Con respecto a los ovocitos ovulados, todos presentaron el estado de MII y con expansión del cúmulo, con excepción de la corona radiada y con más del 70% con máxima expansión, similar a lo descrito en otros estudios *in vivo*, en que las células de la corona radiada pierden las uniones con el ovocito entre 48 a 72 h de ocurrida la ovulación, coincidente con el reinicio meiótico (Reynaud *et al.*, 2005; 2009; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008). Por tanto, durante la maduración *in vitro* de ovocitos de perra, la expansión del cúmulo se desarrolla en forma más eficiente que la maduración nuclear del gameto, a diferencia de lo descrito en otros animales en que ambos procesos ocurren coordinadamente, obteniéndose entre el 80-90% de MII (Downs *et al.*, 1995; Prochazka *et al.*, 2004; Yokoo y Sato 2004; Li *et al.*, 2008). Pareciera ser que las células del cúmulo en la perra, estarían cumpliendo un rol importante en el desarrollo ovocitario, posiblemente

debido a la dificultad del cúmulo para estimular el desarrollo meiótico a MII *in vitro*.

La detección de la proteína de GDF9 y la expansión del cúmulo, se correlacionaron fuertemente de manera inversa. Lo anterior, concuerda con estudios realizados en cerdas (Prochazka *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008) y en ratones (Guéripel *et al.*, 2006; Yoshino *et al.*, 2006), en los cuales a medida que progresó la mucificación del cúmulo la detección de GDF9 fue disminuyendo significativamente y, por el contrario, aumentó la detección de BMP15, factor ovocitario perteneciente a la superfamilia TGF β . Sin embargo, investigaciones realizadas en roedores han demostrado que GDF9 incrementa el número de células del cúmulo que pierden las uniones Gap con el ovocito (Elvin *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2003; Dragovic *et al.*, 2005; Gui y Joyce, 2005; Yeo *et al.*, 2008) y en cerdas la proteína detectada por Western blot durante el cultivo *in vitro* disminuye principalmente posterior a iniciarse la expansión celular (Li *et al.*, 2008). Por lo anterior, en caninos no se podría descartar la posibilidad de que GDF9 pudiese ser necesaria para que se

inicie la mucificación del cúmulo, ya que la proteína madura se detectó en las células del cúmulo del grupo no madurados y en los madurados por 48 h, en el que además en este tiempo de cultivo se inició el proceso de expansión.

Una de las posibles vías de acción de GDF9 durante la expansión del cúmulo se ha descrito en ratón, donde este factor interactúa con la Proteína Kinasa Activadora Mitogénica (MAPK) (Su *et al.*, 2002; 2003; Sasseville *et al.*, 2010), la cual a su vez participa en el reinicio meiótico y la mucificación del cúmulo en los mamíferos (Su *et al.*, 2002). Sin embargo, en caninos la proteína MAPK sigue un patrón similar a lo observado en otras especies e iniciándose la expansión a nivel del folículo ovárico (Saint-Dizier *et al.*, 2004; Viaris de Lesegno *et al.*, 2008; Reynaud *et al.*, 2009), por lo cual uno de los factores que estaría marcando la diferencia durante el proceso de maduración de ovocitos caninos respecto a otros mamíferos, sería la detección de dos variantes de GDF9.

Por consiguiente, GDF9 es una proteína que está presente en los ovocitos y en las células del cúmulo de perra, y que estaría

participando en los procesos iniciales del crecimiento y desarrollo ovocitario. Además, a pesar del rol descrito para este factor de favorecer la mucificación del cúmulo, GDF9 en caninos no estaría relacionado directamente con las etapas finales del proceso de expansión celular, sin embargo, podría estar involucrado en eventos tempranos de la maduración del gameto. Es posible que en caninos otros factores pudieran estar favoreciendo el desarrollo del ovocito en etapas finales y, por ende, en la maduración tardía en el oviducto.

Anexo 1. Inmunodetección de GDF9 en el citoplasma ovocitario, en relación al estado de maduración nuclear en ovocitos de perra no madurados, madurados *in vitro* (MIV) por 48, 72 y 96 horas, y madurados *in vivo* (ovulados). Número (% de ovocitos en cada grupo de maduración).

