

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**FUNÇÃO DA OCITOCINA NA INDUÇÃO DA
RETOMADA MEIÓTICA DE OÓCITOS EM BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Lopes da Silva Trois

Santa Maria, RS, Brasil

2011

FUNÇÃO DA OCITOCINA NA INDUÇÃO DA RETOMADA MEIÓTICA DE OÓCITOS EM BOVINOS

Roberta Lopes da Silva Trois

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, Área de Concentração de Farmacologia Aplicada à Produção Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FUNÇÃO DA OCITOCINA NA INDUÇÃO DA RETOMADA MEIÓTICA
DE OÓCITOS EM BOVINOS**

elaborada por
Roberta Lopes da Silva Trois

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rogério Ferreira, Dr. (UDESC)

Kátia Padilha Barreto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 31 de outubro de 2011.

“Depois de algum tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, e se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe trouxesse flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão **a todos** que contribuíram para a concretização deste estudo.

Aos meus pais, Cristina e Arnaldo que me apoiaram afetiva e financeiramente dando-me o suporte imprescindível para a concretização de mais essa etapa profissional. Com dedicação e abnegação, muitas vezes não entendidas conseguiram me transmitir sensibilidade, determinação e a racionalidade necessária para seguir adiante nessa caminhada que é a vida.

Ao meu irmão Felipe que de certa forma também foi um contribuinte direto na formação de meu caráter, ética e preceitos morais através de seus exemplos e atitudes.

A tia Anna, pelo carinho, disponibilidade e incentivo incansáveis. **Ao vô Syrio e vô Alda** que apesar de sua aparente fragilidade me deram exemplo de força e resiliência.

As minhas amigas que têm me acompanhado ao longo da vida e dão certa leveza a essa trajetória. Cúmplices que a vida me proporcionou.

À minha nova amiga **Lu Gressler** pela sua genialidade com a linguística, energia e auxílio inestimável e que muitas vezes foi além no seu papel profissional.

Aos professores **Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves** e **João Francisco Coelho de Oliveira** por abrirem as portas do seu laboratório num momento de extrema necessidade, pela contribuição dada a minha formação profissional e pelos conhecimentos transmitidos.

À **Karina e ao Matheus** pelas valiosas contribuições durante a realização dos experimentos, das apresentações e da redação da dissertação. Muitas vezes abdicaram de seu próprio trabalho em prol do meu ou do trabalho do próximo.

À maravilhosa **Dona Rosa** (lina) Rossi que ajudou a tornar a minha casa um lar e o cotidiano mais familiar.

À minha querida **Gaia** que sempre esteve ao meu lado seja qual fosse a situação. Muito fiel e companheira, aliviou inúmeros momentos de tensão e dificuldades.

À **fazenda Iviretã** por disponibilizar os animais do experimento *in vivo* e à **fazenda Querência** pelo acolhimento e maravilhosa hospedagem. **Ricardo, Cleide, Sylvia e José**, vocês são exemplos de vida, de amor e de dedicação desprendidos ao campo e “a melhor máquina de fazer carne” que é o gado Charolês. Obrigada pelo auxílio inestimável, gentileza, ensinamentos e confiança durante este estudo.

À Universidade Federal de Santa Maria pelo fornecimento do ensino público e gratuito. Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

FUNÇÃO DA OCITOCINA NA INDUÇÃO DA RETOMADA MEIÓTICA DE OÓCITOS EM BOVINOS

AUTORA: ROBERTA LOPES DA SILVA TROIS

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de outubro de 2011.

O objetivo do presente estudo foi examinar o papel da ocitocina (OT) no controle da retomada meiótica de oócitos bovinos, além da interação desse peptídeo com a progesterona (P4) e prostaglandinas (PGs) neste evento fisiológico. Nesse estudo, verificamos a interação da P4, OT e PGs na cascata de indução de retomada meiótica do oócito. Oócitos foram co-cultivados com metades foliculares por 15 h para determinar o efeito de diferentes doses de OT ou atosiban (ATO; antagonista do receptor de ocitocina) no reinício da maturação meiótica. A OT na concentração de 1 μM foi eficaz em induzir a retomada da meiose de oócitos co-cultivados com células foliculares (84,0%), não diferindo estatisticamente do grupo controle positivo (74,4%). O ATO inibiu o efeito positivo da OT sobre o reinício da meiose de uma forma dose-dependente onde a porcentagem de oócitos que atingiu o estágio de metáfase I (MI), foi apenas 27,6% na presença de 10 μM de ATO, não diferindo do grupo controle negativo (25,5%). Para confirmar que este efeito não era resultante de toxicidade ocasionada pelo ATO, foi realizado um experimento onde o efeito tóxico do ATO foi testado em um cultivo durante 15 e 24 horas, e foi possível observar que ele não apresenta efeitos tóxicos aos oócitos em cultivo, permitindo a retomada da meiose. Foi demonstrado também que a P4 foi capaz de induzir a retomada da meiose do oócito bovino ao qual foi inibida pelo ATO. No entanto, o efeito positivo da OT não foi bloqueado pela mifepristona (antagonista P4), mas foi inibida por indometacina (inibidor não-seletivo de PTGS2). Coletivamente, estes resultados evidenciam que P4 requer OT e esta requer PGs para que oócitos bovinos reiniciem a meiose. Em conclusão, nossos resultados demonstram que, P4, OT e PGs são passos sequenciais da cascata hormonal que culmina com a retomada da meiose em bovinos.

Palavras-chave: Ocitocina. Atosiban. Oócitos. Bovino. Reinício da meiose.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Post Graduate Program in Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria

O PAPEL FUNCIONAL DA OCITOCINA NA INDUÇÃO DA RETOMADA MEIÓTICA DE OÓCITOS EM BOVINOS

AUTHOR: ROBERTA LOPES DA SILVA TROIS
ADVISER: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Defense Place and Date: Santa Maria, October 31nd, 2011.

The aim of the present study was to examine the role of oxytocin (OT) on the control of oocyte meiotic resumption in the events that involves progesterone (P4) and prostaglandins (PGs). Oocytes were co-cultured with follicular hemisections for 15 h to determine the effect of different doses of OT or atosiban (ATO; oxytocin receptor antagonist) on the oocyte meiotic resumption. In another experiment, we examine the effect of P4, OT and PGs interaction on the regulatory cascade of the induction of oocyte meiotic resumption. Oxytocin in the concentration of 1 μ M was effective in inducing the resumption of meiosis of oocytes co-cultured with follicular cells (84.0%), not differing statistically from the positive control group (74.4%). Similarly, atosiban inhibited the positive effect of OT on meiotic resumption in a dose-dependent manner, in which the metaphase I (MI) rate was only 27.6% in the presence of 10 μ M ATO, not differing from the negative control group (25.5%). The possible toxic effect of ATO was tested in a 15 or 24 h-cumulus-oocyte complex culture system. In the third experiment, we demonstrated that P4 was able to induce the oocyte meiotic resumption, which was inhibited by ATO. However, the positive effect of OT was not blocked by mifepristone (P4 antagonist) but was inhibited by indometacine (a non-selective PTGS2 inhibitor). Collectively, these results evidenced that P4 is upstream to OT and PGs are required for the positive effect of OT to induce oocyte meiotic resumption. In conclusion, our results evince that together with Ang II, already proved by our group as involved in oocyte meiotic resumption, P4, OT and PGs are sequential steps in the hormonal cascade that culminates with resumption of meiosis in cattle.

