

# EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGÉNICA ÓSEA 15 (BMP-15) DURANTE LA MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS CANINOS

Expression of bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) during *In vitro* maturation in canine oocytes.

Rodrigo Andrés Castro-Sánchez <sup>1</sup> y Jaime Alfredo Palomino-McKenney <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago de Chile. Becario CONICYT \* Teléfono: 56 9 87906221; Correo electrónico: rocavet@gmail.com

## RESUMEN

Este trabajo caracteriza el patrón de expresión de BMP-15 durante la maduración *in vitro* de ovocitos caninos. BMP-15 es un factor folicular relacionado a la maduración del ovocito, el cual participa en la expansión de las células del *cumulus* (mucificación) y el reinicio meiótico, sin embargo aún no ha sido descrito en caninos, donde estos eventos ocurren en forma retardada, dificultando la replicación de las condiciones de maduración en el laboratorio y limitando el éxito de la tasa de maduración de ovocitos, donde BMP-15 sea un posible responsable de estos eventos. Por medio de Western Blotting e inmunofluorescencia indirecta, BMP-15 fue evaluado en Complejos *Cumulus* Ovocito canino (COCs) cultivados durante 48; 72 y 96 horas, según el grado de mucificación y la progresión meiótica. BMP-15 está presente en el ovocito y en las células del *cumulus*, aumentando sus niveles significativamente a medida que el cultivo progresa ( $P < 0,05$ ). BMP-15 tiene un rol relevante en la maduración del ovocito canino pues está relacionado con la mucificación y su progresión meiótica.

**Palabras clave:** BMP-15; canino; células del *cumulus*; maduración del ovocito.

## ABSTRACT

This research aims to characterize the pattern of expression of BMP-15 during *in vitro* maturation of canine oocyte. BMP-15 is a follicular factor related to the oocyte maturation, taking part in *cumulus* cells expansion and resumption meiotic, however still has not been described in the bitch, whose *cumulus* expansion and meiotic resumption occurs with delay, hindering the replication in labs condition, limiting the success rate in the *in vitro* maturation of oocytes. BMP-15 is a possible responsible. By mean of western blotting and indirect immunofluorescence, BMP-15 was evaluated in canine *cumulus* oocyte complex (COCs) cultured during 48, 72 and 96 hours. BMP-15 is present both oocyte and *cumulus* cells increased its level significantly ( $P < 0.05$ ) while *in vitro* culture progress. BMP-15 is related whit meiotic progression and *cumulus* cells expansion. So, BMP-15 has a role in the oocyte maturation of the bitch.

**Key words:** BMP-15; canine; *cumulus* cells; oocyte maturation.

## INTRODUCCIÓN

La maduración citoplasmática y nuclear del ovocito son eventos fundamentales para una correcta fecundación y desarrollo embrionario. La mayoría de los mamíferos ovulan un ovocito maduro en metafase II (MII) [12] y en estado de competencia citoplasmática, es decir, con redistribución de organelos y almacenamiento de transcritos, nutrientes y factores del crecimiento [10]. Además, cercano a la ovulación ocurre expansión de las células del *cumulus* que rodean al ovocito (mucificación), proceso asociado con el reinicio meiótico [7, 11]. A través de la producción de diversos factores de crecimiento, el ovocito juega un rol protagónico, tanto en la regulación y promoción del desarrollo folicular, como en su propia maduración, estableciendo una comunicación paracrina y bidireccional con las células del *cumulus* [6, 26]. Uno de estos factores es la proteína morfogénica ósea 15 (BMP-15), miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ampliamente relacionada a la reproducción mamífera. BMP-15 es expresado principalmente en el ovocito y reconocido por receptores BMPRII (ALK6) en las células de la teca y del *cumulus* [11, 13, 16]. BMP-15 ha demostrado ser un regulador crítico de la actividad de las células de la granulosa, donde su función ha sido relacionada con estimular mitosis y prevenir apoptosis [9]; promover glicólisis y biosíntesis del colesterol [25]; sensibilización a la hormona luteinizante (LH) [27] y suprimir la producción de progesterona (P4) y receptores a FSH [17]; expansión celular mediante regulación de expresión de hialuronon sintetasa 2 (Has2) [11, 14, 24]. Por esto se ha relacionado a la fertilidad de ratones *Mus musculus* [7], ovejas *Ovis orientalis* [15], cerdos *Sus scrofa* [11] y humanos [28]. Sin embargo, su secreción y rol biológico son especie-específicos, dificultando la extrapolación de datos. Esto justifica su estudio dirigido en cada modelo biológico [29]. El modelo canino, *Canis lupus familiaris*, de maduración de ovocitos, es diferente al de otros mamíferos pues los ovocitos son ovulados sin haber reanudado la primera división meiótica, con su núcleo en estado diploide inmaduro (profase I) y las células del *cumulus* fuertemente unidas al ovocito, alcanzando la maduración meiótica (MII) y mucificación en el oviducto, 2 a 5 días (d) luego de la ovulación. Además, las concentraciones plasmáticas de P4 comienzan a incrementarse antes del peak preovulatorio de LH, así los folículos experimentan luteinización preovulatoria [2, 19, 23], por lo que la expresión de BMP-15 en la perra ha sido puesta en duda. Todas estas características han dificultado la maduración *in vitro* de ovocitos caninos, cuya tasa de éxito (MII) no sobrepasa el 20% [1]. Este hecho restringe la aplicación de biotecnologías reproductivas en la perra y caninos silvestres en riesgo.

