



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

“Análisis de los transcritos de GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo y su relación con la maduración *in vitro* de los ovocitos caninos”

Georges Andre Ramírez Saboya

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

PROFESORA GUÍA: Dra. Mónica De Los Reyes Solovera
Profesora Titular
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1171670

Santiago, Chile
2019



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

“Análisis de los transcritos de GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo y su relación con la maduración *in vitro* de los ovocitos caninos”

Georges Andre Ramírez Saboya

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

NOTA FINAL:

FIRMA

| | | |
|---------------------|-----------------------|-------|
| PROFESOR GUÍA: | Mónica De Los Reyes S | |
| PROFESOR CORRECTOR: | Víctor Martínez M | |
| PROFESOR CORRECTOR: | Oscar Peralta T | |

Quisiera agradecer a la Dra. Mónica De los Reyes por el apoyo incondicional que siempre me brindó. A pesar de mis constantes fracasos, nunca perdió la fe en mí e hizo lo posible para que este trabajo saliera adelante. Gracias por su paciencia, cariño, conocimiento, consejos y por darme la oportunidad de convertirme en profesional.

También darle las gracias al Dr. Jaime Palomino por su amistad, alegría y su excelente disposición para ayudar durante todos estos años. A mis profesores consejeros, el Dr. Oscar Peralta y el Dr. Víctor Martínez, quienes generosamente me ayudaron cuando más lo necesitaba.

A las grandes personas con las que compartí durante mi estadía en el laboratorio: Pablo García, Camila Gómez, Jorge Torres, Carola Gallegos, Roberto Espinoza, Gabriela Figueroa, Pablo Fuentes, Bernardita Quezada, Javiera Flores, Karla Aspee, Allison Villagra, Michelle Salinger, Adrián Araujo y Ana Vergara. Gracias por su valiosa compañía y amistad.

Muchas gracias a la Dra. María Sol Morales, quien desinteresadamente siempre me ayudó como si fuera de su propia familia. Gracias a la Sra. Norma San Martín, Sra. Alma, Sr. Luis Nauto, Sra. Corina Norambuena, quienes siempre me saludaron con una amable sonrisa y me ayudaron en lo que necesitara. También al Dr. Raúl Vizcarra y a la Dra. Luz Correa por su paciencia y buena voluntad.

Agradezco a mi maestro Ven. Drubpon Otzer Rimpoché y a la Sangha Otzer Ling, por todo el apoyo entregado y por enseñarme a cultivar la paciencia, diligencia y otras cualidades necesarias para llevar a cabo este trabajo.

Muchas gracias a mi pareja, Javiera Spicto, por estar presente cuando más lo necesité, siempre dispuesta a ayudarme en todo momento con un amor sincero y energías positivas. También a todos mis amigos que siempre me animaron a seguir trabajando.

Finalmente, quisiera dedicar este trabajo a mi madre y a mi padre, ya que es el fruto del amor incondicional y la dedicación que me han entregado durante toda mi vida. Gracias por haberse esforzado y haber hecho lo imposible para permitirme llegar hasta aquí.

Ofrezco este trabajo a las Tres Joyas y que este estudio solo traiga beneficio a quienes lo lean. Que todo el mérito acumulado durante su realización pueda compartirlo con todos los seres para que logren la iluminación.

INDICE

| | |
|---|-----|
| ABREVIACIONES | III |
| RESUMEN | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| INTRODUCCION..... | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| 1.- Células del cúmulo y su importancia en el desarrollo | 2 |
| 2.- GDF-9 y BMP-15 | 3 |
| HIPÓTESIS | 7 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 7 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| A- Clasificación de folículos y recolección de COCs | 8 |
| 1.- Procesamiento de las células del cúmulo de COCs..... | 11 |
| 1.1.- Obtención de CCs no maduras | 11 |
| 1.2.- Cultivo celular | 11 |
| 2.- Maduración de COCs <i>in vitro</i> | 12 |
| 2.1.- Procesamiento..... | 12 |
| 2.2.- Recolección y cultivo de CCs provenientes de ovocitos madurados <i>in vitro</i> : | 12 |
| 2.3.- Fijación de ovocitos madurados <i>in vitro</i> : | 13 |
| 2.4.- Evaluación del estado meiótico de los ovocitos madurados <i>in vitro</i> : | 14 |
| 3.- Obtención de las CCs en cultivo para extracción de RNA y q-PCR:..... | 15 |
| 4.- PCR en tiempo real (q-PCR): | 16 |
| 5.- Análisis Estadístico | 17 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS | 18 |
| 1.- Evaluación del desarrollo meiótico de ovocitos madurados <i>in vitro</i> : | 18 |
| 2.- Niveles de mRNA..... | 19 |
| DISCUSIÓN | 22 |
| BIBLIOGRAFÍA | 28 |

ABREVIACIONES

| | |
|-----------------|--|
| ANOVA | Análisis de varianza |
| BMP-15 | Proteína morfogénica ósea 15 |
| cAMP | Adenosín monofosfato cíclico |
| CCs | Células del cúmulo |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| CGs | Células de la granulosa |
| cGMP | Guanosín monofosfato cíclico |
| COCs | Complejos cúmulo ovocitos |
| COX2 | Ciclooxigenasa 2 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-fenilindol |
| EGF-like | Factores semejantes al factor de crecimiento epidermal |
| FSH | Hormona folículo estimulante |
| GDF-9 | Factor de crecimiento diferencial 9 |
| GJs | Gap Junctions |
| HAS2 | Hialuronano sintasa 2 |
| IVM | Maduración <i>in vitro</i> |
| LH | Hormona luteinizante |
| MI, | Primera metafase |
| MII | Segunda metafase |
| MAPK | Proteína kinasa activadora mitogénica |
| MPF | Factor promotor de la meiosis |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| P4 | Progesterona |
| PDE3 | Fosfodiesterasa 3 |
| PKA | Proteína kinasa A |
| PTX3 | Pentraxina 3 |
| Q | Quantity |
| q-PCR, | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo |

| | |
|-------------------------------|---|
| TGF-β | Factores de crecimiento transformantes β |
| Tm | Temperatura de <i>melting</i> |
| TNFAIP6 | Factor de necrosis tumoral alfa inducido por proteína 6 |
| VG | Vesícula germinal |
| VGBD | Reinicio meiótico |

RESUMEN

El factor de crecimiento diferencial 9 (*GDF-9*) y la proteína morfogénica ósea 15 (*BMP-15*) regulan en diferentes especies procesos esenciales para la maduración del ovocito, tales como la expansión del cúmulo. Este estudio evaluó en caninos la expresión génica de *GDF-9* y *BMP-15* en las células del cúmulo (CCs) obtenidas de complejos cúmulos ovocitos (COCs) a través del ciclo estral en relación a la maduración *in vitro* (IVM) de los ovocitos y la expansión de estas células. Las CCs se obtuvieron de COCs de folículos antrales de anestro, proestro, estro y diestro, previo y después de la IVM, expandidas y no expandidas. Para lograr mayor cantidad de CCs, antes y después de la IVM, estas se cultivaron *in vitro* por 48 h en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con suero fetal bovino. El desarrollo meiótico luego de la IVM se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, clasificándolo en vesícula germinal (VG), reinicio meiótico (GVBD), primera metafase (MI) y segunda metafase (MII). La expresión relativa de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs se evaluó mediante q-PCR. Estos genes se encontraron en todas las etapas del ciclo antes y después de la IVM, con diferencias significativas entre estas en relación a la expansión y maduración de los ovocitos. De acuerdo a los estados del ciclo estral, en las CCs de COCs no madurados, los niveles de *GDF-9* fueron mayores ($P < 0,05$) durante el estro, seguido por el diestro y los menores ($P < 0,05$) niveles en proestro y anestro. En *BMP-15*, los mayores ($P < 0,05$) niveles de mRNA se observaron en estro y diestro. En las CCs expandidas no hubo diferencias en *GDF-9* entre las distintas etapas del ciclo, pero en *BMP-15* los menores ($P < 0,05$) niveles de mRNA se observaron en estro. Luego de la maduración, hubo un incremento ($P < 0,05$) de los transcritos de ambos genes en las CCs de anestro, proestro y diestro, excepto los niveles de mRNA de *BMP-15* durante el diestro. En estro en cambio, hubo una disminución significativa de la expresión de los dos genes luego de la IVM. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de alcanzar el estado de MII al considerar la etapa del ciclo. Sin embargo, los COCs obtenidos de proestro y diestro que expandieron sus CCs pudieron reiniciar la meiosis en mayor ($P < 0,05$) porcentaje en comparación con las demás etapas del ciclo y los COCs de estro que expandieron sus CCs lograron mayores ($P < 0,05$) porcentajes de MII en relación a los que no expandieron el cúmulo. En conclusión, *GDF-9* y *BMP-15* se expresan en las CCs en todas las etapas del ciclo con un patrón diferente de acuerdo a cada una y estarían involucrados en la expansión del cúmulo de la perra, pudiendo estar

relacionado con la maduración meiótica *in vitro*, al menos en aquellos ovocitos en etapa estral.

ABSTRACT

Differential growth factor 9 (GDF-9) and bone morphogenic protein 15 (BMP-15) regulate essential processes for oocyte maturation in different species, such as cumulus expansion. This study evaluated gene expression of GDF-9 and BMP-15 in canine cumulus cells (CCs) obtained from cumulus-oocyte complexes (COCs) through the estrous cycle in relation to oocyte *in vitro* maturation (IVM) and the expansion of CCs. The CCs were obtained from COCs of antral follicles from anestrus, proestrus, estrus, diestrus phases, before and after IVM, expanded and non-expanded. To achieve more CCs, before and after IVM, these were cultured *in vitro* for 48 h in Dulbecco's Medium Modified Eagle's Medium (DMEM) with fetal calf serum. The meiotic development after IVM was evaluated by fluorescence microscopy, classifying it in germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), first metaphase (MI) and second metaphase (MII). The relative expression of *GDF-9* and *BMP-15* in the CCs was evaluated by q-PCR. These genes were found in all stages of the reproductive cycle, before and after IVM, with significant differences between them in relation to the expansion and oocytes maturation. According to the estrous cycle stages, CCs from non-matured COCs expressed higher ($P < 0.05$) levels of GDF-9 mRNA during estrus in comparison with the other phases and the lowest ($P < 0.05$) levels at proestrus and anestrus. The highest ($P < 0.05$) levels of *BMP-15* transcripts were observed in estrus and diestrus. There were no differences in *GDF-9* gene expression comparing expanded CCs among the different phases of the estrous cycle, regarding *BMP-15* transcripts, the lowest ($P < 0.05$) levels were registered in estrus. After IVM, the level of both genes increased ($P < 0.05$) in CCs of anestrus, proestrus and diestrus, except *BMP-15* during diestrus. In contrast, in estrus GDF-9 transcripts significantly decreased after IVM. Non expanded CCs exhibited the lowest levels of both genes at anestrus and proestrus, whereas at diestrus the levels of *GDF-9* in non-matured CCs were lower ($P < 0.05$) than that of the expanded cells, the levels of *BMP-15* were similar. No differences were found in the oocyte ability to reach MII state when comparing the phases of the estrous cycle. However, COCs obtained from proestrus and diestrus that expanded their CCs showed higher ($P < 0.05$)

percentage of meiosis resumption than to the other phases. At estrus expanded CCs achieved higher ($P < 0.05$) percentages of MII in comparison to those did not expand. In conclusion, *GDF-9* and *BMP-15* are expressed in the CCs over the estrous cycle with different patterns according each phase and these genes maybe involved in the cumulus expansion in canines, maybe related to the *in vitro* maturation, at least in oocytes at estrus phase

INTRODUCCION

En los últimos años se han realizado esfuerzos por desarrollar biotecnologías reproductivas en cánidos como herramientas para la investigación científica, clínica animal y para su aplicación en especies caninas en peligro de extinción (De los Reyes *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2016). Sin embargo, estas tecnologías se han visto limitadas por la baja tasa de maduración *in vitro* de ovocitos, donde se ha reportado que ésta fluctúa entre un 20% y 40% (De los Reyes *et al.*, 2005), lo que se relaciona con la particular fisiología reproductiva en la perra.