Grupo de ovocitos	Intensidad de la fluorescencia en el citoplasma ovocitario	Estado de Maduración Nuclear				Total
		VG	VGBD	MI	MII	
		n= 39	n= 25	n= 109	n= 36	n= 209
No madurados n= 47	A	13 (27,7) ^{aA}	1 (2,1) ^{Ab}	–	–	14 (29,8)
	M	26 (55,3) ^{bA}	7 (14,9) ^{bBx}	–	–	33 (70,2)
	B	–	–	–	–	–
MIV 48H n= 46	A	–	–	–	–	–
	M	–	10 (21,7) ^{ax}	9 (19,6) ^{ax}	–	19 (41,3)
	B	–	4 (8,7) ^{bAx}	21 (45,7) ^{bBx}	2 (4,3) ^{Ax}	27 (58,7)
MIV 72H n= 48	A	–	–	–	–	–
	M	–	1 (2,1) ^{Ay}	5 (10,4) ^{aBy}	–	6 (12,5)
	B	–	1 (2,1) ^{Ay}	33 (68,8) ^{bBy}	8 (16,7) ^{Cy}	42 (87,5)
MIV 96 H n= 52	A	–	–	–	–	–
	M	–	–	4 (7,7) ^{ay}	–	4 (7,7)
	B	–	1 (1,9) ^{Ay}	37 (71,2) ^{bBy}	10 (19,2) ^{Cy}	48 (92,3)
Ovulados n= 16	A	–	–	–	–	–
	M	–	–	–	–	–
	B	–	–	–	16 (100) ^z	16 (100)

Estado nuclear: VG, vesicular germinal; VGBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. Intensidad de la fluorescencia: A, alta; M, media; B, baja

^{a-c} Dentro de la columna y tiempo de muestreo, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

^{A-C} Dentro de la fila, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

^{x-z} Dentro de la columna e intensidad de la fluorescencia, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

Anexo 2. Inmunodetección de GDF9 en ovocitos de perra con células del cúmulo del grupo no madurados, madurados *in vitro* (MIV) por 48, 72 y 96 horas, y madurados *in vivo* (ovulados). Número (% de ovocitos en cada grupo de maduración).

Grupo de ovocitos	Intensidad de la fluorescencia en las células del cúmulo			Total
	Alta	Media	Baja	
	n= 5	n= 60	n= 145	n= 210
No madurados	5 (11,1) ^A	37 (82,2) ^{aB}	3 (6,7) ^{Aa}	45 (100)
MIV 48 H	-	23 (46) ^b	27 (54) ^b	50 (100)
MIV 72 H	-	-	49 (100) ^c	49 (100)
MIV 96 H	-	-	50 (100) ^c	50 (100)
Ovulados	-	-	16 (100) ^c	16 (100)

^{a-c} Dentro de la columna y tiempo de muestreo, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

^{A-C} Dentro de la fila, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

Anexo 3. Distribución del grado de expansión de las células del cúmulo en ovocitos de perra no madurados, madurados *in vitro* (MIV) por 48, 72 y 96 h, y ovulados. Puntuación: 0, no expansión del cúmulo; 1, mínima expansión; 2, expansión de las capas más externas; 3, expansión de todas las capas del COC's excepto la corona radiada; 4, expansión de todas las capas. Número (% de ovocitos en cada grupo de maduración).

Grupo de ovocitos	Grados de expansión de las células del cúmulo					Total
	0	1	2	3	4	
	n= 285	n= 12	n= 172	n= 387	n= 314	n= 1170
No madurados	285 (100)	-	-	-	-	285 (100)
MIV 48 H	-	12 (4,1) ^A	137 (47,2) ^{aB}	100 (34,5) ^{aC}	41 (14,1) ^{aD}	290 (100)
MIV 72 H	-	-	21 (7,3) ^{bA}	158 (54,7) ^{bB}	110 (38,1) ^{bC}	289 (100)
MIV 96 H	-	-	14 (4,8) ^{cA}	125 (43,1) ^{cB}	151 (52,1) ^{cC}	290 (100)
Ovulados	-	-	-	4 (25) ^{dA}	12 (75) ^{dB}	16 (100)