Key words: Oxytocin. Atosiban. Oocytes. Bovine. Meiotic progression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Effect of oxytocin on oocyte nuclear maturation. Resumption of meiosis rates after co-culture of bovine cumulus-oocyte complexes (n=270) and follicular hemisections treated for 15 h with different concentrations of oxytocin (OT; 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05)..... **35**
- Figura 2 - Effect of atosiban on oocyte nuclear maturation. Resumption of meiosis rates after co-culture of bovine cumulus-oocyte complexes (n=270) and follicular hemisections treated for 15 h with different concentrations of atosiban (ATO, 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M). All the treatments were supplemented with oxytocin 1 μ M (OT). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05)..... **36**
- Figura 3 - Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption. The cumulus-oocyte complexes (n=630) were co-cultured for 15 h with progesterone (P4; 100 ng/mL), progesterone plus atosiban (ATO; 100 ng/mL and 1 μ M); oxytocin (OT; 1 μ M); oxytocin plus mifepristone (MIFE; 1 μ M and 1 μ M); and oxytocin plus indomethacin (INDO; 1 μ M and 10 μ M). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05)..... **37**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II – Angiotensina II
ATO - Atosiban
CCOs – Complexos Cumulus Oócitos
FSH - Hormônio folículo estimulante
INDO - Indometacina
LH - Hormônio luteinizante
MIFE - Mifepreristona
MI – Metáfase I
MII – Metáfase II
OT - Ocitocina
OT/NP-1 – Ocitocina/neurofisina -I
OTR – Receptor de Ocitocina
PGs - Prostaglandinas
PR – Receptor da progesterona
PTGS2 - Prostaglandina sintase 2
P4 - Progesterona
RVG – Rompimento da vesícula germinativa
VG – Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	18
3.1 Abstract	19
3.2 Introduction	20
3.3 Methods	21
3.3.1 Oocyte recovery and <i>in vitro</i> maturation.....	21
3.3.2 Preparation of the follicular hemisections	22
3.3.3 Analysis of nuclear maturation	23
3.3.4 Nucleic acid extraction and RT-PCR	23
3.3.5 Experiment I: Dose-response of oxytocin in oocyte meiotic resumption	24
3.3.6 Experiment II: Dose-response of atosiban in oocyte meiotic resumption	25
3.3.7 Experiment III: Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption	25
3.3.8 Statistical analysis	26
3.4 Results	26
3.4.1 Experiment I: Dose-response of oxytocin in oocyte meiotic resumption.....	26
3.4.2 Experiment II: Dose-response of atosiban in oocyte meiotic resumption	27
3.4.3 Experiment III: Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption	27
3.5 Discussion	28

3.5.1 Acknowledgements	30
3.6 References	31
3.7 Figures	34
4 CONCLUSÃO	38
5 REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A ovulação nos ruminantes é um evento iniciado por um aumento na liberação das gonadotrofinas hipofisárias, que desencadeiam uma cascata de alterações bioquímicas, morfológicas e moleculares no folículo dominante, o qual culmina na liberação do oócito maturo e posterior formação do corpo lúteo [4, 5, 29]. O pico de gonadotrofinas pré-ovulatória desencadeia simultaneamente a retomada da maturação nuclear oocitária e a ovulação, através de uma dinâmica interação de fatores sistêmicos e locais. Embora muito se conheça sobre as rotas intracelulares que conectam as gonadotrofinas à liberação do gameta feminino fértil e formação do corpo lúteo, com diferentes modelos experimentais, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas [10].

Em células da granulosa, o LH também induz a expressão de fatores de crescimento associados ao fator de crescimento epidermal (EGF) como anfirregulina, epirregulina e β -celulina, que se ligam aos receptores EGF nessas células e induzem a expressão dos genes da cascata de produção de prostaglandinas [51]. Os fatores de crescimento epidermais (EGF) também foram recentemente apontados como principais mediadores dos efeitos do LH sobre a expansão do cumulus, maturação de oócitos e ovulação [40, 49]. Células da granulosa do folículo pré-ovulatório respondem ao FSH, estradiol e IGF-1 [46]. São altamente proliferativas e expressam genes específicos que regulam o ciclo celular como, por exemplo, ciclina D2 [46]. Essas células da granulosa se diferenciam em resposta a esses hormônios citados acima e adquirem a habilidade de sintetizar estradiol via enzima aromatase, além de responder ao LH [10]. A sinalização ocorre através de receptores nucleares [11] que ativam adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e os membros da família EGF [39].

Sabe-se que a angiotensina II (Ang II), a progesterona (P4) e as prostaglandinas (PGs) são agentes intermediários das ações desencadeadas pelo pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, pois sem suas ações, eventos como a ovulação e a liberação de um oócito maturo são afetados negativamente [2, 16]. As funções atribuídas às PGs incluem vasodilatação tecidual e alterações na região apical do folículo pré-ovulatório [2, 35, 44]. [2] demonstraram um possível envolvimento das PGs via COX-2 é indispensável durante a fase final de diferenciação folicular e para a maturação nuclear do oócito. Como a AngII estimula a síntese de COX-2 e prostaglandinas em diversos tecidos, incluindo o tecido ovariano, Barreta *et al.*, sugerem que o reinício da meiose em oócitos bovinos induzido pela AngII pudesse ser mediado pela produção de COX-2 e prostaglandinas. Entretanto, os mecanismos

intrafolículos que conectam o aumento plasmático de gonadotrofinas ao incremento na secreção de PGs no fluido folicular durante o período periovulatório ainda não são totalmente entendidos.

Os experimentos *in vitro*, com células foliculares coletadas em momentos conhecidos em relação ao pico de gonadotrofinas, confirmaram que o LH é capaz de induzir a síntese de P4 e a expressão de seu receptor (PR) [27, 28]. Da mesma forma a P4 parece não ser capaz de regular a expressão de PR [27]. Utilizando-se cultivo *in vitro* de células da granulosa, demonstrou-se que é possível inibir o aumento da secreção de PGs induzido por LH adicionando-se um bloqueador de PR, e essa inibição pode ser revertida com a utilização de progestágenos [5]. Entretanto, a P4 se mostrou capaz de estimular a secreção de ocitocina (OT), e essa parece estimular a rota das prostaglandinas [4].

Com isso, demonstra-se que existem diversos mecanismos de regulação e que ocorrem no momento periovulatório, os quais são importantes para garantir a ovulação do oócito maturo. A OT depende da rota da Ang II (Siqueira *et al.*, dados não publicados), e através de experimentos *in vivo* e *in vitro* se demonstrou que há importante função da Ang II no desenvolvimento folicular, início do processo ovulatório e progressão meiótica do oócito de bovinos [2, 16, 42, 43].

O reinício da meiose de oócitos bovinos é um evento que ocorre durante o período periovulatório e, *in vivo*, é desencadeado pelo pico de gonadotrofinas [2]. Os resultados indicam que a Ang II é um fator permissivo, essencial e precoce para o reinício da meiose, pois esse peptídeo é capaz de reverter o efeito inibitório das células foliculares sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos [18], atuando via receptores do tipo AT2 [3]. Além disso, a Ang II estimula a expressão de RNAm para COX-2 em cultivo de células da granulosa [42, 43].