La maduración del ovocito implica cambios nucleares y citoplasmáticos que, en la perra, a diferencia de otras especies mamíferas, ocurren tanto dentro del folículo como en el oviducto (Reynaud *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2009). En el desarrollo y maduración del ovocito, las células del cúmulo (CCs) juegan un rol fundamental debido a que al estar en estrecho contacto con el ovocito formando el complejo cúmulo-ovocito (COC), tienen una comunicación directa con el gameto a través de “Gap junctions” (GJs), o uniones de tipo comunicacional. Estas uniones permiten el traspaso de distintas moléculas involucradas en el desarrollo meiótico y citoplasmático (Russell *et al.*, 2016).

En mamíferos se han descrito distintas moléculas que participan en el desarrollo de los ovocitos, de los cuales han tomado gran relevancia la súper familia de Factores de Crecimiento Transformantes Beta (TGF- β), principalmente el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP-15) (Gilchrist *et al.*, 2004). Estos factores están involucrados en la activación de folículos primordiales, en el desarrollo folicular y en los eventos finales de la maduración y ovulación (Paulini y Melo, 2011). Estudios recientes han demostrado que ambos factores son expresados por los complejos cúmulo ovocitos y células foliculares de perra, presentando diferencias durante el desarrollo folicular a través del ciclo estral (De los Reyes *et al.*, 2013; Maupeu *et al.*, 2014; Palomino y De Los Reyes, 2016), como también la expresión de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs de COCs madurados *in vitro* e *in vivo* (Cho *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

La presencia de estos factores en otras especies animales se ha asociado a la expansión de las células del cúmulo (Dragovic *et al.* 2007; Peng *et al.*, 2013; Lin *et al.* 2014), proceso

que involucra la pérdida de las conexiones intercelulares o gap junctions, requisito señalado para el reinicio meiótico previo a la ovulación (Norris *et al.*, 2008), debido a la interrupción del paso de moléculas que mantienen el arresto meiótico del ovocito (Russell *et al.*, 2016). Sin embargo, el ovocito canino no reinicia la meiosis en el folículo si no que después que es ovulado. Este retardo meiótico se ha asociado a una expansión del cúmulo no completa (Reynaud *et al.*, 2005; Concannon, 2011).

Considerando la importancia de las CCs en la maduración del ovocito y la relevancia de estos factores paracrinos en el desarrollo, este estudio tiene como propósito evaluar la expresión de los genes que codifican para GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo en relación a la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos caninos, considerando la expansión del cúmulo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Células del cúmulo y su importancia en el desarrollo

La maduración del ovocito es un proceso complejo que incluye cambios morfológicos, estructurales y transcripcionales de los compartimentos citoplasmáticos y nucleares (De los Reyes *et al.*, 2011). Las CCs son esenciales en este proceso, ya que participarían como reguladoras en el arresto meiótico, la maduración citoplasmática y el reinicio meiótico del ovocito (Zhang *et al.*, 2010). Estas células rodean al ovocito y se mantienen un estrecho contacto con este a través de proyecciones que atraviesan la zona pelúcida llegando a la membrana del ovocito formando así el COC (Gilchrist *et al.*, 2004). De esta manera, se crea una comunicación metabólica bidireccional mediante las uniones GJs entre el ovocito y las CCs (Russell *et al.*, 2016), formadas por conexinas (Winterhager y Kidder, 2015). Estas uniones permiten un intercambio de sustancias como iones, metabolitos, miRNA, nucleótidos y pequeñas moléculas reguladoras (Russell *et al.*, 2016).

Las CCs transfieren nucleótidos cíclicos como cGMP y cAMP al ovocito vía GJs (Russell *et al.*, 2016). El cAMP a altas concentraciones activa la proteína kinasa A (PKA), provocando un efecto inhibitor en el factor promotor de meiosis (MPF), inhibiendo así el reinicio meiótico (Russell *et al.*, 2016). Además, se ha observado en el modelo murino que

la mantención de niveles altos de cAMP intraovocitario, inhibe la fosfodiesterasa 3 (PDE3) que degrada a esta molécula (Zhang *et al.*, 2010).

El reinicio meiótico en los mamíferos estudiados se produciría al retirar el efecto inhibitorio que tienen las CCs y de la granulosa sobre el ovocito. Esto se debería principalmente a la acción que produce la hormona luteinizante (LH), que activa la proteína quinasa activadora mitogénica (MAPK), que causa la fosforilación de la conexina 43, disminuyendo así la permeabilidad entre las células somáticas e impidiendo el paso de moléculas inhibitorias de la meiosis a través de las GJs (Norris *et al.*, 2008). Se ha descrito en el zorro azul que las CCs controlan la activación de la MAPK y la fosforilación (Kalab *et al.*, 1997), confirmando la influencia de las CCs y su interacción con los ovocitos en los cánidos (De los Reyes *et al.*, 2013). En las CCs el alza de LH induce la secreción de diferentes moléculas hacia la matriz extracelular, principalmente ácido hialurónico, logrando así la expansión del cúmulo, lo cual está relacionado con la capacidad del ovocito para alcanzar el estado de metafase II de la meiosis previo a la ovulación (Eppig, 2001). Sin embargo, en las especies caninas los ovocitos son ovulados inmaduros en etapa de primera profase meiótica en estado de vesícula germinal (GV) y requieren más de 48h para completar la maduración meiótica en el oviducto (Reynaud *et al.*, 2009). Un punto relevante es que la comunicación entre el ovocito y las CCs se mantiene varios días luego del peak de LH, por lo que estas células podrían tener mayor relevancia que en otras especies (Reynaud *et al.*, 2005).

2.- GDF-9 y BMP-15

Se ha descrito que la competencia de maduración y de desarrollo del ovocito estaría relacionado a una alta tasa transcripcional durante la foliculogénesis donde se acumulan factores que serán transmitidos bidireccionalmente entre las CCs y el ovocito (Gilchrist *et al.*, 2004; De los Reyes *et al.*, 2011). En los últimos años se ha puesto atención a los factores paracrinos, en especial a dos miembros de la súper familia de TGF- β : GDF-9 y BMP-15 (Gilchrist *et al.*, 2004; Paulini y Melo, 2011; Russell *et al.*, 2016). Estos factores se pueden encontrar presentes a través de la foliculogénesis, de acuerdo a estudios en diferentes hembras como la rata, ratón, cerda, oveja, vaca, ciervo (Crawford y McNatty, 2012) y también en perras (Palomino y De los Reyes, 2016; Fernández *et al.*, 2016). GDF-9 jugaría un rol importante en la activación de folículos primordiales (Kidder y Vanderhyden, 2010),

ambos en el desarrollo folicular (Russell *et al.*, 2016) y en eventos de la maduración como la expansión del cúmulo (Paulini y Melo, 2011).

Los factores paracrinicos GDF-9 y BMP-15 han sido descritos en muchos mamíferos, pero existen diferencias entre las especies en la dinámica de expresión de estos factores. En los roedores estos factores se han encontrado exclusivamente en el ovocito (Gilchrist *et al.*, 2004), pero en otras especies como bovinos (Hosoe *et al.*, 2011), caprinos (Silva *et al.*, 2005) y porcinos (Prochazka *et al.*, 2004; Lin *et al.* 2014), se ha descrito en las células del cúmulo, granulosa o teca. En la perra, se ha descrito la expresión de los genes de ambas proteínas (Cho *et al.*, 2016; Palomino y De los Reyes 2016; Lee *et al.*, 2017), como también las proteínas en los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) *in vitro* (De los Reyes *et al.*, 2013), e *in vivo* en las células foliculares (granulosa y teca) durante el desarrollo folicular (Fernández *et al.*, 2016).

Varios estudios han demostrado que GDF-9 sería esencial en las distintas etapas del desarrollo folicular. En la etapa preantral, GDF-9 promovería el desarrollo de folículos primarios en humanos (Kidder y Vanderhyden, 2010). Esto concordaría con lo que se ha descrito en la perra, donde los mayores niveles de GDF-9 han sido observados principalmente en folículos preantrales y antrales pequeños, lo que ha sugerido que éste podría ser un factor clave en la regulación del desarrollo folicular temprano en la perra (De los Reyes *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2016; Palomino y De los Reyes, 2016).

Estudios en roedores han involucrado también a GDF-9 en la etapa preovulatoria, donde participaría en la regulación de la expansión del cúmulo previo a la ovulación (Paulini y Melo, 2011). Al inyectar bloqueadores de la expresión génica de GDF-9 o al cultivar complejos ovotemizados en presencia de anticuerpos de GDF-9, la expansión del cúmulo se ve neutralizada (Dragovic *et al.*, 2005; Gui y Joyce, 2005). Esto se debe a que GDF-9 actúa regulando la expresión de distintas proteínas para crear una matriz extracelular rica en ácido hialurónico durante la expansión del cúmulo (Pangas y Matzuk, 2005). En la perra, a diferencia de otras especies, se ha descrito que la expansión de las células del cúmulo es prolongada, ocurriendo 24-36 h luego de la ovulación (Concannon, 2011). Según trabajos previos, los niveles de GDF-9 alcanzados en la perra podrían no ser suficientes para promover la expansión del cúmulo en caninos, ya que la expresión de este factor estaría inversamente

correlacionado al grado de mucificación durante la maduración *in vitro* (De los Reyes *et al.*, 2013).