Este estudio propone que en caninos, el inusual patrón de mucificación y retardo en el reinicio meiótico puede estar relacionado a diferentes patrones de expresión de BMP-15, por lo que se evaluó su presencia y patrón de expresión durante el cultivo *in vitro* de ovocitos caninos, en relación a la progresión meiótica y mucificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El uso de animales ha sido aprobado por el comité de bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

### Recolección de ovarios y ovocitos

Ovarios y oviductos fueron obtenidos de perras mestizas clínicamente sanas, de 1 a 6 años y en diferentes estados del ciclo. Luego de la ovariectomía, los tejidos fueron transportados al laboratorio, durante 30 minutos, en Suero Buffer fosfato (PBS) a 37°C, y mediante cortes finos de los ovarios se obtuvieron y seleccionaron bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10, Japón) complejos *cumulus* ovocito (COCs) utilizando los siguientes criterios: Citoplasma oscuro y uniforme, diámetro >100  $\mu$ m y rodeado por al menos 3 capas de células del *cumulus* [4]. Los COCs fueron procesados como no madurados o sometidos a maduración *in vitro*.

### Maduración *in vitro* de ovocitos

Quince a 20 COCs fueron cultivados en gotas (100  $\mu$ L) de medio de cultivo TCM-199 suplementado (25 mM HEPES, 10% suero fetal bovino, 0,25 mM de piruvato, 10 IU/mL de hCG, 100 IU/mL de penicilina y 0,2 mg/mL de estreptomina) por 48; 72 y 96 horas (h) a 38,5 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada (3166, Forma Scientific, Inc, EUA) [1]. Se realizaron 4 réplicas por cada experimento.

### Maduración *in vivo* de ovocitos

Mediante lavado con PBS a 37°C, se obtuvieron COCs de oviductos de perras, 2 a 3 d luego de su ovulación. El momento de ovulación fue estimado antes de la cirugía, utilizando citología vaginal, concentración plasmática de progesterona y ecografía Doppler color (Mindray, Z5 Vet, EUA), según reportes previos [1, 3].

Los COCs obtenidos por diversos métodos y en distintos tiempos de cultivo, fueron procesados intactos o se les extrajo las células del *cumulus* (denudados) mediante pipeteo, conformando 2 grupos: COCs y ovocitos denudados, BMP-15 se evaluó en ambos grupos usando Western Blotting e inmunofluorescencia indirecta. Sólo en los COCs se evaluó expansión en las células del *cumulus*.

### Evaluación de la expansión de las células del *cumulus* (mucificación).

Utilizando un microscopio invertido (Nikon TMS 301953, Tokyo, Japón) a 200x de magnificación se evaluó el grado de expansión de las células del *cumulus*, en base a la siguiente categorización: 0) No expandido; 1) Mínima expansión; 2) Expansión de las células más externas; 3) expansión de todas las capas del *cumulus* menos de la corona radiada; 4) expansión de todas las capas. [18].

### Inmunofluorescencia de BMP-15

Se utilizó el anticuerpo policlonal antihumano BMP-15 (AF2925, R&D Systems, EUA) en dilución 1/100 y anticuerpo secundario conjugado a Isotiocinato de Fluoresceína (FITC) (SC2356) en dilución 1/1500. Se consideró un control negativo usando sólo el segundo anticuerpo [1]. Mediante microscopio Olympus IX71 Japón, equipado con cámara Olympus ProgRes-Capture Japón, se obtuvo imágenes en escala de grises y se calculó la fluorescencia total corregida (CTCF) [1], estableciendo 3 patrones de fluorescencia: Bajo (B) menor a  $5 \times 10^6$ ; Medio (M) entre 5 y  $10 \times 10^6$ ; Alto (A) mayor a  $10 \times 10^6$ . Para la inmunolocalización se usó microscopía confocal (Zeiss 410-Axiovert 100, Jena, Alemania) usando una láser de 543 nm en magnificación de 200X.

