



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

“DINÁMICA DEL APARATO DE GOLGI DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE OVOCITOS DE PERRA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO MEIÓTICO”

María Soledad Jofré Herrera

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

“DINÁMICA DEL APARATO DE GOLGI DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE OVOCITOS DE PERRA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO MEIÓTICO”

“Golgi apparatus dynamic during *in vitro* and *in vivo* maturation in canine oocyte and its relationship with meiotic development”

María S. Jofré Herrera.

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Abstract

Oocyte maturation involves nuclear and cytoplasmic changes that involve the resumption of meiosis and redistribution of organelles such as Golgi. The coordination of these processes over time is a critical event in the establishment of normal embryonic development. This research studied the dynamics of Golgi apparatus (GA) during the maturation of canine oocytes and its relation to nuclear progression. The location of the GA was assessed by indirect immunofluorescence in immature oocytes, matured *in vitro* (IVM) up to 96 hrs and matured *in vivo*, which were randomized to be incubated with the Ac against GA proteins GM130 and Giantin; chromatinic configuration was determined by DAPI staining, in germinal vesicle (GV), meiotic resumption (GVBD), metaphase I (MI) and II (MII). The results showed two patterns of distribution of immunostain: a) Homogeneous in the cytoplasm, which predominated in immature oocytes (99%) presenting in parallel the GV state (87%); b) Cortical, mainly in oocytes undergoing IVM (97%) where meiosis resumes incrementing meiotic development with the culture time and the MI state being predominant (75%). All *in vivo* matured oocytes showed cortical pattern and 94% of MII. These results suggest that in canine oocytes the GA is relocated during IVM, which is related to the meiotic progression but in an uncoordinated manner, being this less efficient *in vitro* than *in vivo*.

Keywords: Golgi apparatus; Canine oocyte; In vitro maturation; Cytoplasmic maturation; Meiotic development.

Resumen

La maduración ovocitaria involucra cambios nucleares y citoplasmáticos que comprenden la reanudación de la meiosis y la redistribución de organelos como el aparato de Golgi. La coordinación de estos procesos en el tiempo es un evento crítico para el establecimiento de desarrollo embrionario normal. Este trabajo estudió la dinámica del aparato de Golgi (AG) durante la maduración de ovocitos de perra y su relación con la progresión nuclear. La localización del AG se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta en ovocitos no madurados, madurados *in vitro* (IVM) hasta 96 hrs y madurados *in vivo*, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente para ser incubados con los Ac contra las proteínas del AG GM130 y Giantin; la configuración cromatínica se determinó mediante tinción DAPI, en vesícula germinal (VG), reinicio meiótico (GVBD), metafase I (MI) y II (MII). Los resultados mostraron dos patrones de distribución de la inmunomarca: a) Homogéneo en el citoplasma, que predominó en ovocitos no madurados (99%) presentando paralelamente el estado de VG (87%) y, b) Cortical, principalmente en ovocitos sometidos a IVM (97%), donde se reanuda la meiosis incrementando el desarrollo meiótico con el tiempo de cultivo y predominando el estado MI (75%). Todos los ovocitos madurados *in vivo* mostraron patrón cortical y 94% de MII. Estos resultados sugieren que el AG se relocaliza durante la IVM de ovocitos de perra, lo que se relaciona con la progresión meiótica pero de manera no coordinada, siendo *in vitro* menos eficiente que *in vivo*.

Palabras clave: Aparato de Golgi; Ovocito canino; Maduración in vitro; Maduración citoplasmática; Desarrollo meiótico.

INTRODUCCIÓN

La maduración ovocitaria es un proceso complejo que involucra cambios a nivel nuclear y citoplasmático que son fundamentales para la adquisición de competencias que le permitan al ovocito sostener el desarrollo embrionario posterior (Eppig, 1996; Fulka *et al*, 1998; Krisher, 2004; Watson, 2007; Luvoni *et al*, 2005). No obstante y debido a particularidades de la fisiología reproductiva canina, no se ha logrado definir un sistema de maduración *in vitro* que asegure una adecuada calidad ovocitaria (Luvoni *et al*, 2005; De los Reyes *et al*, 2005).

Entre las características reproductivas específicas de las perras, se puede mencionar la ovulación de ovocitos en profase de la primera división meiótica, en estado de vesícula germinal (VG) y la maduración completa del gameto en el oviducto (Luvoni *et al*, 2005; Reynaud *et al*, 2006; Songsasen y Wildt, 2007; De los Reyes *et al*, 2011). Por lo tanto en la perra, el proceso de maduración ovocitaria ocurre a nivel folicular y oviductal y los cambios que acontecen al interior del ovocito durante este periodo son fundamentales para la coordinación

de su maduración nuclear y citoplasmática (Viaris de Lesegno *et al*, 2008b; De los Reyes *et al*, 2007; 2011).

La maduración nuclear involucra la reanudación de la meiosis a partir de profase de la primera división meiótica hasta el estado de metafase II, lo que ocurre durante un extenso periodo en el oviducto (48 a 72 hrs; Renton *et al*, 1991; Reynaud *et al*, 2005; Viaris de Lesegno *et al*, 2008a). Por otro lado, la maduración citoplasmática es un proceso complejo que comprende la dinámica de los filamentos del citoesqueleto (Sun y Schatten, 2006), modificaciones transcripcionales del mRNA, síntesis de proteínas fundamentales para el desarrollo (Watson, 2007) y la redistribución de organelos citoplasmáticos (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a; De los Reyes *et al*, 2010; 2011; 2012).

El éxito de maduración nuclear obtenido *in vitro*, evaluado a través de la observación de la cromatina, presenta bajos porcentajes en ovocitos caninos (0 a 40%; De los Reyes *et al*, 2005). Sin embargo, determinar el grado global de maduración citoplasmática es más

complejo, lo que adquiere importancia en MIV, ya que un ovocito que no completa su maduración citoplasmática no es capaz de finalizar exitosamente el proceso de desarrollo (Krisher, 2004).

