



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

**ANÁLISIS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DIFERENCIAL 9
(GDF-9) Y LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA (BMP-15)
DURANTE EL DESARROLLO DE FOLÍCULOS ANTRALES EN
OVARIOS CANINOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Tomás Eduardo Fernández Vergara

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

PROFESOR GUÍA: Dra. Mónica De Los Reyes S.
Profesora Titular
Unidad de Reproducción
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

FONDECYT 1140658
SANTIAGO, CHILE
2015



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

**ANÁLISIS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DIFERENCIAL 9
(GDF-9) Y LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA (BMP-15)
DURANTE EL DESARROLLO DE FOLÍCULOS ANTRALES EN
OVARIOS CANINOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Tomás Eduardo Fernández Vergara

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

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: Mónica De Los Reyes
PROFESOR CONSEJERO	: Jaime Palomino
PROFESOR CONSEJERO	: Oscar Peralta

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9)	4
2. Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15)	5
3. Citometría de Flujo	6
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	8
1. Objetivo General	8
2. Objetivos Específicos	8
MATERIALES Y MÉTODO	9
1. Obtención de Ovarios y Recolección de Folículos	9
2. Inmunofluorescencia	10
3. Análisis de Citometría	11
4. Análisis Estadístico	12
RESULTADOS	13
1. Resultados de la Expresión de GDF-9	14
2. Resultados de la Expresión de BMP-15	19
DISCUSIÓN	23
1. GDF-9	24
2. BMP-15	25
CONCLUSIÓN	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMEN

El ciclo estral de la hembra canina presenta algunas características únicas al ser comparadas con otras especies de mamíferos domésticos. Sin embargo, poco se conoce de las características del desarrollo folicular en relación a otras especies. El Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15), son miembros de la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformantes Beta (TGF- β), y han demostrado un rol fundamental en el desarrollo folicular en muchas especies. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de ambas proteínas en células foliculares proveniente de folículos antrales del ovario canino mediante citometría de flujo. Se obtuvieron células de la granulosa y del cúmulo a través de aspiración y raspado de folículos antrales de distintos niveles de desarrollo y en distintas etapas del ciclo estral. Las células se fijaron e incubaron con anticuerpo anti GDF-9 humano y anti BMP-15 de ratón (1:100) y anticuerpos secundarios conjugados con FITC y PerCP (1:500), respectivamente. Al análisis por citometría se hizo un Gate discriminatorio por tamaño y complejidad en el Dot plot inicial y adicionalmente se discriminó con marcadores de CD45 para leucocitos y yoduro de propidio (IP) para eritrocitos y debris en los histogramas correspondientes. Los resultados se analizaron con ANOVA y regresión lineal. La expresión de GDF-9 disminuyó ($P < 0.05$) a medida que avanzó el desarrollo folicular en Anestro y Proestro/Estro, pero aumentó ($P < 0.05$) en Diestro. BMP-15 aumentó ($P < 0.05$) su presencia en folículos antrales más desarrollados en la etapa de Anestro, disminuyendo ($P < 0.05$) en Proestro/Estro al alcanzar un mayor nivel de desarrollo. Estas proteínas por tanto, se expresaron en las células foliculares de caninos en distintas etapas del ciclo estral y de manera diferente durante el desarrollo folicular, donde ambas podrían estar relacionadas con las características particulares.

ABSTRACT

The estrous cycle of the bitch presents unique features when compared to other domestic mammals, however, little is known about the characteristics of the follicular development compared with other species. The Growth Differential Factor 9 (GDF-9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) are members of the Transforming Growth Factor (TGF- β) superfamily and have demonstrated an important role during the follicular development of many species. The aim of this study was to analyze the presence of both proteins in the follicular cells from canine ovarian antral follicles by flow cytometry. Granulosa and cumulus cells were obtained by aspiration and scraping of antral follicles from different sizes and stages of the estrous cycle. Cells were fixed and incubated with first antibodies against human GDF-9 and mouse BMP-15 (1:100) and second antibodies conjugated with FITC and PerCP (1:500), respectively. A size and complexity discriminatory gate was used for the cytometry analysis in the initial dot plot and, additionally, a CD45 marker for leukocyte and Iodum Propide for erythrocyte and debris discrimination in the corresponding histograms. The results were analyzed with ANOVA and lineal regression. GDF-9 expression decreased ($P < 0,05$) during follicular development in Anestrous and Proestrous/Estrous, but increased during Diestrous ($P < 0,05$). BMP-15 expression increased ($P < 0,05$) during follicular development in Anestrous, but decreased in Proestrous/Estrous ($P < 0,05$) compared to small and medium sizes. Therefore, these proteins are expressed in canine antral follicle cells during different stages of the estrous cycle and at different levels of develop of the antral follicle, where both may be related to the special features of the bitch.

INTRODUCCIÓN

La hembra canina es una especie monoéstrica, no estacional, que al compararla con otras especies domésticas de mamíferos, se aprecian en ella diversas particularidades en su fisiología reproductiva. Hasta la fecha se desconocen los mecanismos específicos que generan estas características de la perra, como son la luteinización preovulatoria del folículo (Concannon, 2011), expansión de las células del cúmulo tardía (De los Reyes *et al.*, 2013) y, la que probablemente sea la más significativa, la ovulación de un ovocito inmaduro sin reinicio meiótico (Reynaud *et al.*, 2006; De los Reyes *et al.*, 2011).

En los últimos años se han descrito diversos factores de regulación paracrina de aspectos reproductivos, siendo dos de ellos fundamentales para el desarrollo folicular en diferentes especies estudiadas (Palma *et al.*, 2012), el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15), ambos miembros de la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformantes beta (TGF- β) (van der Hurk y Zhao, 2005; Orisaka *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2012).

Las funciones que tienen estas proteínas, descritas en otras especies, están directamente relacionadas con el desarrollo y maduración del ovocito (Elvin *et al.*, 1999; Yoshino *et al.*, 2006). Es por esto que la expresión de ambas es relevante en la comprensión de las características reproductivas particulares de la perra.

Para analizar la presencia de estas proteínas en las células foliculares, la citometría de flujo puede ser una alternativa ventajosa ya que puede evaluar, de manera individual, la presencia de estos dos factores a la vez en miles de células de manera simultánea en un lapso significativamente menor en comparación con otras técnicas (Robinson, 2008).

En el presente estudio se analizó mediante citometría de flujo la presencia de GDF-9 y BMP-15 en las células foliculares de folículos antrales de perras durante su desarrollo, en distintas etapas del ciclo estral. Se espera aportar conocimiento para la comprensión de los procesos de interacción folículo-ovocito tendientes a la maduración del gameto y así favorecer el desarrollo biotecnológico reproductivo de los caninos, tanto domésticos como de fauna silvestre.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desde hace años se tiene evidencia sobre el concepto de que el ovocito juega un rol principal en la regulación del crecimiento y desarrollo del folículo. En una revisión de Otsuka *et al.* (2011), se señalan los experimentos de Falck en el año 1959 y de Nalbandov en 1970, los cuales muestran que la remoción del ovocito de folículos dominantes en conejo causa luteinización espontánea de las células de la granulosa y de la teca, demostrando la importancia del ovocito como inhibidor de la luteinización folicular.

Con el tiempo se ha demostrado que el desarrollo folicular consiste en una serie de interacciones entre el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca, en donde la secreción de distintos factores, paracrinós y autocrinós, estimulan el desarrollo, proliferación y diferenciación de las células del folículo (van de Hurk y Zhao, 2005; Orisaka *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2012).

Dentro de estos factores se encuentran el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogenética Ósea (BMP-15), ambos miembros de la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformantes beta (TGF- β) (van der Hurk y Zhao, 2005; Orisaka *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2012). Estos factores fueron caracterizados en la década de 1990, donde al poco tiempo se demostró su importancia en la fertilidad, tanto de ratones como de ovejas (Kidder y Vanderhyden, 2010).

Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9)

El GDF-9 es considerado esencial para el proceso normal de la foliculogénesis en el ovario de los mamíferos, tanto en las fases tempranas como tardías del desarrollo (Otsuka *et al.*, 2011). Existe evidencia de que su ausencia inhibe el crecimiento y maduración del folículo primario a etapas posteriores en roedores (Dong *et al.*, 1996) y ovinos (Hanrahan *et al.*, 2004), además de promover el desarrollo de folículos primarios de ratones (Hayasi *et al.*, 1999) y humanos (Hreinsson *et al.*, 2002).

Este factor estimula la proliferación de células de la granulosa, al inhibir la apoptosis y atresia folicular en folículos preantrales de ratones (Orisaka *et al.*, 2006). Sin embargo, en complejos cúmulo-oofo (CCO) de bovinos no ha mostrado capacidad anti apoptótica

(Hussein *et al.*, 2005), y en folículos preovulatorios de bovinos su acción inhibitoria no ha demostrado ser suficiente para disminuir la incidencia de apoptosis (Orisaka *et al.*, 2009). Lo anterior podría significar una diferencia especie específica importante en su función, como también que su actividad se ve disminuida a medida que avanza el desarrollo folicular.