También se ha descrito que GDF-9 tiene un rol en la supresión de la luteinización temprana al inhibir la expresión de receptores de LH en las CGs en ratones (Eppig, 2001). A diferencia de otros mamíferos, la luteinización folicular preovulatoria con un aumento de la concentración de progesterona en el fluido folicular y periférico, es una característica típica en la perra previo a la ovulación (Concannon, 2011). De esta forma, se ha hipotetizado que la disminución en la expresión de GDF-9 *in vitro* (De los Reyes *et al.*, 2013) e *in vivo* (Fernández *et al.*, 2016) hacia finales del cultivo o del periodo preovulatorio, podría no ser suficiente para evitar la luteinización folicular prematura en perros (Palomino y De los Reyes, 2016).

Al igual que GDF-9, BMP-15 se describe en los folículos durante todas las etapas de la foliculogénesis. En ratas, su expresión es baja en ovocitos de folículos primordiales pero una vez iniciado el desarrollo folicular, los niveles son ascendentes hasta la etapa preovulatoria (Otsuka *et al.*, 2000). En esta última etapa folicular en ratones, BMP-15 influiría en la estimulación de la expansión del cúmulo mejorando la expresión de factores semejantes al Factor de Crecimiento Epidermal (EGF-like) en las células del cúmulo (Yoshino *et al.*, 2006), lo cual sería esencial para que estas células puedan responder a las señales de las CGs murales inducidas por la LH. En la perra se ha descrito un incremento de la expresión génica de BMP-15, tanto en ovocito como células foliculares, que se observa desde folículos primordiales hasta las etapas antrales tempranas, pero sin el equivalente aumento en la etapa preovulatoria (Palomino y De los Reyes, 2016). Más aún, a nivel traduccional, Fernández *et al.* (2016), describieron un descenso en la secreción de GDF-9 Y BMP-15 en folículos preovulatorios, lo que los autores han relacionado al particular patrón de mucificación y reinicio meiótico en la perra.

Otsuka *et al.* (2000), demostraron por primera vez que BMP-15 actuaría principalmente sobre las CGs regulando su función en roedores. Esta proteína estimularía la proliferación de CGs indiferenciadas de folículos preantrales durante la etapa de la foliculogénesis independiente de gonadotrofinas.

Se ha demostrado que GDF-9 y BMP-15 presentan una dinámica particular en la perra en comparación a otras especies (Fernández *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de los estudios respecto a estos factores han sido realizados principalmente en ovocitos y en células foliculares (granulosa y teca), desconociéndose aún la producción de estos factores de las células del cúmulo en relación a su mucificación. Las CCs permanecen unidas al ovocito luego de la ovulación y la maduración del gameto continua después de la ovulación, por tanto, en esta investigación se estudió la expresión génica de estos factores paracrinos en las células del cúmulo y su relación con la expansión y la maduración nuclear del ovocito.

HIPÓTESIS

Dada la relevancia de GDF-9 y BMP-15 en el desarrollo del ovocito y la estrecha comunicación existente entre este y las células del cúmulo que lo rodean, se plantea que la expresión diferencial de los genes que codifican para GDF-9 Y BMP-15 en las células del cúmulo, antes y posterior al cultivo, está relacionada con la expansión y capacidad de maduración de los ovocitos en cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los genes que codifican para GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo en relación a la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos caninos y su grado de expansión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el nivel de los transcriptos (mRNA) de GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo en la perra de acuerdo a su desarrollo previo y posterior a la maduración *in vitro*.
2. Relacionar la expresión génica de *GDF-9* y *BMP- 15* con la expansión de las células del cúmulo y maduración meiótica del ovocito.
3. Determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para GDF-9 y BMP-15 en las células del cúmulo y su relación con la fase del ciclo estral de la perra.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), utilizando los protocolos aprobados previamente por los comités de Bioética de FONDECYT y de FAVET, con el consentimiento de los dueños de las perras.

A- Clasificación de folículos y recolección de COCs

Los ovarios para el estudio se obtuvieron de 198 perras sanas, de 6 meses a 6 años de edad, mestizas, luego de una ovariectomía rutinaria realizada en el Centro de Atención Primaria de Mascotas Santo Tomás y el Centro de Atención Primaria para Mascotas Pablo de Rokha. Adicionalmente, se extrajo de cada perra 3 mL de sangre, mediante canulación durante la cirugía, para medir posteriormente en el laboratorio las concentraciones de progesterona (P4) plasmática y así determinar el estado del ciclo estral de la perra (Prog ELISA Kit; MyBioSource, San Diego, CA, USA) de acuerdo a lo estandarizado en el laboratorio (Fernández *et al.*, 2016), en orden de confirmar el estado del ciclo reproductivo de cada donante.

Inmediatamente después de la cirugía, los ovarios fueron transportados al laboratorio en una solución salina (0,9% (w/v) NaCl más 100 UI/mL de penicilina G procaínica y 50 µg/mL de estreptomina a 38°C y procesados dentro de 2 horas posteriores. En el laboratorio, las muestras fueron mantenidas en solución fosfato salina (PBS): 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCL, 10 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄ a 38 °C en la estufa (ES-20/60, Biosan Sia, Latvia).

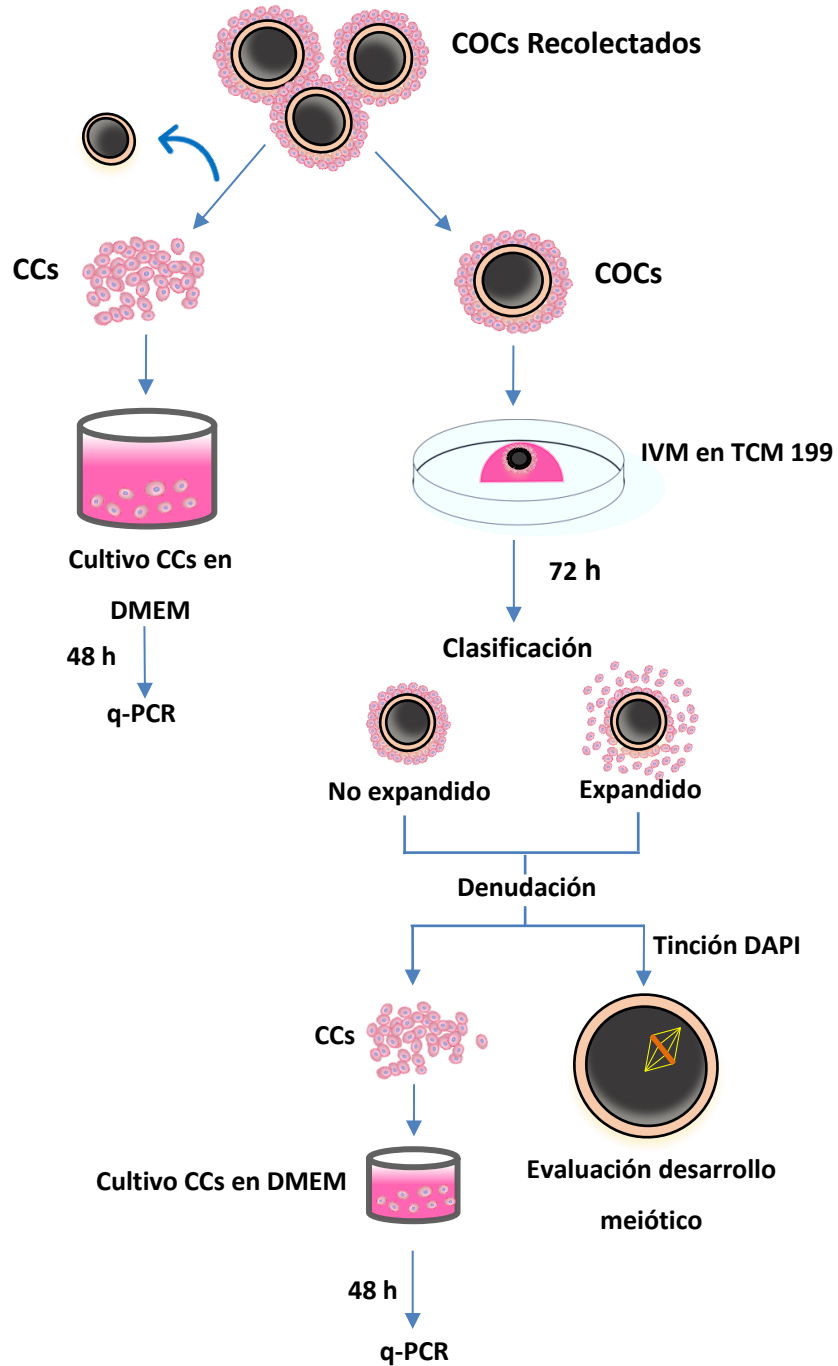
Adicionalmente, la fase del ciclo estral se determinó por la observación de la presencia de folículos y/o cuerpos lúteos y su estado del desarrollo en la superficie ovárica en las muestras de cada perra (De los Reyes *et al.*, 2017). Luego, los ovarios se seccionaron en trozos de aproximadamente 1 cm con un bisturí observando los cortes obtenidos bajo una lupa estereoscópica (Motic SMZ-171, Vancouver, Canadá). Se seleccionaron folículos que presentaban anro y un diámetro de sobre 0,25 mm para las etapas de anestro, diestro y proestro, mientras que en la etapa de estro se seleccionaron folículos grandes preovulatorios (4 mm – 10 mm de diámetro), que no se encuentran en otras etapas (Fernández *et al.*, 2016).

La obtención de los COCs se realizó mediante la liberación desde cada folículo antral previamente clasificado, utilizando una jeringa hipodérmica de 1 mL (U-100 Insulin, NIPRO, Indonesia). Luego, con una pipeta *Pasteur* de punta fina, los COCs se trasladaron a placas *Petri* (100 x 15mm, VWR) con dos medios diferentes dependiendo del procesamiento a realizar (Figura Nro. 1):

1.- Extracción de las células del cúmulo y cultivo celular, trasladándolas al medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (15-017-CMR, Corning, Manassas, VA, USA), alto en glucosa, suplementado (suero fetal bovino (FCS) 10%, 100 UI/mL penicilina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 100 µg/mL estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA)).

2.- Maduración de los COCs *in vitro*, depositándolos en medio de cultivo tisular (TCM199–25 mM HEPES; Earle's salt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)), suplementado con 10% suero fetal bovino (FCS), 0,25 mM piruvato (Sigma), 10 IU/mL de hCG (CG-5, Sigma), 300 IU/mL de penicilina (Sigma), 20 µg/mL de estreptomicina (Sigma) y 2 µg/mL de estradiol (E2) (E8875–1G, Sigma).