Mediante estudios con microscopía electrónica de transmisión en ovocitos caninos, se describen cambios en la forma, tamaño y número de algunos organelos (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a; 2008b), como también su distribución a través del tiempo con microscopía de fluorescencia y confocal (De los Reyes *et al*, 2007; 2011). Sin embargo, poco se sabe acerca del tráfico de membranas durante la maduración ovocitaria y la relación de estas funciones con el reinicio meiótico (Moreno *et al*, 2002). En este contexto, el aparato de Golgi juega un papel preponderante, puesto que es este organelo el encargado de procesos de tráfico intracelular, participando en el procesamiento molecular y proteico y ensamblaje vesicular (Moreno *et al*, 2002).

El aparato de Golgi es un complejo organelo subcelular, con una función central en la vía secretora, participa en procesos de biosíntesis lipídica,

procesamiento, transporte y clasificación de proteínas intracelulares procedentes del retículo endoplásmico (RE) y su posterior envío a destino final (Linstedt y Hauri, 1993; Alvarez *et al*, 2001; Shorter *et al*, 2002; Vinke *et al*, 2011). Su organización estructural varía entre diferentes tipos celulares y durante las diferentes etapas del ciclo celular (Linstedt y Hauri, 1993; Payne y Schatten, 2003). A diferencia de lo que ocurre en las células somáticas, el mecanismo de organización del Golgi en los ovocitos es independiente del centrosoma, lo que puede explicarse por la división asimétrica durante la meiosis (Ferreira *et al*, 2009; Payne y Schatten, 2003). Además, es el encargado de sintetizar y ensamblar los gránulos corticales (GC), organelos que contribuyen a la inhibición de la poliespermia (Liu, 2011).

Estructuralmente, el Golgi consta de varios compartimentos membranosos caracterizados por la presencia de proteínas específicas que determinan su estructura y organización espacial (Linstedt y Hauri, 1993). Dentro de estas proteínas estructurales se encuentran GM130 y Giantin, identificadas como

parte de la matriz cis-Golgi (Sönnichsen *et al*, 1998).

GM130, específica de Golgi, es una proteína periférica de membrana que facilita la fusión vesicular, y juega un rol central en la dinámica del organelo durante la mitosis (Nakamura, 1995; 2010). Mientras que Giantin es una proteína con dominio transmembrana, componente estructural intercisternal que participa en eventos de formación y fusión vesicular (Seelig *et al*, 1994; Nakamura, 2010), formando parte además, de la superficie de las vesículas COPI (“coat protein complex I”: complejo proteico de revestimiento; Sönnichsen *et al*, 1998).

La dinámica del aparato de Golgi durante la maduración de ovocitos mamíferos requiere más estudios (Ferreira *et al*, 2009; Racedo *et al.*, 2012). Aunque existen antecedentes de sus variaciones estructurales, no hay reportes precisos sobre el reordenamiento del Golgi en relación a la maduración nuclear de ovocitos caninos, lo que adquiere relevancia si se toma en cuenta que estos procesos ocurren en la perra en forma más tardía que en otros mamíferos

estudiados, debido a que el reinicio meiótico se produce después de la ovulación, lo que requiere ser investigado. En este estudio se hipotetizó que la dinámica del aparato de Golgi en el ovocito de perra no está igualmente sincronizada al desarrollo meiótico en los ovocitos madurados *in vitro* en comparación con aquellos madurados *in vivo*, indicando incompetencia en el desarrollo durante el cultivo. El objetivo principal fue estudiar el reordenamiento y localización del Golgi a través del tiempo de cultivo y su sincronía con el desarrollo meiótico en ovocitos de perra.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El protocolo utilizado contó con la aprobación de los Comités de Bioética del Fondo de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (FONDECYT) y de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

A menos que se especifiquen otras fuentes, los productos químicos fueron

adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Procesamiento de ovocitos ováricos

Los ovocitos no madurados y madurados *in vitro* se obtuvieron a partir de ovarios de perras clínicamente sanas de 1 a 6 años de edad, de distintas razas y en diferente estado del ciclo estral, las que fueron ovariectomizadas (n=120) en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la Ilustre Municipalidad de la Pintana.

Los ovarios y fueron transportados al laboratorio en solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI de penicilina/mL y 50 µg de estreptomina/mL, a temperatura de 35-37 °C, para ser procesados dentro de un periodo de 2 horas a partir de su extracción quirúrgica.

En el laboratorio, los ovarios se lavaron en buffer fosfato salino (PBS) a 37°C, y a través de cortes finos en la corteza ovárica con hoja de disección se liberaron los complejos cúmulo ovocito (COCs), los cuales fueron seleccionados de acuerdo a lo señalado por De los Reyes *et al.* (2005; 2007; 2011), es decir, ovocitos

con un citoplasma oscuro homogéneo, diámetro mayor a 100 µm y que estén rodeados completamente por al menos dos capas de células del cúmulo. Aquellos ovocitos seleccionados se distribuyeron aleatoriamente para ser procesados como ovocitos no madurados y madurados *in vitro*.

Ovocitos madurados in vitro

Los ovocitos seleccionados se depositaron en cápsulas Falcon 3001 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 (SFB), 0,25 mM de piruvato, 10 UI/mL de gonadotropina 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 horas, bajo condiciones de 98% de humedad, temperatura de 38°C y 5% de CO₂, de acuerdo a lo descrito por De los Reyes *et al.* (2012).

Procesamiento de ovocitos ovulados

Los ovocitos ovulados, es decir madurados *in vivo* (control positivo), se obtuvieron desde oviductos de perras ovariectomizadas en un lapso de 48 a 72 horas de ocurrida la ovulación, según lo señalado por De los Reyes *et al.* (2011).

La determinación del momento de ovulación, se realizó mediante el seguimiento del ciclo a partir del proestro, a través de la signología clínica, frotis vaginales seriados y mediciones séricas de las concentraciones 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, California, USA). Además, el crecimiento folicular hasta la ovulación se evaluó por ultrasonografía con un equipo Doppler color, Sonosite M-turbo (Sonosite Inc, Bothell WA, USA).