En diferentes mamíferos se ha visto que esta proteína actúa inhibiendo la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa, controlando así la luteinización del folículo (Eppig, 2001; Vitt *et al.*, 2000). En el caso de la perra, la luteinización preovulatoria del folículo es una característica normal, terminando su desarrollo con niveles crecientes de progesterona sérica (Concannon, 2011). Esto señalaría una posible diferencia en los mecanismos regulatorios de este fenómeno en la perra, lo que se ha sugerido a través de estudios del GDF-9 en la maduración de ovocitos *in vitro* e *in vivo* (De los Reyes *et al.*, 2013).

El GDF-9 también estimula la expansión de las células del cúmulo en roedores mediante la inducción de expresión de los factores Hialuronano sintasa (*Has2*), Proteína 6 inducida por Factor de Necrosis Tumoral alfa (*Tnfaip6*), Proteína relacionada a Pentraxina (*Ptx3*) y Prostaglandina-endoperóxido sintasa (*Ptgs2*) (Kidder y Vanderhyden, 2010). Sin embargo, al comparar la perra con otros mamíferos, la unión de las células del cúmulo con el ovocito se mantiene por varios días luego del peak de LH y la ovulación (Reynaud *et al.*, 2006). Esto es coincidente con estudios *in vitro* (De Los Reyes *et al.*, 2013), lo que podría señalar un patrón de expresión distinto del GDF-9 en la hembra canina (De Los Reyes *et al.*, 2013), esto debido que la maduración *in vitro* de ovocitos caninos, con y sin células del cúmulo, han mostrado que la expresión de GDF-9 va disminuyendo a medida que el ovocito va madurando, además de presentar mayor concentración en aquellos ovocitos procesados con el cúmulo, (De los Reyes *et al.*, 2013).

Proteína Morfogenética Ósea 15 (BMP-15)

Según Eppig (2001), la BMP-15 (o también conocida como GDF-9b), al igual que GDF-9, tiene gran importancia en la fertilidad. La mutación homocigótica del gen *Bmp15* en ratones, causa una reducción en la fertilidad de la hembra, mientras que en el caso de la oveja, esta misma mutación genera un bloqueo en el desarrollo temprano del folículo y,

consecuentemente, infertilidad (Yan *et al.*, 2001). Esto señala que su importancia difiere entre distintas especies.

Las primeras investigaciones sobre la función de la BMP-15 determinaron que las células de la granulosa eran el principal punto de acción de la proteína, actuando como un agente mitogénico, además de ser un factor de regulación de la esteroidogénesis de dichas células (Otsuka *et al.*, 2000). También se demostró que en roedores la expresión de la proteína va en aumento a medida que avanza el desarrollo del folículo (Otsuka *et al.*, 2000). Adicionalmente se ha demostrado que BMP-15 (junto con GDF-9) tiene relación con la tasa de ovulación en oveja, en donde aquellas hembras con mutación heterocigota para el gen *bmp15* presentan mayor número de ovulaciones (dos a tres) en comparación con los individuos sin mutación (una a dos) (Moore *et al.*, 2004).

Adicional a lo descrito anteriormente, esta proteína puede inhibir la expresión de los receptores de FSH (FSHR) en las células de la granulosa (Otsuka *et al.*, 2001). Además, estimula la expresión de otro factor, el Ligando Kit, el cual entre varias funciones inhibe a su vez la BMP-15. Esto genera un feed-back entre el ovocito y las células que lo rodean, permitiendo una regulación e inducción efectiva de la proliferación de las células de la granulosa (Otsuka *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha visto que BMP-15 regula la apoptosis de las células del cúmulo en el bovino, al contrario de GDF-9 que no presentaba dicha capacidad (Hussein *et al.*, 2005). Este factor también tendría un efecto en la expansión de las células del cúmulo mediante la estimulación del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), el cual permite que estas células sean capaces de responder a las señales de las células de la granula parietal (Yoshino *et al.*, 2006). En la perra se ha demostrado que durante la maduración *in vitro* de ovocitos, su expresión aumenta concomitante a la expansión de las células del cúmulo, a diferencia de GDF-9 (De Los Reyes *et al.*, 2012)

Citometría de flujo

La citometría de flujo permite el análisis individual de células en suspensión al pasar a través de un haz de luz durante un tiempo muy corto (De Neubourg *et al.*, 1996; Robinson,

2008). El aspecto clave de esta técnica es la capacidad de analizar miles de células a gran velocidad evaluando varias características de cada célula simultáneamente. El equipo genera una onda de luz de aproximadamente 488 nm capaz de estimular la fluorescencia de diversas moléculas, para luego detectar las ondas de luz provenientes de las dichas moléculas (Robinson, 2008).

Mediante marcadores fluorescentes, se puede determinar la presencia o ausencia de distintos tipos celulares, permitiendo así discriminar las células, como también estudiar distintos factores de interés en ellas de manera simultánea. No obstante, hasta la fecha a pesar de la abundancia de estudios de estas proteínas descritas en la literatura científica, no existen trabajos publicados que utilicen la citometría de flujo en este propósito.

GDF-9 y BMP-15 son factores paracrinos claves en el desarrollo tanto de ovocito como de las células foliculares que lo rodean, por lo que su evaluación es fundamental en la comprensión de los procesos de interacciones folículo-ovocito tendientes al desarrollo del gameto, *in vivo* e *in vitro*, pudiendo la citometría de flujo ser una herramienta adecuada para analizar la presencia de ambos factores durante el desarrollo folicular.

HIPÓTESIS

El análisis del factor de diferenciación 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogénica 15 (BMP-15) mediante Citometría de Flujo mostrará que la producción endógena de estas proteínas difieren en las distintas etapas del desarrollo folicular antral a través del ciclo reproductivo de la perra, donde el GDF-9 estará presente en folículos mayormente al inicio del crecimiento en comparación con etapas posteriores y BMP-15 principalmente en estadios más avanzados del desarrollo folicular en esta especie.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, mediante citometría de flujo, la presencia de GDF-9 y BMP-15 en relación al desarrollo folicular antral en ovarios de perras en distintos estados del ciclo reproductivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar el uso de la citometría de flujo en el estudio de GDF-9 y BMP-15 en células foliculares durante el desarrollo folicular.
- Determinar la relación temporal de la expresión de GDF-9 y BMP-15 en el desarrollo antral de folículos ováricos de perras.
- Estudiar la presencia de las proteínas GDF-9 y BMP-15 en los folículos antrales en diferentes estado de desarrollo y su relación con él estado del ciclo estral de la perra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de ovarios y recolección de folículos

Todos los procedimientos se efectuaron de acuerdo a los protocolos aprobados por los comités de bioética de FONDECYT y de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de reproducción del Departamento de Fomento de la Producción Animal en la misma facultad.

Los folículos se obtuvieron de ovarios procedentes de 46 perras, de 6 meses a 6 años de edad, de diferentes razas, mediante ovario-histerectomía. Estas cirugías se realizaron en 2 centros quirúrgicos de mascotas cercanos al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre a las perras durante las cirugías mediante jeringa de 3 ml (23G, Nipro Corporation, Japón) para medir los niveles de progesterona sérica. Posteriormente, en el laboratorio, los ovarios fueron procesados dentro de las 2 horas posteriores a la cirugía. Las gónadas se examinaron a través de una lupa (Lieder MZ-730-J6 American Scientific, Portland, USA) para determinar mediante las estructuras presentes y el grado de desarrollo de éstas, la etapa del ciclo estral en la cual se encontraba la hembra donante.

Para la obtención de los folículos, se seccionó la corteza ovárica en pequeños fragmentos, los cuales se mantuvieron durante 90 minutos en una digestión enzimática con Colagenasa (C0130-100MG Sigma, MO, USA) a concentración de 1 mg/ml en agua destilada, con el fin de disgregar el tejido ovárico y facilitar la selección de los folículos.

Con la ayuda de una lupa (Lieder MZ-730-J6 American Scientific, Portland, USA) los folículos antrales de diferentes estados de desarrollos fueron separados del tejido ovárico mediante agujas finas, los que luego fueron fragmentados para retirar el ovocito de su interior.

Los folículos utilizados se clasificaron de acuerdo a su estado de desarrollo (tamaño) considerando 3 categorías: folículos antrales pequeños (~150–390 μm), antrales medianos (400-590 μm) y antrales grandes (600-900 μm). Para la determinación de la etapa del ciclo estral se consideraron las estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) y su grado de

desarrollo, como también las concentraciones séricas de progesterona de cada donante, estandarizadas previamente en el laboratorio (Robles, 2012). Las etapas del ciclo se clasificaron en Anestro, Diestro y Proestro/Estro.

Se juntaron a lo menos 35 folículos antrales de cada categoría de desarrollo folicular. Las células foliculares, tanto de la pared como del cúmulo, se fijaron en paraformaldehído 4% (PAF) para luego ser sometidos a inmunofluorescencia y analizados en el citómetro de flujo.