Figura Nro. 1: Esquema general de procesamiento de COCs sin madurar y madurados *in vitro* para la obtención de CCs y ovocitos. Los COCs sin madurar fueron denudados de sus CCs y estas se cultivaron por 48 h. Los COCs IVM se clasificaron en expandidos y no expandidos, para luego ser denudados de sus CCs y ser cultivadas por 48 h. Se evaluó el desarrollo meiótico en los ovocitos de COCs IVM.



1.- Procesamiento de las células del cúmulo de COCs

1.1.- Obtención de CCs no maduras

Los COCs previamente seleccionados se procesaron bajo ambiente de esterilidad en la sala de cultivo en la campana de flujo laminar. Con la ayuda de una lupa estereoscópica (Meiji Techno SKT, Japón), los COCs se lavaron 2 veces en gotas de medio de cultivo celular: DMEM alto en glucosa suplementado con FCS (Sigma) 10%, 100 UI/mL penicilina (Sigma) y 100 µg/mL estreptomina (Sigma). El medio de cultivo fue previamente entibiado en un baño de agua (Water Bath DSB-500D, Digisystem Laboratory Instruments Inc., Taiwan, China) a 38 °C por 10 minutos. Luego, en gotas de 100 µL de medio de cultivo, los ovocitos fueron desnudados de sus células del cúmulo con ayuda de una pipeta *Pasteur* de punta fina. Una vez obtenidas las CCs, los ovocitos se descartaron de la gota.

1.2.- Cultivo celular

Las células del cúmulo recolectadas desde los COCs obtenidos desde los folículos en cada etapa del ciclo estral fueron sometidas a cultivo celular en orden de obtener suficientes células para evaluación de los genes. Previo al cultivo, estas células se cuantificaron con un contador celular (TC20 Automated Cell Counter, BIO-RAD, Singapur), utilizando Trypan Blue 0.4% (#1450013, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) para determinar la viabilidad celular.

Bajo ambiente de esterilidad en la sala de cultivo, las CCs se sembraron en 1 mL del mismo medio de cultivo DMEM suplementado de acuerdo a lo señalado previamente, utilizando una concentración de 5×10^3 células/cm² en placas para cultivo celular Multiwell de 24 pocillos (#353047, Falcon, Corning, NY, USA). Las CCs fueron incubadas por 48 h a 38 °C y 5% de CO₂ en estufa de cultivo (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA) (Akagi *et al.*, 2003).

2.- Maduración de COCs *in vitro*

2.1.- Procesamiento

Otro grupo de COCs provenientes de los folículos antrales se lavaron 2 veces en medio TCM 199: sal de Earl, tamponada con 25 mM HEPES (Invitrogen), suplementado de acuerdo a lo señalado previamente (García *et al.*, 2019). El medio preparado estuvo en adaptación previa durante 2 h a 38 °C y 5% de CO₂ en una estufa de cultivo (Forma Scientific, Inc.). Luego, se prepararon placas (#351008, Falcon, Corning, NY, USA) con gotas de cultivo de 100 µL del medio suplementado, donde se depositaron no más de 10 ovocitos por gota, para posteriormente cubrirlos con aceite mineral estéril (M5904, Sigma). Los COCs se clasificaron de acuerdo al estado del ciclo de la donante y fueron incubados por 72 horas a 38 °C y 5% de CO₂ en estufa de cultivo (Forma Scientific, Inc.) en máxima humedad.

2.2.- Recolección y cultivo de CCs provenientes de ovocitos madurados *in vitro*:

Luego de la maduración *in vitro* se evaluó la expansión de las CCs de cada COC mediante un microscopio de luz invertida (Nikon TMS 301953, Tokyo, Japón), clasificándolos en no expandidos cuando las CCs presentaban leve respuesta o ninguna de las capas de células separadas del ovocito y entre ellas (Figura Nro. 2. a y b), y en expandidos cuando se observaron separaciones notorias entre las CCs (Figura Nro. 2. c, d y e).

Luego, los COCs según su clasificación, fueron lavados 2 veces en gotas de 100 µL con DMEM alto en glucosa suplementado. Posteriormente, los ovocitos fueron desnudados por remoción mecánica de sus CCs con una pipeta *Pasteur* de punta fina. Las CC obtenidas en la recolección fueron sometidas a cultivo celular de igual forma a lo descrito anteriormente en células del cúmulo de COCs sin madurar *in vitro*.

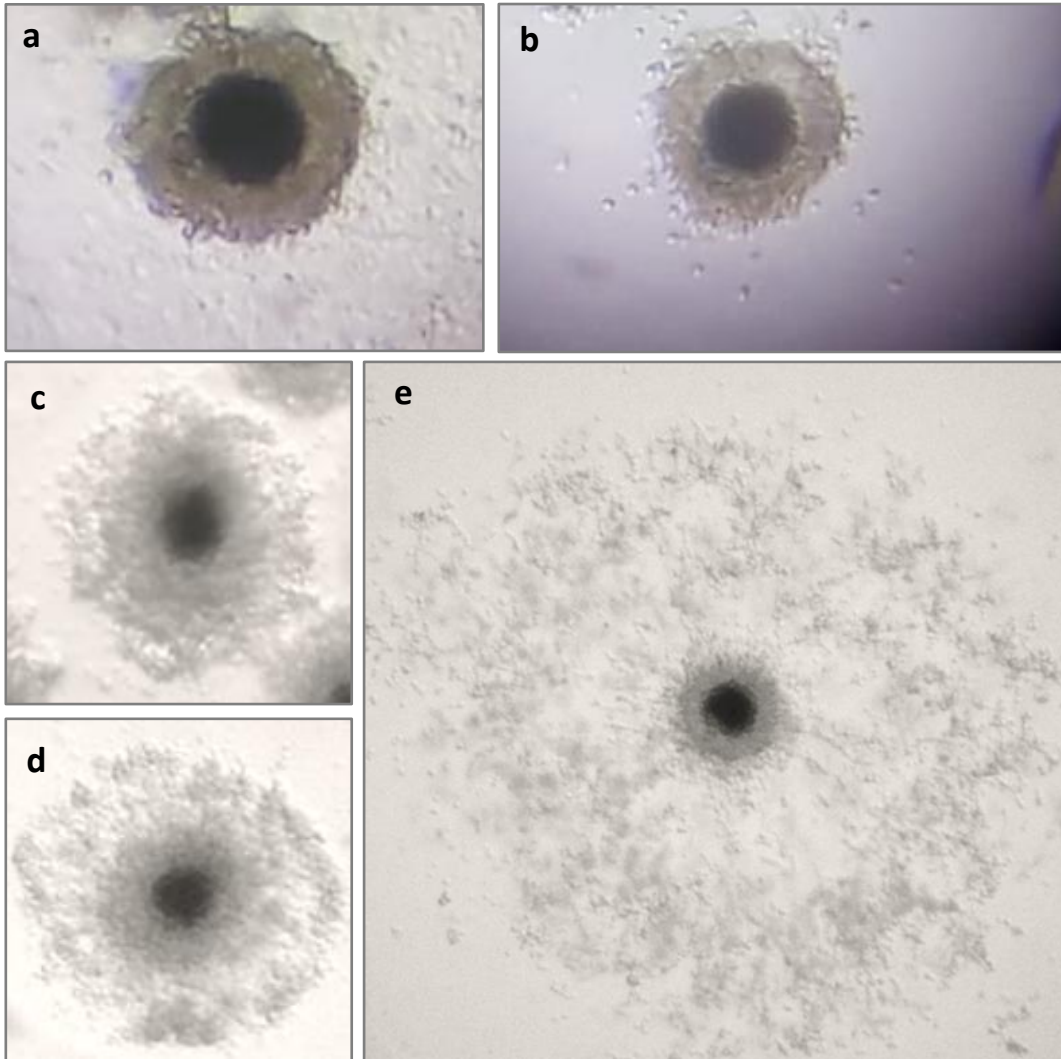


Figura Nro. 2. Complejos cúmulo ovocito caninos (COCs) después de 72 h de maduración *in vitro*. **a y b**, COCs sin expansión del cúmulo. **c, d y e**, COCs con diferentes grados de expansión del cúmulo.

2.3.- Fijación de ovocitos madurados *in vitro*:

Para la visualización del desarrollo meiótico, los ovocitos madurados *in vitro* denudados de sus células del cúmulo se fijaron en paraformaldehído 4% por 30 minutos y luego lavados en PBS 2 veces por 5 minutos cada uno. Posteriormente, se dejaron por 5 minutos en una solución 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA), volviendo a realizar 2 lavados en PBS por 5 minutos cada uno, para retirar el excedente de la solución de tinción (De los Reyes *et al.*, 2011). Finalmente, los ovocitos fueron puestos en un portaobjetos con medio de montaje para

fluorescencia (Vectashield ®; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) entre hilillos de parafina/vaselina y cubiertos con un cubreobjeto.

2.4.- Evaluación del estado meiótico de los ovocitos madurados *in vitro*:

Los ovocitos desnudos se evaluaron utilizando un microscopio de epifluorescencia invertida (Olympus IX71) (emisión UV de 480 nm) del laboratorio, equipado con una lámpara IX2-RFA y una cámara ProgRes-Capture Pro (Olympus; Tokio, Japón). El estado de desarrollo meiótico se clasificó de acuerdo a lo descrito previamente (De los Reyes *et al.*, 2011), en breve: (I) vesícula germinal (VG), cuando la vesícula está claramente visible (Figura Nro. 3. a); (II) reanudación meiótica (VGBD, cuando la cromatina está dispersa e iniciando la condensación) (Figura Nro. 3. b); (III) metafase de la primera división meiótica (MI), cuando los cromosomas están condensados y presentes en la línea ecuatorial o cuando están migrando hacia los polos (Figura Nro. 3. c); (IV) y metafase de la segunda división meiótica (MII), la cual se manifiesta por la presencia de cromosomas en el eje ecuatorial del ovocito metafásico, con el primer cuerpo polar extruido (Figura Nro. 3. d). Los ovocitos a los que no fue posible distinguir estructuras nucleares o que presentaron una distribución de cromatina irregular o cromatina anormal, fueron considerados ovocitos no evaluables y se descartaron.