^{a-d} Dentro de la columna y tiempo de muestreo, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

^{A-D} Dentro de la fila, números sin un superíndice común difieren ($p \leq 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

- **ASSOU, S.; ANAHORY, T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S.** 2006. The human cumulus–oocyte complex gene expression profile. *Hum. Reprod.* 21:1705–19.
- **BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G.G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S.** 2008. Expression pattern of Zygote Arrest 1 (ZAR1), Maternal Antigen that Embryo Requires (MATER), Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and in vitro produced preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 908-915.
- **BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER, C.L.; SAWYER, H.R.** 1999. Molecular cloning of the ovine Growth Differentiation Factor 9 gene and expression of Growth Differentiation Factor 9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60: 381-386.
- **BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; HARPER, S.A.; SANDLER, J.L.; DURRANT, B.S.** 2006. Effects of Epidermal Growth Factor and hormones on granulose expansion and nuclear maturation of dog oocyte in vitro. *Theriogenology* 65: 1037-1047.
- **CHEBROUT, M.; DE LESEGNO, C.V.; REYNAUD, K.; CHAT, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2009. Nuclear and cytoplasmic maturation of canine oocytes related to in vitro denudation. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 243-246.
- **CHOI, T.; AOKI, F.; MORI, M.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y.; KOHMOTO, K.** 1991. Activation of p34 cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 113: 789–795.

- **CONCANNON, P.W.** 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 200-210.

- **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.; SEPULVEDA, S.; MORENO, V.; PARRAGUEZ, V.; BARROS, C.** 2007. Evaluation of cortical granules and viability of canine oocytes during long-term in vitro maturation. *Vet. Rec.* 160: 196-198.

- **DE LOS REYES, M.; HETZ, J.; PALOMINO, J.** 2009. Ultrastructural study of the canine zona pellucida surface during in vitro maturation. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 247-250.

- **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.; JOFRÉ, S.; VILLARROEL, A.; MORENO, R.** 2012. Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum Dynamic during meiotic development in canine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 93-97.

- **DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M.** 1996. Growth Differentiation Factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531-535.

- **DOWNS, S.M.; HUNZICKER-DUNN, M.** 1995. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site selective analogs of Cyclic Adenosine Monophosphate. *Dev. Biol.* 1: 72-85.

- **DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULZ, S.J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B.** 2005. Role of oocyte secreted Growth Differentiation Factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology* 146: 2798-2806.
- **DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULZ, S.J.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B.** 2007. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol. Reprod.* 76: 848-857.
- **DUFFY, D.M.** 2003. Growth Differentiation Factor 9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol. Reprod.* 69: 725-732.
- **EDRY, I.; SELA-ABRAMOVICH, S.; DEKEL, N.** 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell to cell communication in the ovarian follicle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 102-106.
- **ELVIN, J.A.; CLARK, A.T.; WANG, P.; WOLFMAN, N.M.; MATZUK, M.M.** 1999. Paracrine actions of Growth Differentiation Factor 9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.* 13: 1035–1048.
- **ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M.** 2000. Growth Differentiation Factor 9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:10288–10293.
- **EPPIG, J.** 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-838.
- **GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; CRANFIELD, M.; JEFFERY, L.A.; AMATO, F.; SCOTT, S.J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; LANKINEN, H.; MOTTERSHEAD, D.G.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.** 2004. Immunoneutralization of Growth Differential Factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic

mitogenic activity. *Biol. Reprod.* 71: 732-739.