Inmunofluorescencia

Las muestras fijadas en PAF 4% se lavaron 4 veces en PBS a pH 8,2 durante 10 minutos cada lavado, para eliminar los excedentes de paraformaldehído, mediante centrifugación a 8 mil rpm durante 5 minutos. Luego las células fueron permeabilizadas agregando a cada tubo 1 ml de Triton X100 (T878-50ML Sigma, MO, USA) al 1% en PBS durante 10 minutos. Se repitió el proceso de lavado anteriormente señalado y se procedió bloquear los sitios de unión inespecíficos en las células foliculares con 1 ml Albúmina Sérica Bovina (A2152-10G Sigma, MO, USA) en PBS (PBS-BSA 0,2%) durante 1 hora.

Las células foliculares fueron nuevamente lavadas bajo el mismo método descrito con anterioridad para luego ser incubadas con 1 ml del anticuerpo primario para GDF-9 y BMP-15 durante toda la noche a 4°C. Se utilizó anticuerpo primario IgG policlonal anti-GDF9 humano obtenido de conejo (ab93892 Abcam, MA, USA) y un anticuerpo IgG policlonal anti-BMP15 humana obtenido de cabra (AF2925 RD System, MN, USA), ambos en concentración 1/100. Ambos anticuerpos fueron previamente probados en perras (De Los Reyes *et al.*, 2012; De Los Reyes *et al.*, 2013).

Posterior a la incubación, las muestras se lavaron con 1 ml de una solución de Tween-20 0,05% (P9416-50L Sigma, MO USA) en PBS tres veces, durante 10 minutos cada lavado, para luego agregar 1 ml de solución con los anticuerpos secundarios en concentración 1:500 incubándose en oscuridad a 22°C durante 1 hora. Para el GDF-9 se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo preparado en cabra conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (ab97050 Abcam, MA, USA), el cual emite una fluorescencia color verde con una longitud de onda de 519 nm. Para el BMP-15, un anticuerpo anti-IgG de cabra preparado en burro

conjugado con Clorofil-Peridina (PerCP) (sc-45091 Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), el cual emite una fluorescencia con una longitud de onda de 675 nm y color rojo.

Luego de un nuevo lavado con PBS/Tween-20, 3 veces por 10 minutos cada lavado, se agregó 1 ml de solución de Ioduro de Propidio (1351916, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA) en concentración 1:1000 durante 10 minutos. Esta se utilizó como indicador de ADN, para lograr discriminar las células de cualquier detrito celular o partículas que pueda pasar por el lector del citómetro. Su fluorescencia es de una longitud de onda de 617 nm. Además se agregó 1 ml de solución de anticuerpo IgG para Cluster de Diferenciación 45 (CD45) conjugado con Ficoeritrina-Texas Red (ECD) (117018, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) en concentración 1:1000, durante 10 minutos, para detectar la presencia de leucocitos y determinar el nivel de contaminación sanguínea en la muestra. Este fluoróforo emite una fluorescencia de aproximadamente 635 nm de longitud de onda. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 8G durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y re suspendiendo las células en 1 ml de Iso-Flow (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Análisis de Citometría

El análisis de citometría de flujo se realizó con el citómetro modelo Gallius (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) perteneciente al Laboratorio de Reproducción, donde se determinó la presencia del GDF-9 y la BMP-15 en las células foliculares, a través de la estimulación y excitación de las moléculas fluorescentes conjugadas a los anticuerpos utilizados (Robinson, 2008).

Se realizó un control negativo de auto fluorescencia basal de las células foliculares, evaluada en todos los lectores a utilizar del citómetro. Además, otro control negativo donde se utilizaron células foliculares a las cuales no se les agregó el anticuerpo primario para la evaluación de GDF-9 y BMP-15. A través de un Gate discriminatorio, los otros tipos celulares que pudieran encontrarse durante el análisis fueron separados por tamaño (side scatter) y complejidad (foward scatter) de la célula detectada en el citómetro de flujo, excluyendo aquellas señales con un mayor grado de diferencia al voltaje emitido por las células del control negativo (Fig. 1A). La cuantificación de las células positivas se expresó en escala logarítmica, donde el control negativo para cada fluoróforo (fluorescencia basal de

la célula) se situó en la primera década de medición (10^0) y las lecturas positivas se situaron en las siguientes décadas de medición (10^1 , 10^2 y 10^3). Para la determinación del porcentaje de expresión, se consideraron en primer lugar todas las células positivas a GDF-9, a las cuales se les restó el número de células positivas a GDF-9 y CD45 de los dot plots respectivos. Este número se dividió por el total de células o eventos positivos a Ioduro de Propidio (Fig. 1B).

Se realizaron 4 réplicas de medición con el Citómetro de Flujo para cada categoría de clasificación, manteniendo el mismo protocolo de inmunofluorescencia y evaluación en cada una de ellas. Del total de eventos detectado en cada medición, se consideraron solamente aquellos positivos a Ioduro de Propidio (IP), descartando detritos y elementos que no fueran células.

Análisis estadístico

Los datos expresados en porcentaje se transformaron según $\arcsen \sqrt{\%}$ y mediante ANOVA se comparó el contenido de ambas proteínas en los mismos estados foliculares de las etapas del ciclo. El efecto del grado de desarrollo (tamaño del folículo) en el contenido de GDF-9 y BMP-15 se determinó mediante regresión lineal y coeficiente de correlación de Pearson. Para todos los análisis, un valor de $P \leq 0,05$ se consideró diferente.

RESULTADOS

De un total de 46 perras se obtuvieron y evaluaron 522 folículos antrales, los cuales se clasificaron según tamaño y estado del ciclo que se encontraba la perra donante (Tabla 1). Para la medición de GDF-9 se evaluaron 13.920 células foliculares, entre todas las categorías, mientras que para BMP-15 se evaluaron 10.049 células foliculares.

En el control negativo de auto fluorescencia basal de las células, para cada fluoróforo, se obtuvo cada expresión dentro de la primera década de medición de la escala logarítmica (Fig. 2A). Para el control negativo de los anticuerpos primarios, tanto de GDF-9 como de BMP-15, la expresión también se mantuvo dentro de la primera década de medición, a pesar de que en la evaluación de BMP-15 ésta se encontró en el límite (Fig. 2B). Los ajustes de voltaje y ganancia obtenidos con el control negativo se muestran en la Tabla 2.

Los resultados de expresión de cada réplica, obtenidos mediante el Gate de discriminación (Fig. 1A), se calcularon considerando aquellas células positivas a GDF-9 o BMP-15 y se dividieron dentro del total de células detectadas, luego de descartar los eventos positivos a CD45 (Fig. 1B).

A partir de los resultados de expresión de las proteínas que arrojó cada réplica, se obtuvo un promedio de los porcentajes en cada categoría, con el cual se realizó el análisis comparativo entre las distintas etapas del ciclo y los grados de desarrollo folicular (Tabla 3).

Tabla 1. Total de folículos utilizados según las distintas categorías de clasificación. AP: Antrales Pequeños. AM: Antrales Medianos. AG: Antrales Grandes.

Ciclo	Desarrollo Folicular			Total
	AP	AM	AG	
Pro/Est	73	53	35	161
Diestro	148	65		213
Anestro	96	52		148
Total	317	170	35	522

Tabla 2. Detectores utilizados en el estudio, su función de detección y los valores resultantes de la calibración del voltaje y la ganancia para cada uno los detectores del citómetro de flujo.

Calibración Detectores Citometria			
Detector	Detección	Voltaje	Ganancia
FS	Tamaño	673	7,5
SS	Complejidad	796	7,5
FL1	FITC	330	1,0
FL2	IP	355	1,0
FL3	ECD	366	1,0
FL4	PerCP	438	1,0

Tabla 3. Media de expresión de ambas proteínas en cada categoría y análisis comparativo entre etapas del desarrollo folicular y ciclo estral. Valores sin letra no presentan diferencia estadística. ABC: Comparación entre promedios por columna (P<0,05). abc: Comparación entre promedios por fila para cada proteína (P<0,05)

	Desarrollo Folicular					
	Antral Pequeño		Antral Mediano		Antral Grande	
Ciclo	GDF-9	BMP-15	GDF-9	BMP-15	GDF-9	BMP-15
Proestro/Estro	71,82 ^{A,a}	68,47 ^{A,a}	46,75 ^{A,b}	73,8 ^a	28,67 ^c	33,34 ^b
Diestro	57,61 ^{B,a}	48,63 ^{AB}	68,07 ^{B,b}	75,62		
Anestro	88,03 ^{C,a}	34,86 ^{B,a}	79,23 ^{C,b}	74,39 ^b		

Resultados de la Expresión de GDF-9

Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en relación a las expresiones de esta proteína dentro de cada etapa del ciclo reproductivo. En Anestro, el porcentaje de células positivas a GDF-9 disminuye al aumentar el desarrollo folicular, desde folículos antrales pequeños a antrales medianos (Fig. 3A). Para el Diestro, el porcentaje de expresión se incrementó según aumentó el desarrollo folicular (Fig. 3B), mientras que en la etapa de Proestro/Estro, la regresión lineal mostró una disminución en la expresión de GDF-9 a medida que avanzó el desarrollo folicular, desde la etapa de Antral Pequeño a Antral Mediano y a la etapa de folículos Antrales Grandes (Fig. 3C). Para cada categoría, se agregó un dot plot representativo de la intensidad de expresión de GDF-9 (Fig. 7)