### Evaluación de progresión meiótica nuclear

Los ovocitos fueron incubados por 10 minutos a temperatura ambiente con DAPI  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  (4'-6-diamidino-2-phenylindole staining) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA) para ser evaluados en el microscopio. Según la configuración de la cromatina, fueron clasificados en: Vescícula germinativa (GV), Ruptura de la Vescícula (GVBD); Metafase I (MI) y Metafase II (MII) [3].

### Western Blotting para BMP-15

100 ovocitos desnudos y 100 COCs de cada grupo fueron sometidos a Western Blotting según reportes previos [1] utilizando anticuerpo primario policlonal contra BMP-15 humano (AF2925, R&D Systems, EUA) en dilución 1/100 y anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (*rabbit anti-goat IgG-AP*, SC-2771) en dilución 1/300. Los sitios inespecíficos se bloquearon en TBS-Tween al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) más 5% de leche descremada. Para detectar la reactividad del anticuerpo, se utilizó el método enzimático de la fosfatasa alcalina, en solución de BCIP/NBT (SC-24981) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EUA).  $\beta$ -actina (Goat policlonal IgG Actin, SC-1615) fue utilizado como control de carga. La intensidad de banda se calculó a través del programa GEL-PRO ANALYZER V3.1 (Media Cybernetics, Inc., MD, EUA) [1].

### Análisis estadístico

La prueba de independencia de Pearson [1] fue utilizada para determinar asociación entre el tiempo de cultivo y la expansión de las células del *cumulus*, así como también para determinar asociación entre las variables tiempo de cultivo, patrón de fluorescencia y progresión meiótica. ANOVA con posterior prueba de Tukey [1] fue utilizado para comparar la densidad de banda en western blotting. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson [1] entre intensidad de banda y grado de mucificación. Se utilizó el software InfoStat Professional Program, Versión 2004 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), considerando un 95% de significancia estadística.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

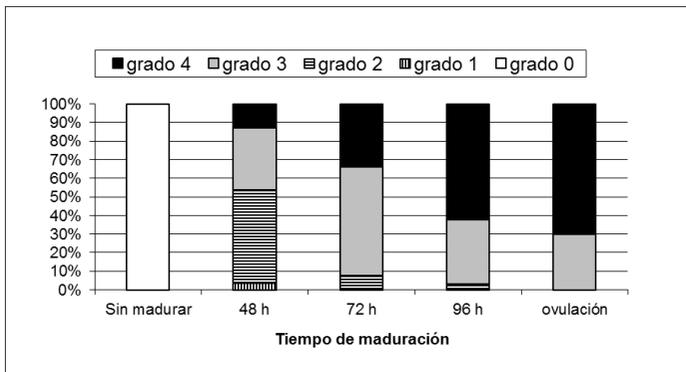
Los materiales y métodos utilizados en esta investigación fueron útiles para reconocer, por primera vez en la perra, la presencia de BMP-15 durante la maduración de ovocitos. Este estudio, también fue capaz de determinar el patrón de expresión de BMP-15 y relacionarlo a la progresión meiótica y la mucificación, dos eventos que ocurren tardíamente en la perra, por lo que permite abrir la discusión sobre el verdadero papel e importancia biológica de esta proteína en la maduración de ovocitos caninos. Estudios realizados en individuos homocigóticos recesivos para BMP-15, determinaron la ocurrencia de trastornos de fertilidad, sin embargo, mientras que en ovinos ésta se explicaba por fallas en los primeros momentos del desarrollo folicular [5, 15], en ratas *Rattus rattus* se explicó por fallas cercanas a la ovulación [29], demostrando especie-especificidad en el rol biológico de BMP-15, justificando el estudio dirigido en cada especie. Estudios funcionales en caninos deben ser realizados.

