



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA CONEXINA 43 EN
CÉLULAS FOLICULARES OVÁRICAS DURANTE EL CICLO
ESTRAL EN LA PERRA**

ROBERTO JOSÉ ESPINOZA PÁEZ

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

Santiago-Chile

2018

**Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del
Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile
y contó con financiamiento**

Proyecto Fondecyt 1171670



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

ROBERTO JOSÉ ESPINOZA PÁEZ

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 24 DE ENERO DE 2018

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. M^a SOLEDAD FERNÁNDEZ G.

DR. OSCAR PERALTA T.

BIOGRAFÍA

Roberto José Espinoza Páez, nacido el 8 de enero de 1990 en la ciudad de Quito, Ecuador. Realiza sus estudios primarios y secundarios en la “Unidad Educativa Cristiana Verbo”, desde pequeña edad demuestra un gran interés por el estudio de las ciencias biológicas. Realiza sus estudios universitarios en la Universidad de las Américas, adquiriendo el título de Médico Veterinario y Zootecnista en el año 2012, tras 3 años de trabajo en la clínica médica y quirúrgica de animales de compañía inicia sus estudios para optar por el grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias en la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a la Dra. Mónica de Los Reyes por la confianza depositada en mí durante este proyecto, por ser una gran guía y por demostrar una preocupación permanente por el correcto desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Jaime Palomino por respaldar, instruir y apoyar cada paso de este proyecto, por su gran amor por la docencia y su interminable paciencia con todo el equipo del laboratorio de reproducción animal.

A mi esposa que es el motor que impulsa mi vida, a mis padres por enseñarme a tener el valor necesario para alcanzar mis metas y ser el ejemplo del esfuerzo. A mis hermanos y sobrinos cuyo apoyo ha sido constante. A mi abuelo que despertó en mí el deseo de ser mejor y triunfar en mi vida personal y profesional sin importar el sacrificio necesario para lograrlo.

A mis compañeros de laboratorio Georgi, Pablo, Carola, Camila, Jorge, Karla, Javi, Pablo y Gabi, por hacer del trabajo en el laboratorio una experiencia grata y acogedora, y por ser un equipo de trabajo sólido.

Quiero agradecer a todo el equipo de la clínica veterinaria Macul que me permitió trabajar conjuntamente al desarrollo de mi tesis y brindó un apoyo económico y moral indispensable para la realización de este proyecto.

Finalmente a todo Chile y su gente, por abrirme las puertas de su hermoso país y por tratarme como a uno más de los suyos.

Roberto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	1
AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. Características Reproductivas de la Perra.....	11
2. Gap Junction.....	12
3. Conexina 43 (Cx43).....	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Procesamiento de Ovarios.....	17
2. Aislamiento de las Células Foliculares.....	18
3. Expresión Génica.....	19
3.1. Extracción de RNA y Retro Transcripción (RT):.....	19
3.2. Diseño de Partidores.....	20
3.3. PCR en Tiempo Real (qPCR):.....	21
3.4. Cuantificación Relativa.....	21
4. Expresión Proteica.....	22
4.1. Inmunohistoquímica.....	22
4.2. Western Blot.....	24
5. Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS Expresión del gen de Cx43	28
Localización de Cx43 por Inmunohistoquímica	31

Evaluación de Cx43 por Western Blot.....	35
Relación mRNA – Proteína	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Tabla 1. Número de folículos ováricos utilizados para extracción de RNA según variables de clasificación.....	19
Tabla 2: Secuencia de partidores utilizada en análisis de PCR.....	22
Figura 1. Niveles de mRNA de Cx43 durante el desarrollo folicular en cada etapa del ciclo estral.....	29
Figura 2. Expresión relativa (mRNA) de Cx43 entre folículos de similar etapa del desarrollo (tamaño) provenientes de distintas etapas del ciclo estral.....	31
Figura 3. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en anestro.....	32
Figura 4. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en proestro.....	32
Figura 5. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en anestro.....	33
Figura 6. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en proestro.....	34
Figura 7. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en diestro.....	34
Tabla 3. Número de folículos ováricos utilizados en la extracción de proteínas.....	35
Figura 8. Análisis de Western Blot para cuantificación de Cx43 durante el desarrollo folicular en cada etapa del ciclo estral.....	37
Figura 9. Intensidad de Bandas en Western Blot para Cx43 entre folículos de similar etapa del desarrollo provenientes de distintas etapas del ciclo estral.....	39
Figura 10. Correlación entre Expresión Relativa e Intensidad de Banda en Western Blot para Cx43.....	40

RESUMEN

Palabras Clave: conexina 43, células foliculares, hembra canina, ciclo estral.

La hembra canina presenta características reproductivas particulares comparado con las otras especies de mamíferos domésticos, donde destaca el arresto meiótico prolongado del ovocito reanudando la meiosis posterior a la ovulación. El desarrollo del ovocito es regulado por señales entre el ovocito y las células foliculares que le rodean mediante conexones constituidos por conexinas, de ellas la Conexina 43 es la proteína con mayor expresión en el ovario. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica de Cx43 y de su proteína en células foliculares de perra durante el desarrollo folicular y a lo largo del ciclo estral. Usando un lupa estereoscópica se aislaron células de folículos preantrales y antrales de ovarios de perra en anestro, proestro, estro y diestro. Se utilizó q-PCR para la evaluación de los niveles de mARN y Western Blot e Inmunohistoquímica para la cuantificación y localización de la proteína respectivamente. Los valores de expresión génica y densidad óptica de las bandas de Western Blot se analizaron con ANOVA; además, se hicieron correlaciones de Pearson. La Cx43 se encontró en todos los folículos desde folículo primordial hasta preovulatorio, la expresión del gen de Cx43 y su proteína codificante varió a lo largo del ciclo estral, presentando los mayores niveles de mARN en anestro ($P < 0,05$) y los mayores niveles de Cx43 en diestro ($P < 0,05$), adicionalmente la expresión de mRNA y de Cx43 no disminuyeron en folículos preovulatorios, sugiriendo que la comunicación entre el ovocito y las células foliculares se mantienen, lo que podría explicar el arresto meiótico prolongado de la perra. La correlación entre mARN y proteína fue negativa en la mayoría de etapas del ciclo, lo que se podría asociar a los mecanismos de control traduccional a las que son sometidas las conexinas.

SUMMARY

Key Words: connexin 43, follicular cells, female dog, estral cycle.

The female canine has particular reproductive characteristics compared to the other species of domestic mammals, where it stands out the prolonged meiotic arrest of the oocyte that resumes meiosis after ovulation. Oocyte development is regulated by signals between the oocyte and follicular cells that surround it by connexons constituted of connexins, of these, Connexin 43 is the protein with the highest expression in the ovary. The objective of this work was to study the gene expression of Cx43 and its protein in dog follicular cells during follicular development and throughout the estrous cycle. Using a stereoscopic magnifying glass, cells were isolated from preantral and antral follicles of the ovaries of bitches in anestrus, proestrus, estrus and diestrus. q-PCR was used for the evaluation of mRNA levels and Western Blot and Immunohistochemistry for the quantification and localization of the protein respectively. The values of gene expression and optical density of the Western Blot bands were analyzed with ANOVA; in addition, Pearson correlations were made. The Cx43 was found in all the follicles from primordial to preovulatory, the expression of the Cx43 gene and its coding protein varied throughout the estrous cycle, presenting the highest levels of mRNA in anoestrus ($P < 0.05$) and the highest levels of Cx43 in diestrus ($P < 0.05$), additionally the expression of mRNA and Cx43 did not decrease in preovulatory follicles, suggesting that communication between the oocyte and follicular cells is maintained, which could explain the prolonged meiotic arrest of the dog. The correlation between mRNA and protein was negative in most stages of the cycle, which could be associated with the mechanisms of translational control to which connexins are subjected.

INTRODUCCIÓN

La investigación reproductiva en la perra se ha transformado en un foco de interés considerando las potenciales aplicaciones en el desarrollo biotecnológico que involucra comprender las características reproductivas de esta especie. No obstante, el avance en la investigación reproductiva de esta especie ha sido lento principalmente por la baja tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos (De los Reyes *et al.*, 2005; Songsasen *et al.*, 2012). Esto se ha asociado a particularidades reproductivas que la diferencian de otras hembras mamíferas y a la falta de conocimientos más profundos de estas diferencias.

Dentro de los aspectos reproductivos que difieren de otras especies mamíferas, está el inicio del desarrollo folicular y de la ovogénesis posterior al parto (Lunardon *et al.*, 2015). Los primeros folículos en desarrollo en el recién nacido se observan del día 17 al 54 después del parto y a partir de estos folículos se pueden diferenciar cinco etapas de desarrollo folicular, de acuerdo al tamaño del ovocito, cantidad de células del cúmulo, presencia y desarrollo del antro folicular y de la zona pelúcida (Songsasen y Wildt, 2007).

El desarrollo del ovocito y el crecimiento folicular es regulado por un mecanismo complejo de comunicación a través de señales celulares, que varía a lo largo de la foliculogénesis. La comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo, que conforman el Complejo Ovocito-Células del Cúmulo (COC), se produce mayoritariamente por canales proteicos llamados conexones o uniones gap, formados por proteínas integrales de membrana, denominadas conexinas (Russell *et al.*, 2016). Estas proteínas son reguladas probablemente por mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos, no bien entendidos en su totalidad (Fernández *et al.*, 2016; Ferré *et al.*, 2016). Estos mecanismos de comunicación, son indispensables para el desarrollo folicular y el arresto meiótico del ovocito, como también para la diferenciación y la función de las

células de la granulosa (Domínguez *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2016). Uno de los aspectos más significativos en la reproducción canina, es el arresto meiótico más prolongado que en otras hembras mamíferas (Songsasen y Wildt, 2007), donde la reanudación de la meiosis ocurre sólo después de la ovulación, describiéndose un período entre 48 hasta 72 horas aproximadamente posterior a la ovulación (Chastant-Maillard *et al.*, 2015).

La correcta función de los canales de comunicación ha demostrado tener un gran impacto en la capacidad mitótica en varios grupos celulares (Boassa *et al.*, 2010) y en la posibilidad del ovocito de ser fecundado (Kussano *et al.*, 2016). La Conexina 43 (Cx43) es la conexina de mayor expresión en el ovario de animales y humanos (Sela-Abramovich *et al.*, 2005; Gershon *et al.*, 2008). La Cx43 se ha identificado en la membrana de las células de la granulosa y del cúmulo, así como también entre las células del cúmulo y el ovocito en menor medida (Tielmann Cuoni, 2005; Gherson *et al.*, 2008) participando en el tránsito de nucleótidos cíclicos, cuya variación en cantidad regula el arresto meiótico del ovocito (Edry *et al.*, 2006).

El arresto meiótico es mantenido en las diferentes especies debido a los altos niveles de AMP cíclico, ya que la enzima fosfodiesterasa que degrada este nucleótido cíclico está inhibida por el GMP cíclico derivado de las células de la granulosa y del cúmulo (Zhang *et al.*, 2009). Luego del alza de la Hormona Luteinizante (LH), se estimula la activación de la proteína quinasa mitogénica activada (MAPK), la cual participa en la fosforilación de la Cx43 cerrando el flujo de nucleótidos cíclicos desde las células de la granulosa al ovocito, lo que lleva a que se corte el freno impuesto por el GMPc a la fosfodiesterasa y por tanto se degrade el AMPc en el ovocito induciendo con esto, el reinicio meiótico (Zhang *et al.*, 2009, 2010).

La perra sin embargo, no reanuda la meiosis luego del alza de LH (Concannon, 2011), por tanto, es posible que la Cx43 no sea rápidamente fosforilada como en otras especies, permaneciendo la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo y de la granulosa por más tiempo. Hay estudios que señalan que la expresión de Cx43 difiere a través del ciclo reproductivo en la perra mostrando una menor expresión durante el estro, aumentando durante el diestro y declinando en anestro (Willingham-Rocky *et al.*, 2007). Sin embargo, es posible que esta menor expresión no sea suficiente para impedir la mantención de la comunicación entre el ovocito y las células somáticas adyacentes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Características Reproductivas de la Perra

Las hembras caninas son monoéstricas no estacionales, politocas, de ovulación no inducida por el coito (Concannon, 2011). En esta especie, la fase luteal es similar al tiempo de duración de la gestación, seguido de un periodo de anestro obligatorio de aproximadamente de 3 a 5 meses (Concannon, 2009). Por tanto, el intervalo interestral es un periodo prolongado, de 5 a 12 meses (Root Kustritz, 2012), ocurriendo la ovulación de ovocitos inmaduros en un estado de vesícula germinal en etapa de primera profase meiótica, característico y peculiar en la reproducción canina (De los Reyes *et al.*, 2005, Reynaud *et al.*, 2009; De los Reyes *et al.*, 2013). Los ovocitos una vez ovulados, requieren de alrededor de 48-96 horas para alcanzar la maduración meiótica, la que ocurre en el oviducto (Reynaud *et al.*, 2009; De los Reyes, *et al.*, 2013). Estas características fisiológicas son específicas y peculiares de la reproducción canina.