Los ovocitos se obtuvieron por canulación del lumen oviductal y posterior lavado con 15 mL de PBS a 37°C.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Todos los ovocitos de los diferentes grupos, no madurados, madurados *in vitro* y ovulados, se separaron totalmente de las células del cúmulo por desprendimiento mecánico a través de pipeteos sucesivos con pipeta angosta de vidrio y luego fueron fijados durante 20 minutos en Paraformaldehído al 4% en PBS (pH 8,2) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS (pH 8,2).

Las muestras se permeabilizaron mediante el tratamiento con Triton X-100 al 1% en PBS (pH 8,2) por 10 minutos, para luego ser lavadas tres veces por 5 minutos en PBS (pH 8,2). A continuación, se dispusieron en solución de bloqueo de 0,2% de BSA (albúmina sérica bovina) en PBS (pH 8,2), durante una hora a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS (pH 8,2), durante 5 minutos.

Luego, los ovocitos en cada estado de maduración (no madurados, madurados *in vitro* por diferentes tiempos y madurados *in vivo*) fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos para ser

incubados con los anticuerpos. Un primer grupo fue incubado bajo humedad con el anticuerpo monoclonal anti-GM130 purificado en ratón (Becton Drive Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), mientras que los ovocitos del segundo grupo se incubaron con el anticuerpo anti-Giantin purificado en conejo (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA), ambos en dilución 1/100 en PBS (pH 8,2) a 4° C, durante toda la noche.

Posteriormente, en ambos grupos se realizaron cuatro lavados con 0,05% de Tween-20 en PBS (pH 8,2) por períodos de 10 minutos y se incubaron con el segundo anticuerpo. Tanto para los ovocitos incubados con GM130, como con Giantin, se usó anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), ambos en dilución 1/1000 en PBS (pH 8,2). Luego de una hora y bajo oscuridad, se realizaron cuatro lavados de 10 minutos con 0,05% de Tween-20 en PBS (pH 8,2).

Para la tinción nuclear, los diferentes grupos de ovocitos se incubaron con 1 µg/mL de DAPI (diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro; Thermo Fisher Scientific

Inc., Rockford, IL, USA), en PBS (pH 8,2) por 20 minutos. Después, se lavaron cuatro veces con 0,05% de Tween-20 en PBS (pH 8,2) por períodos de 10 minutos.

Finalmente, las muestras procesadas fueron montadas entre porta y cubre objeto con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories Inc., California, USA) y almacenadas a 4°C antes de su evaluación.

Como control de tinción con el anticuerpo primario, en cada grupo, se utilizaron ovocitos no incubados con este.

Evaluación de la cromatina nuclear y distribución del aparato de Golgi

Se evaluó tanto el núcleo como el citoplasma utilizando un microscopio de luz invertida Olympus IX71 (Nikon Optiphot II; Nikon, Tokio, Japón), equipado con epifluorescencia a través de una lámpara IX2-RFA y con una cámara ProgRes-Capture Pro (Jenoptik, Alemania).

La distribución del aparato de Golgi se analizó a través de la localización de la marca fluorescente a nivel citoplasmático,

mientras la determinación del estado nuclear se realizó a través de la clasificación de la configuración cromatínica, de acuerdo a lo descrito previamente por De los Reyes *et al*, 2011, en: vesícula germinal (VG), cuando la cromatina se encontró dispersa en el núcleo del ovocito y la vesícula fue claramente visible; reinicio meiótico (GVBD), cuando la cromatina fue encontrada en el citoplasma en proceso de compactación; primera metafase (MI), con los cromosomas alineados en la placa metafásica y segunda metafase (MII), cuando los cromosomas se presentaron en la placa metafásica, acompañados de la extrusión del primer corpúsculo polar. Los ovocitos que presentaron una distribución cromatínica irregular o difícilmente distinguible se consideraron degenerados y fueron descartados del estudio.

Análisis estadístico

Se analizaron un total de 876 ovocitos a través de 8 réplicas experimentales de aproximadamente 12 a 15 ovocitos por grupo de maduración con cada anticuerpo (GM130 y Giantin). Se evaluaron aproximadamente 105 ovocitos totales

por cada grupo: 1) no madurados y madurados *in vitro* por 2) 48, 3) 72 y 4) 96 horas; a diferencia de aquellos madurados *in vivo*, obteniéndose en 6 réplicas experimentales un total de 17 ovocitos. En todos los casos se evaluó paralelamente la distribución de la marca fluorescente y el estado de maduración nuclear de los ovocitos.

Se analizaron y compararon mediante análisis de varianza los patrones de distribución de la inmunomarca de cada proteína dentro y entre los diferentes grupos de maduración, cuando este resultó significativo, se realizó la prueba de Duncan para establecer cuáles fueron los grupos diferentes.

El posible efecto de los diferentes estados de maduración nuclear (estados de la meiosis) sobre la distribución de los patrones de fluorescencia, indicativos del aparato de Golgi y los diferentes tiempos de incubación, se evaluaron mediante un análisis logístico a través del tiempo, donde las réplicas se utilizaron como efecto fijo. Estos análisis se realizaron utilizando el programa InfoStat/ Profesional versión 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para

todos los casos, se utilizó un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Se evaluaron 436 ovocitos procesados con el anticuerpo antiGM130, de los cuales 120 correspondieron a no madurados, 311 MIV y 5 ovulados (Anexo 1). Se procesaron 440 ovocitos con antiGiantin, de los cuales se obtuvieron 105 no madurados, 323 MIV y 12 ovulados (Anexo 2).

Las distintas localizaciones del aparato de Golgi en los ovocitos se determinaron a través de la marca fluorescente a nivel citoplasmático. De acuerdo a esto, se observaron 2 patrones de distribución en

los distintos tiempos de maduración ovocitaria, Patrón A: homogéneo, en que la marca fluorescente se presentó distribuida uniformemente por todo el citoplasma ovocitario (Figura 1a), observándose en casi la totalidad de los ovocitos no madurados, y Patrón B: cortical, en el que la fluorescencia se ubicó en todo su perímetro inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del ovocito (Figura 1b). Este patrón se observó en ovocitos cultivados *in vitro* (Figura 2a) y en todos aquellos ovulados (Figura 2b).