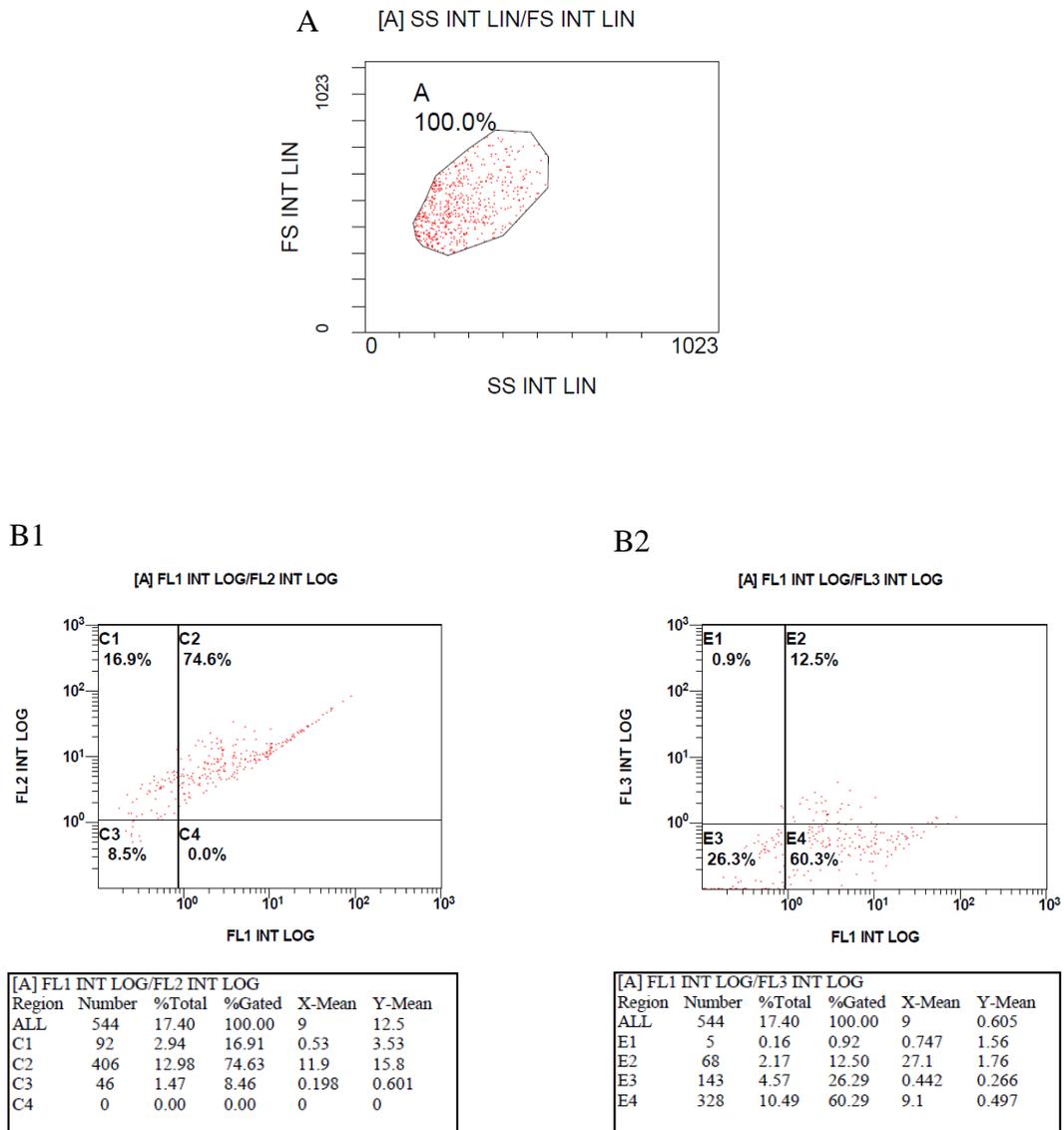


Figura 1. A. Gráfico de tamaño celular (forward scatter, FS) y complejidad celular (side scatter, SS) mediante el cual se realizó el Gate de discriminación. **B.** Cálculo del porcentaje de expresión para cada proteína. Ejemplo de evaluación de GDF-9 en folículos antrales medianos en Diestro. Al total de células positivas a la proteína (imagen B1, cuadrante C2: 406 eventos) se le resta el número de células positivas a GDF-9 y CD45 (imagen B2, cuadrante E2: 68 eventos) y este número se divide por el total de células positivas a IP (imagen B1, cuadrantes C1 más C2: 92 eventos más 406 eventos).

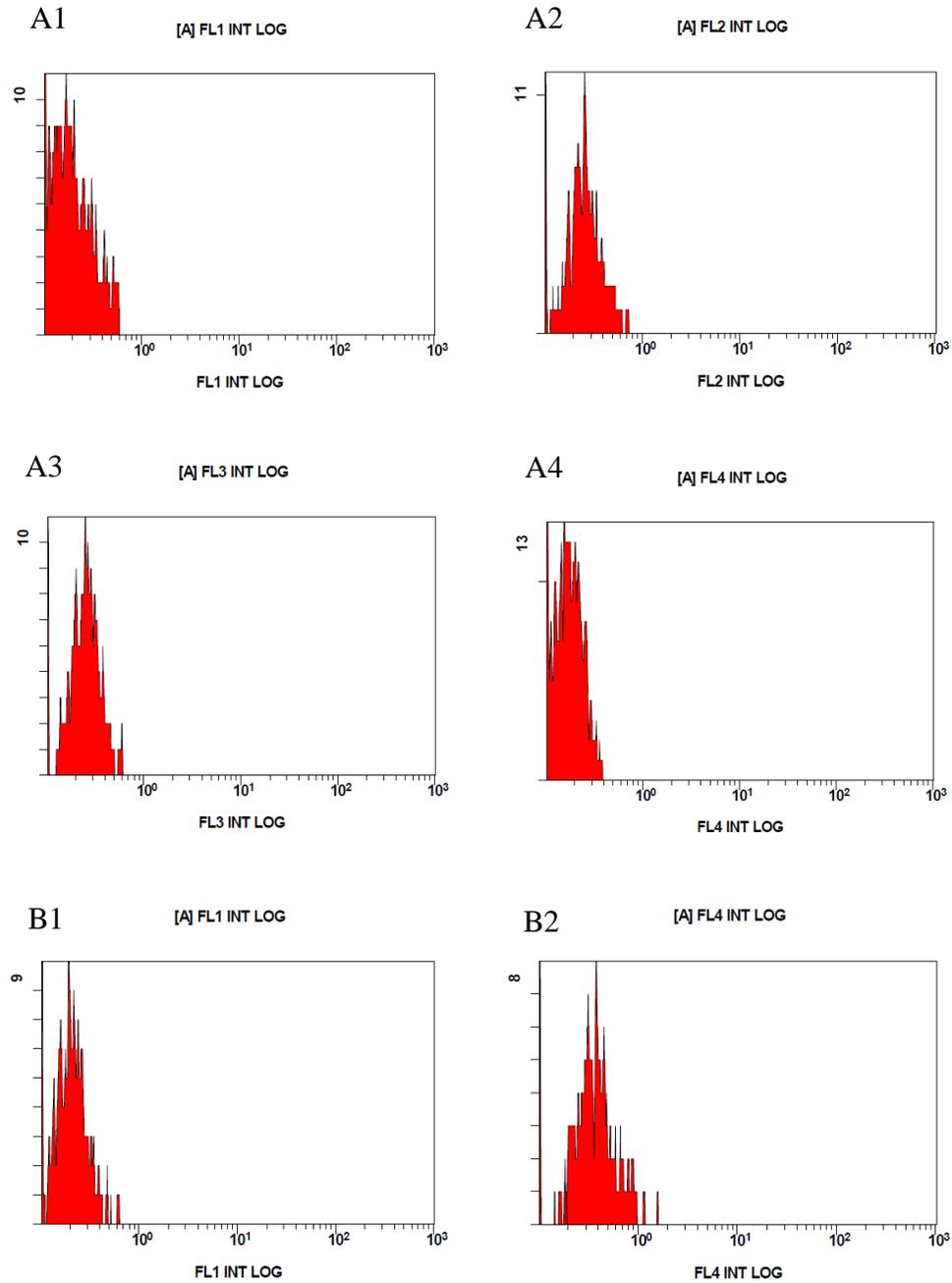


Figura 2. A. Resultados controles negativos de auto fluorescencia basal en los lectores de los diferentes fluoróforos: FITC (A1, lector FL1), Ioduro de Propidio (A2, lector FL2), CD45 (A3, lector FL3) y PerCP (A4, lector FL4), en los cuales la fluorescencia basal de las células se registró en la primera década de medición de la escala logarítmica. **B.** Resultados controles negativos sin anticuerpo primario para GDF-9 (B1) ni para BMP-15 (B2).