A partir disso, a proposta deste estudo foi determinar um melhor entendimento das inter-relações hormonais no período periovulatório de bovinos. Para isso, primeiramente buscou-se elucidar se os hormônios citados acima pertencem à cascata ovulatória e se são fatores pertencentes a uma mesma rota de ação. Sendo isso comprovado, torna-se necessário entender qual hormônio é estimulado primeiro pelo pico de gonadotrofinas e como este regulará a ação do seu sucessor. Buscando entender o papel da OT nos processos descritos, este estudo avaliou a hipótese de que a OT participa na progressão da meiose de oócitos induzidos pelo aumento de gonadotrofinas, juntamente com P4 e PGs.

Embriologicamente, o ovário se desenvolve a partir de um espessamento da porção ventral do ducto mesonéfrico, descrito como prega genital. As células germinativas

produzidas no saco vitelínico migram e colonizam as gônadas indiferenciadas. Essas células são chamadas de oogônias [1, 36]. O ovário é revestido pela túnica albugínea recoberto pelo epitélio germinativo e é dividido em uma porção medular e outra cortical. O compartimento medular possui tecido conjuntivo fibroelástico, nervos e vasos. As diferentes estruturas de desenvolvimento do folículo, incluindo formas atrésicas, corpos hemorrágicos, corpos lúteos e *corpus albicans* são encontradas no córtex ovariano [22].

Os ovários dos mamíferos exercem como função exócrina a liberação de gametas e endócrinas, a produção de hormônios esteróides, peptídeos e protéicos [55]. Os folículos são as unidades funcionais dos ovários, proporcionando um microambiente para o crescimento e para a maturação do oócito. Nos folículos bovinos, as células somáticas (células da granulosa e da teca) mantêm os oócitos até seu crescimento máximo e maturação. Segundo [20, 55], as células somáticas provavelmente iniciam o processo de crescimento da célula germinativa. [59] demonstram que o crescimento folicular e proliferação das células da granulosa podem ser iniciados pelos próprios oócitos ou pelos fatores ovarianos independentemente das influências hormonais.

O crescimento do folículo e ovulação são controlado principalmente por dois hormônios pituitários, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) [13]. Em *Bos taurus*, os folículos dominantes obtêm completa capacidade ovulatória ao atingir o diâmetro aproximado de 12 mm [50]. Esses folículos são chamados de pré-ovulatórios, os quais, a partir do pico de LH sofrem uma série de eventos regulatórios [46]. Entende-se por período periovulatório o tempo entre o pico de LH e a ovulação, caracterizando-se pelas mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que culminam com a liberação do oócito maturo [47]. O pico ovulatório de LH desencadeia a expressão final de genes associados com a foliculogênese, até o momento imediatamente anterior ao processo de ovulação [53], e os padrões de sinalização iniciam a luteinização das células da teca e granulosa para formação do corpo lúteo [48]. Muitos eventos são espacialmente restritos a microambientes específicos dentro ou ao redor do folículo para permitir com sucesso a liberação do complexo *cumulus-oócito* a partir do rompimento do folículo [10]. As células somáticas presentes no folículo são responsáveis pela nutrição do oócito e regulam sua maturação nuclear, citoplasmática e molecular, de maneira que participar do processo de seleção dos folículos para a ovulação e também para atresia daqueles que não são selecionados. Em parte estas alterações são induzidas pelos produtos secretados por aquelas células no fluido folicular que permeia o oócito. Por outro lado, as projeções celulares (“gap

junctions”) do *cumulus* se comunicam diretamente com o citoplasma do oócito promovendo a transferência dos nutrientes e demais fatores modulatórios [20].

Segundo [34], muitos oócitos sofrem processos degenerativos como resultados de erros genéticos ocorridos durante o “crossing over” ou devido a distúrbios metabólicos e/ou vasculares. Na fêmea bovina, em torno dos 72-82 dias de gestação, alguns oócitos já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, na qual ocorre o primeiro bloqueio da meiose, também denominado estádio de dictióteno da prófase I ou de vesícula germinativa [45]. A maturação do oócito tem por objetivo formar uma célula haplóide (bloqueada em metáfase II - MII), apta a ser fecundada, e que tenha capacidade para suportar os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma. Os oócitos bovinos adquirem progressivamente a competência meiótica (capacidade de reiniciarem a meiose), de modo que, com tamanho em torno de 110 - 115µm em folículos com 2-3mm de diâmetro esta se completa [14, 38]. *In vivo*, o reinício da divisão meiótica ocorre somente, em oócitos inclusos em folículos pré-ovulatórios e competentes, em resposta ao surgimento do pico de LH ovulatório.

Porém, *in vitro*, esse processo é desencadeado independentemente de hormônios, simplesmente pela remoção do oócito competente do ambiente folicular [41]. A interação entre oócito, células da granulosa e células da teca, pela liberação de fatores autócrinos e parácrinos, determinam o controle do desenvolvimento folicular e maturação oocitária [12]. Estes fatos evidenciam que no folículo são produzidos fatores inibitórios que impedem a maturação nuclear, e que com o surgimento do LH ovulatório a maquinaria celular das células foliculares é alterada cessando a produção de fatores inibidores e estimulando a síntese de fatores promotores da meiose [9].

O reinício da meiose, tanto *in vivo* como *in vitro*, inicia pelo rompimento da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de rompimento da vesícula germinativa (RVG), progredindo sucessivamente para os estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e MII, na qual ocorre o segundo bloqueio da meiose [19]. O tempo requerido para a maturação nuclear varia entre as espécies. No bovino, a RVG ocorre de 7 – 12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a MII 18-22 horas após o pico pré ovulatório de LH ou após a remoção do oócito do ambiente folicular [52, 57].

A regulação da meiose em bovinos é extremamente complexa, incluindo eventos de fosforilação e de desfosforilação. O armazenamento de RNAm, através do encurtamento da cauda poli-A, principalmente para o fator promotor da maturação (MPF) é necessário para conferir competência para o oócito [15] (Ferreira *et al.*, 2008) (Ferreira *et al.*, 2008) (Ferreira *et*

al., 2008). O MPF é uma proteína de 79kD composta por 1 subunidade catalítica (34kD) conhecida como p34Cdc2 kinase e uma subunidade regulatória (45kD) conhecida como ciclina B [17]. Para a ativação do MPF, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforiladas pela enzima Cdc25 fosfatase [30, 33]. Os oócitos em fase de crescimento têm níveis baixos de p34Cdc2 e não progridem da fase G2 (intervalo entre síntese de DNA e divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose), entretanto, no final da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e atividade da p34Cdc2 para a aquisição da competência meiótica [6, 8]. Durante a RVG, os níveis de MPF estão baixos, tendo um aumento gradual até atingir níveis máximos no estágio de MI. Após essa fase, o MPF apresenta uma diminuição significativa coincidindo com AI e TI, e um novo aumento é observado em MII, que é mantido por várias horas no oócito, diminuindo gradativamente depois de 30 horas de maturação ou imediatamente após a fecundação e ativação [31, 57]. O processo de maturação nuclear do oócito compreende o término da primeira redução meiótica, incluindo as fases desde a progressão de diplóteno da primeira prófase meiótica até metáfase II (MII). *In vivo*, esse processo tem início simultaneamente com o pico pré-ovulatório de LH e, *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular [23, 25, 37].