El patrón A de distribución citoplasmática se observó en un 39,4% del total de ovocitos evaluados, representando la totalidad de los ovocitos no madurados

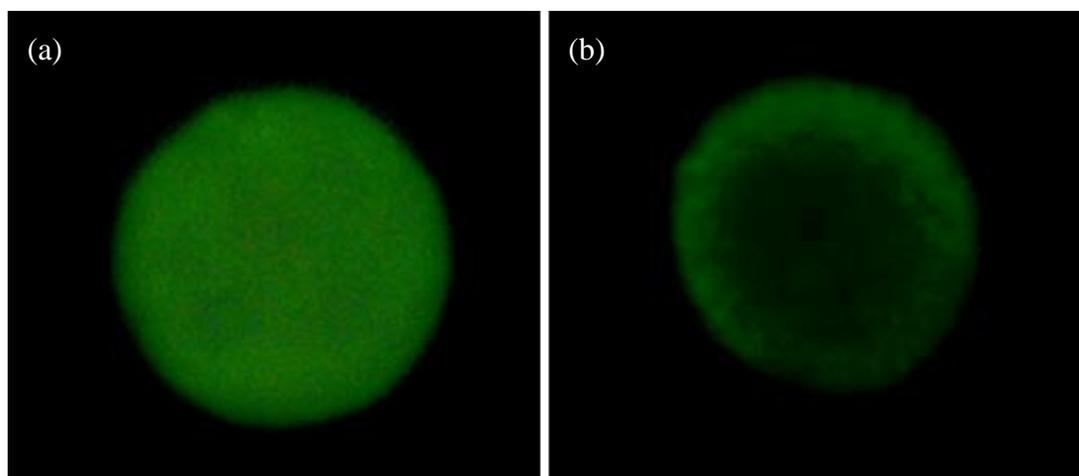


Fig.1. Patrones de distribución citoplasmática del aparato de Golgi en ovocitos de perra incubados con los anticuerpos anti-GM130 y anti-Giantin. (a) Patrón A: Homogéneo, la marca fluorescente se encuentra distribuida por todo el citoplasma ovular; y (b) Patrón B: cortical, la fluorescencia se ubicó inmediatamente por debajo de la membrana plasmática del ovocito en todo su perímetro. 200X.

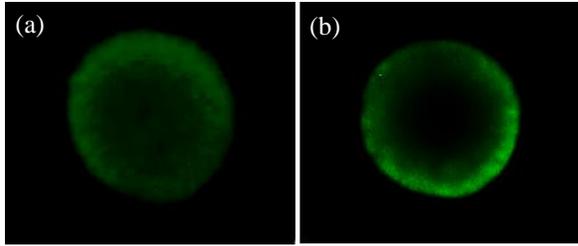


Fig.2. Patrón cortical de distribución del aparato de Golgi en el citoplasma de ovocitos de perra (a) MIV y (b) madurados *in vivo* (ovulados) incubados con los anticuerpos anti-GM130 y anti-Giantin. 200X.

procesados con el anticuerpo antiGiantin y el 98,3% con antiGM130. Este patrón también se encontró en los ovocitos sometidos a cultivo, disminuyendo conforme aumentó el tiempo de maduración ($p \leq 0,05$; Figura 3A y 3B), y representando en aquellos ovocitos evaluados con antiGM130 el 26,9%, 18,4% y 11,5%, mientras que en aquellos evaluados con antiGiantin, representaron el 40%, 13,6% y 5,6% a las 48, 72 y 96 h, respectivamente (Anexos 1 y 2).

El patrón B se observó en los ovocitos madurados *in vitro* y en todos los

ovulados, representando el 60,6% del total de ovocitos evaluados en este estudio. No se encontraron diferencias en la distribución citoplasmática de elementos del Golgi entre ovocitos madurados *in vitro* versus *in vivo* (Figura 2a y 2b).

A medida que avanzó el tiempo de cultivo *in vitro* se observó un aumento del patrón B ($p \leq 0,05$); Figura 4a, 4b), el que se presentó en el 73,1%, 81,6% y 88,5% de los ovocitos con inmunomarca antiGM130 a las 48, 72 y 96 h respectivamente, con una tendencia similar en aquellos procesados con el anticuerpo antiGiantin (60%, 86,4% y 94,4% a las 48, 72 y 96 h, respectivamente).

La evaluación nuclear mostró ovocitos en distintos estados de la meiosis, lo que estuvo relacionado al tiempo de cultivo

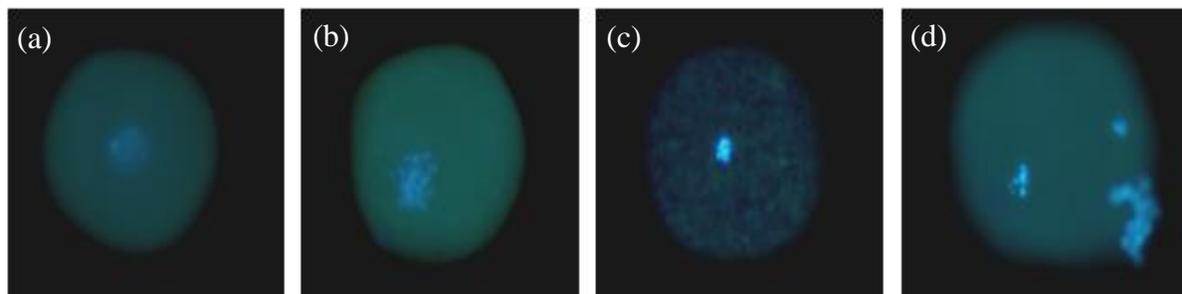


Fig. 3. Configuración de la cromatina en ovocitos de perra teñidos con DAPI (de 4-6 diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro). (a) Vesícula germinal (VG); (b) Reinicio meiótico (GVBD); (c) Primera metafase (MI); (d) Segunda metafase (MII) con su corpúsculo polar (CP). 200X.