La técnica de maduración *in vitro* de ovocitos en la perra ha sido implementada desde hace años, obteniéndose una baja tasa de ovocitos madurados en etapa de segunda metafase en comparación a lo obtenido con ovocitos de otras hembras mamíferas (Kim *et al.*, 2005, Evencen *et al.*, 2011; De los Reyes *et al.*, 2013). Esto se atribuye a las características reproductivas particulares que presenta la especie en comparación a las demás especies animales domésticas (Songsasen y Wildt, 2007). A pesar de conocerse el estímulo hormonal que desencadena la ovulación en la perra, poco se conoce sobre los eventos que conllevan al desarrollo folicular durante el anestro y proestro, ya que la información disponible sobre la foliculogénesis en la perra se considera escasa (Songsasen y Wildt, 2007; Terazono *et al.*, 2012).

2. Gap Junction

En la actualidad existen estudios enfocados en la intercomunicación del ovocito con las células de la granulosa y del cúmulo, comprobando la importancia en el desarrollo folicular y la competencia ovocítica (Gherson *et al.*, 2008; Durllej *et al.*, 2011, Botigelli *et al.*, 2017).

La maduración ovocitaria y el crecimiento folicular están regidos por un complejo mecanismo de comunicación a través de señales celulares, que varía a lo largo de la foliculogénesis (Kussano *et al.*, 2016). La comunicación entre el ovocito, células del cúmulo y células de la granulosa parietal y techal, se produce mayoritariamente a través de “uniones gap”, o uniones comunicantes, constituidos por canales proteicos llamados conexones, formados por proteínas integrales de membrana denominadas conexinas (Russell *et al.*, 2016) y probablemente controlados por mecanismos autocrinos y paracrinos no entendidos en su totalidad (Fernandez *et al.*, 2016). El flujo bidireccional de moléculas como nucleótidos cíclicos, iones, nutrientes, Micro RNA (miRNA) y pequeñas moléculas reguladoras es indispensable para el desarrollo y función de ambos grupos celulares (Russell *et al.*, 2016). El ovocito es dependiente de los nutrientes y metabolitos proporcionados principalmente por las células de la granulosa, ya que el gameto presenta una baja capacidad de síntesis de aminoácidos colesterol y glucosa en las etapas finales de la maduración (Xu *et al.*, 2014).

El flujo bidireccional de señales celulares influye de forma particular en cada fase del desarrollo folicular; existiendo similitudes y diferencias entre las especies de mamíferos (Eppig, 2001; Domínguez *et al.*, 2016; Ortiz-Escribano *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2016). Se propone que las diferencias entre especies radicarían en las funciones de los factores de secreción del ovocito, células foliculares y del cúmulo (Ferré *et al.*, 2016). Además la variabilidad de conexones y el tipo de conexinas que los conforman (Domínguez *et al.*, 2016),

así serían responsables de este proceso como también de la diversidad de nucleótidos cíclicos y otras moléculas que transportan (Russell *et al.*, 2016).

3. Conexina 43 (Cx43)

La conexina 43 es la más estudiada y expresada en tejidos sanos y patológicos en humanos y animales como ratones, perros y ovinos (Grek *et al.*, 2016). Ésta es una fosfoproteína con un peso molecular de ~43 KDa, su estructura mantiene una similitud con la estructura general de las conexinas (Song *et al.*, 2016). Posee 12 sitios de fosforilación en serina y tirosina en el dominio carboxi terminal y tiene una vida media de 2 horas (Laird, 2005, Boassa *et al.*, 2010 Schulz *et al.*, 2015). Se ha identificado en tejidos como corazón, ovarios, venas pulmonares, neuronas, barrera hematoencefálica, glándula mamaria, testículos y linfocitos (Verheule *et al.*, 2002; Matsuuchi y Naus, 2013, Pecorara *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2015; Grek *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016).

La disposición de Cx43 en las diversas células humanas y animales se encuentra en estudio, pero se conoce que el estado de fosforilación participa en la regulación de su distribución y permeabilidad (Schulz *et al.*, 2015), al igual que cambios en su oligomerización hacia conexones y des ensamblaje proteico (Boassa *et al.*, 2010). Una característica relevante de la Cx43 son los cambios de distribución y expresión que sufre en condiciones apoptóticas, hiperproliferativas y cuadros inflamatorios crónicos (Lutz *et al.*, 2009; Oik *et al.*, 2009; Grek *et al.*, 2016).

En folículos ováricos se han identificado varias conexinas, como Cx 26, Cx 32, Cx37 y Cx 43 en diferentes especies animales como en el ratón, rata, ovino, bovino y porcino (Gershon *et al.*, 2008). Siendo la Cx43 y la Conexina 37 (Cx37) aquellas con mayor expresión en la mayoría de especies estudiadas (Sela-Abramovich *et al.*, 2005; Gershon *et al.*, 2008). La Cx43 ha sido

identificada en todos los estadios del desarrollo folicular en ovarios de ratones (Teilmann Cuoni, 2005), siendo su principal función, tras la oligomerización, conformar los canales de comunicación entre el ovocito, las células del cúmulo y de la granulosa (Teilmann Cuoni, 2005; Iris *et al.*, 2006; Willingham-Rocky *et al.*, 2007; Durlej *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la integridad y correcta función de los canales de comunicación tienen un gran impacto en la capacidad del ovocito de ser fecundado (Kussano *et al.*, 2016). Esto debido a que el mecanismo de comunicación intercelular juega un rol crítico en el arresto meiótico del ovocito. Las uniones comunicantes, constituidas principalmente por Cx43, participan en el arresto meiótico al permitir el tránsito de nucleótidos cíclicos como cAMP y cGMP producidos por las células del cúmulo y de la granulosa, entre estas células y hacia el ovocito (Iris *et al.*, 2006, Ferré *et al.*, 2016, Russell *et al.*, 2016). De esta forma mantienen una concentración de nucleótidos suficiente para activar a PKA (Proteína Quinasa A) la cual inhibe al factor promotor de la maduración (MPF), y a la Fosfodiesterasa 3, responsable de la degradación del cAMP manteniendo así el arresto meiótico (Zhang *et al.*, 2010).

El folículo ovárico de la hembra canina sufre un proceso de luteinización previa a la ovulación, si bien la hormona Luteinizante (LH) induce la ovulación, el incremento de esta hormona no desencadena el reinicio meiótico como se produce en otros mamíferos, desconociéndose los mecanismos que retrasan el desarrollo meiótico (Gherson *et al.*, 2008; Reynaud *et al.*, 2009; Chastant-Meillard *et al.*, 2011). A partir de esta característica reproductiva de la perra, es posible pensar que la Cx43 podría tener un comportamiento particular en el folículo canino. El estudio de la expresión tanto del gen como de la proteína Cx43 en las células foliculares durante el crecimiento folicular y ovulación,

otorgará información respecto al desarrollo del ovocito y el arresto meiótico en caninos.

HIPÓTESIS

La expresión de Cx43, tanto a nivel de mRNA como de su proteína, en las células foliculares aumentará durante el desarrollo folicular, no encontrándose una disminución significativa en folículos preovulatorios como ocurre en otras especies, lo que podría explicar en parte el retraso en el reinicio meiótico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de Cx43 durante el desarrollo folicular a lo largo del ciclo estral hasta previo a la ovulación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el nivel de expresión del gen y de la proteína Cx43 en las células foliculares ováricas en diferentes estados del desarrollo folicular en la hembra canina.
2. Identificar las posibles diferencias en la expresión de Cx43 a través del ciclo estral de la hembra canina en células foliculares ováricas.
3. Determinar la relación entre la expresión del gen y la presencia de la proteína Cx43 y el estado de desarrollo folicular en células foliculares en la hembra canina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile (FAVET), bajo las normas establecidas por el Comité de Bioética de FAVET y por el Comité de Bioética de la Comisión Nacional Chilena para la Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).

1. Procesamiento de Ovarios

Se utilizaron aproximadamente 120 ovarios de perras, recolectados de hembras no gestantes sometidas a ovariectomías de rutina en el Centro de Atención Primaria de Mascotas Santo Tomás y en el Centro de Atención Primaria para Mascotas Pablo de Rokha, en la comuna de La Pintana de Santiago. Las hembras escogidas para el estudio fueron de diferentes razas o mestizas de uno a seis años clínicamente sanas. Luego de la cirugía los ovarios se colocaron en una solución de transporte 0.9% NaCl más 100 UI/mL de penicilina G procaínica y 50 µg/mL de estreptomina, pH 7,4 y a 4°C de temperatura y para ser transportados al laboratorio de reproducción animal.

Se utilizaron ovarios sin signos de degeneración ni patologías visibles macroscópicamente. La etapa del ciclo estral de cada donante se determinó mediante el análisis de las estructuras ováricas de acuerdo a lo determinado previamente (Palomino y De Los Reyes, 2016), evaluando la presencia o ausencia del cuerpo lúteo y/o de folículos en crecimiento, adicionalmente, se midieron los niveles de progesterona plasmática para complementar la evaluación del estado reproductivo (etapa del ciclo estral) de cada perra. La sangre (3 mL) de cada perra se obtuvo mediante venopunción cefálica durante la cirugía, bajo anestesia general.

En el laboratorio, la sangre de cada animal se centrifugó (Centrifuge 5415 D Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 3000 rpm por seis minutos

almacenando el plasma a -20° C hasta su análisis. La concentración plasmática de progesterona se determinó mediante Ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA) utilizando el equipo mini VIDAS Compact multiparametric immunoanalyzer (REF 410416, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y utilizando el kit MINI VIDAS Progesterone Kit (REF 30409, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Aislamiento de las Células Foliculares

Ovarios enteros sin signos de degeneración, se cortaron y fueron fijados e incluidos en parafina para su procesamiento para el estudio de inmunohistoquímica. Otros ovarios se depositaron en una placa petri de vidrio (5058541, Normax, Vimaroni, Santiago, Chile) y se lavaron en una solución buffer fosfato salino PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO 1mM, KH₂PO₄, pH 7,4), y se utilizaron para los estudios de PCR y Western Blot mediante el aislamiento de células foliculares. Se realizaron cortes finos en la corteza de los ovarios utilizando una hoja de bisturí N° 21, bajo una lupa estereoscópica (Lieder mz-730-j6 American Scientific, Portland, OR, Estados Unidos). Con la ayuda de una gráticula en el lente de la lupa, los folículos se clasificaron en preantral (rodeado de células de la granulosa y ausencia de antro), antral pequeño (0.2 mm – 0.39 mm), antral mediano (0.4 mm – 5.9 mm) y antral grande (6 mm- 10 mm) (Palomino y De los Reyes, 2016).

La obtención de las células foliculares se realizó mediante el aislamiento cuidadoso de cada folículo, utilizando una jeringa de tuberculina de 29 gauge (Nipro Corporation, Miami, FL, Estados Unidos) de 1 mL, bajo una lupa estereoscópica (Lieder mz-730-j6 American Scientific, Portland, OR, Estados Unidos) para luego trasladar las células con una pipeta Pasteur de punta fina a una solución buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente, la suspensión de células en PBS fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos (Centrifuge 5415 D,

Eppendorf, Hamburg, Alemania). El pellet se resuspendió en una solución de RNALater (Ambion Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos) o en PBS, dependiendo el análisis de expresión génica o proteica respectivamente. en ambos casos, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento (De los Reyes *et al.*, 2017).

TABLA 1. Número de folículos ováricos utilizados para extracción de RNA según variables de clasificación.

Ciclo Estral	Desarrollo Folicular				Total
	PA	AP	AM	AG	
Anestro	199	190	178	-	567
Proestro	173	272	175	-	620
Estro	140	141	134	22	415
Diestro	180	159	152	-	491
Total	692	762	639	22	2115

PA: Pre Antral. AP: Antrales Pequeños. AM: Antrales Medianos. AG: Antrales Grandes.