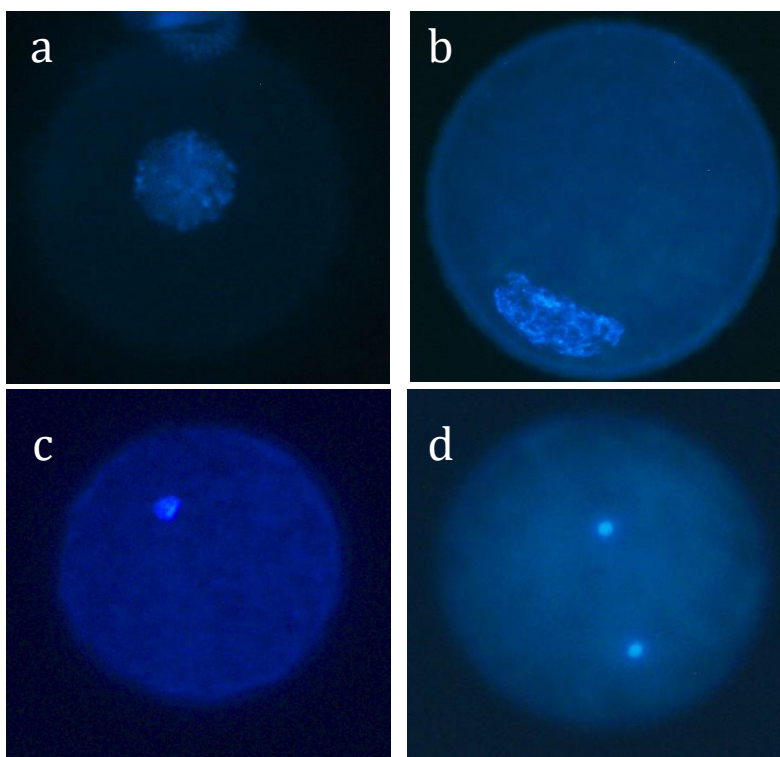


Figura Nro. 3. Microfotografías del desarrollo meiótico de ovocitos caninos madurados *in vitro* no expandidos y expandidos teñidos con DAPI. **a**, Vesícula Germinal (VG); **b**, reanudación meiótica (breakdown) (VGBD); **c**, Primera metafase (MI); **d**, Segunda metafase (MII).

3.- Obtención de las CCs en cultivo para extracción de RNA y q-PCR:

Transcurridas las 48 h del cultivo celular, se evaluó la adherencia de las CCs en cultivo bajo un microscopio de luz invertida (Nikon TMS 301953, Japón). El medio de cultivo fue retirado del pocillo y las CCs adheridas fueron lisadas utilizando el Kit GeneJet RNA purification (Thermo Scientific, Eugene, OR, USA). El RNA total de las CCs se extrajo a través de una columna de afinidad incluida en el Kit previamente mencionado, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total fue cuantificada mediante fluorimetría utilizando un aparato Qubit® Fluorometer (Invitrogen™, Eugene, OR, USA) y el Kit de cuantificación Qubit® RNA Assay (Molecular Probes®, Invitrogen™). Posteriormente el RNA de las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento. Para la obtención del DNA complementario (cDNA), se procesaron las muestras para transcripción reversa (RT) usando el conjugado enzimático SuperScript™ First- Strand

Synthesis System (Invitrogen™, Eugene, OR, USA) el cual incluye un tratamiento inicial con DNasa I. La concentración del cDNA se determinó utilizando el Kit de cuantificación Qubit® ssDNA Assay (Molecular Probes® Invitrogen™). Una vez obtenido el cDNA, éste fue almacenado a -20 °C.

4.- PCR en tiempo real (q-PCR):

Las amplificaciones se realizaron con un termociclador Illumina® Eco Real Time PCR System Model EC-100-1001 (San Diego, CA, USA). Cada 12,5 µl de reacción estuvo compuesto por: 6,25 µl de Máxima SYBR Green/Fluoresceína qPCR Master Mix (2X; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), una concentración de 0,2- 0,6 mM de cada partidor, 10 ng de cDNA y se completó el volumen diferencial con agua libre de nucleasas que incluye el kit. Para la cuantificación de los niveles de mRNA de GDF-9 y BMP-15 se utilizaron los partidores diseñados por Cho *et al.* (2016) y Palomino y De los Reyes (2016), respectivamente. Para el análisis referencial se utilizó como gen constitutivo *β-actina*, diseñado por Palomino y De los Reyes (2016) (Tabla Nro. 1).

Tabla Nro. 1: Secuencia del diseño de partidores de los genes en estudio y el gen de referencia para el análisis de qPCR.

| Gen | Oligos (5'– 3') | Amplicón (bp) | Referencia |
|---------------|--|---------------|-------------------------------|
| <i>ACTB</i> | F: ATTGTCATGGACTCTGGGGATG R: TCCTTGATGTCACGCACGAT | 191 | Palomino y De Los Reyes, 2016 |
| <i>GDF-9</i> | F: TACCCCATCCCTGCTTTTA R: TCCACCTTCAGTCGATTCTT | 155 | Cho <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>BMP-15</i> | F: CCCTGCCCTGATTTCGGGAG R: CCGCAAAGGATGCCCAAGGAC | 82 | Palomino y De Los Reyes, 2016 |

Las reacciones se montaron en microplacas ECOPLATE 48 (Bibby Scientific, ST, UK), las cuales se sellaron con un *film* adhesivo óptico y se realizaron las siguientes condiciones de PCR: primero se llevó a cabo una etapa inicial de desnaturalización del DNA durante 15

min a 95 °C. Luego, se realizaron 40 ciclos de amplificación: desnaturalización durante 15 segundos a 94 °C, hibridación por 30 segundos a aproximadamente 60 °C (dependiendo en el Tm específico de cada par de partidor) y extensión por 30 segundos a 72 °C. Se utilizó un protocolo de disociación con un gradiente de 60 °C a 95 °C para investigar la especificidad de la reacción q-PCR y la presencia de los dímeros del partidor. Los niveles de expresión génica fueron registrados como valores Ct, que corresponde al número de ciclos donde la señal de fluorescencia puede ser detectada sobre un valor umbral. Los valores Cts promedios de cada réplica biológica fueron calculados y transformados en valores relativos *Quantity* (Q) a través del Método $\Delta\Delta Ct$. Luego, la cuantificación de la expresión relativa de *GDF-9* y *BMP-15* fue estimada como el cociente entre el valor Q del gen analizado y el Q del gen de referencia (Bustin *et al.*, 2009). Se incluyeron muestras controles sin templado y sin partidores en cada q-PCR.

5.- Análisis Estadístico

Para el análisis de la expresión de los genes *GDF-9* y *BMP-15*, se realizaron 3 réplicas experimentales para el q-PCR de CCs provenientes de COCs según etapa del ciclo, antes y después de la maduración *in vitro* y de acuerdo al estado de expansión (N = 494). Las diferencias en los niveles de expresión relativa de ambos genes en las CCs provenientes de los COCs no madurados y madurados *in vitro*, fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) y posterior *Test* de Duncan, utilizando como variables la maduración *in vitro*, la etapa del ciclo y el estado de expansión.

Se evaluó el desarrollo meiótico en un total de 372 COCs, considerando ~50 ovocitos madurados *in vitro* por cada etapa del ciclo y estado de expansión, los cuales provinieron de 141 perras. Las posibles diferencias entre cada etapa del ciclo y su estado de expansión dentro de los diferentes estados del desarrollo fueron evaluadas mediante ANOVA y posterior *Test* de Duncan, utilizando como variables la etapa del ciclo, estado de expansión en el caso de los COCs madurados *in vitro* y la interacción entre estos.

Todos los análisis se realizaron con el Programa InfoStat 2018 considerando como valor de significancia $P < 0,05$.

RESULTADOS

1.- Evaluación del desarrollo meiótico de ovocitos madurados *in vitro*:

El número de ovocitos evaluados y los porcentajes del desarrollo meiótico obtenidos de acuerdo a la etapa del ciclo estral y el grado de expansión de sus células del cúmulo se muestran en la Tabla Nro. 2.

Tabla Nro. 2: Desarrollo meiótico de ovocitos caninos madurados *in vitro* según grado de expansión y etapa del ciclo estral de la perra.

| Etapa del ciclo | Exp | Desarrollo Meiótico (%) | | | | Ovocitos (N) |
|-----------------|-----|-------------------------|------------------|----|------------------|--------------|
| | | VG | VGBD | MI | MII | N |
| Anestro | + | 0 | 37 ^{ab} | 53 | 10 ^{ab} | 51 |
| | - | 7 | 37 ^{ab} | 48 | 7 ^{ab} | 54 |
| Proestro | + | 0 | 60 ^c | 36 | 4 ^{ab} | 53 |
| | - | 9 | 21 ^a | 57 | 13 ^{ab} | 56 |
| Estro | + | 6 | 21 ^a | 56 | 18 ^b | 34 |
| | - | 5 | 26 ^a | 68 | 0 ^a | 19 |
| Diestro | + | 4 | 50 ^{bc} | 39 | 7 ^{ab} | 46 |
| | - | 5 | 22 ^a | 56 | 17 ^b | 59 |

VG, vesícula germinal; VGBD, reinicio meiótico; MI, primera metafase; MII, segunda metafase. N número de ovocitos evaluables. Exp, expansión de las células del cúmulo.

^{a, b, c} Dentro de una columna, valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Se observó que luego de la IVM, en general no hubo diferencias significativas entre las etapas del ciclo estral según expansión o no expansión de las CCs al comparar los ovocitos que permanecieron en VG o los que alcanzaron los estados de MI del desarrollo meiótico. Sin embargo, los COCs obtenidos de proestro y diestro que expandieron sus CCs, pudieron en mayor porcentaje reiniciar la meiosis, alcanzando el estado de VGBD en comparación a los COCs provenientes de las demás etapas del ciclo estral. En la etapa de estro para el estado

de MII hubo diferencias ($P < 0,05$) entre los ovocitos que tenían sus CCs expandidas respecto a aquellos con sus CCs sin expandir (Tabla Nro. 2).

2.- Niveles de mRNA

De las tres réplicas experimentales evaluadas de acuerdo a etapa del ciclo, maduración *in vitro* y estado de expansión, se obtuvo expresión de ambos genes en todas las etapas del ciclo estral analizadas, tanto antes como después de la maduración en cultivo. Sin embargo, se observó una clara diferencia ($P < 0,05$) en estos niveles de acuerdo al estado de expansión de las células del cúmulo y la maduración *in vitro* del ovocito.

Los niveles de expresión relativa del mRNA de GDF-9 y BMP-15 en las CCs se presentan en la Figura Nro. 4 y 5.

Los niveles de expresión relativa de ambos genes en las CCs provenientes de COCs en las etapas de anestro (Figura Nro. 4. a y b) y proestro (Figura Nro. 4. c y d), fueron menores ($P < 0,05$) en los COCs no madurados *in vitro* respecto a aquellas CCs de COCs sometidos a maduración.