O desenvolvimento do oócito *in vivo* necessita de um período de 72 horas para retomada da meiose e progressão até MII, incluindo a maturação e fertilização dos oócitos dentro da tuba uterina [56, 58]. *In vivo* os oócitos permanecem viáveis por um período superior a 96 horas, e as condições ideais para a maturação *in vitro* podem diferir de outros mamíferos que ovulam oócitos na MII da primeira divisão meiótica [7, 23, 24, 37].

Em estudos de maturação e fecundação *in vitro* diversos protocolos foram propostos com resultados semelhantes. A maturação meiótica refere-se ao processo de conversão dos oócitos completamente crescidos, dos folículos antrais, em oócitos não fertilizados antes da ovulação, seguido da estimulação por gonadotrofinas, FSH e LH. O processo envolve a progressão nuclear de diplóteno da primeira prófase meiótica (MI) até a MII, e alterações meióticas para ativação do oócito na fertilização. Portanto, a maturação nuclear, e a maturação das demais organelas celulares (citoplasmática) são condições essenciais para que ocorra a fertilização do oócito e desenvolvimento inicial dos embriões. O núcleo do oócito primário permanece nesta condição invariável até a atresia ou retomada da meiose, em diacinese, em resposta aos hormônios gonadotróficos se estiver em um folículo terciário saudável. Quando retirados dos folículos e maturados *in vitro* os oócitos da maioria dos mamíferos sofrem maturação espontânea [26]. A morfologia dos CCOs e o diâmetro do oócito são parâmetros utilizados para inferir sobre a competência de maturação. Objetivando melhores resultados na maturação

in vitro recomenda-se apenas a seleção de CCOs de grau 1, selecionados para maturação *in vitro* [21, 23, 25, 58]

A maturação de oócitos *in vitro* é um mecanismo complexo onde são realizadas tentativas de se reproduzir as condições observadas no folículo ovariano pré-ovulatório. As pesquisas nesta área do conhecimento representam potenciais contribuições para o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na maturação e na interação entre os gametas. Desta forma a pesquisa produz conhecimentos que potencialmente contribuem para a elucidação de aspectos pertinentes aos complexos mecanismos da fisiologia dos oócitos, bem como podem subsidiar outras pesquisas nas áreas de biotecnologia da reprodução. Torna-se importante o conhecimento do papel da OT durante esse processo ajudando a um melhor entendimento das funções fisiológicas, aplicação em biotecnologias da reprodução e no tratamento de infertilidade. As biotécnicas da reprodução podem ser adaptadas para a melhoria do desempenho reprodutivo das diferentes espécies [32]. A proposta do presente estudo foi caracterizar a presença e regulação da OT na maturação nuclear durante o processo ovulatório de bovinos.

3 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PEPTIDES**The functional role of oxytocin in the induction of oocyte meiotic
resumption in cattle**

Roberta Lopes Trois, Karina Gutierrez, Matheus De Cesaro, Lucas Siqueira, Werner Giehl Glanzner, João Francisco Oliveira, Paulo Bayard Gonçalves*

Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Prédio 97, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.. Tel.: +55 55 3220 8752; fax: +55 55 3220 8484.

E-mail address: bayard@ufsm.br (P.B. Gonçalves).

ABSTRACT

The aim of the present study was to examine the role of oxytocin (OT) in the progesterone (P4) and prostaglandins (PGs) pathway to induce oocyte meiotic resumption. Oocytes were co-cultured with follicular hemisections for 15 h to determine the effect of different doses of OT or atosiban (ATO; oxytocin receptor antagonist) on oocyte meiotic resumption. In another experiment, we examined the effect of the P4, OT and PGs interaction on the regulatory cascade of the oocyte meiotic resumption. Oxytocin at 1 μM was effective in inducing resumption of meiosis in oocytes co-cultured with follicular cells (84.0%), not differing from the positive control group (74.4%). Atosiban inhibited the positive effect of OT on meiotic resumption in a dose-dependent manner (27.6% of metaphase I (MI) in the presence of 10 μM ATO, not differing from 25.5% in the negative control group). In the third experiment, we demonstrated that P4 was able to induce oocyte meiotic resumption, which was inhibited by ATO. However, the positive effect of OT was not blocked by mifepristone (P4 receptor antagonist) but was inhibited by indometacine (a non-selective PTGS2 inhibitor). Collectively, these results evidenced that P4 is upstream to OT as well as PGs are required for the positive effect of OT to induce oocyte meiotic resumption. In conclusion, our results suggest that P4, OT and PGs are sequential steps in the hormonal cascade that culminates with resumption of meiosis in cattle.

Keywords: oxytocin; atosiban; oocyte; meiotic progression; bovine

1. Introduction

Oocytes are arrested in the first meiotic prophase during follicular development, and LH preovulatory surge is required for meiotic resumption. However, bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) are devoid of LH receptors [13, 30]. Therefore, the triggering signal for meiotic resumption must come through LH receptors in theca and mural granulosa cells [2, 28, 43].

Meiotic resumption is inhibited, at least temporarily, when COCs are co-cultured with follicular wall [32], indicating that follicular cells produce factors that inhibit meiotic progression. This co-culture system has been demonstrated to be a good model to study factors that regulate oocyte nuclear maturation by follicular cells [15, 41]. Using such model, we have provided evidences that angiotensin II (Ang II) acts through prostaglandin (PGs) pathway to mediate gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption [3].

We have also observed that Ang II regulates secretion of progesterone (P4) and PGs (unpublished data), hormones involved in the ovulatory process [5, 20]. Angiotensin II added to LH-stimulated cells induces an increased abundance of prostaglandin synthase 2 (PTGS2) mRNA and protein in granulosa cell culture [43]. This is the rate-limiting enzyme for PGs production [9] and its pathway is a classical mediator of LH-induced ovulation and nuclear oocyte maturation in cattle [3]. Likewise, P4 is an essential component of the ovulatory cascade and there are clear evidences that PGs are downstream factors to this steroid [34]. Gonadotropin surge stimulates a rise in intrafollicular P4, which binds to its nuclear receptor and increases the abundance of mRNA for PTGS2 [13]. The role of P4 in bovine oocyte nuclear maturation is yet to be clarified. Sirotkin [37] has shown a stimulatory effect of P4 on oocyte meiotic resumption. However, other reports have concluded that such hormone is not required for nuclear maturation [36, 47]. Recently, it was demonstrated that P4 from cumulus cells plays a role in developmental competence during in vitro oocyte maturation [1].

The peptide oxytocin (OT) is another factor that has been identified in the follicular fluid of a number of mammalian species, including cattle [12, 18, 21-23, 35, 48, 49]. Oxytocin is synthesized concomitantly with neurophysin I in cows [35] and ewes [50]. The expression of oxytocin/neurophysin-I (OT/NP-I) gene has been observed in bovine granulosa cells, resulting in OT synthesis and secretion [10, 17, 25]. Gene expression of the OT receptor (OTR) has also been observed in granulosa and cumulus cells in cattle [14]. Granulosa cells isolated after the preovulatory gonadotropin surge secrete 20-fold more OT *in vitro* than granulosa cells isolated before the preovulatory gonadotropin surge [45, 46]. Moreover, the expression of OT/NP-I mRNA is higher in granulosa cells after than before LH surge [19]. Oxytocin/neurophysin-I mRNA accumulation and OT synthesis and secretion are tightly synchronous in the follicle during the preovulatory stage [46]. There are evidences that OT plays a role in ovulation [44], oocyte maturation [14] and cumulus expansion [46]. However, only limited information is available on the role of OT in controlling oocyte nuclear maturation. We have examined the hypotheses that OT is involved in controlling oocyte meiotic resumption, acting in the same pathway of P4 and PGs.