3. Expresión Génica

3.1. Extracción de RNA y Retro Transcripción (RT):

A partir de las células foliculares aisladas y congeladas a -20°C se extrajo el RNA utilizando una columna de afinidad del Kit de Purificación Kit GeneJET RNA Purification (Fermentas LifeSciences, Budapest, Hungría) siguiendo las instrucciones del fabricante, bajo una campana de flujo laminar y en condiciones ausentes de RNAsas. El RNA extraído se cuantificó mediante fluorimetría a través del aparato Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) mediante el Kit Qubit RNA Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría). Las muestras de RNA fueron posteriormente preservadas a -80°C hasta la obtención de DNA complementario (cDNA).

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

3.2. Diseño de Partidores

Los partidores para Cx43 se diseñaron utilizando la secuencia publicada en GenBank, a través del programa PRIMER 3PLUS y sintetizados por Biosearch Technologies (Novato, CA, Estados Unidos), se probaron cinco juegos de partidores, de los cuales se seleccionó el juego de partidores que obtuvo el menor valor de Ct (ciclos detección de amplificación) y la eficiencia más cercana al 100% para los experimentos en las muestras. La selección del partidor se realizó usando cDNA extraído de un pool de tejido ovárico de las donantes en las distintas etapas del ciclo estral, siguiendo el mismo diseño experimental descrito anteriormente para las muestras.

Paralelamente, las condiciones del q-PCR se optimizaron en función de la concentración óptima de los partidores y su eficiencia mediante curva de calibrado. Como genes de referencia se utilizaron β -actina (ACTB) e Histona (H2A), con partidores ya diseñados y estandarizados para células foliculares caninas (Palomino y De los Reyes, 2016).

3.3. PCR en Tiempo Real (qPCR):

La evaluación de la expresión génica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las amplificaciones de los genes se realizaron por q-PCR, utilizando un termociclador Illumina Eco Real Time PCR System Model EC-100-1001 (San Diego, CA, Estados Unidos) del laboratorio, con el kit Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), respetando las cantidades por reacción indicadas por el fabricante. Donde 12,5 μ L de reacción estuvo compuesta por: 6,25 μ L de Máxima SYBR Green/ Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), 0,2 - 0,6 mM del partidor seleccionado, 10 ng de cDNA y el volumen diferencial fue (1 a 8 μ L) completado con agua libre de nucleasas. Se utilizaron placas (Ecoplate48, Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido) de 48 pocillos, a razón de 1 placa para las muestras de cada etapa del ciclo estral. Muestras de control sin el templado de cDNA y sin partidores respectivamente se incluyeron en cada placa como control negativo. Las placas fueron selladas con un película adhesiva óptica (Proseal48, Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido) y se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: etapa inicial de desnaturalización del cDNA durante 15 minutos a 95 °C, posteriormente se realizaron 40 ciclos de amplificación: desnaturalización por 15 segundos a 95 °C, hibridación por 30 segundos a 55 °C y extensión por 30 segundos a 72 °C.

Cada réplica experimental de qPCR se repitió al menos tres veces en réplicas técnicas para garantizar los resultados obtenidos; donde se evaluaron células foliculares provenientes de cada tipo folicular.

3.4. Cuantificación Relativa

Los niveles de expresión génica se registraron como valores Ct, que representan al número de ciclos de detección de amplificación, por fluorometría,

sobre un valor umbral. Los valores Cts promedios pertenecientes a cada réplica biológica se calcularon y transformaron en valores relativos llamados *Quantity* (Q) a través del Método $\Delta\Delta C_t$ (Ramani *et al.*, 2016). La cuantificación relativa en la expresión de Cx43, para cada estado del ciclo y tamaño folicular, se estimó con el cociente entre el valor de Q y un factor de normalización (NF), que fue calculado en base a la media genómica de los valores de Q de los genes de referencia.

TABLA 2: Secuencia de partidores utilizada en análisis de PCR.

Partidor	Secuencia
Cx43	5'- AGGAGCTCAAAGTTGCCCAA - 3' (Forward)
	5'- CATTTCACCTTGCCGTGCT - 3' (Reverse)
ACTB	5'- ATTGTCATGGACTCTGGGGATG -3' (Forward)
	5'- TCCTTGATGTACGCACGAT - 3' (Reverse)
H2A	5'- GACGGCTTCACAGTCCTCTC - 3' (Forward)
	5'- TCTTCTCGAGCGTGTTTCCT - 3' (Reverse)

4. Expresión Proteica

4.1. Inmunohistoquímica

Los ovarios enteros sin alteraciones macroscópicas se incluyeron en una solución Bouin (Ácido pícrico 71,42%, formalina concentrada 23,81%, ácido acético glacial 4,77%), por 24 horas luego fueron deshidratados en una batería de alcoholes, mediante la inmersión del tejido en concentraciones crecientes de etanol por 1 hora respectivamente. brevemente, 30 min en etanol 70%, 60 minutos etanol 70%, 60 minutos en etanol 70%, 60 minutos en etanol 80%, 60

minutos etanol 90%, 60 minutos etanol 100%, 12 h en etanol 100%, 60 minutos Histoclear 1 (HS-200, National Diagnostics, Atlanta, GA, Estados Unidos) y 60 minutos en Histoclear 2 (HS-200, National Diagnostics, Atlanta, GA, Estados Unidos). Posteriormente los tejidos se cortaron y se incluyeron en bloques de parafina.

Se realizaron cortes de 5 μ m, del tejido ovárico incluidos en parafina para lo que se utilizó un Micrótopo (RM2245, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania), las muestras se colocaron posteriormente en un portaobjetos xilenizado. Para ser hidratados siguiendo el protocolo inverso al de deshidratación, con diferencia en el tiempo de inclusión: 5 minutos respectivamente. Histoclear 1, 5 minutos Histoclear 2, 5 minutos etanol 100%, 3 minutos etanol 100%, 3 minutos etanol 90%, 3 minutos etanol 80%, 3 minutos etanol 70%. Las muestras fueron sumergidas PBS con Citrato de Sodio (0,1 M, 6,0 pH) en un vaso de precipitación, para llevarlo a punto de ebullición utilizando una platina térmica, en este punto se dejó reposar las muestras por 20 minutos para luego reemplazar la solución de PBS con Citrato por una solución similar fría. Tras el secado los cortes fueron delimitados utilizando un plumón hidrofóbico (Liquid Blocker Super Pap Pen, Tokio, Japón). Se procedió a bloquear las uniones inespecíficas utilizando 3% de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (A2152-10 G Sigma, St., Louis, MO, USA) y 1,5% de Glicina (BM-0820-1Kg, Winkler, USA) en PBS por 60 minutos. Posteriormente los portaobjetos fueron secados, e incubados con el anticuerpo primario depositando una solución de PBS y BSA 3% (A2152-10 G Sigma, St., Louis, MO, Estados Unidos) con una concentración 1:100 del anticuerpo Connexin 43 Antibody F-7 (sc-271837, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) sobre cada corte y se incubó a 4°C por toda la noche en una cámara húmeda.

Terminado el periodo de incubación los cortes fueron lavados en PBS con Tween 20 0,1% (P9416-50ML Sigma, St., Louis, MO, Estados Unidos). Las muestras se incubaron con el Anticuerpo Secundario conjugado con fosfatasa alcalina Goat Anti-Mouse IgG-AP (sc-2047, Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, Estados Unidos) por 60 minutos a 25°C en una dilución de 1:100 de PBS y BSA al 3% (A2152-10 G Sigma, St., Louis, MO, Estados Unidos). Posteriormente fueron lavadas con PBS con Tween 20 0,1%,(P9416-50ML Sigma, St., Louis, MO, Estados Unidos), para ser revelados utilizando el kit de substrato de peroxidasa ImmPACT NovaRED (SK-4805, Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante, previo a su deshidratación y montaje fueron contra teñidos utilizando hematoxilina (Hematoxylin QS, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante. Los cortes fueron deshidratados depositándolos por 15 segundos en Etanol 90%, 15 segundos en etanol 100% y 2 minutos en xilol (Xilol P.A, Prodelab, Concepción, Chile) para luego ser montados utilizando medio de montaje (Entellan, Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas montadas fueron evaluadas utilizando un microscopio de luz invertida Olympus IX71 (Shinjuku, Tokio, Japón) incorporado con la cámara ProgRes C3 (Jenoptik, Jena, Turingia, Alemania). Se evaluaron placas para cada etapa del ciclo estral, cada placa incluyó un corte como control negativo sin el anticuerpo primario.

4.2. Western Blot

Las células foliculares aisladas y congeladas a -20° C en tubos Eppendorf (1,5 mL) con 0,5 mL de buffer fosfato salino (PBS) fueron utilizadas para el análisis de la expresión proteica mediante Western Blot.

4.2.1. Extracción de Proteínas

A partir de las células foliculares en PBS, mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se realizó una extracción de proteínas totales adicionando buffer de lisis (Tris 20 mM, HCl (pH 7), NaCl 150 mM, Na_2EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 100x 1% (T8787, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos) suplementado con cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa (ThermoFisher Scientific, Budapest, Hungría). La concentración proteica se determinó mediante fluorimetría usando el aparato Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Budapest, Hungría) a través del kit de cuantificación Qubit Protein Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría).

4.2.2. Electroforesis

Se utilizó la cámara electroforética Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, Estados Unidos) en la que se colocaron Geles de SDS-Poliacrilamida 12% (ExpressPlus PAGE Gels, GeneScrip, Piscataway, NJ, Estados Unidos). Se utilizó el primer pocillo para correr un estándar de peso molecular (M00443 GeneScrip Piscataway, NJ, Estados Unidos), mientras que en los demás carriles se depositaron 50 μg de las muestras ordenadas según tamaño folicular y etapa del ciclo estral.

Se transfirió el corrido electroforético a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore Corporation, Billerica MA, Estados Unidos) utilizando la unidad de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System (170-4155, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos), y el pack de transferencia Mini PVDF Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CL, Estados Unidos) a 1.3A por siete minutos utilizando un protocolo prediseñado por el equipo. Posteriormente, se realizó un bloqueo de la membrana de transferencia utilizando leche descremada al 5% en TBST (Tris 35 mM, NaCl 137 mM, KCl

2,7 mM, Tween 20 0,1% en agua destilada a pH 8,0), para inhibir uniones inespecíficas.

Se incubó en la membrana el anticuerpo primario monoclonal anti conexina 43 de secuencia humana desarrollado en ratón Connexin 43 Antibody F-7 (sc-271837, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) en dilución 1:500, durante toda una noche a 4 °C en una cámara húmeda utilizando el equipo Mini Rocker MR-1 (BioSan, Warren, MI, Estados Unidos) y con agitación constante de 15 oscilaciones por minuto. Se realizaron tres lavados con TBST a la membrana para proceder a la incubación con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse IgG (GR 2220 15-22, Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos) conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:500. Finalmente las muestras se lavaron 3 veces con TBST antes del revelado, las bandas de la proteína se visualizaron con sustrato NBT/BCIP 50x (Sc-24981, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos) y Solución de Tinción (Tris 10 mM, NaCl 10 mM y MgCl₂ 0,025 mM, en 100 mL de Agua Destilada, a pH 9,5).

4.2.3. Intensidad de Bandas

La intensidad de las bandas se evaluó utilizando el programa BIOTOP Gel Imaging System (Bio-Tech Co., Ltd, Shangai, China), de acuerdo a lo señalado en De los Reyes *et al.*, (2017). Se obtuvo un valor de integridad óptica (IOD) al cuantificar la cantidad de pixeles en un área delimitada y similar en cada banda.

5. Análisis Estadístico

Se efectuaron al menos tres réplicas para el q-PCR, cada una correspondiente a un *pool* de células foliculares provenientes de 60 folículos de

distintas perras para cada etapa del ciclo y tamaño folicular. Los datos de la expresión génica por q-PCR y los de expresión proteica por Western Blot fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, analizando la expresión proteica y la expresión relativa como variables dependientes y la etapa del ciclo (anestro, proestro, estro, diestro) y los tamaños foliculares (preantral, antral pequeño, antral mediano y antral grande) como variables independientes, posteriormente se realizó como prueba a posteriori la Prueba de Duncan's, para determinar diferencias significativas en la expresión génica y/o proteica entre las etapas del ciclo y los tamaños foliculares. Todos los análisis estadísticos se hicieron en el Software InfoStat (InfoStat Professional Program, Version 2015).