En la etapa de estro (Figura Nro. 4. e y f) solo fue posible comparar la expresión génica de las CCs provenientes de COCs sin madurar y CC de COCs madurados *in vitro* con expansión del cúmulo, ya que muy pocos COCs no lograron expandir sus CCs luego de la maduración. Se observó que, a diferencia de las etapas anteriores, la mayor expresión ($P < 0,05$) de los dos genes se da en las CCs de COCs sin madurar *in vitro*. De igual forma, en la etapa de diestro (Figura Nro. 4. g y h), los niveles de expresión génica de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs provenientes de COCs sin madurar fueron significativamente mayores en comparación a las CCs de COCs madurados *in vitro* que no expandieron sus células del cúmulo. Sin embargo, al igual que anestro y proestro, se observaron los mayores ($P < 0,05$) niveles de *GDF-9* en CCs provenientes de COCs que lograron la expansión del cúmulo.

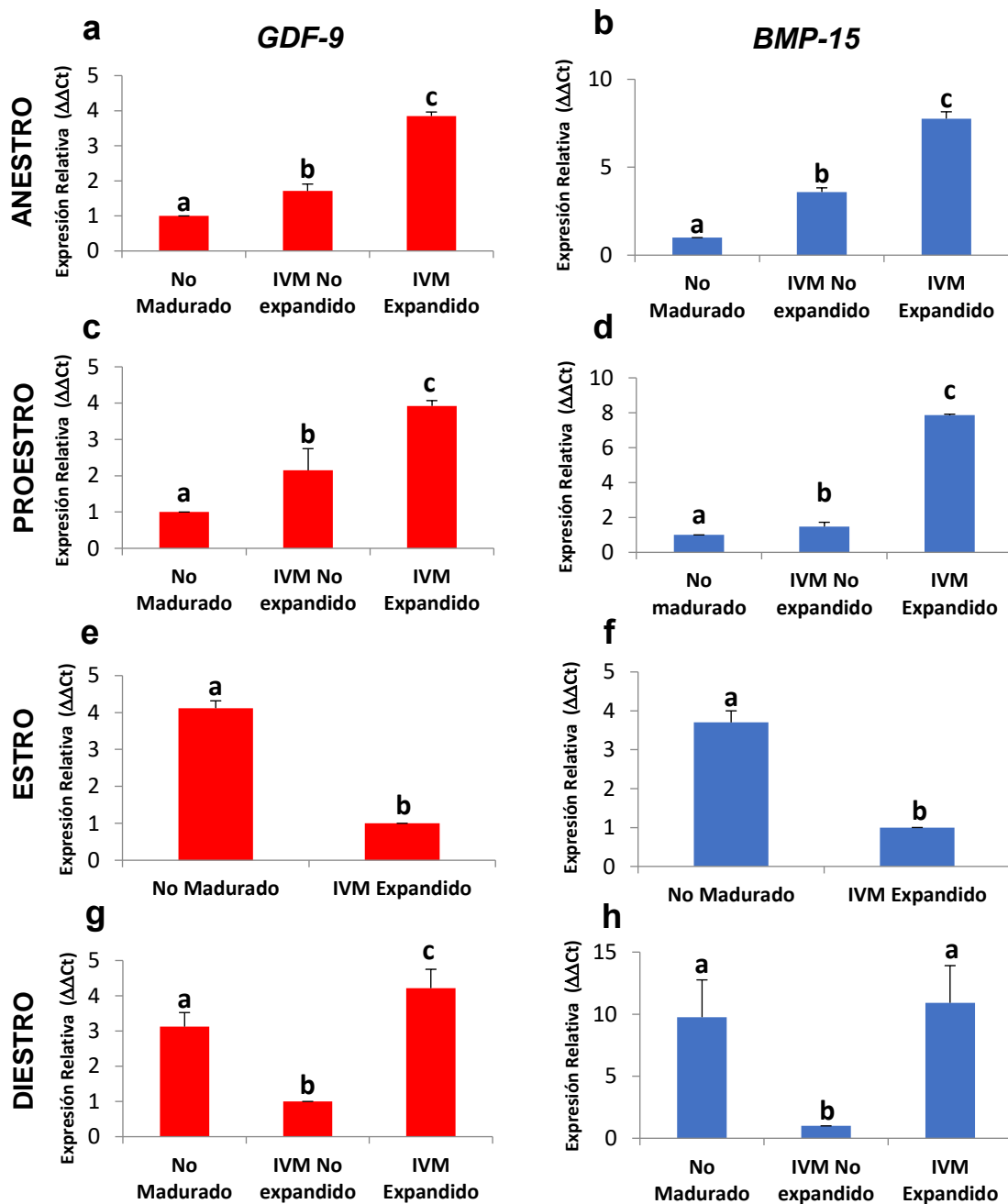


Figura Nro. 4. Expresión relativa de los genes *GDF-9* y *BMP-15* en células del cúmulo de COCs sin madurar, COCs madurados *in vitro* no expandidos y madurados *in vitro* expandidos durante las etapas de Anestro (a y b), Proestro (c y d), Estro (e y f) y Diestro (g y h). Los niveles de *GDF-9* (a, c, e y g) y *BMP-15* (b, d, f y h) fueron expresados en relación al gen de referencia β -ACTINA. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Previo a la maduración *in vitro*, en la etapa de anestro y proestro, se observaron los menores niveles de expresión ($P < 0,05$) de *GDF-9* y *BMP-15* (Figura Nro. 5. a y c), registrándose el mayor nivel de expresión de *GDF-9* en estro y de *BMP-15* en estro y diestro ($P < 0,05$; Figura Nro. 5. a y c). Al comparar la expresión de ambos transcritos en las CCs que se expandieron después de la IVM, no se encontró diferencias en las entre las etapas del ciclo estral en *GDF-9* (Figura Nro. 5. b), pero en *BMP-15* la menor expresión se observó en estro ($P < 0,05$); sin diferencias entre las otras etapas del ciclo (Figura Nro. 5. d).

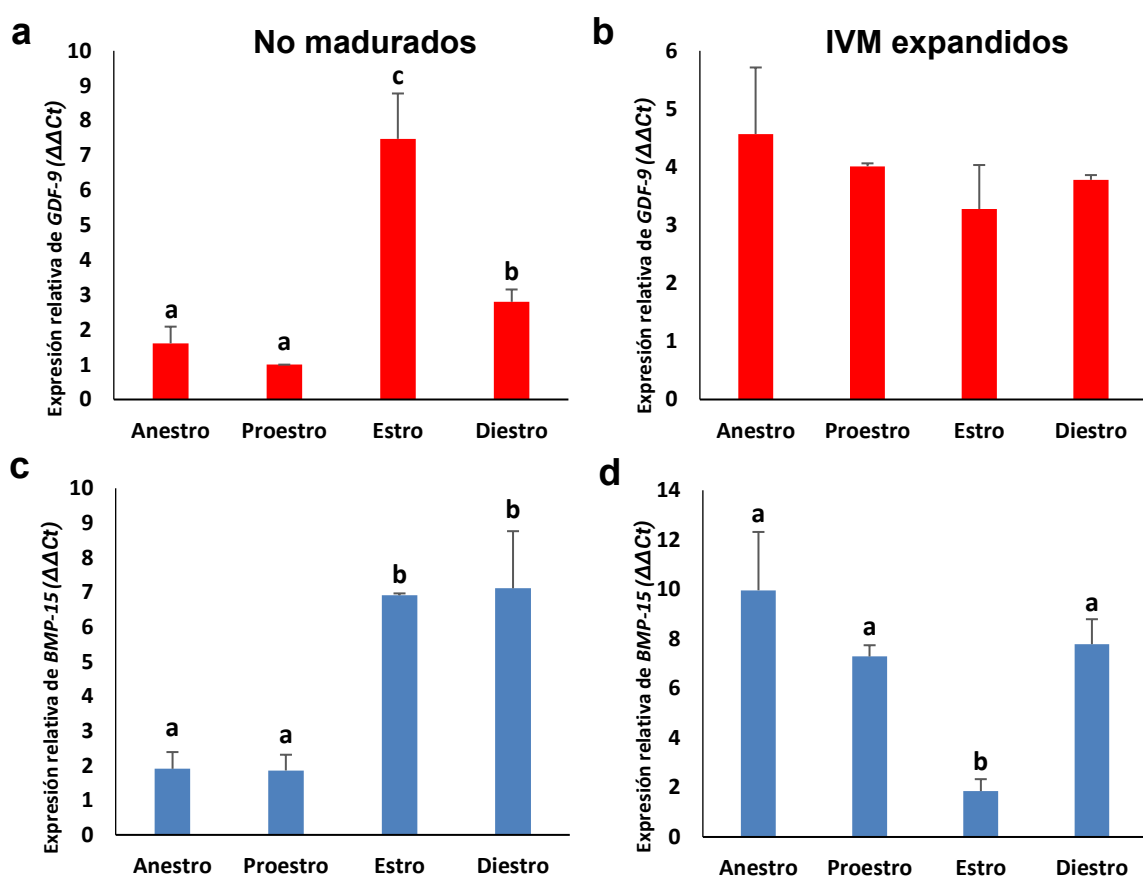


Figura Nro. 5. Expresión relativa de los genes *GDF-9* (a y b) y *BMP-15* (c y d) en células del cúmulo de COCs sin madurar (a y c) y madurados *in vitro* expandidos (b y d) durante la etapa de Anestro, Proestro, Estro y Diestro. Los niveles de *GDF-9* y *BMP-15* fueron expresados en relación al gen de referencia β -ACTINA. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los factores paracrinicos GDF-9 y BMP-15 han sido ampliamente estudiados en las varias especies de mamíferos, llegando a ser considerados dentro de los más importantes para el desarrollo folicular y la maduración del ovocito (Gilchrist *et al.*, 2004; Paulini *et al.*, 2011). Tanto GDF-9 como BMP-15 han sido asociados a los denominados “factores promotores de la expansión del cúmulo” (CEEFs por sus siglas en ingles), los cuales son indispensables para la expansión del cúmulo y la maduración del ovocito (Eppig, 2001; Russell *et al.*, 2016). Aunque recientemente, se ha demostrado que GDF-9 y BMP-15 son factores que también influyen en el desarrollo meiótico de los ovocitos caninos (García *et al.*, 2019), aún se desconocen muchas de sus funciones en esta especie. En el presente estudio, se logró determinar por primera vez la relación existente entre la expresión génica de ambos factores y la expansión del cúmulo en los COCs caninos.