(Anexos 1 y 2). Los estados de maduración nuclear descritos previamente fueron: vesícula germinal (VG; Figura 3a), reinicio meiótico (GVBD; Figura 3b), primera metafase (MI; Figura 3c) y segunda metafase (MII; Figura 3d).

La distribución tipo A fue observada principalmente en aquellos ovocitos que presentaban el estado nuclear VG (61% y 58,3% con antiGm130 y antiGiantin,

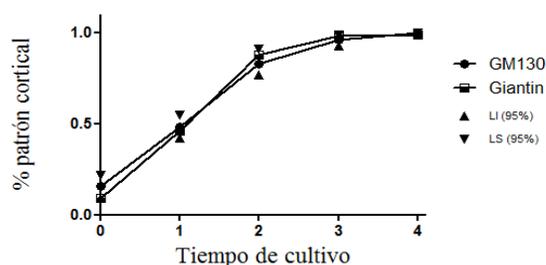
respectivamente), mientras que la mayoría de los ovocitos en VG presentó patrón A ($p \leq 0,05$; 99,1% con antiGM130 y todos los ovocitos VG con antiGiantin). La mayor parte de los ovocitos que presentaron un núcleo VG fueron aquellos no madurados ($p < 0,05$), 95,4% con antiGM130 y 92,9% con antiGiantin.

En relación a los ovocitos madurados *in vitro*, sólo aquellos cultivados por 48 h presentaron estado VG (4,6 y 6,7% con los anticuerpos antiGM130 y antiGiantin, respectivamente).

Una menor proporción de ovocitos con patrón tipo A (23,5%) se encontró en estado GBVD. En la mayoría de los ovocitos GVBD procesados con el anticuerpo antiGiantin predominó la distribución tipo B (54,5%; $p < 0,05$) y un 97,9% de estos fueron MIV, mientras que aquellos procesados con el anticuerpo antiGM130 no exhibieron diferencias ($p \leq 0,05$) en la presentación de ambos patrones (Anexos 1 y 2).

La distribución tipo B fue observada principalmente ($p \leq 0,05$) en ovocitos en metafase I, representando el 70,7% y 73,8% con los anticuerpos antiGM130 y

a) Distribución de Golgi según tiempo de cultivo



b) Distribución de Golgi según estado nuclear

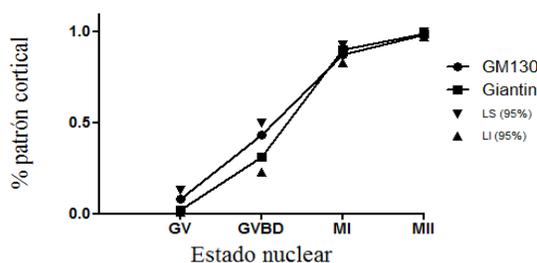


Figura 4: Probabilidad pronosticada de presentar patrón B en función a) del tiempo de cultivo y b) del estado nuclear, en ovocitos de perra procesados con antiGM130 y antiGiantin. En ambos casos, se considera que valores mayores o iguales a 0.5 corresponden a una distribución cortical. El tiempo de cultivo fue clasificado en: 0, ovocitos no madurados; 1, MIV por 48 h; 2, MIV por 72 h; 3, MIV por 96 h; y 4, ovulados.

antiGiantin, respectivamente. Además, la mayoría de los ovocitos en MI presentó patrón B ($p \leq 0,05$; 88,4% y 87,8% con GM130 y Giantin, respectivamente). Los ovocitos con patrón B y paralelamente MI fueron casi exclusivamente MIV, representando el 25,7%, 35% y 39,3% de los procesados con antiGM130 y el 22,9%, 35,8% y 40,8% con antiGiantin, por 48, 72 y 96 h respectivamente; y solo en un ovocito ovulado (0,5%).

Los ovocitos en estado de MII se observaron a partir de las 48 h de cultivo, donde el 81,4% y 97,4% de los MIV procesados con GM130 y Giantin respectivamente, presentaron patrón tipo B (Anexos 1 y 2). El porcentaje de ovocitos con patrón B que alcanzó el estado de MII en cultivo fue de 8,7% con antiGM130 y 11,8% con antiGiantin. Por lo tanto, a medida que progresó el estado nuclear el número de ovocitos que presentó patrón B aumentó ($p \leq 0,05$; Figura 4a y 4b).

Sólo uno del total de ovocitos madurados *in vivo* presentó MI (5,9%, $p \leq 0,05$), mientras que todo el resto se encontró en estado MII (100% de aquellos procesados

con GM130 y un 91,7% con Giantin) (Anexos 1 y 2).

DISCUSION

En el presente estudio se logró establecer, mediante el análisis con microscopía de fluorescencia, que durante la MIV de ovocitos caninos se produce una migración del aparato de Golgi en el citoplasma ovocitario. A través del estudio de las proteínas del cis-Golgi GM130 y Giantin, marcadores específicos del organelo (Arvan *et al*, 2002; Barr y Short, 2003), se determinaron dos patrones de distribución durante los diferentes tiempos de incubación para MIV, los cuales fueron comparados con ovocitos no madurados y madurados *in vivo*. Este reordenamiento estructural del Golgi representó la transición de una distribución homogénea por todo el citoplasma ovocitario (patrón A) hasta una localización periférica (patrón B).

Se ha establecido en diferentes especies mamíferas que el reordenamiento de los organelos constituye un criterio de evaluación del grado de maduración del citoplasma (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a; 2008b; Ferreira *et al*, 2009; De los

Reyes *et al*, 2010; 2011; 2012), siendo considerada actualmente la redistribución de Golgi como un sello de maduración citoplasmática ovocitaria (Moreno *et al*, 2002; Payne y Schatten, 2003; Racedo *et al*, 2012).