Se realizó conjuntamente una Prueba de Correlación de Pearson para relacionar la expresión génica relativa de Cx43 (q-PCR) y los valores de la proteína codificante obtenidos como intensidad de banda (Western Blot) según tamaño folicular y etapa del ciclo estral. En todos los análisis se tomó como valor de significancia $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Expresión del gen de Cx43.

El RNA necesario para la evaluación génica de Cx43 se obtuvo desde de 2115 folículos clasificados según el desarrollo folicular en folículos preantrales, antrales pequeños, antrales medianos y antrales grandes en las diferentes etapas del ciclo estral (Anestro, Proestro, Estro y Diestro) mostrado en la Tabla 1, los que provinieron de 62 perras donantes.

Para el q-PCR se realizaron tres réplicas experimentales, cada una con un proceso de extracción de RNA independiente. La expresión del mRNA de la Cx43 fue detectada durante las cuatro etapas del ciclo estral de la perra y en todos los tamaños foliculares estudiados.

Los resultados de la expresión relativa del gen de Cx43 para cada etapa del ciclo estral se muestran en la Figura 1 (A,B,C y D). Al analizar la expresión relativa del gen que codifica para Cx43, de acuerdo al desarrollo folicular en cada etapa del ciclo estral, los folículos antrales medianos tuvieron una mayor expresión relativa ($P < 0,05$) comparado con los folículos pre antrales, antral pequeño y antral grande, los cuales no mostraron diferencias entre ellos.

La expresión relativa para el gen de Cx43 de acuerdo a la etapa del ciclo muestra que en Anestro (Fig 1 A) se presentó una mayor expresión ($P < 0,05$) comparado con las otras etapas que no mostraron diferencias entre sí. Las células foliculares provenientes de diferentes tamaños foliculares (Fig 1) evidenciaron que aquellas de los folículos preantrales de estro (Fig 1 C) presentaron una menor expresión ($P < 0,05$) del gen para Cx43 comparadas con las de los tamaños foliculares pequeño, mediano y grande. En cambio, las células de folículos medianos de diestro (Fig 1 D) presentaron una mayor ($P < 0,05$) expresión del gen al compararlos con los tamaños preantral y pequeño.

En la etapa de proestro no existieron variaciones significativas en la expresión de Cx43 entre las células de distintos tamaños foliculares (Fig 1 B).

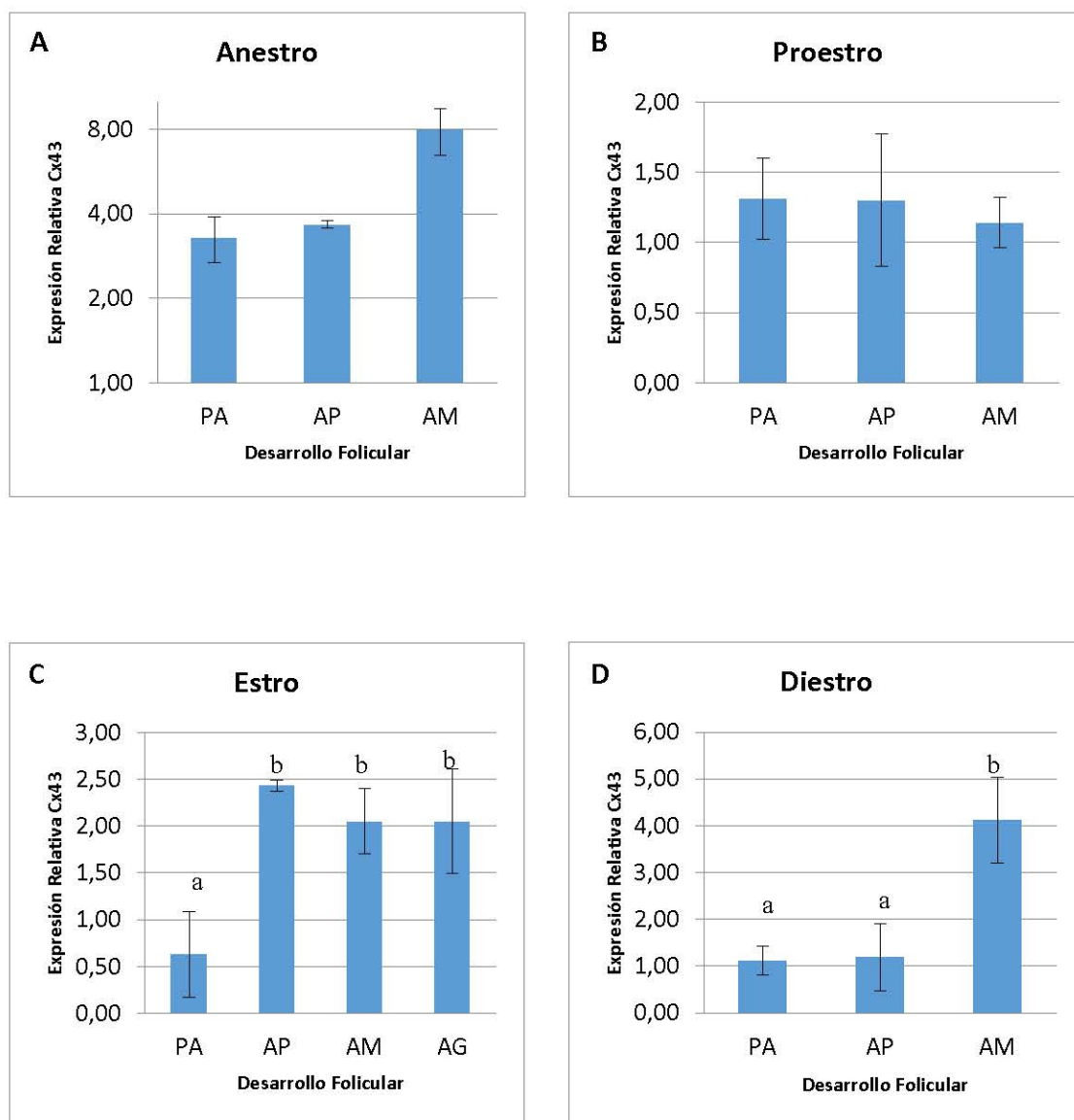
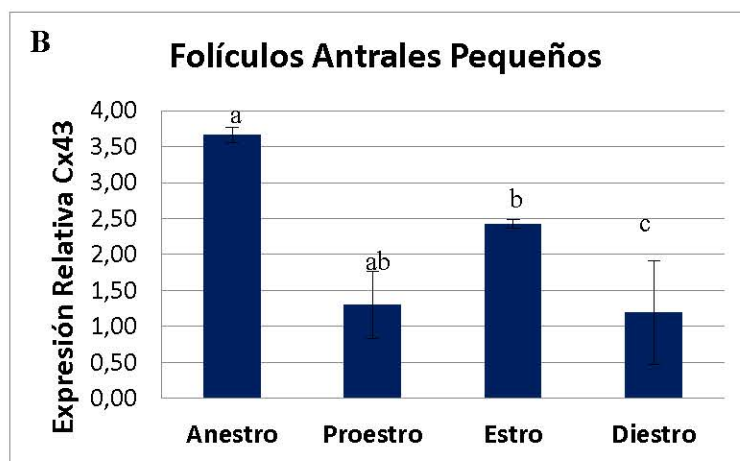
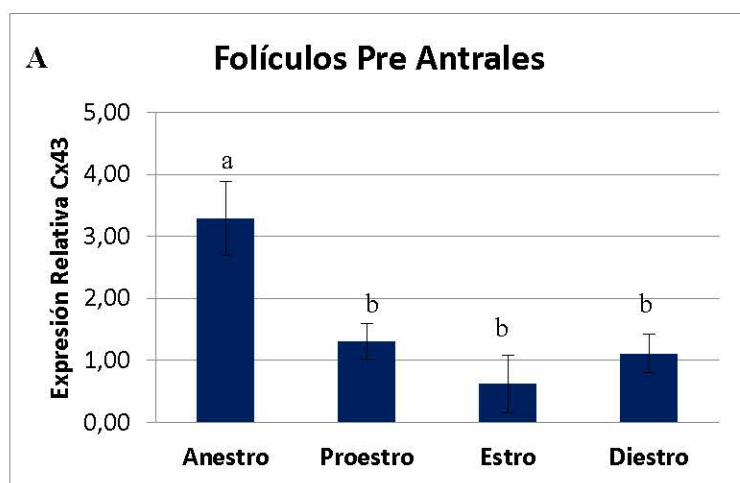


FIGURA 1. Niveles de mRNA de Cx43 durante el desarrollo folicular en cada etapa del ciclo estral. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tamaño folicular de cada etapa. A: Anestro, B: Proestro, C: Estro, D: Diestro. PA: Pre Antral. AP: Antral Pequeño. AM: Antral Mediano. AG: Antral Grande.

En la Figura 2 (A,B,C) se muestran los resultados de expresión relativa del gen de Cx43 al comparar los tamaños foliculares entre las etapas del ciclo estral. Se observó que los folículos preantrales de anestro presentaron una mayor expresión relativa ($P < 0,05$) con relación a los folículos preantrales de proestro, estro y diestro (Fig 2 A). De manera similar los folículos pequeños de la etapa de anestro presentaron una mayor expresión relativa ($P < 0,05$) al compararlos con los de proestro, estro y diestro (Fig 2 B). Los folículos medianos de la etapa de anestro presentaron una mayor expresión ($P < 0,05$) al compararlos con los folículos de estro y proestro pero una similitud con los folículos de diestro, los mismos que, no fueron estadísticamente diferentes a los folículos de estro y proestro (Fig 2 C).



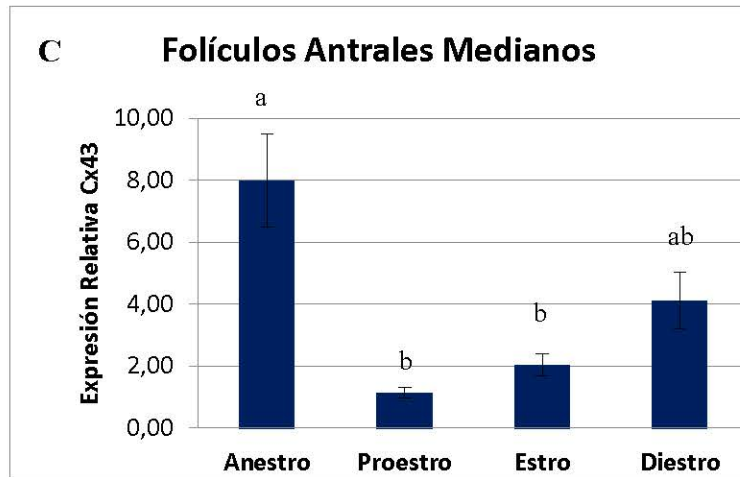


FIGURA 2. Expresión relativa (mRNA) de Cx43 entre folículos de similar etapa del desarrollo (tamaño) provenientes de distintas etapas del ciclo estral. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). A: Preantral, B: Antral Pequeño, C: Antral Mediano.

Localización de Cx43 por Inmunohistoquímica

La inmunoreacción del sustrato fue detectada en cortes de ovarios provenientes de diferentes etapas del ciclo estral y en todos los tamaños foliculares (Fig 3 – Fig 7). El marcaje que corresponde a la Cx43 se observó principalmente en células de la granulosa y teca y en la zona de contacto entre las células del cúmulo y de la granulosa. No se observó en el ovocito.

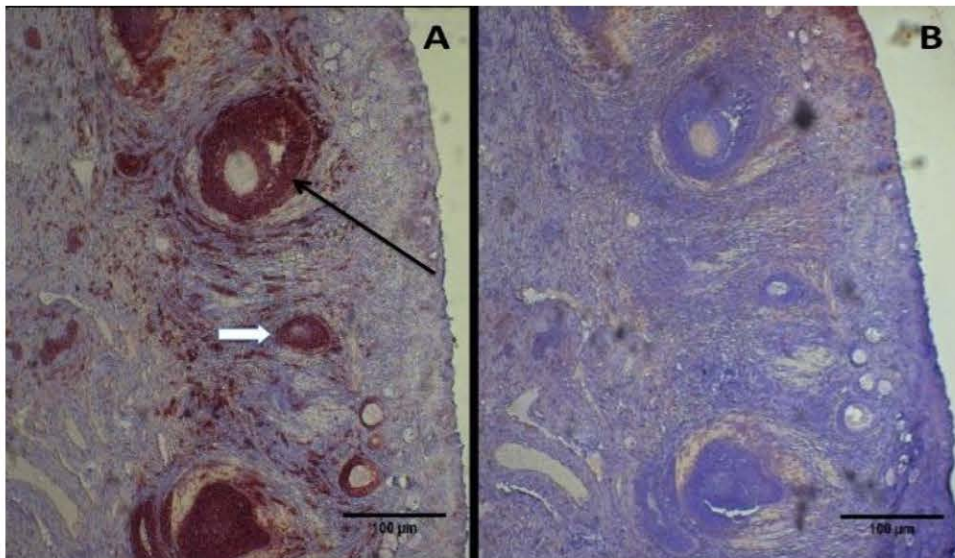


FIGURA 3. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en anestro (A), fotografía del control negativo del mismo corte histológico (B). Folículo antral pequeño con marcaje de color vino indicando la distribución de Cx43 en las células de la granulosa (Flecha negra). Folículo preantral con marca en células de la granulosa bilaminar (Flecha blanca).