Mediante la técnica de q-PCR, fue posible determinar en las CCs de perra la presencia de los genes que codifican para GDF-9 y BMP-15 antes y después de la maduración *in vitro*, lo que confirma lo reportado previamente en caninos (De los Reyes *et al.*, 2013, Maupeu *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). Además, los genes que codifican para GDF-9 y BMP-15 se observaron en las CCs provenientes de distintas etapas del ciclo de la perra, presentando diferencias entre ellas. Esto es coincidente con lo observado en estudios previos en células de la granulosa (Fernández *et al.*, 2016; Palomino y De los Reyes, 2016), en el ovocito canino (Palomino y De los Reyes, 2016) canino.

Al comparar la expresión de ambos genes entre las etapas del ciclo, en estro y diestro los niveles de los transcritos de *GDF-9* y *BMP-15* previo a la maduración fueron mayores en relación a los de anestro y proestro. Estas diferencias podrían explicarse por las características fisiológicas de la perra, donde el pick de LH se presenta delimitando la etapa de proestro y estro, marcando el inicio del estro (Concanon, 2011). En anestro y proestro, por tanto, los folículos no han sido expuestos aún a los efectos del alza de LH, mostrando niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* menores. Se ha descrito que previo al pick de LH, la mayor actividad se presenta en las células de la granulosa en relación a la proliferación y estereidogénesis (Eppig, 2001). Por el contrario, las CCs mantienen un rol en la regulación

metabólica del ovocito en procesos como la glicolisis y la síntesis de colesterol, ambos regulados mediante GDF-9 y BMP-15 (Sugiura *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2008). Luego del pick de LH, la actividad principal de las CCs consiste en regular la expresión de genes relacionados a la maduración final del ovocito y a la expansión del cúmulo (Sánchez y Smitz, 2012). Por lo tanto, los mayores niveles observados en estro en relación al anestro y proestro, podrían estar asociados a la actividad que presentan las CCs en cada una de estas etapas.

Por otro lado, los menores niveles en diestro en comparación al estro, pudieran relacionarse con el efecto del cuerpo lúteo y las concentraciones de P4 sobre los folículos en crecimiento (Quezada *et al.*, 2018), ya que si bien en la perra los COCs son expuestos a concentraciones crecientes de P4 a nivel periférico y en el ambiente folicular previo a la ovulación (Concanon, 2011), se desconoce el efecto directo de esta hormona en los COCs de folículos en desarrollo en caninos, especialmente durante el diestro, ya que en esta etapa del ciclo los niveles de FSH y LH bajan (Concanon, 2011) y la P4 tiene una función claramente antagonotrófica (Coss, 2018). Se ha descrito que las CCs caninas presentan receptores de P4 (Gonçalves *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no está claro la influencia de la P4 sobre la expresión de *GDF-9* y *BMP-15*. A pesar de esto, se ha descrito que existe una correlación negativa entre los niveles de P4 y GDF-9 en el líquido folicular de mujer (Gode *et al.*, 2011). Del mismo modo, los niveles de GDF-9 disminuyen en presencia de los altos niveles de P4 en quistes foliculares de bovino (Polat *et al.*, 2015), lo que podría implicar que la progesterona podría tener una función en la regulación de estos factores.

Los mayores niveles de *GDF-9* observados en las CCs sin madurar obtenidos en estro difieren de lo descrito en las células foliculares y ovocitos en trabajos previos (Palomino y De los Reyes, 2016), donde se encontraron los mayores niveles del gen en etapa preantral en anestro, lo que no se evaluó en este estudio, ya que se trabajó con células del cúmulo en etapa diferenciada. Sin embargo, se ha descrito que los niveles del gen de *BMP-15* en el ovocito y folículos aumentan gradualmente de la etapa preantral a antral en anestro y diestro para permanecer estable en estro, coincidiendo parcialmente con lo observado en este estudio en las células del cúmulo. No obstante, considerando que el mayor sitio de producción de estas

proteínas es a nivel del ovocito (Palomino y De los Reyes, 2016), el nivel de expresión en las células del cúmulo no tiene necesariamente que ser coincidente.

Los niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* se vieron influenciados debido a la maduración *in vitro* y al grado de expansión de las CCs. Luego de la maduración *in vitro* los patrones de expresión relativa de los genes de *GDF-9* y *BMP-15* de anestro y proestro fueron mayores en aquellas CCs de COCs que presentaron expansión del cúmulo en comparación a aquellas CCs que no expandieron sus células o que no fueron maduras *in vitro*. Esto sugiere que tanto *GDF-9* como *BMP-15* estarían relacionados con la mucificación en etapas tempranas del desarrollo folicular en la perra. La asociación de estos factores con la expansión del cúmulo ha sido vastamente estudiada en otras especies como el ratón (Dragovic *et al.*, 2005; Gui y Joyce, 2005; Gueripel *et al.*, 2006) y el bovino (Machado *et al.*, 2015), donde la adición o inhibición de estos factores repercutiría en la expansión del cúmulo. Los mayores niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* observados en las CCs expandidas tendrían, por tanto, coincidencia con lo descrito en otras especies, ya que estos factores actuarían promoviendo la expresión de distintos genes en las CCs, tales como hialuronano sintasa 2 (*HAS2*), ciclooxygenasa 2 (*COX2*), pentraxina 3 (*PTX3*) y el factor de necrosis tumoral alfa inducido por proteína 6 (*TNFAIP6*), los cuales son indispensables en la regulación de la expansión del cúmulo (Caixeta *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015). Estudios en curso en el laboratorio, han demostrado que la adición de *GDF-9* y *BMP-15* recombinante en el medio de cultivo promovería la expresión de los genes de *HAS2*, *COX2* y *TNFAIP6* en las CCs provenientes de COCs caninos madurados *in vitro* (datos no publicados), por lo que estos factores podrían tener un rol similar en la perra durante la expansión del cúmulo. Sin embargo, estas proteínas disminuirían la expresión de *PTX3* (datos no publicados), lo que podría estar asociado al patrón característico de expansión en la perra, ya que se ha observado que la disminución de su expresión comprometería la expansión (Varani *et al.*, 2002).

A pesar de los altos niveles observados en las CCs de estro previo a la maduración, los niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs expandidas maduras *in vitro* durante esta etapa fueron aproximadamente cuatro veces menores en relación a las no

maduradas. Esta disminución sería coincidente con la actividad transcripcional característica durante la etapa preovulatoria, ya que la competencia meiótica del ovocito es adquirida gradualmente a través del desarrollo folicular debido a la interacción existente entre éste y las CCs que lo rodean (Epigg, 2001; Otoi *et al.*, 2001; Songsasen y Wildt 2005). Esta competencia consistiría en la transcripción, almacenamiento y procesamiento del mRNA que se utilizará en la síntesis de proteínas que influirán directamente en los eventos celulares posteriores (Landim-Alvarenga y Maziero, 2014). Sin embargo, una vez alcanzado el estado de folículos preovulatorios durante la foliculogénesis, luego del pick de LH se presenta un silencio transcripcional en el periodo previo al reinicio meiótico (De la Fuente, 2006; Sánchez y Smith, 2012). Durante el anestro, proestro y diestro de la perra, los folículos son incapaces de desarrollarse hasta alcanzar el estado preovulatorio, apreciándose folículos antrales grandes únicamente en la etapa de estro (Concanon, 2011). En este estudio, las CCs utilizadas durante el estro fueron obtenidas de COCs provenientes de folículos grandes o preovulatorios, por lo que los altos niveles de expresión observados previo a la maduración *in vitro* podrían estar asociados a la acumulación de transcritos durante el desarrollo folicular hasta la etapa preovulatoria. Por el contrario, a pesar de los mayores niveles de mRNA de *GDF-9* y *BMP-15* observados durante el diestro en las CCs de COCs sin madurar, los niveles de expresión de estos factores en las CCs expandidas fueron mayores para *GDF-9* e iguales en cuanto a *BMP-15*, demostrando así una actividad transcripcional activa durante esta etapa.

Los porcentajes de MII en los ovocitos de estro que expandieron sus CCs fueron mayores en comparación a los que no lo hicieron, ya que no se alcanzó esta etapa de desarrollo en ningún ovocito con sus células del cúmulo no expandidas. Este hecho es coincidente con los menores niveles de *GDF-9* y *BMP-15* observados en las CCs expandidas en comparación a las sin madurar, por lo que posiblemente los COCs de estro no requerirían en esta etapa del desarrollo niveles elevados de estas proteínas para expandir sus células del cúmulo ni para el reinicio meiótico, lo que corrobora trabajos previos en la expresión de estas proteínas *in vivo* antes de la ovulación (Fernández *et al.*, 2016), como en la IVM y después de ovulados (De los Reyes *et al.*, 2013). Aunque el porcentaje de MII obtenido *in vitro* en esta etapa sigue siendo menor a lo observado *in vivo* (De los Reyes *et al.*, 2013). Por lo tanto,

GDF-9 y BMP-15 participarían en la expansión del cúmulo, pero al parecer se requieren eventos adicionales para la maduración nuclear del ovocito canino.

Por otro lado, a pesar de las alzas significativas en los niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs expandidas de anestro, proestro y diestro, en este estudio no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de MII al considerar la interacción entre la etapa del ciclo y el grado de expansión. Esto es concordante con lo observado por diversos autores, donde no se detectan diferencias en la capacidad de alcanzar la MII en ovocitos provenientes de distintas etapas del ciclo (Hewitt y England, 1997; De Avila Rodrigues y Rodrigues, 2003; Songsasen y Wildt, 2005). El efecto de la etapa del ciclo sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* de los ovocitos caninos aun es controversial, ya que otros estudios han determinado que las mayores tasas de maduración se producen en ovocitos de estro (Yamada *et al.*, 1993; Luvoni *et al.*, 2001; Otoi *et al.*, 2001). Sin embargo, estos últimos autores obtuvieron los resultados mediante la técnica de *slicing*, mientras que al considerar la calidad del ovocito (Hewitt y England, 1997; Otoi *et al.*, 2001; De Avila Rodrigues y Rodrigues, 2003) o el tamaño folicular desde donde son obtenidos (Songsasen y Wildt, 2005), no se observan diferencias entre las etapas del ciclo, lo cual es congruente, en parte, con el presente estudio.