- **GUÉRIPEL, 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.
- **GUI, L.M.; JOYCE, I.M.** 2005. RNA interference evidence that Growth Differentiation Factor 9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol. Reprod.* 72: 195-199.
- **HASHIMOTO, O.; TAKAGI, R.; YANUMA, F.; DOI, S.; SHINDO, J.; ENDO, H.; HASEGAWA, Y.; SHIMASAKI, S.** 2012. Identification and characterization of canine Growth Differentiation Factor 9 and its splicing variant. *Gene* 499: 266-272.
- **HAYASHI, M.; MCGEE, E.A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U.M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A.J.** 1999. Recombinant Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236-1244.
- **HOSOE, M.; KANEYAMA, K.; USHIZAWA, K.; HAYASHI, K.; TAKAHASHI, T.** 2011. Quantitative analysis of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 33.
- **JACKOWSKA, M.; KEMPISTY, B.; WOZNA, M.; PIOTROWSKA, H.; ANTOSIK, P.; ZAWIERUCHA, P.; BUKOWSKA, D.; NOWICKI, M.; JASKOWSKI, J.M.; BRÜSSOW, K.P.** 2013. Differential expression of GDF9, TGFB1, TGFB2 and TGFB3 in porcine oocytes isolated from follicles of different size before and after culture in vitro. *Acta Vet. Hung.* 61: 99-115.

- **JAIN, T.; JAIN, A.; KUMAR, P.; GOSWAMI, S.L.; DE, S.; SINGH, D.; DATTA, T.K.** 2012. Kinetics of GDF9 expression in buffalo oocytes during in vitro maturation and their associated development ability. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3: 477-484.
- **JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P.** 2002. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67: 1777-1789.
- **JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; BERG, M.; HAMEL, K.; SMITH, P.; LAWRENCE, S.B.; WHITING, L.; MCNATTY, K.P.** 2009. Effects of active immunization against Growth Differentiation Factor 9 and/or Bone Morphogenetic Protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction* 1: 107-114.
- **LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **LEE, H.S.; SEO, Y.I.; YIN, X.J.; CHO, S.G.; LEE, S.S.; KIM, N.H.; CHO, S.K.; KONG, I.K.** 2007. Effect of Follicle Stimulation Hormone and Luteinizing Hormone on cumulus cell expansion and in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 561-567.
- **LEE, G.; KIM, H.; HWANG, W.; HYUN, S.** 2008. Characterization of porcine Growth Differentiation Factor 9 and its expression in oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 707-714.
- **LI, H.K.; KUO, T.Y.; YANG, H.S.; CHEN, L.R.; LI, S.S.L.; HUANG, H.W.** 2008. Differential gene expression of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 103: 312-322.

- **LIN, J.; WANG, L.; ZHAO, Y.; HOU, M.; WANG, J.; HUANG, J.** 2012. Relations between GDF9, Zar1, Mater and DNMT1 gene relative mRNA abundance and oocytes quality of ovine oocytes. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7:868-875.

- **LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ, A.A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.** 2003. Relative Messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory Luteinizing Hormone surge. *Mol. Reprod. Dev.* 3: 297-305.

- **LOPES, G.; ALVES, M.G.; CARVALHO, R.A.; LUVONI, G.C.; ROCHA, A.** 2011. DNA fragmentation in canine oocytes after in vitro maturation in TCM-199 medium supplemented with different proteins. *Theriogenology* 7: 1304-1312.

- **MCLNTOSH, C.J.; LAWRENCE, S.; SMITH, P.; JUENGEL, J.L.; MCNATTY, K.P.** 2012. Active immunization against the proregion of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice. *Reproduction* 143: 195-201.

- **MCNATTY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B.; READER, K.; HANRAHANL, J.P.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, L.P.** 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128: 379–386.

- **MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; READER, K.L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.F.; MOTTERSHEAD, D.G.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M.P.** 2005. Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 cooperate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* 129: 481-487.

- **MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; JUENGEL, J.L.** 2007.

The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol. Reprod.* 4: 552-560.

- **NAITO, K.; TOYODA, Y.** 1991. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 93: 467-473.
- **ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J.; CRAIG, J.; WANG, Y., KOTSUJY, F.; TSANG, B.** 2006. Growth Differentiation Factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol. Endocrinol.* 20: 2456-2468.
- **ORISAKA, M.; JIANG, J.; ORISAKA, S.; KOTSUJI, F.; TSANG, B.** 2009. Growth Differentiation Factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology* 150: 2740-2748.
- **OTOI, T.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.E.** 2007. Role of cumulus cell on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 184-189.
- **PENG, J.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; RANGARAJAN, A.; KATTAMURI, C.; PETERSON, R.T.; EPPIG, J.J.; THOMPSON, T.B.; MATZUK, M.M.** 2013. Growth Differentiation Factor 9: Bone Morphogenetic Protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8: 776-785.
- **PROCHAZKA, R.; NEMCOVA, L.; NAGYOVA, E.; KANKA, J.** 2004. Expression of Growth Differentiation Factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 71: 1290–1295.
- **REYNAUD, K.; SAINT-DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2004. In vitro maturation and fertilization of canine oocytes. *Methods Mol. Biol.* 253: 255-272.
- **REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.;**