FIGURA 4. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en proestro (C), fotografía del control negativo del mismo corte histológico (D). Folículo antral pequeño

con marcaje de color vino indicando la distribución de Cx43 en las células de la granulosa y la teca parietal (Flecha negra). Marcaje para Cx43 entre células del cúmulo y de la granulosa (Flecha blanca).

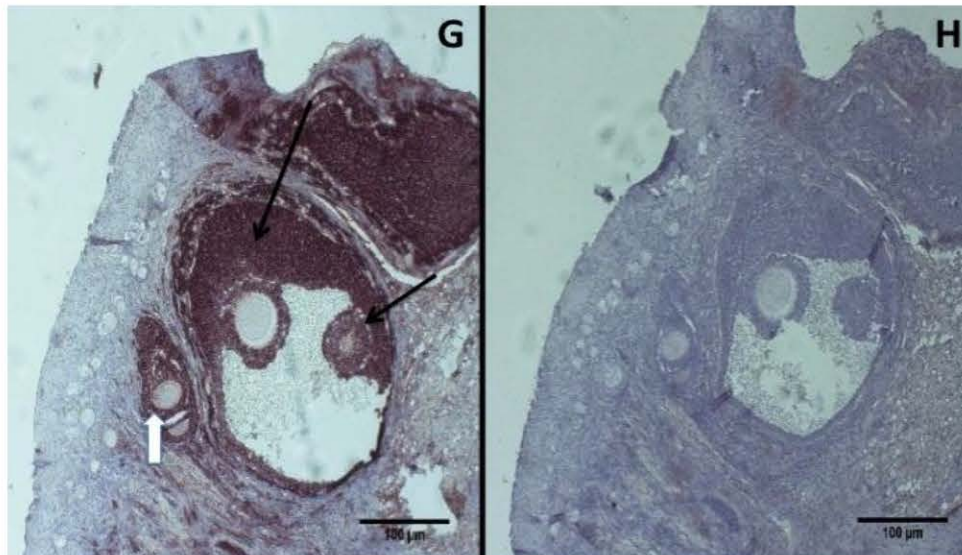


FIGURA 5. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en anestro (G), fotografía del control negativo del mismo corte histológico (H). Folículo antral pequeño poliovocitoco con marcaje de color vino indicando la distribución de Cx43 en las células de la granulosa y entre las células del cúmulo y de la granulosa de ambos Complejo Ovocito – Células del Cúmulo (Flecha negra). Folículo preantral con marcaje para Cx43 en las células de la granulosa unilaminar (Flecha blanca).

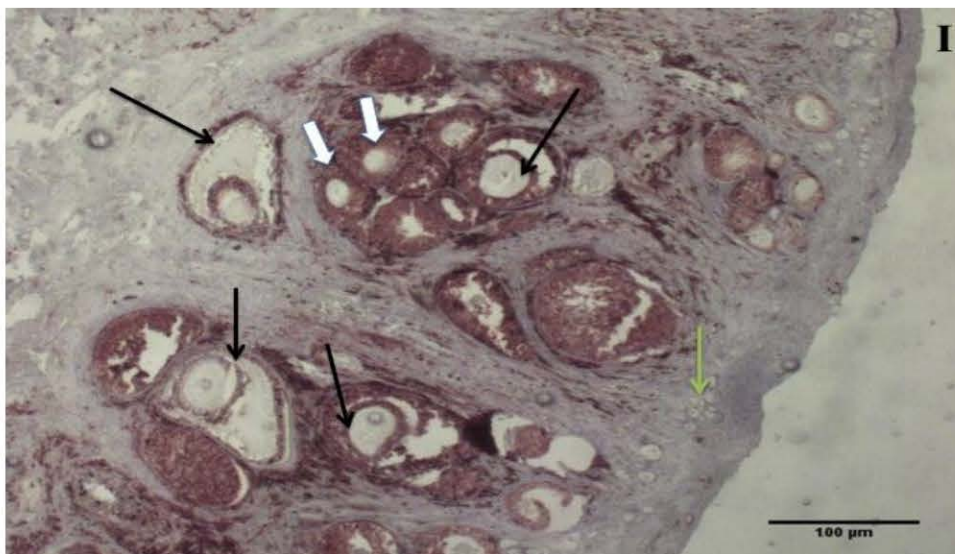


FIGURA 6. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en proestro (I). Se observan folículos antrales pequeños (Flechas negras), folículos preantrales primarios (Flechas blancas) y folículos primordiales (Flecha verde). Tanto en folículos preantrales y pequeños se observa el marcaje color vino para Cx43 en células de la granulosa.

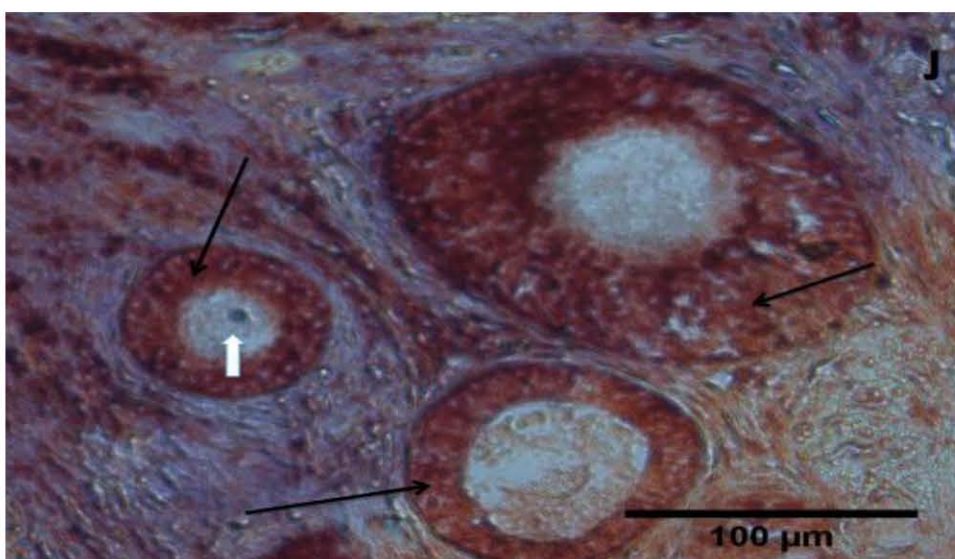


FIGURA 7. Análisis inmunohistoquímico en ovario de perra en diestro (J). Marcaje de Cx43 en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños.

Folículos antrales pequeños (Flechas negras). Ovocito sin marcaje de Cx43 (Flecha Blanca).

Evaluación de Cx43 por Western Blot

La extracción de proteínas necesarias para los experimentos de Western Blot, se realizó utilizando 30 perras donantes, a partir de las que se evaluaron las células foliculares de 1547 folículos ováricos, clasificados según desarrollo folicular y estado del ciclo. (Tabla 3).

TABLA 3. Número de folículos ováricos utilizados en la extracción de proteínas, según las distintas categorías de clasificación.

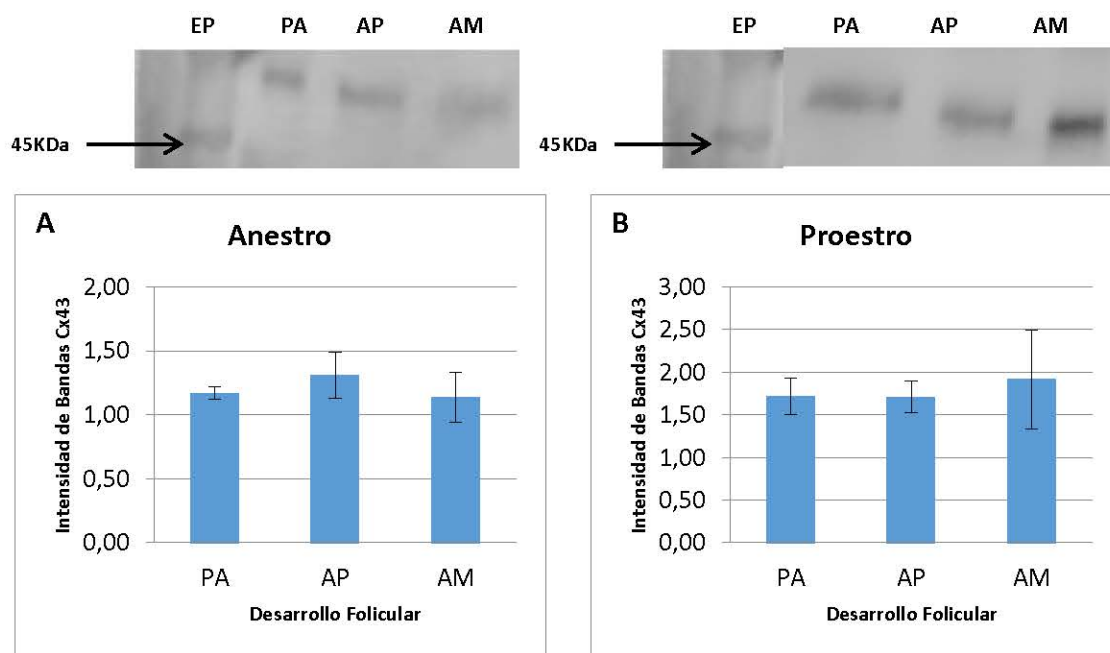
	Desarrollo Folicular				Total
	PA	AP	AM	AG	
Ciclo Estral	<i>qPCR- WB</i>	<i>qPCR- WB</i>	<i>qPCR- WB</i>	<i>qPCR- WB</i>	<i>qPCR- WB</i>
Anestro	199 - 180	190 - 157	178 - 104	-	567 - 441
Proestro	173 - 160	272 - 175	175 - 136	-	620 - 471
Estro	140 - 80	141 - 58	134 - 39	22-12	415 - 189
Diestro	180 - 200	159 - 136	152 - 110	-	491 - 446
Total	692 - 620	762 - 526	639 - 389	22 - 12	2115 - 1547

PA: Pre Antral. AP: Antrales Pequeños. AM: Antrales Medianos. AG: Antrales Grandes.

Se realizaron dos réplicas para cada etapa del ciclo y tamaño folicular. Al analizar las muestras se detectó la presencia de una banda de 43KDa, banda que correspondería a la Conexina 43. Las bandas se presentaron en todas las etapas del ciclo estral y a lo largo de todo el desarrollo folicular con diferente intensidad de tinción (Fig 8).

En anestro la intensidad de las bandas fue similar en los tres tamaños foliculares (Fig 8 A). En la etapa de estro se presentó una mayor intensidad de banda ($P < 0,05$) en folículos preantrales comparado con los folículos pequeños

y una intensidad de banda mayor en folículos medianos y grandes comparados con los folículos pequeños, pero que no fueron diferentes entre ellos (Fig 8 C). En las etapas de proestro y diestro (Fig 8 B, D), la intensidad de bandas fue incrementando conjuntamente con el desarrollo folicular. En el diestro los folículos medianos presentaron mayor expresión proteica ($P < 0,05$) de Cx43 al compararlos con los folículos preantrales pero fueron similares a los folículos pequeños, los cuales fueron estadísticamente similares a los preantrales.