2. Materials and methods

All experimental procedures were reviewed and approved by the Federal University of Santa Maria Animal Care and Use Committee (ACUC n° 001/2011). The chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil) unless otherwise specified.

2.1 Oocyte recovery and in vitro maturation

Bovine ovaries at different stages of the estrous cycle were obtained in local abattoir

and placed in saline solution (0.9 % NaCl) at 30 °C containing 100 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin sulfate. The ovaries were transported to the laboratory in less than an hour and then rinsed three times with 0.9 % NaCl at 30 °C. The maximum interval between collection and the beginning of follicle aspiration was 4 h.

Cumulus-oocyte complexes were aspirated from follicles between 3 and 8 mm in diameter, recovered under a stereomicroscope and selected according to criteria outlined elsewhere [24]. Only grade 1 and 2 COCs were used and randomly distributed in different treatments. The COCs were cultured in 200 µL (about 1 oocyte/10 µL of medium) of maturation medium at 39 °C in a saturated humidity atmosphere with 5 % CO₂, for 15 or 24 h. The basic maturation medium consisted of TCM-199, containing Earle's salt and L-glutamine (Gibco Labs., Grand Island, NY) supplemented with 25 mM HEPES, 2.2 mg/mL sodium bicarbonate, 5.0 µg/mL LH (Lutropin[®]-V, Bioniche, Ontario, Canada, USA), 0.5 µg/mL FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, Ontario, Canada, USA), 100 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin sulfate, 0.2 mM pyruvic acid and 0.4 % fatty acid-free BSA. The basic medium was supplemented with OT, atosiban (ATO; OT receptor antagonist), mifepristone (MIFE; P4 antagonist) or indometacine (INDO; non-selective PTGS2 inhibitor), according to treatment.

2.2 Preparation of the follicular hemisections

Theca and granulosa cells were isolated from ovarian follicles and dissected free of the stromal tissue [32]. Follicles measuring 2 to 5 mm in diameter were sectioned into two equal halves with a scalpel blade, and their respective oocytes were discarded. The follicular hemisections were washed three times in TCM 199 with 0.4 % BSA, randomly distributed into 4-well culture plates (Nunc[®], Roskilde, Denmark) containing culture medium with the desired treatment (two follicular halves per 50 µL of medium) and incubated for 2 h before

adding the COCs under the same conditions described above for *in vitro* oocyte maturation. Dissection and follicle culture procedures have been successfully conducted in our laboratory and validated by measuring progesterone and estradiol ratio and by histological analysis [3, 15, 41]. Most of the cattle oocytes do not proceed with the meiotic divisions when co-cultured with follicular cells for 15 h or 24 h [6, 15, 32].

2.3 Analysis of nuclear maturation

At the end of the maturation period, cumulus cells were removed by vortexing for 5 min and the oocytes were fixed with paraformaldehyde 4 % for 15 min followed by permeabilization of the nuclear membranes with 0.5 % Triton X-100 for at least 2 h. After this period, the oocytes were exposed to 10 µg/mL bisbenzimidazole (Hoescht 33342) in a drop on glass slide and covered with a cover slip. Evaluation of nuclear maturation was performed under UV light in a fluorescent microscope and classified based on their nuclear chromatin configuration in germinal vesicle (GV), GV breakdown (GVBD), metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI) and metaphase II (MII). The oocytes were considered to have resumed meiotic division when reached MI at 15 h of culture. Only oocytes that reached MII were considered fully mature in 24-h culture.

2.4 Nucleic acid extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from the COCs using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and was quantified by absorbance at 260 nm using a NanoDrop1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Purity was assessed through

absorption ratio OD260/OD280 and samples with values below 1.8 were discharged. RNA integrity was checked by electrophoresis on 1 % agarose gel stained with ethidium bromide.

Total RNA (1 µg) was first treated with 0.2 U DNase (Invitrogen) at 37 °C for 5 min to digest any contaminating DNA, followed by heating at 65 °C for 3 min. RNA was reverse-transcribed (RT) in the presence of 1 µM oligo (dT), 4 U Omniscript RTase (Omniscript RT Kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 0.5 mM dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, and 10 U RNase Inhibitor (Invitrogen) in a volume of 20 µL at 37 °C for 1 h. The reaction was terminated by incubation at 93 °C for 5 min.

PCR was performed in a PX2 Thermal Cycler thermocycler (Thermo Scientific) using the enzyme Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a final volume of 25 µL reaction in a total of 40 cycles of amplification. The amplification products were visualized in 2.5 % agarose gel stained with ethidium bromide and observed in the UV light. The primers of neurophysin-I/oxytocin (NP-I/OT; primer *sense* CACCATGGCAGGTTCCA and *anti-sense* GGGCAGTTCTGAATGTAGCA), and oxytocin receptor (OTR - primer *sense* GTCAGCAACGTCAAGCTCATCT and *anti-sense* AGACACTCCACATCTGCACGAA) were designed based on GenBank sequences using Primer Express Software 3.0 and synthesized by Invitrogen.

2.5 Experiment I: Dose-response of oxytocin in oocyte meiotic resumption

To evaluate the effect of OT on oocyte meiotic resumption, grade 1 and 2 COCs (n=270) derived from abattoir ovaries were co-cultured with follicular hemisections treated with oxytocin at 0.1 µM (n=45), 1 µM (n=45) and 10 µM (n=45). As controls, COCs were cultured in the basic maturation medium without follicular hemisections (positive control; n=45) or in the presence of follicular hemisections (negative control; n=45). After 15 h in the

in vitro maturation system, oocytes were denuded, fixed and then stained for assessment of the nuclear maturation. This experiment was performed in triplicate.

2.6 Experiment II: Dose-response of atosiban in oocyte meiotic resumption

Atosiban was used to verify the effect of OT on oocyte nuclear maturation. COCs (n=270) obtained from abattoir ovaries were co-cultured with follicular hemisections treated with OT at 1 μ M and different doses of atosiban at 0.1 μ M (n=45), 1 μ M (n=45) and 10 μ M (n=45). As controls, COCs were cultured in the basic maturation medium without follicular hemisections (positive control; n=45) or in the presence of follicular hemisections (negative control; n=45). Following a 15-h *in vitro* maturation, oocytes were processed as described in 2.5. The experiment was performed in triplicate. To assess a possible toxic effect of atosiban on COCs development, COCs without follicular hemisections were cultured in the presence (n=45) or absence (n=45) of 10 μ M atosiban. After 15- and 24-h *in vitro* culture, oocytes were fixed, stained and submitted to fluorescence microscopy for evaluation of nuclear maturation. These two experiments (two culture periods) were performed in triplicate.