De acuerdo a lo observado, la distribución homogénea (patrón A) de elementos de Golgi a través del citoplasma, se presentó mayoritariamente en ovocitos no madurados, que mostraron en paralelo un núcleo en estado de VG, similar a la disposición observada del aparato de Golgi en ovocitos no madurados con núcleo VG de ratón, mono Rhesus (Moreno *et al*, 2002) y bovino (Payne y Schatten, 2003; Racedo *et al*, 2012), lo que sugiere un patrón inicial común a los ovocitos mamíferos (Moreno *et al*, 2002). A pesar que no se conoce la función fisiológica exacta de esta disposición del aparato de Golgi durante la maduración ovocitaria, podría asociarse con el aporte de Golgi a requerimientos metabólicos específicos de maduración, ya que se describe una distribución homogénea similar de las mitocondrias en ovocitos de perra (De los Reyes *et al*, 2011). Además, el análisis ultraestructural de ovocitos caninos en estado de VG, en el periodo

comprendido entre el alza de LH y la ovulación, describe el aumento del número de complejos de Golgi y de mitocondrias (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a), reflejando el incremento de la actividad metabólica, por lo que esta distribución homogénea podría estar relacionada a una mayor eficiencia a través de la vía secretora.

El patrón B comienza a detectarse en ovocitos con núcleo en estado GVBD, a partir de las 48 hrs de cultivo. Sin embargo, los ovocitos con núcleo VG en este tiempo de cultivo presentan patrón A, por lo que la migración hacia la periferia en estos ovocitos podría indicar que la relocalización de Golgi comenzaría con la reanudación meiótica, posiblemente como consecuencia de la liberación de contenido nuclear hacia el citoplasma (De los Reyes *et al*, 2012). Sin embargo, se describe que la fragmentación de Golgi durante la mitosis en células somáticas libera factores mitóticos esenciales que se encuentran usualmente secuestrados en las pilas de Golgi (Shorter y Warren, 2002). A pesar de estos antecedentes, en cánidos se dispone de escasa información respecto a una supuesta relación causal entre el reinicio meiótico y la

relocalización de Golgi, por lo que se hacen esenciales nuevas investigaciones.

En ovocitos de ratón en estado GVBD se ha observado el predominio de una distribución de tipo central (Moreno *et al*, 2002), a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo y previamente en bovino (Racedo *et al*, 2012), por lo que el aparato de Golgi en ovocitos de perra podría seguir el modelo de ovocitos de bovino, siendo organizado por un mecanismo específico para maduración meiótica e independiente del centrosoma (Payne y Schatten, 2003). Esto sugiere que durante la maduración meiótica el aparato de Golgi seguiría los cambios de los sitios de exportación del retículo endoplásmico (Racedo *et al*, 2012). De esta forma y al restringirse la asociación de Golgi con el huso meiótico, se limitaría la pérdida de material citoplasmático, como fragmentos de Golgi, con los corpúsculos polares durante el proceso de división meiótica asimétrica (Payne y Schatten, 2003).

Estudios previos realizados en bovino (Ferreira *et al*, 2009), cerdo (Brevini *et al*, 2007) y perra (De los Reyes *et al*, 2010; 2011; 2012) establecen que una adecuada

coordinación entre los cambios nucleares y citoplasmáticos es indispensable para asegurar el normal proceso de desarrollo. Los datos obtenidos en este trabajo indican que los ovocitos que presentaron patrón A mostraban básicamente núcleos en estado de VG, mientras que aquellos que exhibieron el patrón B, caracterizado por elementos de Golgi en la periferia del gameto, exhibieron diversos grados de desarrollo meiótico, aunque la mayoría de los que presentaban su núcleo en MII mostraban patrón B, indicando una relación entre la localización del aparato de Golgi y el estado de desarrollo meiótico.

De acuerdo a lo observado, los cambios en la distribución citoplasmática del Golgi se producirían durante la MIV, con un aumento progresivo en la presentación del patrón B a partir de las 48 hrs de maduración, lo que indicaría que la relocalización del aparato de Golgi en ovocitos de perra se relacionaría con la progresión del tiempo de cultivo, iniciándose durante el periodo de incubación *in vitro*, en concordancia con un aumento en la proporción de ovocitos que reanudan la meiosis a nivel nuclear. Estos resultados indican que la

localización del aparato de Golgi, evaluada a través de las proteínas GM130 y Giantin es fundamentalmente cortical durante la maduración *in vitro* de ovocitos de perra.

Durante la maduración ovocitaria la migración de organelos citoplasmáticos ocurre a través de la acción de microtúbulos y microfilamentos. Aunque no existen muchos antecedentes sobre el control de la traslocación del Golgi en ovocitos de mamíferos (Sun y Schatten, 2006; Ferreira *et al*, 2009), en la oveja se ha establecido una asociación de grandes agregados de Golgi con microtúbulos (Crozet, 1988), mientras que en bovino, estos no desempeñarían un rol esencial en las dinámicas de Golgi durante la maduración ovocitaria (Racedo *et al*, 2012). Por otro lado, en ovocitos de perra no hay referencias acerca de las dinámicas del citoesqueleto durante la traslocación del aparato de Golgi. No obstante, el desplazamiento de los GC a la corteza del ovocito, que coincide con la migración de Golgi podría estar asociado a la dinámica de los microfilamentos, fundamentalmente de los filamentos de actina, los que regulan la migración periférica de los GC durante la

maduración de ovocitos humanos (Sathananthan *et al*, 1985).

El análisis de los ovocitos ovulados mostró que presentaron una distribución citoplasmática de tipo cortical similar a la observada mayoritariamente en ovocitos madurados *in vitro*, luego de la reanudación de la meiosis y en porcentajes crecientes al aumentar el tiempo de cultivo. De manera que este patrón podría reflejar el resultado de la migración periférica del aparato de Golgi, producto de la maduración del citoplasma ovocitario (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a, 2008b; De los Reyes *et al*, 2012).

El estudio ultraestructural de ovocitos caninos madurados *in vivo* (Viaris de Lesegno *et al*, 2008a) evidenció que luego del alza de LH el aparato de Golgi está presente en numerosas capas y en cantidad cada vez mayor, concentrado alrededor de los GC, organelos derivados del Golgi (Liu, 2011) y situados cerca de la membrana plasmática. Además, en estudios con microscopía de fluorescencia se determinó que en ovocitos madurados *in vitro* por 72 y 96 hrs, y en los que predominaba el estado de metafase, los GC presentaron esencialmente una

localización periférica (De los Reyes *et al*, 2007; 2010). Estos resultados sugieren que existiría una asociación de los GC y el aparato de Golgi a través del proceso de migración citoplasmática hacia la corteza durante la maduración ovocitaria. Por consiguiente, las variaciones de Golgi asociadas a los GC durante la maduración ovocitaria, conducirían a un normal proceso de fecundación.