### Expansión de las células del *cumulus*

El grado de mucificación incrementó en relación al tiempo de maduración (Pearson Ji cuadrado  $_{(16)} = 2,7e03$  (Pr = 0.00001). Mientras que el 100% de los ovocitos no madurados mostraron nivel 0 de expansión, un progresivo y significativo aumento en la expansión celular fue visto durante la progresión de la maduración *in vitro*. Los ovocitos madurados *in vivo* no presentaron nivel 0 de expansión y por el contrario presentaron el mayor porcentaje de nivel 4 (FIG. 1). Si bien, todos los COCs no madurados mostraron grado de expansión 0, diversos grados de expansión se determinaron durante el cultivo, aumentando progresivamente durante la maduración y alcanzando significación estadística a partir de las 48 h, lo cual concuerda con lo informado anteriormente para la perra [1]. La mucificación progresiva también está descrita para las cerdas [11, 18], sin embargo, en esta especie la significación estadística se logra tempranamente (18 h de cultivo) lo que permite inferir que en la perra hay una mayor estabilidad de las uniones intercelulares entre el *cumulus* y el ovocito, o que los mecanismos biológicos que la producen están retardados. En el presente estudio, los mayores grados de expansión celular ocurrieron a las 96 h de cultivo *in vitro* y en los COCs ovulados, siendo significativamente mayores en estos últimos, generando una discusión similar a la establecida en informes anteriores [1, 3], en relación a que las condiciones *in vitro* utilizadas actualmente no imitan de buena manera las condiciones *in vivo*, alcanzando estados de submaduración.

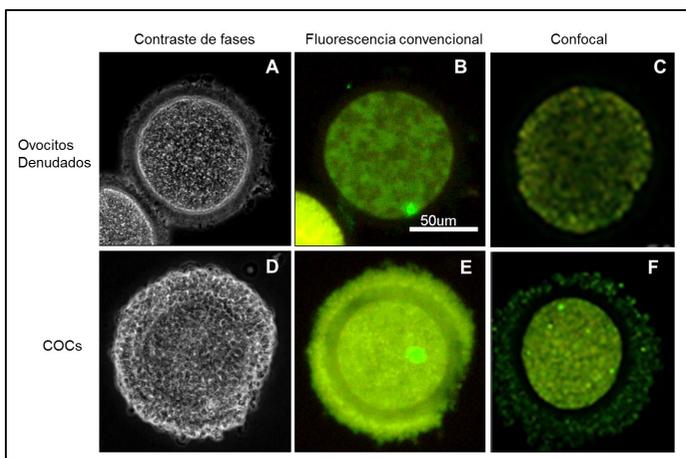
### Inmunofluorescencia BMP15

Técnicas de microscopía confocal (Zeiss 410-Axiovert 100, Jena, Alemania) y fluorescencia convencional (microscopio Olympus IX71 Japón) fueron de utilidad para inmunolocalizar la proteína BMP-15 determinando su presencia y distribución espacial en COCs y ovocitos caninos. El anticuerpo policlonal contra BMP-15 humano (AF2925, R&D Systems, EUA), fue de utilidad para reconocer, por primera vez en la perra, la presencia



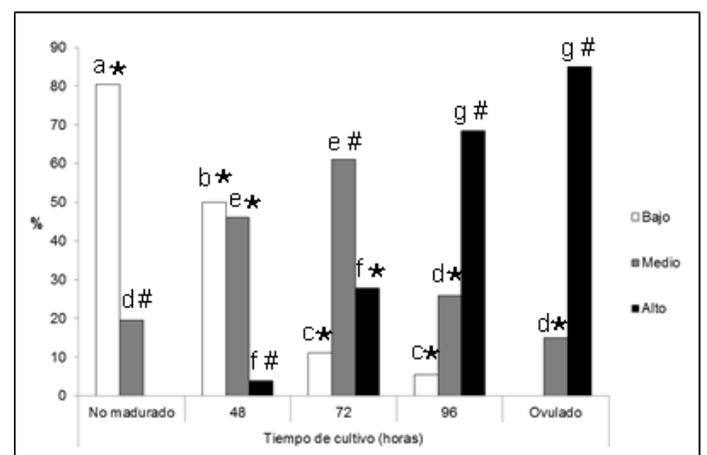
**FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE COACS CANINOS SEGÚN GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO Y TIEMPO DE MADURACIÓN**

de BMP-15, lo cual denota una gran conservación de esta proteína entre especies. La ausencia de inmunomarcaje en el control negativo determinó la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. BMP-15 estuvo presente, tanto en las células del *cumulus* como en el ovocito (FIG. 2). Esta información concuerda con los reportes en bovinos *Bos taurus*, caprinos *Capra aegagrus* y porcinos *Sus scrofa* [8, 17, 18, 22], pero difiere con el modelo murino *Mus musculus*, donde la presencia de ARNm y proteínas BMP15 sólo se ha reportado en el ovocito [29]. En datos no publicados, del laboratorio donde se realizó este trabajo, los niveles de ARNm para BMP-15 aumentaron progresivamente durante el desarrollo folicular y la maduración *in vitro* de ovocitos caninos, tanto en las células del *cumulus* como en el ovocito, este hecho permite inferir que la presencia y la síntesis de la proteína ocurre en ambos tipos celulares.