2.7 Experiment III: Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption

Cumulus-oocyte complexes (n=630) were co-cultured with follicular hemisections in the presence of P4 (100 ng/mL; n=30), P4 plus ATO (100 ng/mL and 1 μ M; n=30), OT (1 μ M; n=30); OT plus MIFE (1 μ M each; n=30) or OT plus INDO (1 μ M and 10 μ M; n=30) for 15 h. Cumulus-oocyte complexes cultured in the basic maturation medium with or without follicular cells were used, respectively, as negative or positive control groups. The experiment

was performed in triplicate. Oocytes were denuded, fixed and then stained after a 15-h *in vitro* culture to evaluate nuclear maturation.

2.8 Statistical analysis

Effect of treatments on nuclear maturation rate was assessed using a generalized linear model (Proc Genmod) with fitted binomial distribution of logit-transformed data and including replicate as random effect. Multi-comparison between groups was further analyzed by least squares means. Statistical analyses were performed using the SAS statistical program (SAS Institute Inc., Cary, NC) and 5% was the significance level. Data are represented as percentage of nuclear maturation in each group.

3. Results

Initially, we examined mRNA presence for NP-I/OT and OTR by conventional RT-PCR in bovine COCs. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products revealed a single band consistent with NP-I/OT (81 bp) and OTR (121 bp).

3.1 Experiment I: Dose-response of oxytocin in oocyte meiotic resumption

The hypothesis tested in this experiment was that OT induces meiotic resumption in cattle oocytes. Bovine COCs from abattoir ovaries were co-cultured with follicular hemisections for 15 h with OT at 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M. Oxytocin induced resumption of meiosis in bovine oocytes co-cultured with follicular cells in a dose dependent manner (Fig.

1). The highest MI rate was observed when oocytes were co-cultured with follicular cells treated with 1 μ M OT ($P < 0.05$).

3.2 Experiment II: Dose-response of atosiban in oocyte meiotic resumption

The hypothesis that ATO blocks nuclear maturation in cattle oocytes was tested in this experiment. Cattle COCs recovered from abattoir ovaries were co-cultured with follicular hemisections for 15 h with ATO at 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M. These doses of ATO were supplemented with 1 μ M of OT. ATO inhibited oocyte nuclear maturation induced by OT in a dose-dependent manner (Fig. 2). To verify a possible toxic effect of the OT antagonist, COCs without follicular hemisections were cultured for 15 and 24 h in the presence or absence of atosiban (10 μ M). This experiment was performed in triplicate. Toxic effects of ATO were not observed in cattle oocytes. The rates of oocytes in MI when cultured for 15 h in the presence or absence of ATO were 94.8 % and 93.5 %, respectively. The rates of oocytes in MII when cultured for 24 h in the presence or absence of ATO were 88 % and 85 %, respectively.

3.3 Experiment III: Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption

The role of OT in the cascade of oocyte meiotic resumption was evaluated. Cumulus-oocyte complexes (n=630) were co-cultured with follicular hemisections for 15 h in the presence of P4, P4+ATO, OT, OT+MIFE or OT+INDO. Oocytes in MI or latter stages were considered to have a normal resumption of meiosis. Progesterone or OT induced meiotic resumption (Fig. 3). However, the positive effects of P4 and OT on meiotic resumption were partially inhibited by ATO and INDO, respectively. On the contrary, the presence of MIFE

did not inhibit the positive effect of OT.

4. Discussion

Our significant findings are: (1) neurophysin-I/oxytocin and oxytocin receptor mRNA are present in cattle cumulus-oocyte complexes (data not shown); (2) oxytocin induced oocyte meiotic resumption, whereas atosiban blocked it, both in a dose-dependent manner; and (3) progesterone required oxytocin, which, in turn, required prostaglandins, to induce oocyte meiotic resumption. These results indicate that the events leading to oocyte meiotic resumption are coordinated by a signaling cascade involving the sequence: P4, OT and PGs.

Firstly, we examined the presence of NP-I/OT and OTR mRNA in bovine cumulus-oocyte complexes to study the role of OT in oocyte meiotic resumption. In the first trial, we found that NP-I/OT and OTR mRNA were present in bovine COCs. Oxytocin and OTR mRNA are expressed in granulosa cells of several mammalian species, such as bovine [46], baboon [21], swine [18] and human [49]. Gonadotropins promoted a dramatic increase in the levels of OT and its mRNA in granulosa cells of preovulatory follicles *in vitro* [45, 46] and *in vivo* [23, 45, 46, 48]. In cumulus cells, the presence of OT and OTR mRNA was detected in human [14]. Furthermore, OT stimulated cumulus expansion in bovine COCs [29]. Therefore, our findings showing the presence of OT and OTR mRNA in bovine cumulus-oocyte complexes are consistent with these previous studies and were necessary for the next experiments.

In vivo, a gradually increase of oxytocin was observed in follicular fluid after GnRH challenge, reaching the maximum level just before ovulation (at 24 h) [20]. In this study, oxytocin induced oocyte meiotic resumption in a dose-dependent manner. The doses 0.1, 1 and 10 μ M were based on studies with granulosa cells of cattle [7, 39], porcine [38] and

human [40]. Oxytocin treatment at 0.1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ stimulated $\text{PGF}_2\alpha$ secretion while only lower (0.001 or 1 $\mu\text{g/ml}$) doses increased cAMP in human granulosa cells [40]. In cattle, OT induced progesterone production by granulosa cells in a dose-dependent manner (at 0.5, 5, 50, and 500 mIU/ml OT) [7].

In the present study, the effect of OT on bovine oocyte meiotic resumption was validated by a competitive OT antagonist. Atosiban inhibited the positive effect of OT on oocyte meiotic resumption in a dose dependent manner, reaching maximum inhibition at 10 μM . Evidently, this inhibition could be caused by a toxic effect of ATO on COCs. To discard such possibility, we cultured COCs without follicular cells and in the presence of 10 μM ATO for 15 and 24 h. In the absence of follicular cells, ATO had no inhibitory effect on oocyte meiotic maturation, supporting the evidence that resumption of meiosis was not affected by a toxic action of this antagonist (data not shown). Atosiban has been used for many years to inhibit *in vivo* myometrial activity in pregnant animals [26] and humans [16].

Progesterone is essential to induce PGs secretion during the ovulatory process [5]. The finding that P4 is required for meiotic resumption has been well described in *Xenopus* oocyte [17, 27], but has not been extensively studied in mammals [34]. In mammals, meiotic resumption is triggered concomitantly with the gonadotropin preovulatory surge [42]. Several factors are involved in the process of releasing the matured oocyte [33]. Angiotensin II (Ang II), converted in angiotensin-(1-7), stimulates P4 synthesis [8]. Angiotensin II is required for LH-induced bovine ovulation [11] and oocyte meiotic resumption, and PGs play a key role in this event as a potential mediator of Ang II [3]. It has also been demonstrated that P4 may stimulate the secretion of OT, which, in turn, excites the route of PGs [4]. MIFE inhibited the resumption of meiosis induced by Ang II *in vitro* and prevented GnRH-induced oocyte meiotic resumption *in vivo* (Siqueira *et al*, submitted data). Based on these evidences, the role of P4, OT and PGs in oocyte meiotic resumption in a hormonal cascade has been

demonstrated in the present study in an unprecedented manner.