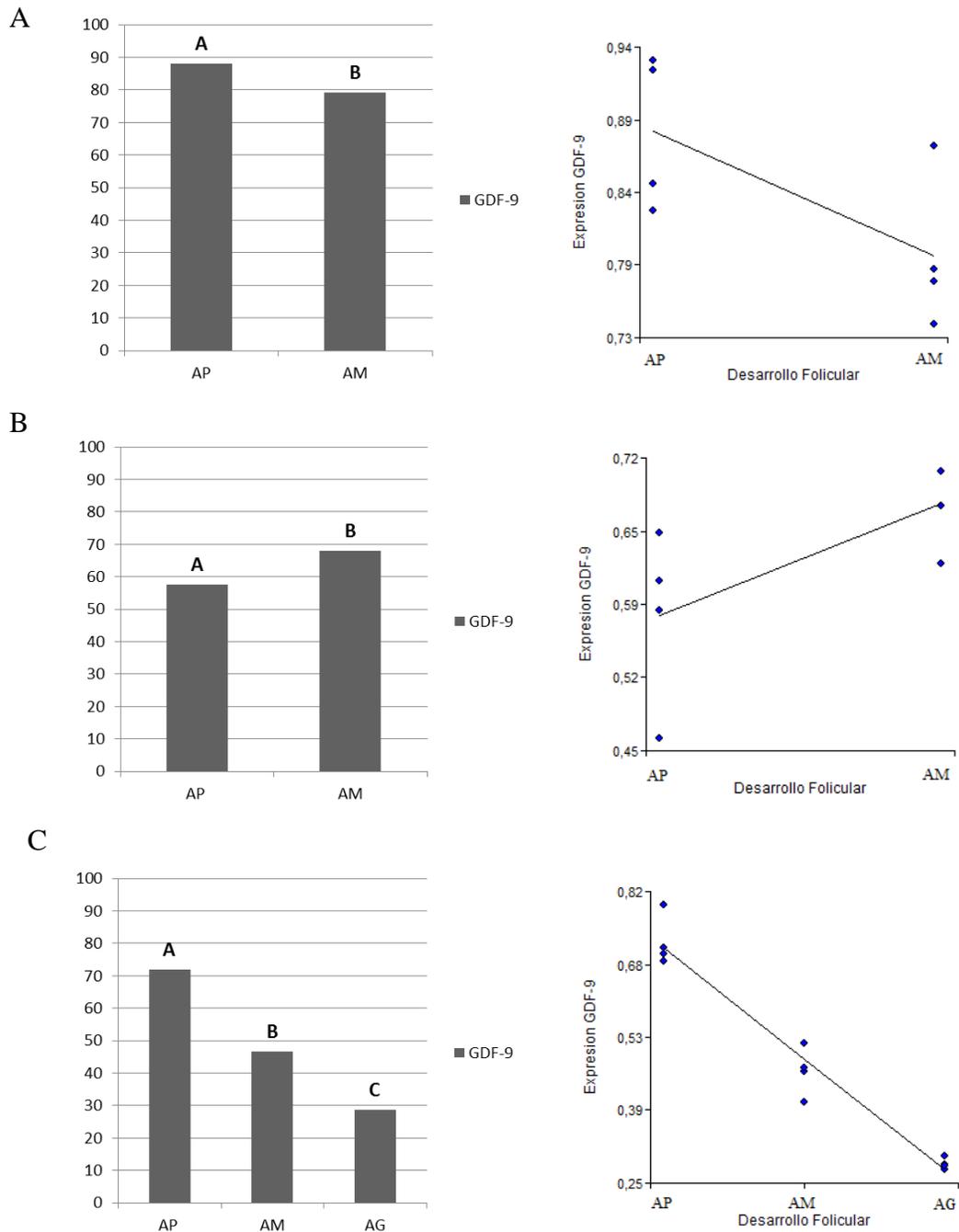


Figura 3. Expresión de GDF-9 según desarrollo folicular en distintas etapas del ciclo estral. Gráficos comparativos (izquierda) y regresiones lineales (derecha). **AP:** Antral Pequeño. **AM:** Antral Mediano. **AG:** Antral Grande. **A:** Anestro. **B:** Diestro. **C:** Proestro/Estro. En los gráficos, letras distintas significan diferencia significativa ($P < 0,05$).

Los resultados de la expresión de GDF-9 entre las distintas categorías del ciclo estral, para cada etapa del desarrollo folicular, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) al comparar los folículos antrales pequeños, existiendo una disminución en la expresión desde la etapa de Proestro/Estro a la etapa de Diestro, y luego un aumento en la etapa de Anestro (Fig. 4A). En el caso de los folículos antrales medianos, GDF-9 presentó un aumento en su expresión desde Proestro/Estro a Diestro, y luego otro aumento a la etapa de Anestro (Fig. 4B).

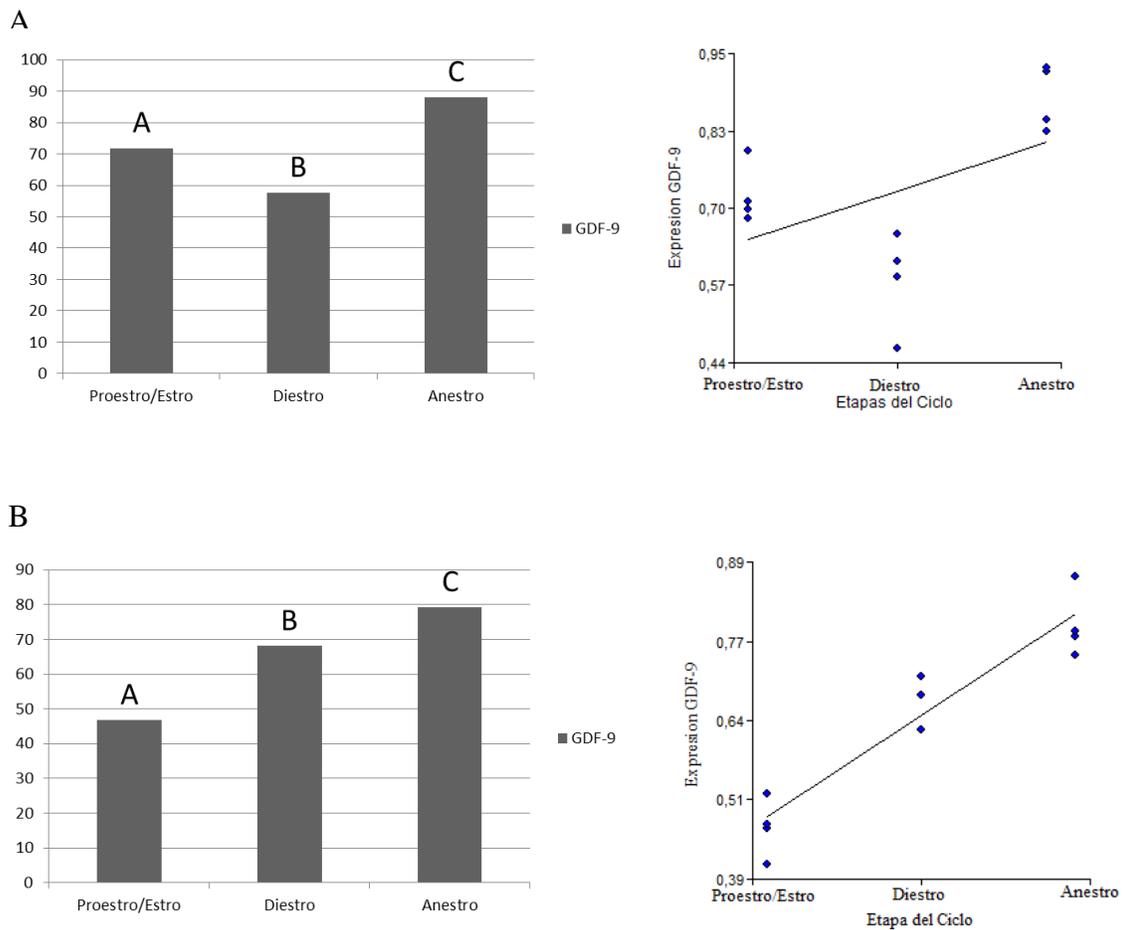


Figura 4. Expresión de GDF-9 entre etapas del ciclo estral. Gráficos comparativos (izquierda) y regresiones lineales (derecha). **A:** Comparación de Antrales Pequeños (AP). **B:** Comparación de Antrales Medianos (AM). Las letras distintas en el gráfico representan diferencias estadísticamente significativas.