CHEBROUT, M.; VIARIS 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.** 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology* 66: 1685-1693.
- **REYNAUD, K.; DE LESEGNO, C.V.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 72: 1120–1131.
- **RODRIGUES, B.A.; DOS SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L.** 2007. Effect of maturation medium on in vitro cleavage of canine oocytes fertilized with fresh and cooled homologous semen. *Zygote* 15: 43-53.
- **SAINT-DIZIER, M.; REYNAUD, K.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2004. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 205-212.
- **SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J.** 2009. Quantification of oocyte specific transcripts in follicle enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 15: 539 –50.
- **SASSEVILLE, M.; RITTER, L.J.; NQUYEN, T.M.; LIU, F.; MOTTERSHEAD, D.G.; RUSSELL, D.L.; GILCHRIST, R.B.** 2010. Growth Differentiation Factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells. *J. Cell. Sci.* 123: 3166-3176.

- **SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL H.T.; ROELEN, B.A.; FIGUEIREDO, J.R.** 2005. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* 70: 11-19.
- **SIRARD, M.A.** 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241-1254.
- **SPICER, L.; AAD, P.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A.; HSUEH, A.** 2008. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biol. Reprod.* 18: 243-253.
- **SU, Y.Q.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J.** 2002. Mitogen Activated Protein Kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 143: 2221-2232.
- **SU, Y.Q.; DENEGRE, J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J.** 2003. Oocyte dependent activation of Mitogen Activated Protein Kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte cumulus cell complex. *Dev. Biol.* 263: 126-138.
- **SU, Y.Q.; WU, X.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.L.; DENEGRE, J.N.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.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.
- **SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.J.; AFFOURTIT, J.P.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J.J.** 2008. Oocyte

regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135: 111-121.

- **SUN, R.Z.; LEI, L.; CHENG, L.; JIN, Z.F.; ZU, S.J.; SHAN, Z.Y.; WANG, Z.D.; ZHANG, J.X.; LIU, Z.H.** 2010. Expression of GDF9, BMP15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *J. Mol. Histol.* 6: 325-332.
- **SUZUKAMO, C.; HOSHINA, M.; MORIYA, H.; HISHIYAMA, N.; NAKAMURA, S.; KAWAI, F.; SATO, H.; ARIGA, M.; ITO, J.; KASHIWAZAKI, N.** 2009. Kinetics of nuclear status and kinase activities during in vitro maturation of canine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 55: 116-120.
- **TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4359.
- **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.
- **VITT, U.A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A.J.** 2000. Growth Differentiation Factor 9 stimulates proliferation but suppresses the Follicle Stimulating Hormone induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.* 62: 370-377
- **YEO, C.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J.; LANE, M.** 2008. Exogenous Growth Differentiation Factor 9 in oocytes maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum. Reprod.* 23: 67-73.
- **YOKOO, M.; SATO, E.** 2004. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte

maturation. *Int. Rev. Cytol.* 91: 235-251.

- **YOSHINO, O.; MCMAHON, H.E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S.** 2006. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP15 in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 10678-10683.

- **ZHANG, D.X.; PARK, W.J.; SUN, S.C.; XU, Y.N.; LI, Y.H.; CUI, X.S.; KIM, N.H.** 2011. Regulation of maternal gene expression by MEK/MAPK and MPF signalling in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *J. Reprod. Dev.* 57: 49-56.

- **ZHAO, S.Y.; QIAO, J.; CHEN, Y.J.; LIU, P.; LI, J.; YAN, J.** 2010. Expression of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 94: 261-267.