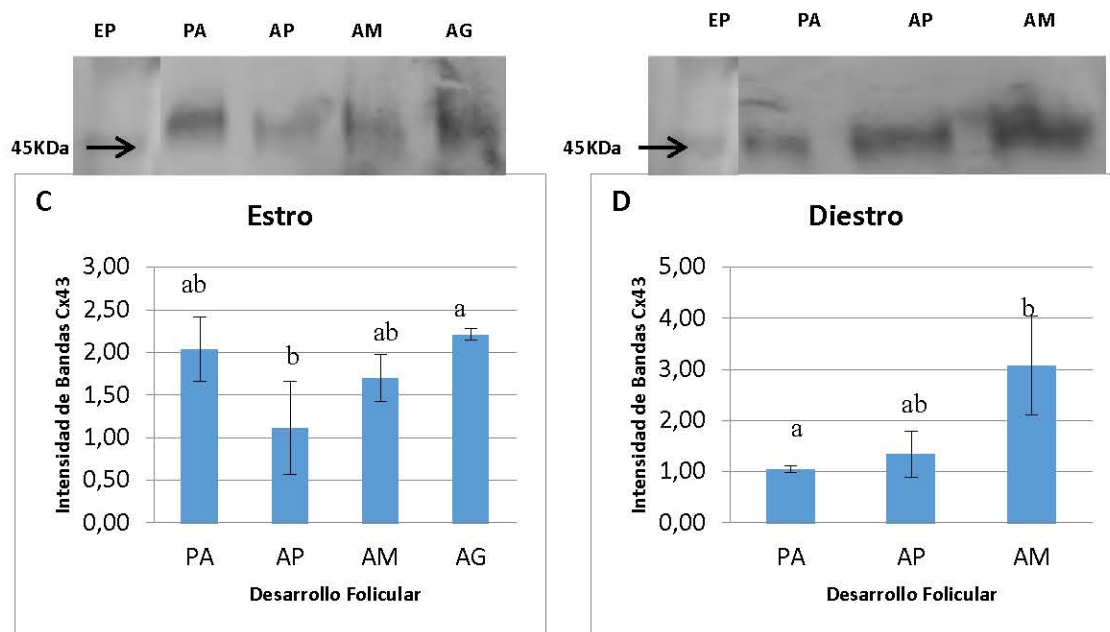
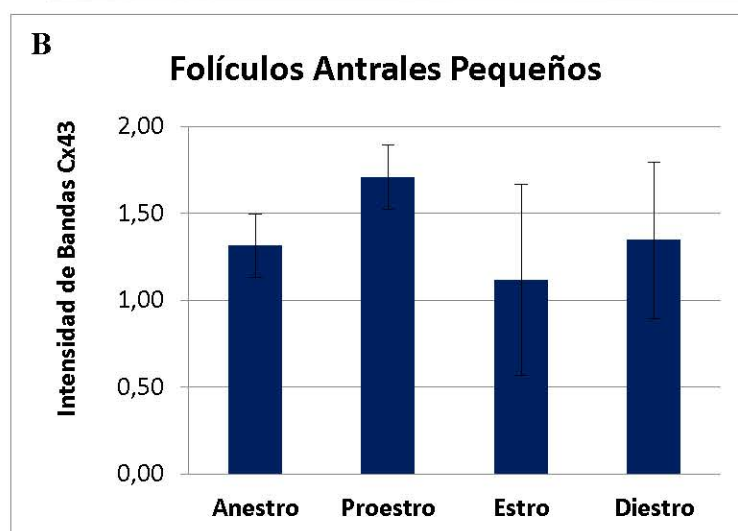
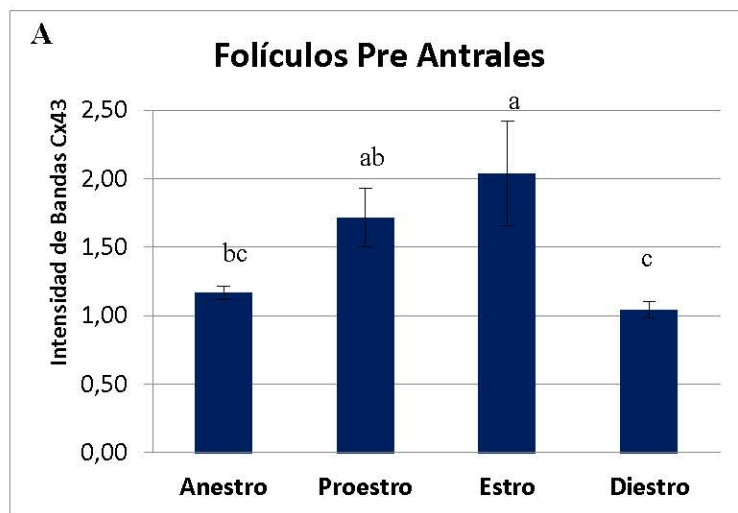


FIGURA 8. Análisis de Western Blot para cuantificación de Cx43 durante el desarrollo folicular en cada etapa del ciclo estral. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tamaño folicular de cada etapa. A: Anestro, B: Proestro, C: Estro, D: Diestro. PA: Pre Antral. AP: Antral Pequeño. AM: Antral Mediano. AG: Antral Grande. EP: Estándar Peso Molecular.

En la Figura 9 se muestra la intensidad de banda entre similar tamaño folicular de distintas etapas del ciclo, se observó la mayor intensidad de banda en los folículos medianos (Fig 9 C), seguido de los folículos pre-antrales (Fig 9 B) y luego de los folículos pequeños (Fig 9 A). En los folículos preantrales, la etapa de estro manifestó la mayor ($P < 0,05$) intensidad de banda comparado con el anestro y diestro, pero fue estadísticamente similar al proestro. En los folículos pequeños la mayor intensidad de banda se mostró en el proestro, pero no existieron diferencias ($P < 0,05$) entre las demás etapas del ciclo. En los folículos medianos existió una mayor intensidad de banda en el diestro ($P < 0,05$) al compararlo con el anestro, pero fue estadísticamente similar al estro y proestro los cuales no fueron diferentes entre si.



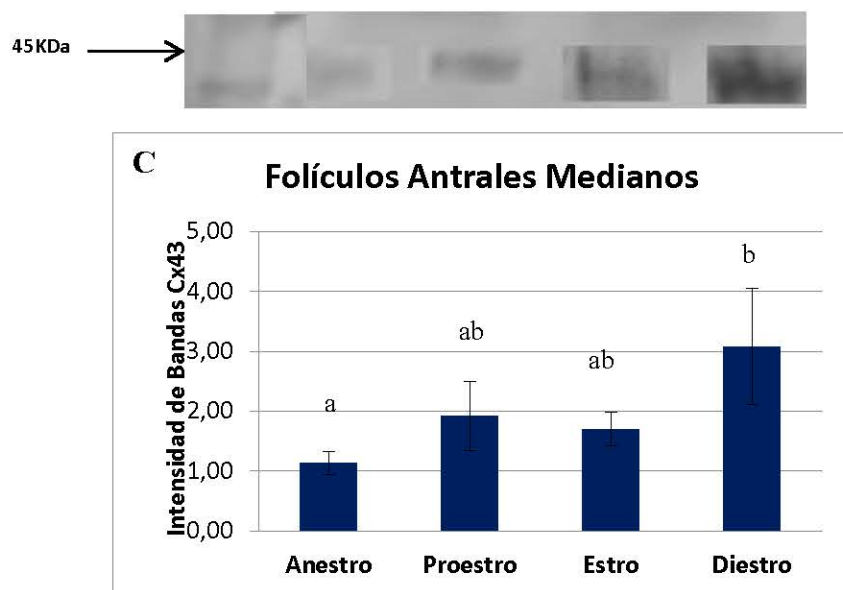


FIGURA 9. Intensidad de Bandas en Western Blot para Cx43 entre folículos de similar etapa del desarrollo (tamaño) provenientes de distintas etapas del ciclo estral. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). A: Preantral, B: Antral Pequeño, C: Antral Mediano.

Relación mRNA – Proteína

Se realizó para cada etapa del ciclo un análisis de correlación de Pearson relacionando la expresión relativa y la intensidad de banda de Cx43. En las etapas de Anestro, Proestro y Estro se observaron correlaciones negativas, mientras que la etapa de Diestro presentó una correlación positiva en los tres tamaños foliculares. Los resultados de correlación se muestran en la Figura 10 (A,B,C,D).

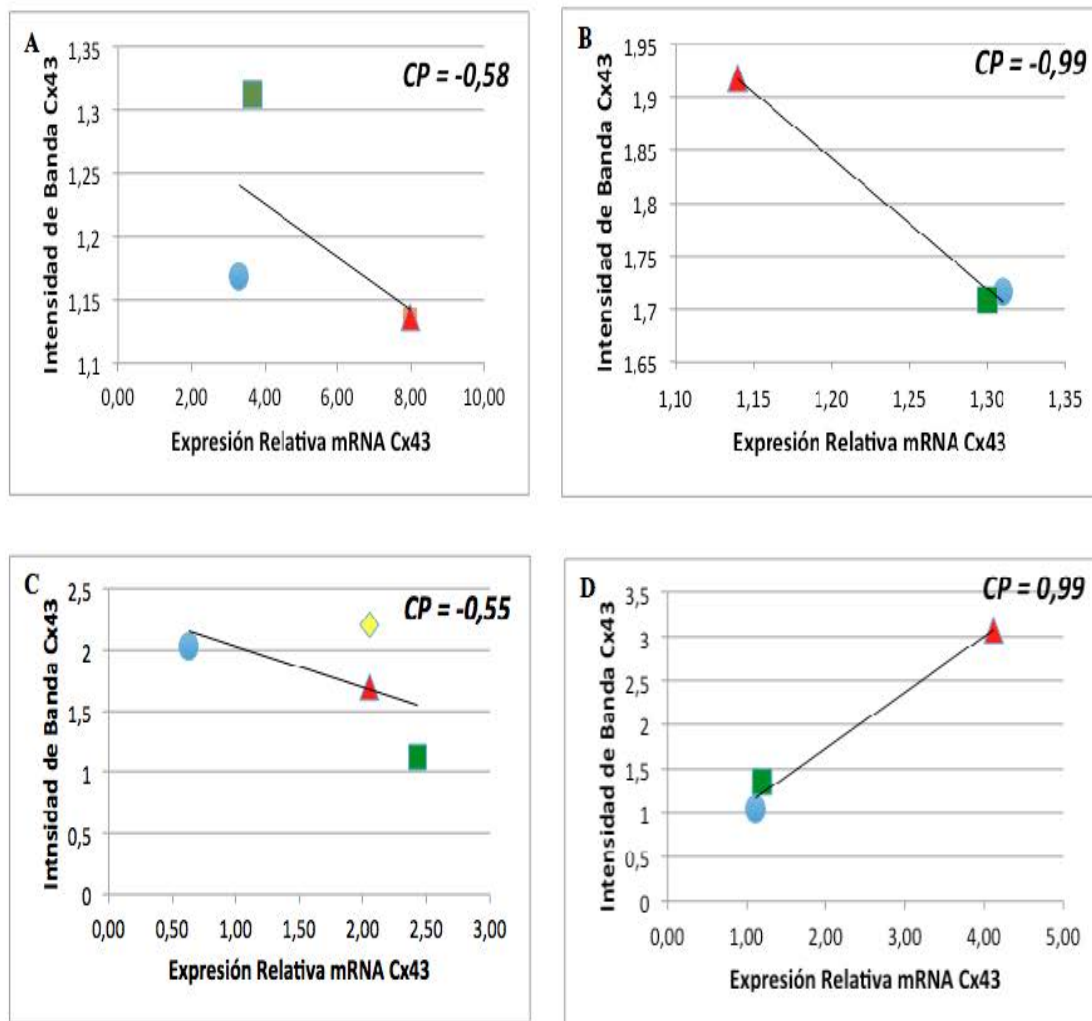


FIGURA 10. Correlación entre Expresión Relativa e Intensidad de Banda de Cx43 durante las etapas de Anestro (A), Proestro (B) Estro (C) y Diestro (D). ●: Folículo Preantral; ■: Folículo Antral Pequeño; ▲: Folículo Antral Mediano; ◆: Folículo Antral Grande. CP: Coeficiente de Pearson.

DISCUSIÓN

El presente estudio detectó la expresión del gen codificante de Cx43 y la presencia de su proteína en células foliculares ováricas de perra durante todas las fases del desarrollo folicular a lo largo del ciclo estral. Estudios en ratones (Yang *et al.*, 2015), humanos (Umbahuer *et al.*, 2000), ovinos (Moreira *et al.*, 2016), ratas y cerdos (Schreiber *et al.*, 1993; Melton *et al.*, 2001) y en perros (Willingham-Rocky *et al.*, 2007), han también demostrado la presencia del mRNA y/o de la proteína en ovarios, folículos ováricos o células foliculares, demostrando la transversalidad de su expresión durante la foliculogénesis y en la fisiología ovárica (Kussano *et al.*, 2016). Los conexones conformados por Cx43 en las especies estudiadas podrían ser una ruta importante de comunicación intercelular entre las células foliculares en la perra, permitiendo el paso de señales celulares, favoreciendo el desarrollo (Yang *et al.*, 2015; Domínguez *et al.*, 2016; Ortiz-Escribano *et al.*, 2016; Russell *et al.*, 2016).