Resultados de la Expresión de BMP-15

La expresión de BMP-15, dentro de cada etapa del ciclo estral, sólo presenta diferencias significativas ($P < 0,05$) en las etapas de Proestro/Estro y Anestro, no así en Diestro. En la primera, hay una disminución en su expresión en los folículos Antrales Grandes al compararla con las etapas de menor desarrollo (Fig. 5A), mientras que en Anestro, la expresión de BMP-15 aumenta desde los folículos Antrales Pequeños a los Antrales Medianos (Fig. 5B). Para cada categoría, se agregó un dot plot representativo de la intensidad de expresión de BMP-15 (Fig. 8)

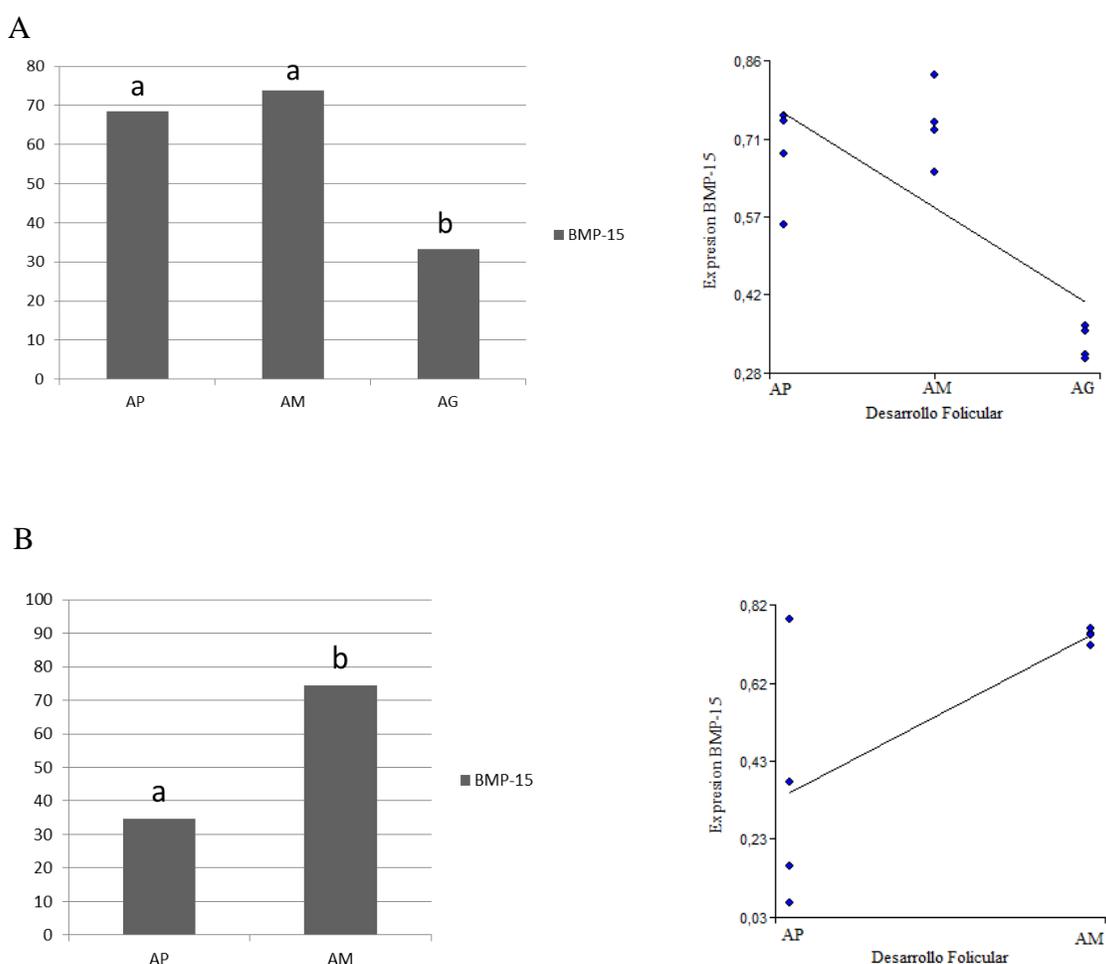


Figura 5. Expresión de BMP-15 según nivel de desarrollo folicular en distintas etapas del ciclo estral. Gráficos comparativos (Izquierda) y regresiones lineales (Derecha). **AP:** Antral Pequeño. **AM:** Antral Mediano. **AG:** Antral Grande. **A:** Proestro/Estro. **B:** Anestro. Barras con letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

En el caso de BMP-15, al analizar su expresión entre las distintas etapas del ciclo estral, presenta diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los folículos antrales pequeños, pero no entre folículos antrales medianos. Los resultados mostraron que no hay un aumento significativo en la expresión entre la etapa de Proestro/Estro y la de Diestro, así como tampoco es considerable el aumento entre la etapa de Diestro y la de Anestro. Sin embargo, sí es significativa la diferencia entre la de Proestro/Estro y Anestro (Fig. 6).

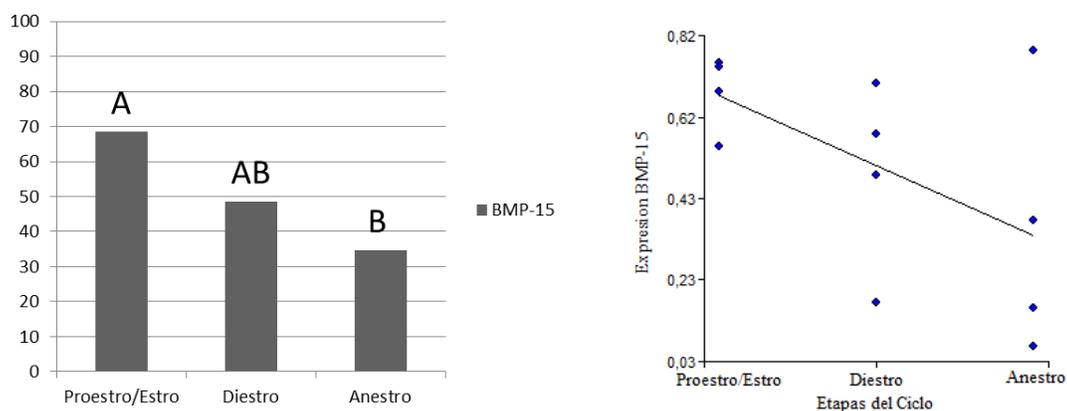


Figura 6. Expresión de BMP-15 en folículos antrales pequeños según distintas etapas del ciclo estral. Gráfico comparativo (izquierda) y regresión lineal (derecha). Barras con letras distintas representan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

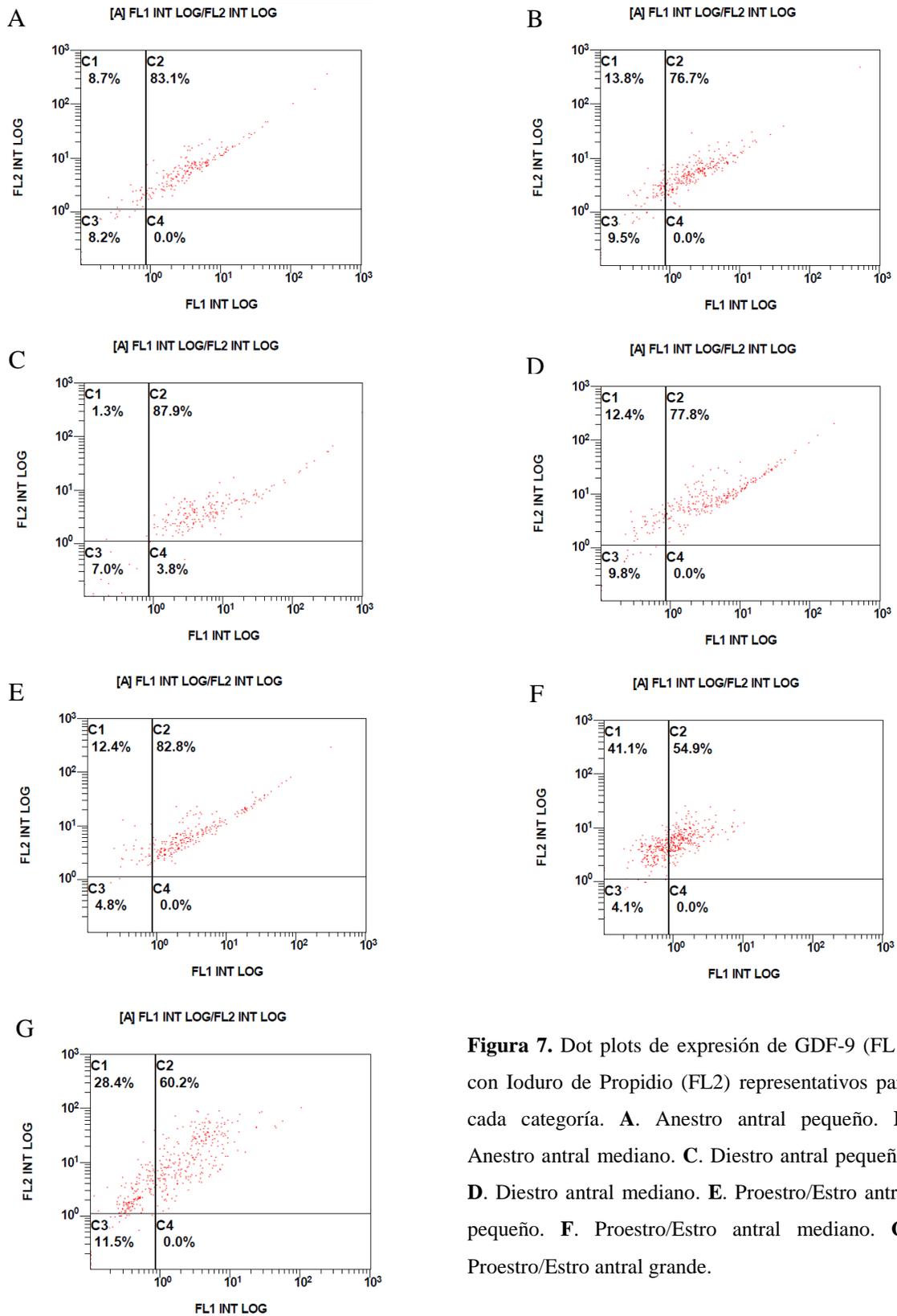


Figura 7. Dot plots de expresión de GDF-9 (FL1) con Ioduro de Propidio (FL2) representativos para cada categoría. **A.** Anestro antral pequeño. **B.** Anestro antral mediano. **C.** Diestro antral pequeño. **D.** Diestro antral mediano. **E.** Proestro/Estro antral pequeño. **F.** Proestro/Estro antral mediano. **G.** Proestro/Estro antral grande.