**FIGURA 2. INMUNOLocalización DE BMP15 EN OVOCITOS DENUDADOS (A, B Y C) Y EN COACS (D, E Y F) USANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (A Y D), FLUORESCENCIA CONVENCIONAL (B Y E) Y CONFOCAL (C Y F).**

Los patrones de intensidad de inmunofluorescencia Bajo (B) y Alto (A) mostraron un comportamiento inverso a lo largo del cultivo (FIG. 3). Mientras el patrón B disminuyó progresivamente, el patrón A aumentó alcanzando significancia ( $P < 0,05$ ) desde las 96 h de cultivo. El mayor porcentaje de patrón A fue reconocido en los ovocitos ovulados. El patrón Medio (M) incrementó progresivamente alcanzando su máximo porcentaje a las 72 h de cultivo para luego disminuir progresivamente. La intensidad de fluorescencia está relacionada con el tiempo de cultivo (Pearson Ji cuadrado  $(8) = 157,0633$  Pr = 0,0001). La tinción DAPI [1], permitió reconocer la progresión meiótica a lo largo del cultivo (FIG. 4), permitiendo determinar asociación entre el tiempo de cultivo y la progresión meiótica (Pearson Ji cuadrado  $(12) = 283,7183$  Pr = 0,0001) representado por un mayor porcentaje de vesícula germinativa (VG) al inicio del cultivo y un incremento del porcentaje de MII a medida que el cultivo progresa. La intensidad de fluorescencia (BMP-15) está relacionada a la progresión meiótica (Pearson Ji cuadrado  $(6) = 94,665$  Pr = 0,0001) (TABLA I). Las condiciones utilizadas en este estudio para la maduración *in vitro* permitieron que los ovocitos de la perra consiguieran reanudar la meiosis desde GV al estado nuclear MII, logrando correlacionar los niveles de proteína con la progresión meiótica. Doce de 54 ovocitos cultivados durante 96 h llegaron al estado nuclear MII (22,2% MII), este porcentaje está de acuerdo con lo informado anteriormente para la perra [1]. Además se correlacionó la progresión meiótica con la mucificación, ambos eventos se producen en forma retardada en la perra y su relación se ha descrito en otras publicaciones, principalmente a través de la activación del Factor promotor de la Mitosis (PMF) dado a la disminución del AMPc generada por la interrupción de las uniones comunicantes entre ovocito y las células del *cumulus* en etapas preovulatorias [20, 21]. El retardo en la mucificación, durante la maduración de ovocitos caninos, se ha señalado como un factor que contribuye al retardo en la reanudación meiótica y el bajo éxito de la maduración *in vitro* de ovocitos caninos.



**FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL PATRÓN DE INMUNOFUORSCENCIA DE BMP-15 (BAJO, MEDIO, ALTO) EN OVOCITOS DE PERRA SEGÚN TIEMPO DE CULTIVO. Letras distintas indican diferencia entre barras ( $P < 0,05$ ) a, b y c: Patrón bajo; d y e: Patrón medio; f y g: Patrón alto. \*, #: Símbolo distinto dentro de grupo denotan diferencia ( $P < 0,05$ )**

**TABLA I**  
**DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE OVOCITOS DENUDADOS DE PERRA CON DISTINTOS TIEMPOS DE MADURACIÓN, SEGÚN PATRÓN DE EXPRESIÓN DE BMP-15 Y GRADO DE PROGRESIÓN MEIÓTICA.**