Los niveles de mRNA para Cx43 mostraron una mayor expresión del gen en anestro, la que aumentó con el desarrollo folicular. A finales del anestro en la perra se describe un aumento de los pulsos de LH (Concannon, 2009), por lo que se cree que hay una selección de los folículos que responden a esta gonadotropina y pueden continuar su desarrollo hacia proestro (Chaffaux *et al.*, 1984; Concannon, 2009; De los Reyes *et al.*, 2017). Estos folículos desarrollan receptores a LH lo que se ha demostrado con un aumento de los receptores de LH hacia fines del anestro (De los Reyes *et al.*, 2017). Factores paracrinos importantes en el desarrollo folicular como GDF-9 y BMP-15 (Su *et al.*, 2008), muestran un aumento a finales del anestro en la perra (Fernández, *et al.*, 2016; Palomino y De los Reyes, 2016) indicando que posiblemente la expresión y función de factores paracrinos pueden regular la expresión de estas proteínas.

La capacidad de expresión génica de Cx43 podría estar por tanto, relacionada con la capacidad de los folículos de continuar su desarrollo hacia proestro. La expresión de mRNA de Cx43 en proestro fue similar en los tres tamaños foliculares estudiados por lo que los eventos asociados a esta etapa del ciclo, tanto endocrinos como paracrinos, probablemente no incidan significativamente en la expresión génica de Cx43 en la perra. La expresión de mRNA de Cx43 en estro tampoco presentó variaciones entre los folículos antrales en crecimiento. A diferencia, en la rata la LH causa una disminución parcial del mRNA de Cx43, causando la reducción de un 45% del mRNA de Cx43 tras 20 horas de exposición a LH (Granot y Dekel, 1994), detectando mRNA de Cx43 en ausencia de la proteína, lo que permite pensar que la disminución de la expresión de Cx43 producido por el alza de LH en ratones y ratas tiene un efecto mayor sobre la traducción, por lo que transcriptos de mRNA de Cx43 pueden permanecer en el citoplasma (Granot y Dekel, 1994; Gherson, 2008).

En ovinos se ha demostrado que el estradiol participa en la expresión de conexinas en tejido uterino y placenta, aumentando el mRNA de varias conexinas entre ellas Cx43 (Jhonson et al., 2017). Igualmente, en células endometriales de ratón cultivadas in vitro se demostró el efecto promotor de estradiol en la expresión del mRNA de Cx43 y un aumento en la concentración de progesterona disminuye la expresión del mRNA de Cx43 (Grümer *et al.*, 1999). En la perra a finales del proestro comienza la luteinización de los folículos, por lo que los niveles de estradiol empiezan a disminuir lo que continúa durante el estro, al mismo tiempo que los niveles de progesterona aumentan previo y durante el peak de LH. Esto hace que la relación estradiol/progesterona disminuya a través del estro (Concannon, 2011). Es probable que en células foliculares de perra la menor expresión del mRNA de Cx43 en las etapas tempranas del estro estén influenciadas por la disminución

en la relación estradiol/progesterona debido a la luteinización temprana de folículos preovulatorios (Songsases y Wildt, 2007; Concannon, 2011).

La expresión del mRNA de Cx43 en la etapa final del diestro fue mayor comparada con las etapas iniciales, pudiendo estar influenciada por el aumento de secreción de prolactina, hormona con efecto luteotrófico en la perra, la cuál alcanza sus mayores concentraciones en las etapas finales del diestro (Concannon, 2009). En glándula mamaria de ratón se ha demostrado que la expresión del mRNA de Cx43 se correlaciona con la concentración de prolactina, asociado a la mayor necesidad de conducción intercelular de calcio y nutrientes mediado por conexones constituidos por Cx43 (Lambe *et al.*, 2006). Por lo que los mayores valores de expresión de mRNA y Cx43 en el diestro tardío comparado con el diestro temprano pueden asociarse a las altas concentraciones y pulsatilidad de esta hormona.

Mediante Inmunohistoquímica y Western Blot se observó la presencia de Cx43 en los distintos tamaños foliculares a través del ciclo reproductivo. Las bandas de Western Blot de 43 a 45 Kda, correspondiente a Cx 43 (Wang *et al.*, 2017) fueron coincidentes con la Cx43 registrada en ratones (Ramani *et al.*, 2016) y humano (Solan y Lampe, 2009; Leithe *et al.*, 2018). Estas bandas aunque se observaron en todos los estados del ciclo no fueron con la misma intensidad. La localización de Cx43 en folículos ováricos fue similar a lo descrito en cerdos y ovinos (Melton *et al.*, 2001; Gherson *et al.*, 2008), ratones (Yang *et al.*, 2015) y en la perra (Willingham-Rocky *et al.*, 2007). En folículos pre-antrales la Cx43 se encontró en las células de la granulosa, y en folículos antrales el marcaje se distribuyó en las células de la granulosa, teca y entre las células de la granulosa y del cúmulo.

En anestro la presencia de Cx43 no mostró diferencias entre los tamaños foliculares, a diferencia de la expresión del gen que fue mayor en la parte final de esta etapa. En ratón se han identificado varios mecanismos de control de la expresión de Cx43 como la fosforilación por MAPK, la degradación por el retículo endoplásmico de proteínas aberrantes, la internalización hacia conexasomas por ubiquitinización y el aumento de la tasa de recambio e internalización de Cx43 bajo condiciones de estrés citoplasmático (Leithe *et al.*, 2018). Es posible que la expresión de Cx43 en células foliculares de perra sea regulada también por estos mecanismos celulares de control explicando los altos niveles de mRNA de Cx43 no traducidos hacia la proteína en la parte final del anestro. Además, la expresión de conexas en mamíferos es regulada por varios mecanismos transcripcionales y traduccionales como transcriptos ubicuos de unión al mRNA de Cx43 y transcriptos activadores de traducción (Oyamada *et al.*, 2013), la expresión de oncogenes que disminuyen la expresión de Cx43 (Bertram, 2004) y secuencias de micro RNA que participan en la traducción de Cx43 (Klotz, 2012; Vinken, 2016), estos mecanismos ejercen un sistema regulatorio de la expresión de esta proteína y podrían explicar los niveles de expresión de Cx43 a lo largo del desarrollo folicular en las etapas de anestro y proestro.

Estudios en ratones demuestran que el reinicio meiótico se produce en respuesta al peak de LH, el cual desencadena la fosforilación de Cx43 principalmente por MAPK, cerrando los conexones conformados por esta proteína, y de esa forma impidiendo el tránsito de nucleótidos cíclicos desde las células foliculares hacia el ovocito. Esto desencadena el reinicio meiótico del ovocito (Sela-Abramovich *et al.*, 2005; Gherson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, en la perra el ovocito es ovulado en primera profase meiótica (Willingham-Rocky *et al.*, 2003; De los Reyes 2005 *et al.*, 2005) y reinicia la meiosis en el oviducto alrededor de 50 horas desde el peak de LH (Songsasen

y Wildt, 2007; Concannon, 2011). En este trabajo, se encontró que tanto los niveles de expresión del gen de Cx43 como de su proteína obtenidos en estro, donde se produce el peak de LH, no disminuyeron, lo que sugeriría que los conexones constituidos por Cx43 podrían continuar manteniendo el tránsito de nucleótidos cíclico entre células foliculares y el ovocito, manteniendo el arresto meiótico.

En el tamaño folicular mediano durante el diestro presentó el mayor valor de Cx43 en relación a los folículos preantrales y pequeños de diestro. En endometrio de ratón la variación hormonal de estrógenos y progesterona durante el ciclo reproductivo influye en la expresión de varias conexinas entre ellas Cx43 (Grüner *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha visto en ratón que la expresión de conexinas influye en la síntesis de progesterona por las células foliculares luteinizadas permitiendo posiblemente el flujo de enzimas esteroideogénicas entre las células luteales favoreciendo la síntesis de progesterona (Gherson *et al.*, 2008). En folículos ováricos de bovinos, la expresión de Cx43 es indispensable para la función de las células luteales y del cuerpo lúteo (Bao y Garverick 1998; Berisha *et al.*, 2009), como también en el cuerpo lúteo de babuinos y humanos, en donde la Cx43 influye en la síntesis de progesterona y la apoptosis de células luteales (Khan-Dawood *et al.*, 1996). Por lo tanto es posible que en diestro en la perra la Cx43 ayude en la síntesis de progesterona y en la funcionalidad de las células luteales, explicando así los niveles de Cx43 encontrada en esta etapa del ciclo, como lo observado en células luteales de bovino durante la luteinización, diferenciación de células foliculares a luteales y regresión del cuerpo lúteo (Berisha *et al.*, 2009).

Al analizar la expresión del gen y la proteína en las cuatro etapas del ciclo se obtuvieron resultados de correlación negativa en anestro, proestro y estro, pero en el diestro la correlación fue positiva. Las conexinas y

particularmente la Cx43 es sometida varios mecanismos celulares de control en su expresión como la degradación por el retículo endoplásmico, degradación por ubiquitinización y aumento de la tasa de internalización y recambio proteico en condiciones de estrés celular (Klotz, 2012; Oyamada *et al.*, 2013; Vinken, 2016). Además, se conoce que varias hormonas pueden afectar la transcripción de Cx43 de forma diferente dependiendo del tejido, estudios en células foliculares de ratón demuestran que la progesterona fomenta la expresión de Cx43 y regula el funcionamiento armónico de las células luteales (Ke *et al.*, 2005); pero, en miometrio de hámster la progesterona disminuye la transcripción de Cx43 para prevenir la acción contráctil del útero y mantener la gestación (Dong *et al.*, 2009), por lo que el control post transcripcional tiene un papel fundamental en esta proteína.

Los resultados de correlación negativa entre la expresión de mRNA y la expresión de Cx43 en las etapas de anestro, proestro y estro pudieron deberse a los distintos mecanismos de regulación postranscripcional que tienen las proteínas en mamíferos (Roundtree y He, 2016). Adicionalmente, existe evidencia que indica que la traducción de conexinas es controlada por mecanismos epigénicos como metilación del ADN (Wu *et al.*, 2014), acetilación de histonas (Vinken, 2016) y secuencias de microARN, proteínas y transcritos activadores de la traducción que se unen al mRNA de Cx43 (Oyamada *et al.*, 2013). Debido a la gran cantidad de adenina y uracilo en la región de traducción 3' del mRNA de Cx43, secuencias de microARN pueden unirse al mRNA de Cx43, esta unión causa una inhibición o en efecto promotor en la traducción de la proteína controlando su expresión (Vinken, 2016; Cao *et al.*, 2017), de igual forma esta región del mRNA de Cx43 permite la interacción de proteínas de unión al RNA que atraen RNasas y degradan la secuencia (Klotz, 2012; Oyamada *et al.*, 2013; Vinken 2016). Por lo que es probable que en las células foliculares de perra la expresión de Cx43 esté también bajo mecanismos

regulatorios tanto post transcripcionales y traduccionales, reflejado en una menor cantidad de proteína en relación a la disponibilidad de su mensajero.

CONCLUSIONES

- La expresión del gen de Cx43 y su proteína presentaron diferencias a lo largo del desarrollo folicular y a través del ciclo estral en la perra, lo que podría sugerir un control endocrino y/o paracrino en su función.
- La mantención de la Cx43, tanto en su expresión génica como la presencia de la proteína en los folículos preovulatorios, sugiere la mantención funcional de los conexones constituidos por esta proteína manteniendo así el arresto meiótico.

BIBLIOGRAFÍA

Bao, H. & Garverick, H. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*. 76: 1903 - 1921.

Basheer, W. & Shaw, R. 2015. The “Tail” of Connexin 43: An Unexpected Journey from Alternative Translation to Trafficking. *Biochimica and Biophysica Acta*. 7: 1848 - 1856.

Berisha, B., Bridger, P., Toth, A., Kliem, H., Meyer, H., Schams, D. & Pfarrer, C. 2009. Expression and localization of gap junctional connexins 26 and 43 in bovine periovulatory follicles and in corpus luteum during different functional stages of oestrous cycle and pregnancy. *Reproduction of Domestic Animals*. 44: 295 - 302.

Bertram, J. 2004. Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430: 120 -126.