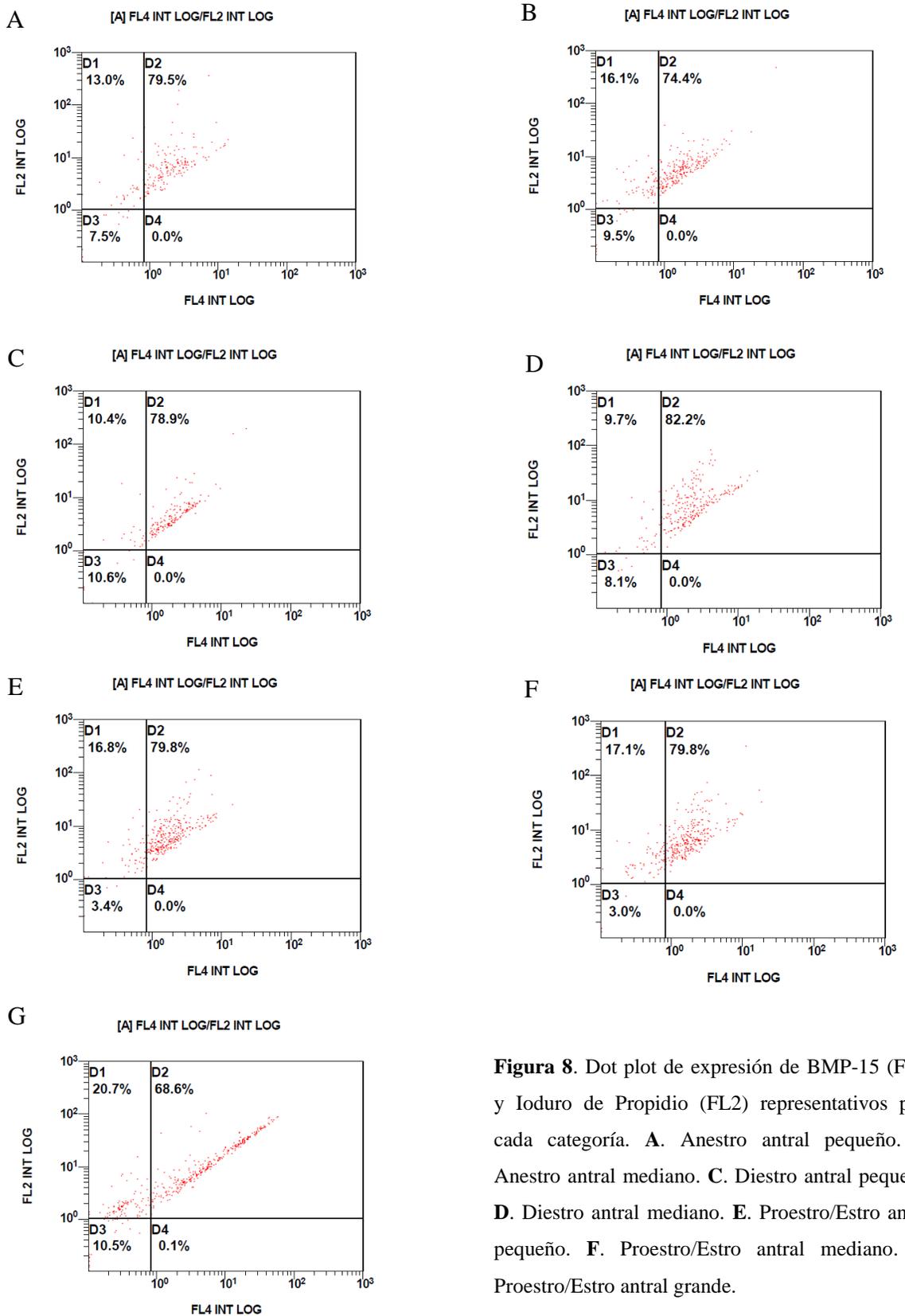


Figura 8. Dot plot de expresión de BMP-15 (FL4) y Ioduro de Propidio (FL2) representativos para cada categoría. **A.** Anestro antral pequeño. **B.** Anestro antral mediano. **C.** Diestro antral pequeño. **D.** Diestro antral mediano. **E.** Proestro/Estro antral pequeño. **F.** Proestro/Estro antral mediano. **G.** Proestro/Estro antral grande.

DISCUSIÓN

Los controles negativos de auto fluorescencia de las células, al igual que los controles sin el anticuerpo primario, permitieron detectar y diferenciar las lecturas de fluorescencia basales con aquellas que efectivamente indicaron la presencia de los fluoróforos del estudio y, por lo tanto, las proteínas de interés. Para ello, fue fundamental la calibración del citómetro de flujo ajustando el voltaje y los niveles de amplificación de cada detector que se utilizó en el estudio. Así, el control negativo de auto fluorescencia de las células nos permitió definir el nivel de intensidad mínimo que se consideró positivo para la expresión de cada fluoróforo, el cual se ajustó al límite de la primera década de la escala logarítmica, ya que la auto fluorescencia no presentó niveles mayores a estos. Por otro lado, el control negativo sin anticuerpo primario indicó que los anticuerpos secundarios no se unieron inespecíficamente a ningún componente de las células foliculares.

La utilización de un Gate de discriminación, mediante el gráfico de dot plot entre el Foward Scatter (Tamaño) y el Side Scatter (Complejidad), permitió eliminar del estudio tanto el detrito celular que pudiese haber sido leído por el citómetro de flujo, además de aglomerados celulares, asegurando un grupo celular homogéneo en el cual se encontraron las células foliculares.

La utilización del marcador de CD45 conjugado con Ficoeritrina-Texas Red (Energy Coupled Dye: ECD) permitió descartar la contaminación con leucocitos en cada muestra. Aquellas células que presentaron positividad a ECD y GDF-9 o BMP-15 se descartaron del estudio, esto debido a que la proteína CD45 es expresada por todas las células sanguíneas nucleadas (Goto-Koshino *et al.*, 2014). Los bajos niveles de expresión de este fluoróforo en las muestras indican que el protocolo utilizado para la obtención de células foliculares a través de folículos individuales fue adecuado para este tipo de estudio ya que no hay contaminación sanguínea que introduzcan otras células, ya sean leucocitos o eritrocitos, al estudio.

Los resultados obtenidos en este estudio son indicativos de que la citometría de flujo fue una técnica efectiva para la detección de estos factores ovocitarios en células foliculares.

Expresión de GDF-9 en Folículos Antrales

Se ha señalado en estudios anteriores de maduración *in vitro*, que la expresión de GDF-9 en el ovocito canino y células del cúmulo disminuye a medida que avanza su maduración (De Los Reyes *et al.*, 2013). Por otra parte, la expresión de mRNA de GDF-9 fue mayor en folículos de menor tamaño, comparado con aquellos de mayor desarrollo, en ovocitos porcinos (Li *et al.*, 2008), CCOs de ovinos (Almeida *et al.*, 2011) y en células foliculares de bovino (Spicer *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo estarían en acuerdo con lo señalado en dichas investigaciones, donde en las etapas de Anestro y de Proestro/Estro la presencia de GDF-9 en las células foliculares en la perra disminuyó a medida que avanzó el desarrollo folicular (Maupeu, *et al.*, 2015).

Sin embargo, en la etapa de Diestro se observó un aumento en su presencia al avanzar el desarrollo folicular. GDF-9 puede favorecer el desarrollo del ovocito mediante la activación se diversas señales a través de gap junctions o conexinas (Cx), particularmente Conexina 43 (Cx43) (Willingham-Rocky *et al.*, 2006). Estas gap junctions son moléculas muy importantes para la comunicación entre el ovocito y las células foliculares (Kidder y Mhawi, 2002). Incluso, se ha descrito que las células de la granulosa deben estar unidas mediante Cx43 para responder óptimamente a GDF-9 (Norris *et al.*, 2008). Estudios han señalado que su expresión presenta variaciones en en las distintas etapas del ciclo estral. La expresión de Cx43 en los folículos antrales en la perra, disminuyó desde la etapa de Proestro-Estro, para luego volver a aumentar en la etapa de Diestro (Willingham-Rocky *et al.*, 2006). Esta disminución se puede explicar debido al peak de LH, que ocurre al término del Proestro en la perra (Concannon, 2011) y el cual tendría un efecto inhibitorio sobre la expresión de la Cx43, de acuerdo a lo descrito en otras especies, como roedores (Gershon *et al.*, 2008; Norris *et al.*, 2008). En la perra, al disminuir las concentraciones plasmáticas de LH luego en el Estro (Concannon, 2011), disminuiría el efecto inhibitorio para Cx43, restableciendo una mayor comunicación entre el ovocito y las células foliculares, lo que podría explicar en parte la presencia creciente de GDF-9 en Diestro señalado en los resultados de este estudio.