| Grupos de ovocitos     | Patrón de expresión BMP-15 | Grados de Progresión meiótica |                            |                             |                             | Total N = 231 (%) |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                        |                            | GV = 44                       | GVBD = 32                  | MI = 114                    | MII = 41                    |                   |
| No madurados<br>N = 51 | A                          | -                             | -                          | -                           | -                           | -                 |
|                        | M                          | 8 (15,69) <sup>a,A</sup>      | 2 (3,92) <sup>a,B,x</sup>  | -                           | -                           | 10 (19,61)        |
|                        | B                          | 35 (68,63) <sup>b,A,x</sup>   | 6 (11,76) <sup>b,B,x</sup> | -                           | -                           | 41 (80,39)        |
| IVM por 48h<br>N = 52  | A                          | -                             | 1 (1,92) <sup>a</sup>      | 1 (1,92) <sup>a,x</sup>     | -                           | 2 (3,85)          |
|                        | M                          | -                             | 9 (17,31) <sup>b,A,y</sup> | 13 (25,00) <sup>b,A,x</sup> | 2 (3,85) <sup>B,x</sup>     | 24 (46,15)        |
|                        | B                          | 1 (1,92) <sup>A,y</sup>       | 6 (11,54) <sup>c,B,x</sup> | 19 (36,54) <sup>c,C,x</sup> | -                           | 26 (50,00)        |
| IVM por 72h<br>N = 54  | A                          | -                             | -                          | 10 (18,52) <sup>a,A,y</sup> | 5 (9,26) <sup>a,B,x</sup>   | 15 (27,78)        |
|                        | M                          | -                             | 4 (7,41) <sup>a,A,x</sup>  | 26 (48,15) <sup>b,B,y</sup> | 3 (5,56) <sup>b,A,x</sup>   | 33 (61,11)        |
|                        | B                          | -                             | 1 (1,85) <sup>b,A,y</sup>  | 4 (7,41) <sup>c,B,y</sup>   | 1 (1,85) <sup>c,A</sup>     | 6 (11,11)         |
| IVM por 96h<br>N = 54  | A                          | -                             | 1 (1,85) <sup>a,A</sup>    | 28 (51,85) <sup>a,B,z</sup> | 8 (14,81) <sup>a,C,y</sup>  | 37 (68,52)        |
|                        | M                          | -                             | 2 (3,70) <sup>a,A,x</sup>  | 9 (16,67) <sup>b,B,z</sup>  | 3 (5,56) <sup>b,A,x</sup>   | 14 (25,93)        |
|                        | B                          | -                             | -                          | 2 (3,70) <sup>c,A,y</sup>   | 1 (1,85) <sup>c,A</sup>     | 3 (5,56)          |
| Ovulados<br>N = 20     | A                          | -                             | -                          | 2 (10,00) <sup>A,x</sup>    | 15 (75,00) <sup>a,B,z</sup> | 17 (85,00)        |
|                        | M                          | -                             | -                          | -                           | 3 (15,00) <sup>b,x</sup>    | 3 (15,00)         |
|                        | B                          | -                             | -                          | -                           | -                           | -                 |

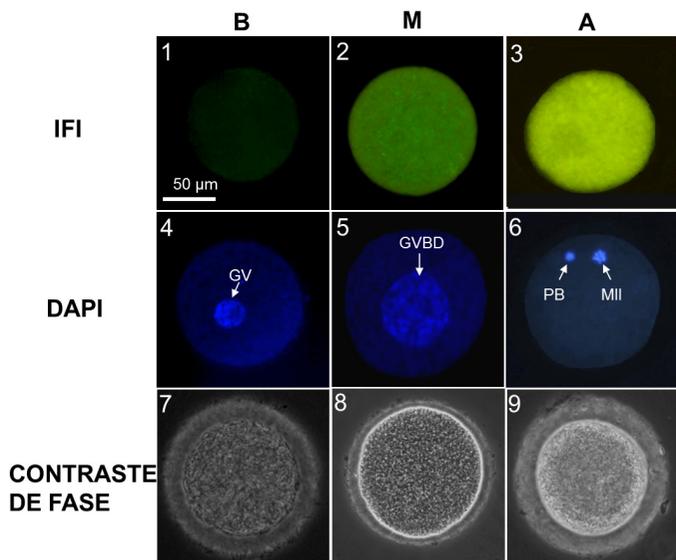
Los datos se presentan como % dentro de los grupos de maduración. IVM = Maduración *in vitro*. Patrones de expresión: A = Alto; M = Medio; B = Bajo.

Grados de progresión meiótica: GV = Vescícula germinativa; GVBD = Ruptura de vesícula germinativa; MI = Metafase I; MII = Metafase II.

a,b: Valores dentro de la misma columna y grupo de ovocitos con diferentes superíndices, difieren (P < 0,05)

A,B,C: Valores dentro de una misma fila con diferente superíndice, difieren (P < 0,05).

x,y,z: Valores dentro de una misma columna y patrón de fluorescencia con diferente superíndice, difieren (P < 0,05).

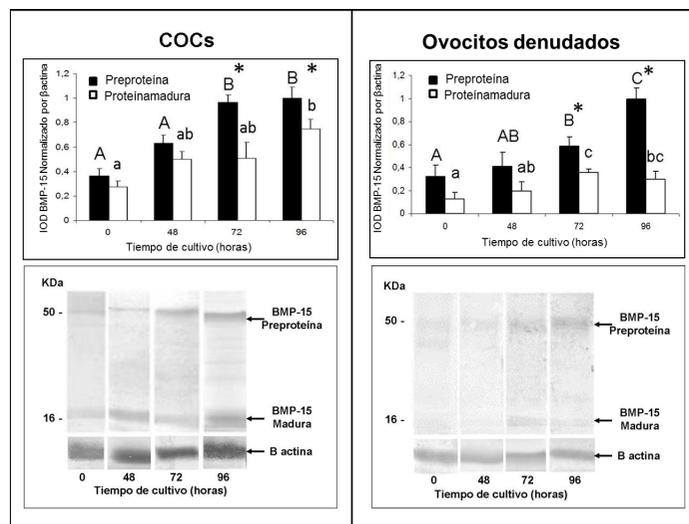


**FIGURA 4. INMUNOFLORESCENCIA DE BMP-15 Y PROGRESIÓN MEIÓTICA EN OVOCITOS DE PERRA. Imagen muestra patrones representativos de intensidad de fluorescencia (Bajo:b; Medio: b; Alto: a) en relación al estado nuclear (GV: Vescícula germinativa; GVBD: Ruptura de vesícula germinativa; PB: Corpúsculo polar; MII: Metafase II).**