Por otro lado, estudios previos han determinado que la expansión del cúmulo en la perra no tendría un efecto significativo en la proporción de ovocitos que alcanzan el estado de MII (Bolamba *et al.*, 2006). Los hallazgos de este estudio durante la maduración *in vitro* difieren de lo observado en otras especies como los porcinos (Torner *et al.*, 2004), equinos (Torner *et al.*, 2007) y camélidos (Moulavi y Hosseini, 2018), en los cuales la expansión del cúmulo ha sido asociada a un mayor éxito en la probabilidad de alcanzar el estado de MII. Las diferencias existentes entre la perra y las demás especies podrían radicar en los niveles de expresión de *GDF-9* y *BMP-15* en las CCs. El aumento en niveles de estos genes en las CCs ha sido relacionado positivamente con la capacidad de alcanzar el estado de MII (Li *et al.*, 2014), ya que ambos estimularían la expresión y actividad de la MAPK en las CCs, la cual es requerida en distintos procesos de maduración, como la expansión del cúmulo y el reinicio meiótico (Su *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2014). La actividad de esta

proteína aumenta principalmente durante el reinicio meiótico en especies como el porcino y el murino (Wehrend y Meinecke, 2001). Sin embargo, en la perra, la actividad de MAPK se ve postergada hasta las etapas de MI y MII durante la maduración *in vitro* (Saint-Dizier *et al.*, 2004). La particular actividad de MAPK en la perra podría estar asociado a la incapacidad de las CCs caninas para activar esta proteína mediante GDF-9 y BMP-15, lo cual podría explicar, en parte, las bajas tasas de maduración nuclear *in vitro* y el patrón de mucificación característico en la perra.

En conclusión, en este estudio fue posible determinar que los genes de GDF-9 y BMP-15 se expresan en las CCs en todas las etapas del ciclo, presentando diferentes patrones en cada una ellas; previo y posterior a la maduración *in vitro*. Además, la expresión de ambos genes estarían involucrados en la expansión del cúmulo en caninos, lo cual podría estar relacionado con la maduración meiótica *in vitro*, al menos en aquellos ovocitos en etapa estral.

BIBLIOGRAFÍA

AKAGI, S.; TAKAHASHI, S.; ADACHI, N.; HASEGAWA, K.; SUGAWARA, T.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, E.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. 2003. In vitro and in vivo developmental potential of nuclear transfer embryos using bovine cumulus cells prepared in four different conditions. *Cloning Stem Cells*. 5(2):101-108.

BOLAMBA, D.; RUSS, K.; HARPER, S.; SANDLER, J.; DURRANT, B. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology*. 65(6):1037-1047.

BUSTIN, S.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.; SHIPLEY, G.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55(4):611-622.

CAIXETA, E.; SUTTON-MCDOWALL, M.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J.; PRICE, C.; MACHADO, M.; LIMA, P.; BURATINI, J. 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*. 146(1):27-35.

CHO, SJ.; LEE, KL.; KIM, YG.; KIM, DH.; YOO, JG.; YANG, BC.; PARK, JK; KONG, IK. 2016. Differential gene –expression profiles from canine cumulus cells of ovulated versus in vitro-matured oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 28(3):278-285.

CONCANNON, P. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 124(3-4):200-210.

COSS, D. 2018. Regulation of reproduction via tight control of gonadotropin hormone levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 463:116–130.

CRAWFORD, J.; MCNATTY, K. 2012. The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348(1):339-343.

DE AVILA RODRIGUES, B.; RODRIGUES, J. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology.* 60(1):59-66.

DE LA FUENTE, R. 2006. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol.* 292(1):1-12.

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):1-11.

DE LOS REYES, M.; PALOMINOS, J.; PARRAGUEZ, V.; HIDALGO, M.; SAFFIE, P. 2011. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 75(2):346-353.

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(6):587-596.

DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; RAMIREZ, F. 2017. Analysis of LH receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Theriogenology.* 93:71-77.

DRAGOVIC, R.; RITTER, L.; SCHULZ, S.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D.; GILCHRIST, R. 2005. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology.* 146(6):2798-2806.

DRAGOVIC, R.; RITTER, L.; SCHULZ, S.; AMATO, F.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, D.; GILCHRIST, R. 2007. Oocyte-Secreted Factor Activation of SMAD 2/3 Signaling Enables Initiation of Mouse Cumulus Cell Expansion. *Biol. Reprod.* 76(5):848-857.

EPPIG, JJ. 2001. Oocyte control of the ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122(6): 829-838.

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. *Anim. Reprod. Sci.* 167:59-67.

GARCIA, P.; ASPEE, K.; RAMIREZ, G.; DETTLEFF, P.; PALOMINO, J.; PERALTA, O.; PARRAGUEZ, V.; DE LOS REYES, M. 2019. Influence of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 54(2):373-380.

GILCHRIST, R.; RITTER, L.; ARMSTRONG, D. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:431-446.

GODE, F.; GULEKLI, B.; DOGAN, E.; KORHAN, P.; DOGAN, S.; BIGE, O.; CIMRIN, D.; ATABEY, N. 2011. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertil. Steril.* 95(7):2274-2278.

GONÇALVES, J.; VANNUCCHI, C.; BRAGA, F.; PAULA-LOPES, F.; MILAZZOTTO, M.; ASSUMPCAO, M.; VISINTIN, J. 2009. Oestrogen and progesterone receptor gene expression in canine oocytes and cumulus cells throughout the oestrous cycle. *Reprod. Domest. Anim.* 44(2):239-242.

GUÉRIPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. 2006. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol. Reprod.* 75(6):836-843.

GUI, L.; JOYCE, I. 2005. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol Reprod.* 72(1):195-199.

HEWITT, D.; ENGLAND, G. 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51:83-91.

HOSOE, M.; KANEYAMA, K.; USHISAWA, K.; HAYASHI, KG.; TAKAHASHI, T. 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:33.

KALAB, P.; SRSEN, V.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; MOTLIK, J.; HAFNE, A. 1997. MAP kinase activation and RAF-1 synthesis of blue fox oocytes is controlled by cumulus granulose cells. *Theriogenology.*47:400.

KIDDER, G.; VANDERHYDEN, B. 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88(4):399-413.

LANDIM-ALVARENGA, F.; MAZIERO, R. 2014. Control of oocyte maturation. *Anim. Reprod.* 11(3):150-158.

LEE, S; OH, H.; KIM, M.; KIM, G.; CHOI, Y.; JO, Y.; SETYAWAN, E.; LEE, B. 2017. Oocyte maturation-related gene expression in the canine oviduct, cumulus cells, and oocytes and effect of co-culture with oviduct cells on in vitro maturation of oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 34(7):929-938.

LI, Y.; LI, R.; OU, S.; ZHANG, N.; REN, L.; WEI, L.; ZHANG, Q.; YANG, D. 2014. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:81.

LIN, Z.; LI, Y.; XU, Y.; WANG, Q.; NAMGOONG, S.; CUI, X.; KIM, N. 2014. Effects of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 on the in vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 49(2):219-227.

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. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*57:141-146.

MACHADO, M.; CAIXETA, E.; SUDIMAN, J.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J.; LIMA, P.; PRICE, C.; BURATINI, J. 2015. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology.* 84(3):390-398.

MAUPEU, D., PALOMINO, J., DE LOS REYES, M., (2014). Immunohistochemistry localization of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) in canine follicles throughout estrus cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 27(1): 182.

MOULAVI, F.; HOSSEINI, S. 2018. Diverse patterns of cumulus cell expansion during in vitro maturation reveal heterogeneous cellular and molecular features of oocyte competence in dromedary camel. *Theriogenology.* 119:259-267.

NORRIS, R.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.; COWAN, A.; SIMON, A.; PAUL, D., LAMPE, P.; JAFFE, L. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development.* 135(19):3229-3238.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N.; SUZUKI, T. 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 13(2-3):151-155.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.; SHIMISAKI, S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* 275(50):39523-39528.

PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M. 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology.* 86(6):1541-1549.

PANGAS, S.; MATZUK, M. 2005. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod.* 73(4):582-5.

PAULINI, F.; MELO, E. 2011. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod. Domest. Anim.* 46(2):354-361.

PENG, J.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; RANGARAJAN, A.; KATTAMURI, C.; PETERSON, R.; EPPIG, J.; THOMPSON, T.; MATZUK, M. 2013. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110(8):776-785.

POLAT, I.; ALÇIĞIR, E.; PEKCAN, M.; VURAL, S.; ÖZENÇ, E.; CANATAN, H.; KÜPLÜLÜ, Ş.; DAL, G.; YAZLIK, M.; BAKLACI, C.; VURAL, M. 2015. Characterization of transforming growth factor beta superfamily, growth factors, transcriptional factors, and lipopolysaccharide in bovine cystic ovarian follicles. *Theriogenology.* 84(6):1043-1052.

PROCHAZKA, R.; NEMCOVA, L.; NAGYOVA, E.; KANKA, J. 2004. Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 71(4):1290-1295.

QUEZADA, A.; MARTÍNEZ, K., ITZÁ, M.; ESCÁRCEGA, A.; PÉREZ, E.; FILIPIAK, Y.; LARocca, C.; CARRERA, J. 2018. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests, *Journal of Applied Animal Research*, 46(1): 967-972.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. 130(2):193-201.

REYNAUD, K.; DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. 72(8):1120-1131.

RUSSELL, D.; GILCHRIST, R.; BROWN, H.; THOMPSON, J. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players?. *Theriogenology*. 86(1):62-68.

SAINT-DIZIER, M.; REYNAUD, K.; CHASTANT-MAILLARD, S. 2001. Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 68(2):205-212.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1822(12):1896-1912.

SILVA, J.; VAN DER HURK, R.; VAN TOL, H.; ROELEN, B.; FIGUEIREDO, J. 2005. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* 70(1):11-19.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. 2005. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 72(1):113-119.

SU, Y.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J. 2002. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology.* 143(6):2221-2232.

SU, Y.; DENEGRÉ, J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J. 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev. Biol.* 263(1):126-138.

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. *Development.* 135(1):111-121.

SUGIURA, K.; SU, Y.; DIAZ, F.; PANGAS, S.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.; MATZUK, M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development.* 134(14):2593-2603

TORNER, H.; BRÜSSOW, K.; ALM, H.; RATKY, J.; PÖHLAND, R.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W. 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology.* 61(9):1675-1689.

TORNER, H.; ALM, H.; KANTZ, W.; GOELLNITZ, K.; BECKER, F.; POEHLAND R.; BRUESSOW, K.; TUCHSCHERER, A. 2007. Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. *Reprod. Domest. Anim.* 42(2):176-183.

VARANI, S.; ELVIN, J.; YAN, C.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F.; HORTON, H.; BYRNE, M.; MATZUK, M. 2002. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol. Endocrinol.* 16(6):1154-67.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim. Reprod. Sci.* 66(3-4):175-184.

WINTERHAGER, E; KIDDER, G. 2015. Gap junctions connexins in female reproductive organs: implications for women´s reproductive health. *Hum. Reprod. Update.* 21:340-352.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl.* 47:227-229.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(28):10678-10683.

ZHANG, M.; SU, YQ.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science.* 330(6002):366-369.