Expresión de BMP-15 en Folículos Antrales

Los resultados respecto a la expresión de BMP-15 en las células foliculares mostraron que en la etapa de Anestro aumenta de folículos antrales pequeños a medianos. Estos resultados van acorde con lo descrito en otras especies, como roedores (Otsuka *et al.*, 2000; Erickson y Shimasaki, 2003) y porcinos (Li *et al.*, 2008). Por otro lado, en este estudio, la expresión de BMP-15 disminuyó al avanzar el desarrollo hasta folículos antrales grandes en la etapa de Proestro/Estro al igual que GDF-9. En porcinos se ha descrito que el momento de máxima expresión de BMP-15 coincide con la expansión de las células del cúmulo (Li *et al.*, 2008), mientras que en humanos BMP-15 tiene un efecto supresor sobre la actividad de las gap junctions que mantienen la unión entre las células del cúmulo (Chang *et al.*, 2014). Por otro lado, BMP-15 presenta una acción inhibitoria sobre la expresión de progesterona inducida por FSH (Otsuka *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014). La baja presencia de esta proteína en el Proestro/Estro, señalado en los resultados, podrían relacionarse con la mucificación tardía de las células del cúmulo de la perra, similar a lo descrito con el descenso de GDF-9 en la perra (De Los Reyes *et al.*, 2013). A su vez, su disminución en la expresión al final del desarrollo folicular podría indicar que este factor en la perra no sería suficiente para mantener la inhibición de la síntesis de progesterona inducida por FSH, lo cual generaría los aumentos de esta hormona antes de la ovulación, característicos de la perra (Concannon, 2011).

Al comparar los resultados entre las distintas etapas del ciclo estral, los folículos antrales pequeños mostraron una diferencia en el porcentaje de BMP-15, disminuyendo desde las etapas de Proestro/Estro a la de Anestro, lo que no se observó en los folículos antrales mediano. Estudios señalan en ratas que la etapa del ciclo estral pareciera no afectar la expresión de BMP-15 (Erickson y Shimasaki, 2003). Sin embargo, se ha descrito en ovocitos caninos diferencias en la comunicación del ovocito con las células foliculares en distintas etapas del ciclo estral, siendo muy baja en la etapa de Anestro y mayor en la de Proestro/Estro (Luvoni *et al.*, 2001). Esta comunicación, realizada por uniones gap junctions, posiblemente mediante conexina 43 (Kidder y Mhawi, 2002), podría influenciar en parte en parte de los distintos niveles de presencia de BMP-15 en las células foliculares entre las distintas etapas del ciclo estral de la perra.

De acuerdo a lo señalado en la hipótesis, respecto a la expresión de GDF-9, esto se cumplió tanto en la etapa de Proestro/Estro como en la etapa de Anestro. Sin embargo, en relación a la expresión de BMP-15, esto sólo se cumplió en la etapa de Anestro, lo que reflejaría un patrón diferente de esta proteína respecto a lo observado en otras especies, lo que podría relacionarse en parte a diferencias fisiológicas reproductiva descritas en caninos.

CONCLUSIÓN

- 1.- La utilización de la citometría de flujo resultó ser una técnica efectiva para el análisis de la expresión de GDF-9 y BMP-15 en células foliculares provenientes de folículos antrales del ovario canino.
- 2.- Las proteínas GDF-9 y BMP-15 se expresan en las células foliculares de las perras durante las distintas etapas del ciclo estral de la perra.
- 3.- Ambas proteínas se expresan de manera diferencial en las células de folículos antrales de la perra durante el desarrollo folicular y ciclo estral.
- 4.- La disminución en la presencia de GDF-9 y BMP-15 al final del desarrollo folicular podría relacionarse con la mucificación tardía de las células del cúmulo y el aumento de progesterona pre ovulatorio, características particulares del ciclo reproductivo de la perra.

BIBLIOGRAFÍA

ALMEIDA, A.; SARAIVA, M.; ARAUJO, V.; MAGALHAES, D.; DUARTE, A.; FROTA, I.; LOPES, C.; CAMPELLO, C.; SILVA, J.; FIGUEIREDO, J. 2011. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Ruminant Research* 100 (2): 169-176.

CHANG, H.; CHENG, J.; TAYLOR, E.; LEUNG, P. 2014. Oocyte-derived BMP15 but no GDF9 down-regulates connexin43 expression and decrease gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction* 20 (5): 373-383.

CONCANNON, P. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124: 200-210.

DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; MARTINEZ, V.; ROJAS, C. 2012. Immunolocalization of GDF9 and BMP15 during *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 46 (Suppl 4): 935

DE LOS REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUEZ, V.; PALOMINO, J. 2013. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. *Theriogenology* 80: 587-596.

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

ELVIN, J.; CLARK, A.; WANG, P.; WOLFMAN, M.; MATZUK, M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* 13: 1035-1048.

EPPIG, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-838.

- ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S.** 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 9-28.
- GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N.** 2008. Gap junction in the ovary: Expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 282 (1): 18-25.
- GOTO-KOSHINO, Y.; TOMIYASU, H.; SUZUKI, H.; TAMAMOTO, T.; MIZUTANI, N.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H.** 2014. Differential expression of CD45 isoforms in canine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 160: 118-122.
- HANRAHAN, J.; GREGAN, S.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.** 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70: 900-909.
- HAYASI, M.; MCGEE, E.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A.** 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236-1244.
- HREINSSON, J.; SCOTT, J.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M.; HSUEH, A.; HOVATTA, O.** 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocr Metab* 87: 316-321.
- HUSSEIN, T.; FROILAND, D.; AMATO, F.; THOMPSON, J.; GILCHRIST R.** 2005. Oocyte prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118: 5257-5268.
- KIDDER, G.; MHAWI, A.** 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123: 613-620.
- KIDDER, G.; VANDERHYDEN, B.** 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 399-413.

- LI, H.; KUO, T.; YANG, H.; CHEN, L.; LI, S.; HUANG, H.** 2008. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal Reproduction Science* 103 (3-4): 312-322.
- LUVONI, G.; LUCIANO, A.; MODINA, S.; GANDOLFI, F.** 2001. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 57: 141-146.
- MAUPEU D, PALOMINO J, DE LOS REYES M.** 2015. Immunohistochemistry localization of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) in canine follicles throughout estrus cycle. *Reproduction Fertility and Development* 27 (1): 182
- MOORE, R.; ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S.** 2004. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Trends Endocrin Met* 15: 356-361.
- DE NEUBOURG, D.; ROBINS, A.; FISHEL, S.; GIBBON, L.** 1996. Flow cytometric analysis of granulosa cells from follicular fluid after follicular stimulation. *Hum Reprod* 11: 2211-2214.
- NORRIS, R.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.; COWAN, A.; SIMON, A.; PAUL, D.; LAMPE, P.; JAFFE, L.** 2008. Luteinizing hormone cause MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junction in mouse ovarian follicles: on of two paths to meiotic resumption. *Development* 135 (19): 3229-3238.
- ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, 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.; TAJIMA, K., TSANG, B.; KOTSUJI, F.** 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2: 9-15.

- OTSUKA, F.; MCTAVISH, K.; SHIMASAKI, S.** 2011. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 78: 9-21.
- OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S.** 2001. Bone morphogenetic protein 15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 276: 11387-11392.
- OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S.** 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275: 39523-39528.
- PALMA, G.; ARGANÑARAZ, M.; BARRERA, A.; RODLER, D.; MUTTO, A.; SINOWATZ, F.** 2012. Biology and biotechnology of follicle development. *Scientific World Journal* 2012, 14 pp
- 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.
- ROBINSON, J.** 2008. Flow cytometry **In:** Wnek, G.; Bowling, G. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Pp 330-340.
- ROBLES, N.** 2012. Estandarización de la medición de progesterona sérica en la perra mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. Memoria para obtención del título de Médico Veterinario. Universidad de Viña del Mar. 90 pp
- SPICER, L.; AAD, P.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A.; HSUEH, A.** 2008. Growth differentiation factor 9 (GDF-9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicular size on responses to GDF-9. *Biology of Reproduction* 78: 243-253.
- VAN DER HURK, R.; ZHAO, J.** 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-1751.

VITT U.; MCGEE, E.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. 2000. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141: 3814-3820.

WILLINGHAM-ROCKY, L.; GOLDING, M.; WRIGHT, J.; KRAEMER, D.; WESTHUSIN, M.; BURGHARDT, R. 2006. Cloning of GJA1 (connexin 43) and its expression in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Gene Expression Patterns* 7: 66-71.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15: 814-866.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. 2006. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *P Natl Acad Sci USA* 103: 10678-10683.