### Western Blotting BMP-15

Mediante Western Blotting se determinaron los niveles de expresión de BMP-15 en ovocitos denudados y COCs (FIG. 5). Dos bandas de 56 y 16 KDa representaron a la preproteína y la proteína madura, respectivamente, caracterizando una típica proteína perteneciente a la familia TGF  $\beta$  lo cual concuerda con lo anteriormente descrito para BMP15 en cerdos *Sus scrofa* [11]. Ambos marcajes estuvieron presentes en ovocitos y COCs, en todos los tiempos estudiados, incrementando progresivamente en asociación al tiempo de cultivo. La preproteína siempre mostró mayores niveles de expresión que la proteína madura, esta diferencia alcanzó significancia desde las 72 h de cultivo, lo cual denota una mantención de la actividad de síntesis proteica y de las modificaciones postraduccionales, infiriendo además que estos mecanismos biológicos se incrementan hacia los momentos finales del cultivo, cuando también aumentó la progresión meiótica, intensidad de fluorescencia y mucificación, lo cual sugiere una relación entre todas estas variables. La preproteína incrementó progresivamente durante el cultivo alcanzando significancia desde las 72 h (P < 0,05), tanto para denudados como para COCs, pero en los denudados el incremento significativo se mantuvo hasta las 96 h. El incremento de la proteína madura alcanzó significancia a las 72 h en denudados y a las 96 h en COCs. Los niveles de expresión para ambas proteínas fueron menores en ovocitos denudados que en COCs, lo cual permite inferir la presencia de BMP-15, tanto en el ovocito como en las

células del *cumulus*, reforzando la información reportada en los métodos de inmunofluorescencia. Sin embargo, los valores de BMP-15 en el ovocito fueron mayores que en las células del *cumulus*, denotando que los ovocitos son la principal fuente de producción de BMP-15 en la perra. Por otra parte, mientras que la proteína madura mantuvo un aumento progresivo hasta las 96 h en cultivo de COCs, en los ovocitos desnudos detuvo su aumento a las 96 h, este hecho podría denotar una mayor participación de las células del *cumulus* hacia los momento final de la maduración *in vitro* de los ovocitos y explicar otro papel relevante de estas células en la maduración de ovocitos de la perra. Todo lo anteriormente expuesto, concuerda con lo descrito en la fisiología reproductiva de la perra, en donde la maduración (MII) y mucificación se logran tardíamente en el oviducto, 72 a 96 h post ovulación [19, 23], el mismo en que se consiguen altos niveles de BMP-15 en condiciones *in vitro*.



**FIGURA 5. WESTERN BLOT DE BMP-15 DURANTE MADURACIÓN *In vitro* DE COCS (IZQUIERDA) Y OVOCITOS DENUDADOS (DERECHA). BANDAS OBTENIDAS EN ELECTROFORESIS SON REPRESENTADAS ABAJO. INTENSIDAD DE BANDA SON GRAFICADAS ARRIBA. Letras distintas denotan diferencia, A, B, C, D: Representan barras de preproteína. a, b, c, d: Representan barras de proteína madura. \* denota diferencia entre niveles de preproteína y proteína madura dentro de grupo (P<0,05)**