Boassa, D., Solan, J. L., Papas, A., Thornton, P., Lampe, P. D. & Sosinsky, G. E. 2010. Trafficking and Recycling of the Connexin43 Gap Junction Protein during Mitosis. *Traffic*. 11: 1471-1486.

Botigelli, R., Montanari, E., Pioltine, E., Fábio, M. & Nogueira, G. (2017). New approaches regarding the in vitro maturation of oocytes: manipulating cyclic nucleotides and their partners in crime. *JBRA Assisted Reproduction*. 21: 35-44.

Cao, H., Hong, L. & Amendt, B. 2017. Mesenchymal MicroRNA function branches out. *Developmental Cell*. 40: 1 - 2.

Chaffaux, S., Locci, D., Pontois, M., Deletang, F. & Thibier, M. 1984. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *British Veterinary Journal*. 140: 191 - 195.

Chastant-Maillard, S., Viaris de Lesegno, C., Chebrou, M., Thoumire, S., Meylheuc, T., Fontbonne, A., Chodkiewicz, M., Saint-Dizier, M. & Reynaud, K. 2011. The canine oocyte: uncommon features if *in vivo* and *in vitro* maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 23: 391 - 402.

Chastant-Maillard, S. Saint-Dizer, M., Grimard, B., Chebrou, M., Thoumire, S. & Reynaud, K. (2015). Are oocytes from the anestrous bitch competent for meiosis? *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 74 – 79

Concannon, P. W. 2009. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 3 - 15.

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

De Los Reyes, M., Lange, J., Miranda, P., Palominos, J. & Barros, C. 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 64:1 - 11.

De Los Reyes, M., Rojas, C., Parraguez, H. & Palomino, J. 2013. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. *Theriogenology*. 80: 587 - 596.

De Los Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, H. & Ramirez, F. 2017. Analysis of LH receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Theriogenology*. 93: 71 - 77.

Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teletitla, M. & Bonilla, E. 2016. Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*. 35: 93 - 99.

Dong, X., Yu, C., Shynlova, O., Challis, J., Rennie, P. & Lye, S. 2009. P54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (*gja1*). *Molecular Endocrinology*. 23: 1147 - 1160.

Durlej, M., Kopera, I., Knapczyk-Stwora, K., Hejmej, A., Duda, M., Kozirowski, M., Slomczynska, M. & Bilinska, B. 2011. Connexin 43 gene expression in male and female gonads of porcine offspring following in utero exposure to an anti-androgen, flutamide. *Acta Histochemica*. 113: 6 - 12.

Edry, I., Sela-Abramovich, S. & Dekel, N. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 252: 102 - 106.

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

Evencen, M., Cirit, U., Demir, K., Hamzaoglu, A., Bakirer, G., Pabuccuoglu, S. & Biriera, S. 2011. Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dogs oocytes. *Theriogenology*. 75: 1647 - 1651

Fernandez, T., Palomino, J., Parraguez, V., Peralta, O. & De Los Reyes, M. 2016. Differential expression of GDF-9 and BMP-15 during follicular

development in canine ovaries evaluated by flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 167: 59 - 67.

Ferré, P., Thi Bui, T. M., Wakai, T. & Funahashi, H. 2016. Effect of removing cumulus cells from porcine cumulus-oocyte complexes derived from small and medium follicles during IVM on the apoptotic status and meiotic progression of the oocytes. *Theriogenology*. 86: 1705 - 1710

Gershon, E., Plaks, V. & Dekel, N. 2008. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 282: 18 - 25.

Gittens, J., Barr, K., Vanderhyden, B. & Kidder, G. 2004. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *Journal of Cell Science*. 118: 113 - 122.

Grek, C. L., Rhatt, M. J., Bruce, J. S. & Ghatnekar, G. S. 2016. Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections? *Cancer Letters*. 374: 117 - 126.

Grüner, R., Traub, O. & Winterhager, E. 1999. Gap junction connexin genes cx26 and cx43 are differentially regulated by ovarian steroid hormones in rat endometrium. *Endocrinology*. 140: 2509 - 2516.

Iris, E., Sela-Abramovich, S. & Dekel, N. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 252: 102 - 106.

Johnson, M., Redmer, D., Reynolds, L. & Grazul-Bilska, A. 2017. Gap junctional connexin messenger RNA expression in the ovine uterus and placenta: effects of estradiol-17B-treatment, early pregnancy stages, and embryo origin. *Domestic Animal Endocrinology*. 58: 104 - 112.

Khan-Dawood, F., Yang, J. & Dawood, M. 1996. Expression of gap junction protein connexin-43 in the human and baboon (*Papio anubis*) corpus luteum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81: 835 - 842.

Ke, F., Fang, S., Lee, M., Sheu, S., Lai, S., Chen, Y., Huang, F., Wang, P., Stocco, D. & Hwang, J. 2005. Lindane, a gap junction blocker, suppresses FSH and transforming growth factor B1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology*. 184: 555 - 556.

Kim, K. M., Fibrianto, Y. H., Oh, J. H., Jang, G., Kim, H. J., Lee, K. S., Kang, S.K., Lee, B.C. & Hwang, W.C. 2005. Effects of estradiol-17b and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63: 1342 - 1353.

Klotz, L.O. 2012. Posttranscriptional regulation of connexin-43 expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 524: 23 - 29

Kussano, N. R., Leme, L. O., Guimaraes, A. S., Franco, M. M. & Dode, M. S. 2016. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology*. 85: 1167 - 1176.

Lambe, T., Finlay, D., Murphy, M. & Martin, F. 2006. Differential expression of connexin 43 in mouse mammary cells. *Cell Biology International*. 30: 472 - 479

Laird, D. W. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1711: 172 - 182.

Leithe, E., Mesnil, M. & Aasen, T. 2018. The connexin43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1860: 48 - 64.

Lunardon, N., Silva-Santos, K., Justino, R., Dessunti, G., Seneda, M. & Martins, M. 2015. Population estimate of the preantral follicles and frequency of

multioocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology*. 83: 105 - 1020

Lutz, S. E., Zhao, Y., Gulinello, M., Lee, S. C., Raine, C. S. & Brosnan, C. F. 2009. Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation. *Journal of Neuroscience*. 29: 7743 - 7752

Matsuuchi, L. & Naus, C. C. 2013. Gap junction proteins on the move: Connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1823: 94 - 108.

Melton, C., Zaunbrecher, G., Yoshizaki, G., Patiño, R., Whisnant, S., Rendon, A. & Lee, V. 2001. Expression of connexin 43 mRNA and protein in developing follicles of prepubertal porcine ovaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130: 43 - 55.

Moreira, A., Bezerra, J., Ferreira, L., Riberio, N., Osmarini, F., Accioly, A., Vieira, H., Nascimento, F., Rocha, V., Lobo, C., Alencar, A., Moura, A., Cabral, C., Smitz, J., Figueiredo, J. & Ribeiro, A. 2016. Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultures *in vitro* after vitrification of ovarian tissue. *Theriogenology*. 85: 1457 - 1467.

Olk, S., Zoidl, G. & Dermietzel, R. 2009. Connexins, Cell Motility, and the Cytoskeleton. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 66: 1000 - 1016.

Ortiz-Escribano, N., Smits, K., Piepers, S., Van den Abbeel, E., Woelders, H. & Van Soom, A. 2016. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology*. 86: 635 - 641.

Oyamada, M., Takebe, K. & Oyamada, Y. 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 1828: 118 - 133.

Palomino, J. & De Los Reyes, M. 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology*. 86: 1541 - 1549.

Pecorara, M., Verrilli, V., Pinto, A. & Popolo, A. 2015. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*. 768: 71 - 76.

Ramani, M., Mylvaganam, S., Krawczyk, M., Wang, L., Zoidi, C., Brien, J., Reynolds, J., Kapur, B., Poulter, M., Zoidl, G. & Carlen, P. 2016. Differential expression of astrocytic connexins in a mouse model of prenatal alcohol exposure. *Neurobiology of Disease*. 91: 83 - 93

Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris De Lesegno, C., Saint-Dizier, M. & Chastant-Maillard, S. 2009. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology*. 72: 1120 - 1131.

Root Kustritz, M. 2012. Managing the reproductive cycle in the bitch. *Veterinary Clinics of North America- Small Animal Practice*. 42: 423 - 437.

Roundtree, I. & He, C. 2016. RNA epigenetics – chemical messages for posttranscriptional gene regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 30: 46 - 51.

Russell, D., Gilchrist, R., Brown, H. & Thompson, J. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*. 86: 62 - 68.

Schreiber, J., Beckmann, M., Polacek, D. & Davies, P. 1993. Changes in gap junction connexin-43 ribonucleic acid levels associated with rat ovarian follicular development as demonstrated as in situ hybridization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 168: 1094 - 1104.

Schulz, R., GÖrge, P. M., GÖrbe, A., Ferdinandy, P., Lampe, P. D. & Leybaert, L. 2015. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacology & Therapeutics*. 153: 90 - 106.

Sela-Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D. & Dekel, N. 2005. Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Luteinizing Hormone-Induced Breakdown of Communication and Oocyte Maturation in Rat Ovarian Follicles. *Endocrinology*. 146: 1236 - 1244.

Solan, J. & Lampe, P. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochemical Journal*. 419: 261 - 272

Song, H., Zheng, G., Liu, Y., Shen, X.F., Zhao, Z.H., Aschner, M., Luo, W.J. & Chen J.Y. 2016. Cellular uptake of lead in the blood-cerebrospinal fluid barrier: Novel roles of Connexin 43 hemichannel and its down-regulations via Erk phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 297: 1 - 11.

Songsasen, N., Comizzoli, P., Nagashima, J., Fujihara, M. & Wildt, D. E. 2012. The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development in vitro. *Reproduction of Domestic Animals*. 47: 13 - 18.

Songsasen, N. & Wildt, D.E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*. 98: 2 - 22

Su, Y., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M., Affourtit, J., Pangas, S., Matzuk, M. & Eppig, J. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 135: 111 - 121.

Teilmann Cuoni, S. 2005. Differential expression and localization of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234: 27 - 35.

Terazono, T., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, A., Viet, VL., Takagi, M., Inoue, M., Sato, Y., Taniguchi, M. & Otoi, T. 2012. Follicle formation in the canine ovary after autografting to a peripheral site. *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 16 - 21.

Umbahuer, S., Ruch, R. & Fanning, J. 2000. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 182: 999 - 1000.

Verheule, S., Wilson, E. E., Arora, R., Engle, S. K., Scott, L. R. & Olgin, J. E. 2002. Tissue structure and connexin expression of canine pulmonary veins. *Cardiovascular Research*. 55: 727 - 738.

Vinken, M. 2016. Regulation of connexin signaling by the epigenetic machinery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 1859: 262 - 268.

Wang, Q., Zhang, S., Qin, L., Zhang, W., Liu, F., Xu, J., Ma, Y. & Teng, K. 2017. Yimu San improves obstetric ability of pregnant mice by increasing serum oxytocin levels and connexin 43 expression in uterine smooth muscle. *Journal of Zhejiang University Science*. 18: 986 - 993.

Willingham-Rocky, L. A., Hinrichs, K., Westhusin, M. & Kraemer, D. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 126: 501 - 508.

Willingham-Rocky, L. A., Golding, M. C., Wright, M. J., Kraemer, D. C., Westhusin, M. E. & Burghardt, R. C. 2007. Cloning of GJA1 (connexin43) and

its expression in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Gene Expression Patterns*. 7: 66 - 71.

Wu, X., Wang, Y., Sun, Y., Chen, S., Zhang, S., Shen, L., Huang, X., Lin, X. & Kong, W. 2014. Reduced expression of connexin 26 and its DNA promoter hypermethylation in the inner ear of mimetic aging rats induced by d-galactose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 452: 340 - 346.

Xu, X., Li, J., Cao, Y., Chen, D., Zhang, Z., He, X., Ji, D. & Chen, B. 2014. Differential expression of long noncoding RNAs in human cumulus cells related to embryo developmental potential. *Reproductive Sciences*. 22: 672 - 678.

Yang, M., Li, J., An, Y. & Zhang, S. 2015. Effects of androgen on immunohistochemical localization of androgen receptor and Connexin 43 in mouse ovary. *Tissue and Cell*. 47: 526 - 532.

Zhang, M., Ouyang, H. & Xia, G. 2009. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*. 15: 399 - 409.

Zhang, M., Su, Y., Sugiura, K., Xia, G. & Eppig, J. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. 330: 366 - 369.