Granulosa and theca cells of periovulatory follicles expressed OT receptor mRNA [20]. Jo and Fortune [19] have reported that OT had no effect on progesterone or androstenedione production by theca cells from bovine preovulatory follicles obtained before the LH surge and cultured in the presence or absence of LH [7, 45]. However, the production of the nonapeptide hormone OT by granulosa cells of preovulatory follicles increases dramatically between the LH/FSH surge and ovulation [23, 45, 46, 48]. There are also strong evidences that, at the periovulatory period, progesterone mediates LH action to increase PTGS2 mRNA and PGs in the ovulatory cascade [5]. Together, these studies about ovulation support the hypothesis that P4, OT and PGs play an important role in oocyte meiotic resumption. Testing this hypothesis, we observed that P4 was able to stimulate the resumption of meiosis when oocytes were cultured with follicle hemisections, and ATO inhibited this positive effect of P4. Furthermore, OT induced oocyte meiotic resumption, and INDO, but not MIFE, blocked this OT effect. Our previous study showed that INDO is not toxic for COCs [3]. In conclusion, our results provide strong evidences to support a new model, in which P4 stimulates OT to activate PTGS2 to induce PGs synthesis, all acting in a cascade to trigger oocyte meiotic resumption in cattle.

Acknowledgements

We would like to thank CAPES and CNPq for the financial support and Silva's abattoir for providing the ovaries.

References

- [1] Aparicio IM, Garcia-Herreros M, O'Shea LC, Hensey C, Lonergan P, Fair T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2011;84:910-21.
- [2] Ayalon D, Tsafiriri A, Lindner HR, Cordova T, Harell A. Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes. *J Reprod Fertil.* 1972;31:51-8.
- [3] Barreta MH, Oliveira JF, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction.* 2008;136:733-40.
- [4] Bridges PJ, Fortune JE. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;263:1-9.
- [5] Bridges PJ, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology.* 2006;147:4713-22.
- [6] Carbonneau G, Sirard MA. Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemisections. *J of Reprod and Develop.* 1994;40:125-32.
- [7] Chandrasekher YA, Fortune JE. Effects of oxytocin on steroidogenesis by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology.* 1990;127:926-33.
- [8] Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RA, et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology.* 2003;144:1942-8.
- [9] Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-73.
- [10] Einspanier R, Pitzel L, Wuttke W, Hagendorff G, Preuss KD, Kardalidou E, et al. Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. Effects of these hormones on progesterone secretion in vitro. *FEBS Lett.* 1986;204:37-40.
- [11] Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction.* 2007;134:713-9.
- [12] Fields PA, Eldridge RK, Fuchs AR, Roberts RF, Fields MJ. Human placental and bovine corpora luteal oxytocin. *Endocrinology.* 1983;112:1544-6.
- [13] Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod.* 2009;6:60-71.
- [14] Furuya K, Mizumoto Y, Makimura N, Mitsui C, Murakami M, Tokuoka S, et al. Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. *Horm Res.* 1995;44 Suppl 2:47-9.
- [15] Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology.* 2005;63:1014-25.
- [16] Goodwin TM, Valenzuela GJ, Silver H, Creasy G. Dose ranging study of the oxytocin antagonist atosiban in the treatment of preterm labor. Atosiban Study Group. *Obstet Gynecol.* 1996;88:331-6.
- [17] Holtorf AP, Furuya K, Ivell R, McArdle CA. Oxytocin production and oxytocin messenger ribonucleic acid levels in bovine granulosa cells are regulated by insulin and insulin-like growth factor-I: dependence on developmental status of the ovarian follicle. *Endocrinology.* 1989;125:2612-20.

- [18] Jarry H, Einspanier A, Kanngiesser L, Dietrich M, Pitzel L, Holtz W, et al. Release and effects of oxytocin on estradiol and progesterone secretion in porcine corpora lutea as measured by an in vivo microdialysis system. *Endocrinology*. 1990;126:2350-8.
- [19] Jo M, Fortune JE. Changes in oxytocin receptor in bovine preovulatory follicles between the gonadotropin surge and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;200:31-43.
- [20] Jo M, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2002;67:1981-8.
- [21] Khan-Dawood FS. Localization of oxytocin and neurophysin in baboon (*Papio anubis*) corpus luteum by immunocytochemistry. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1986;113:570-5.
- [22] Khan-Dawood FS, Marut EL, Dawood MY. Oxytocin in the corpus luteum of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Endocrinology*. 1984;115:570-4.
- [23] Kiehm DJ, Walters DL, Daniel SA, Armstrong DT. Preovulatory biosynthesis and granulosa cell secretion of immunoreactive oxytocin by goat ovaries. *J Reprod Fertil*. 1989;87:485-93.
- [24] Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979;48:76-86.
- [25] Luck MR, Rodgers RJ, Findlay JK. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the in vitro differentiation of bovine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev*. 1990;2:11-25.
- [26] Nathanielsz PW, Honnebler MB, Mecenas C, Jenkins SL, Holland ML, Demarest K. Effect of the oxytocin antagonist atosiban (1-deamino-2-D-tyr(OET)-4-thr-8-orn-vasotocin/oxytocin) on nocturnal myometrial contractions, maternal cardiovascular function, transplacental passage, and fetal oxygenation in the pregnant baboon during the last third of gestation. *Biol Reprod*. 1997;57:320-4.
- [27] Nebreda AR, Ferby I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:666-75.
- [28] Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Mialot JP, et al. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol Reprod Dev*. 2002;61:93-101.
- [29] Okuda K, Miyamoto A, Sauerwein H, Schweigert FJ, Schams D. Evidence for oxytocin receptors in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod*. 1992;46:1001-6.
- [30] Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 1991;129:3200-7.
- [31] Portela, V. M., Zamberlam, G., Goncalves, P. B.de Oliveira, J. F., Price, C. A. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro. *Biol Reprod*. 2011:
- [32] Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod*. 1996;54:16-21.
- [33] Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. 2007;13:289-312.
- [34] Sartori R, Baruselli PS, Souza AH, Cunha AP, Wiltbank MC. Recent advances in ovulation synchronization and superovulation in dairy cattle. *Anim Reprod*. 2009;6:194.
- [35] Schams D, Kruip TA, Koll R. Oxytocin determination in steroid producing tissues and in vitro production in ovarian follicles. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985;109:530-6.
- [36] Silva CC, Knight PG. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil*. 2000;119:261-9.