## CONCLUSIONES

BMP-15 está presente, tanto en el ovocito como en las células del *cumulus* de la perra, sus niveles aumentan progresivamente conforme avanza el cultivo *in vitro* y está correlacionada a la progresión meiótica y mucificación, siendo relevante en la maduración del ovocito canino.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue patrocinado por los proyectos 1110265 y 1140658 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DE LOS REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUEZ, V.; PALOMINO, J. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. **Theriogenol.** 80:587-596. 2013.
- [2] DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; VERGARA, J. Sperm nuclear decondensation induction capacity of *in vitro* and *in vivo* matured canine oocytes. **Reprod. Dom. Anim.** 47:98-101. 2012.
- [3] DE LOS REYES, M.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.; HIDALGO, M.; SAFFIE P. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. **Theriogenol.** 75:346-53. 2011.
- [4] DE LOS REYES, M.; DE LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, J.; BARROS, C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenol.** 64:1-11. 2005.
- [5] GALLOWAY, S.; MCNATTY, K.; CAMBRIDGE, L.; LAITINEN, M.; JUENGL, J.; JOKIRANTA, T.; MCLAREN, R.; LUIRO, K.; DODDS, K.; MONTGOMERY, G.; BEATTIE, A.; DAVIS, G.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nat. Genet.** 25:279-283. 2000.
- [6] GILCHRIST, R.; LANE, M.; THOMPSON, J. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum. Reprod. Update.** 14:159-177. 2008.
- [7] GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. 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. of Reprod.** 75:836-843. 2006.
- [8] HOSOE, M.; KANEYAMA, K.; USHIZAWA, K.; HAYASHI, K.; TAKAHASHI, T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. **Reprod. Biol. and Endocrinol.** 9:33-40. 2011.
- [9] HUSSEIN, T.; FROILAND, D.; AMATO, F.; JEREMY, G.; GILCHRIST, T.; GILCHRIST, R. Oocytes prevent *cumulus* cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J. of Cell Sci.** 118:2557-2568. 2005.
- [10] KRISHER, R. The effect of oocyte quality on development. **J. of Anim. Sci.** 82:14-23. 2004.
- [11] LI, H.; KUO, T.; YANG, H.; CHEN, L.; LI, S.; HUANG, H. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. **Anim. Reprod. Sci.** 103:312-322. 2008.

- [12] MARTEIL, G.; RICHARD-PARPAILLON, L.; KUBIAK, J. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. **Reprod. Biol.** 9:203-224. 2009.
- [13] MCNATTY, K.; SMITH, P.; MOORE, L.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. **Mol. Cell Endocrinol.** 234:57-66. 2005a.
- [14] MCNATTY, K.; JUENGEL, J.; READER, K.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.; MOTTERSHEAD, D.; GROOME, N.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reprod.** 129:481-487. 2005b.
- [15] MONTEAGUDO, L.; PONZ, R.; TEJEDOR, M.; LAVIÑA, A.; SIERRA, I. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. **Anim. Reprod. Sci.** 110:139-146. 2009.
- [16] MOORE, R.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. **J. Biol. Chem.** 278:304-310. 2003.
- [17] OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; ERICKSON, G.; SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. **J. Biol. Chem.** 275:39523-39528. 2000.
- [18] PROCHAZKA, R.; NEMCOVA, L.; NAGYOVA, E.; KANKA, J. Expression of Growth Differentiation Factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. **Biol. Reprod.** 71:1290-1295. 2004.
- [19] REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; VIARIS DE L, C.; SAINT-DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. **Theriogenol.** 66:1685-93. 2006.
- [20] RICHARD, F.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. **Biol. Reprod.** 65:1444-1451. 2001.
- [21] ROBINSON, J.; ZHANG, M.; SHUHAIBAR, L.; JAFFE, L. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylylcyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. **Develop. Biol.** 366:308-316. 2012.
- [22] SILVA, J.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.; ROELEN, B.; FIGUEIREDO J. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), and bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. **Mol. Reprod. Dev.** 70:11-19. 2005.
- [23] SONGSASEN, N.; WILDT, D. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Anim. Reprod. Sci.** 98:2-22. 2007.
- [24] SU, Y.; WU, X.; O'BRIEN, M.; DENEGRE, J.; MATZUK, M.; EPPIG, J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-*cumulus* cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. **Dev. Biol.** 276:64-73. 2004.
- [25] SU, Y.; SUGIURA, K.; O'BRIEN, M.; AFFOURTIT, J.; PANGAS, S.; MATZUK, M.; EPPIG, J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse *cumulus* cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in *cumulus* cells. **Develop.** 135:111-121. 2008.
- [26] SU, Y.; SUGIURA, K.; EPPIG J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of *cumulus* cell metabolism. **Semin. Reprod. Med.** 27:32-42. 2009.
- [27] SU, Y.; SUGIURA, K.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M.; EPPIG J. Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the *cumulus*-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. **Mol. Endocrinol.** 24:1230-1239. 2010.
- [28] WEI, L.; LIANG, X.; FANG, C.; ZHANG, M. Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. **Fertil. and Steril.** 96:464-468. 2011.
- [29] YAN, C.; WANG, P.; DE MAYO, J.; DE MAYO, F.; ELVIN, J.; CARINO, C.; PRASAD, S.; SKINNER, S.; DUNBAR, B.; DUBE, J.; CELESTE, A.; MATZUK, M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Mol. Endocrinol.** 15:854-866. 2001.