Sin embargo, en ovocitos bovinos con marcaje simultáneo para la proteína GM130 y los GC con tinción FITC-LCA no se detectó colocalización de las marcas (Payne y Schatten, 2003), lo que podría indicar la disociación entre los GC y Golgi en ovocitos en MII, lo que permitiría su maduración y posterior localización inmediatamente bajo la membrana plasmática, donde se desarrolla la reacción cortical.

Las bajas tasas de MII obtenidas en ovocitos madurados *in vitro* por 96 hrs (16%) concuerda con trabajos previos, que informan tasas de maduración nuclear menores a 20% en ovocitos MIV (Luvoni *et al*, 2005; De los Reyes *et al*, 2007; 2010; 2011;). Por otro lado, el patrón B predomina en ovocitos en MI,

presentándose en el 78% de aquellos madurados *in vitro* por 96 hrs. Estos altos porcentajes de MI en ovocitos MIV son mayores a lo reportado previamente en perras (Song *et al*, 2010; De los Reyes *et al*, 2011), aunque siguen siendo bajos en comparación con otras especies (Sun *et al*, 2001; Li *et al*, 2005; Adona *et al*, 2008). Esta menor eficiencia en la maduración nuclear puede asociarse, entre otros factores, a la menor competencia de los ovocitos seleccionados o los medios de maduración utilizados, que no logran recrear completamente el ambiente oviductal, donde se alcanza *in vivo* el desarrollo meiótico (Rodrigues y Rodrigues, 2010; Chastant-Maillard *et al*, 2011). Por lo tanto, a pesar de que los ovocitos de perra pueden reanudar la meiosis *in vitro*, no son totalmente competentes como para alcanzar la etapa de MII (Viaris de Lesegno *et al*, 2008b; De los Reyes *et al*, 2011; 2012).

Más del 85% de los ovocitos MIV que alcanzan el estado MII, presenta una distribución cortical del Golgi. A nivel ultraestructural, estos ovocitos en MII han adquirido una organización citoplasmática similar a ovocitos

madurados de otras especies (Ferreira *et al.*, 2009). Es decir, que durante el cultivo se logran características de maduración citoplasmática, como la migración periférica del aparato de Golgi, similar a lo que ocurre *in vivo*, lo que no sucede simultáneamente a nivel nuclear, ya que a pesar de la distribución cortical del Golgi estos ovocitos no avanzan hasta MII en igual magnitud, indicando asincronía entre los eventos de maduración citoplasmática y progresión meiótica a través del tiempo de cultivo.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que el cultivo de ovocitos induce cambios citoplasmáticos que se manifiestan en la redistribución y migración del aparato de Golgi similares a los observados en ovocitos madurados *in vivo*. Sin embargo, estos cambios no ocurrirían en coordinación con los cambios nucleares experimentados durante el proceso de maduración *in vitro*, indicando incompetencia en el desarrollo durante el cultivo.

Anexo 1. Distribución citoplasmática de la fluorescencia del anticuerpo antiGM130, 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	Distribución citoplasmática Patrón Golgi	Estado de Maduración Nuclear				Total
		VG	GVBD	MI	MII	
		n= 109	n= 88	n= 207	n= 32	n= 436
No madurados n= 120	A	103 (85.8) ^{aAx}	15 (12.5) ^{aBx}	-	-	118 (98.3)
	B	1 (0.8) ^b	1 (0.8) ^{bx}	-	-	2 (1.7)
MIV 48 n= 104	A	5 (4.8) ^{Ay}	13 (12.5) ^{Bxy}	10 (9.6) ^{aAB}	-	28 (26.9)
	B	-	24 (23) ^{Ay}	47 (45.2) ^{bBx}	5 (4.8) ^C	76 (73.1)
MIV 72 n= 103	A	-	10 (9.7) ^{aAy}	9 (8.7) ^{aA}	-	19 (18.4)
	B	-	13 (12.6) ^{aAx}	64 (62.1) ^{bBxy}	7 (6.8) ^A	84 (81.6)
MIV 96 n= 104	A	-	2 (1.9) ^{aAz}	5 (4.8) ^{aA}	5 (4.8) ^{aA}	12 (11.5)
	B	-	10 (9.6) ^{bAx}	72 (69.2) ^{bBy}	10 (9.6) ^{aA}	92 (88.5)
Ovulados n= 5	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	5 (100)	5 (100)

Estado nuclear: VG, vesicular germinal; GVBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. Patrones de distribución citoplasmática del aparato de Golgi: A, homogéneo; B, cortical.

^{a-c} Dentro de la columna y tiempo de muestreo, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

^{A-C} Dentro de la fila, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

^{x-z} Dentro de la columna y distribución de la fluorescencia, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

Anexo 2. Distribución citoplasmática de la fluorescencia del anticuerpo antiGiantin, 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	Distribución citoplasmática Patrón Golgi	Estado de Maduración Nuclear				Total
		VG	VGBD	MI	MII	
		n= 98	n= 64	n= 229	n= 49	n= 440
No madurados n= 105	A	91 (86.7) ^A	14 (13.3) ^{Bx}	-	-	105 (100)
	B	-	-	-	-	-
MIV 48 n= 105	A	7 (6,7) ^A	26 (24,8) ^{aBy}	9 (8.5) ^{aA}	-	42 (40)
	B	-	17 (16.2) ^{bAx}	46 (43.8) ^{bBx}	-	63 (60)
MIV 72 n= 110	A	-	-	14 (12.7) ^{aA}	1 (0,9) ^{aB}	15 (13.6)
	B	-	3 (2.7) ^{Ay}	72 (65.5) ^{bBy}	20 (18.2) ^{bC}	95 (86.4)
MIV 96 n= 108	A	-	1 (0.9) ^{az}	5 (4.6) ^a	-	6 (5.6)
	B	-	3 (2.8) ^{bAy}	82 (76) ^{bBy}	17 (15.7) ^C	102 (94.4)
Ovulados n= 12	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	1 (8,3) ^{Az}	11 (91.7) ^B	12 (100)

Estado nuclear: VG, vesicular germinal; VGBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. Patrones de distribución citoplasmática del aparato de Golgi: A, homogéneo; B, cortical.

^{a-c} Dentro de la columna y tiempo de muestreo, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

^{A-C} Dentro de la fila, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

^{x-z} Dentro de la columna y distribución de la fluorescencia, números sin un superíndice común difieren (P <0.05).

BIBLIOGRAFÍA

- **ADONA, P.; RATTO P.; QUETGLAS, M.; SCHWARZ, K.; LIMA VERDE, C.** 2008. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Anim Reprod Sci* 108: 49-65.
- **ALVAREZ, C.; GARCIA-MATA, R.; HAURI, H.; SZTUL, E.** 2001. The p115-interactive proteins GM130 and Giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J Biol Chem* 276: 2693-2700.
- **ARVAN, P.; ZHANG, B.; FENG, L.; LIU, M.; KULIAWAT, R.** 2002. Luminal protein multimerization in the distal secretory pathway/secretory granules. *Curr Opin Cell Biol* 14:448–453.
- **BARR, F.; SHORT, B.** 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15: 405–413.
- **BREVINI, T.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F.** 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 98: 23–38.
- **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 Fertil Dev* 23:391-402.
- **DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINO, 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.; LUNA, D.; PALOMINO, J.** 2010. Meiotic development and cortical granules distribution in canine oocytes during *in vitro* maturation. *Reprod Fertil Dev* 22: 324-325.
- **DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., 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., JOFRE, S., VILLARROEL, A., MORENO, R.** 2012. Golgi apparatus and endoplasmic reticulum dynamic during meiotic development in canine oocytes. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 6), 93-97.
- **EPPIG, J.** 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8: 485-489.
- **FERREIRA, E.; VIREQUE, A.; ADONA, P.; MEIRELLES, F.; FERRIANI, R.; NAVARRO, P.** 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocyte: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71: 836-848.
- **FULKA, J.; FIRST, N.; MOOR, R.** 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 4: 41-49.
- **KRISHER, R. L.** 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82: 14-23.

- **LI, G.; LIU, Y.; BUNCH, T.; WHITE, K.; ASTON, K.** 2005. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from Metaphase I to Metaphase III. *Mol Reprod Dev* 71:220–226.
- **LINSTEDT, A.; HAURI, H.** 1993. Giantin, a novel conserved golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* 4: 679-693.
- **LIU, M.** 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 149.
- **LUVONI, G.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D.** 2005. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocyte. *Theriogenology* 63: 41-59.
- **MANANDHAR, G.; SCHATTEN, H.; SUTOVSKY, P.** 2005. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* 72: 2-13.
- **MORENO, R.; SCHATTEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J.** 2002. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor Brefeldin A. *Biol Reprod* 66: 1259–1266.
- **NAKAMURA, N.; RABOUILLE, C.; WATSON, R.; NILSSON, T.; HUI, N.; SLUSAREWICZ, P.; KREIS, T.; WARREN, G.** 1995. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 131: 1715-1726.
- **NAKAMURA, N.** 2010. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order functions. *J Pharmacol Sci* 112: 225-264.
- **PAYNE, C.; SCHATTEN, G.** 2003. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev Biol* 264: 50–63.
- **RACEDO, S.; RAWE, V.; NIEMANN, H.** 2012. Dynamic changes of the Golgi apparatus during bovine *in vitro* oocyte maturation. *Reproduction* 143: 439-447.

- **RENTON, J.; BOYD, J.; ECKERSALL, P.; FERGUSON, J.; HARVEY, M.; MULLANEY, J.; PERRY, B.** 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 93: 221-231.

- **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.

- **RODRIGUES, B.; RODRIGUES, J.** 2010. *In vitro* maturation of canine oocyte: a unique conundrum. *Anim Reprod* 7: 3-17.

- **SATHANANTHAN, A.; CHIA, C.; LAW, H.; EDIRISINGHE, W.; RATNAM, S.** 1985. The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity. *Ann NY Acad Sci* 442:251–64.

- **SCHATTEN, G.** 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* 165: 299-335.

- **SEELIG, H.; SCHRANZ, P.; SCHRÖTER, H.; WIEMANN, C.; GRIFFITHS, G.; RENZ, M.** 1994. Molecular genetic analyses of a 376-kilodalton Golgi complex membrane protein (Giantin). *Mol Cell Biol* 14: 2564-2576.

- **SHORTER, J.; BEARD, M.; SEEMANN, J.; DIRAC-SVEJSTRUP, A.; WARREN, G.** 2002. Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J Cell Biol* 157: 45-62

- **SHORTER, J.; WARREN, G.** 2002. Golgi architecture and inheritance. *Cell Dev Biol* 18: 379–420.

- **SONGSASEN, N.; WILDT, D.** 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation system in the domestic dog. *Anim Reprod Sci* 98: 2-22.

- **SÖNNICHSEN, B.; LOWE, M.; LEVINE, T.; JÄMSÄ, E.; DIRAC-SVEJSTRUP, B.; WARREN, G.** 1998. A role for Giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* 140: 1013-1021.

- **SUN, Q.; LAI, L.; PARK, K.; KÜHHOLZER, B.; PRATHER, R.; SCHATTEN, H.** 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 64: 879–889.

- **SUN, Q.; SCHATTEN, H.** 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131: 193–205.

- **VIARIS DE LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2008^a. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol Reprod Dev* 75:115–125.

- **VIARIS DE LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2008^b. Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. *Mol Reprod Dev* 20:626–639.

- **VINKE, F.; GRIEVE, A.; RABOUILLE, C.** 2011. The multiple facets of the Golgi reassembly stacking proteins. *Biochem J* 433: 423-433.

- **WATSON, A.** 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci* 85:E1-E3.