- [37] Sirotkin AV. Involvement of steroid hormones in bovine oocytes maturation in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41:855-8.
- [38] Sirotkin AV, Nitray J. The interrelationships between nonapeptide and steroid hormones secretion by bovine granulosa cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;43:529-34.
- [39] Sirotkin AV, Nitray J, Bulla J. Oxytocin in bovine and porcine granulosa cells. Regulation of secretion and biological effects. *Adv Exp Med Biol.* 1995;395:541-2.
- [40] Sirotkin AV, Schaeffer HJ, Mlyncek M, Missik J, Bulla J. Oxytocin affects the release of steroids, insulin-like growth factor-I, prostaglandin F₂alpha and cyclic nucleotides by human granulosa cells in vitro. *Hum Reprod.* 1996;11:152-5.
- [41] Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 2006;66:2068-76.
- [42] Tsafiriri A, Cao X, Ashkenazi H, Motola S, Popliker M, Pomerantz SH. Resumption of oocyte meiosis in mammals: on models, meiosis activating sterols, steroids and EGF-like factors. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234:37-45.
- [43] van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:218-24.
- [44] Viggiano M, Franchi AM, Zicari JL, Rettori V, Gimeno MA, Kozlowski GP, et al. The involvement of oxytocin in ovulation and in the outputs of cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase products from isolated rat ovaries. *Prostaglandins.* 1989;37:367-78.
- [45] Voss AK, Fortune JE. Oxytocin secretion by bovine granulosa cells: effects of stage of follicular development, gonadotropins, and coculture with theca interna. *Endocrinology.* 1991;128:1991-9.
- [46] Voss AK, Fortune JE. Oxytocin/neurophysin-I messenger ribonucleic acid in bovine granulosa cells increases after the luteinizing hormone (LH) surge and is stimulated by LH in vitro. *Endocrinology.* 1992;131:2755-62.
- [47] Wang HF, Isobe N, Kumamoto K, Yamashiro H, Yamashita Y, Terada T. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:4.
- [48] Wathes DC, Guldenaar SE, Swann RW, Webb R, Porter DG, Pickering BT. A combined radioimmunoassay and immunocytochemical study of ovarian oxytocin production during the periovulatory period in the ewe. *J Reprod Fertil.* 1986;78:167-83.
- [49] Wathes DC, Swann RW. Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature.* 1982;297:225-7.
- [50] Watkins WB, Moore LG, Flint AP, Sheldrick EL. Secretion of neurophysins by the ovary in sheep. *Peptides.* 1984;5:61-4.

Figure captions

Fig. 1. Effect of oxytocin on oocyte nuclear maturation. Resumption of meiosis rates after co-culture of bovine cumulus-oocyte complexes (n=270) and follicular hemisections treated for 15 h with different concentrations of oxytocin (OT; 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05).

Fig. 2. Effect of atosiban on oocyte nuclear maturation. Resumption of meiosis rates after co-culture of bovine cumulus-oocyte complexes (n=270) and follicular hemisections treated for 15 h with different concentrations of atosiban (ATO, 0.1 μ M, 1 μ M or 10 μ M). All the treatments were supplemented with oxytocin 1 μ M (OT). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05).

Fig. 3. Oxytocin in the cascade of oocyte meiotic resumption. The cumulus-oocyte complexes (n=630) were co-cultured for 15 h with progesterone (P4; 100 ng/mL), progesterone plus atosiban (ATO; 100 ng/mL and 1 μ M); oxytocin (OT; 1 μ M); oxytocin plus mifepristone (MIFE; 1 μ M and 1 μ M); and oxytocin plus indomethacin (INDO; 1 μ M and 10 μ M). The experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant difference (P<0.05).

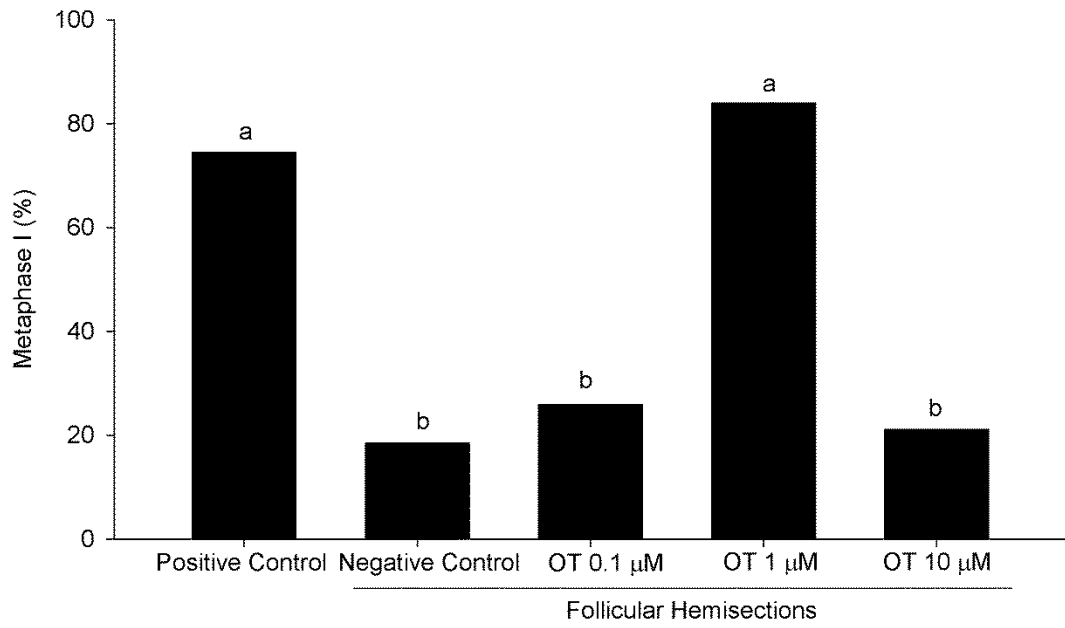


Figure 1

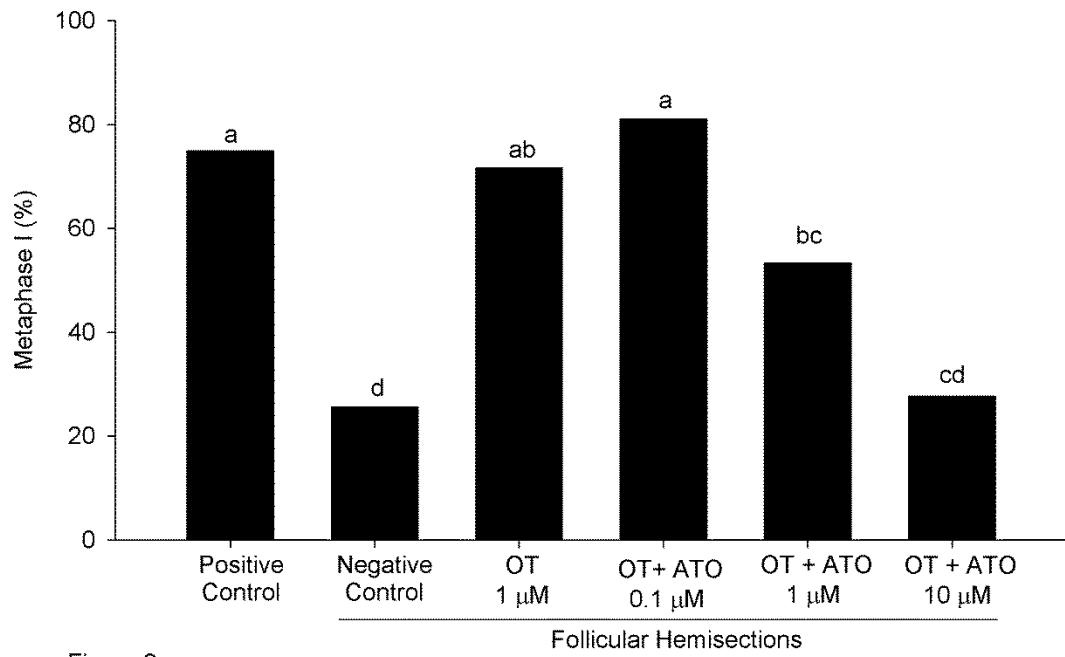


Figure 2

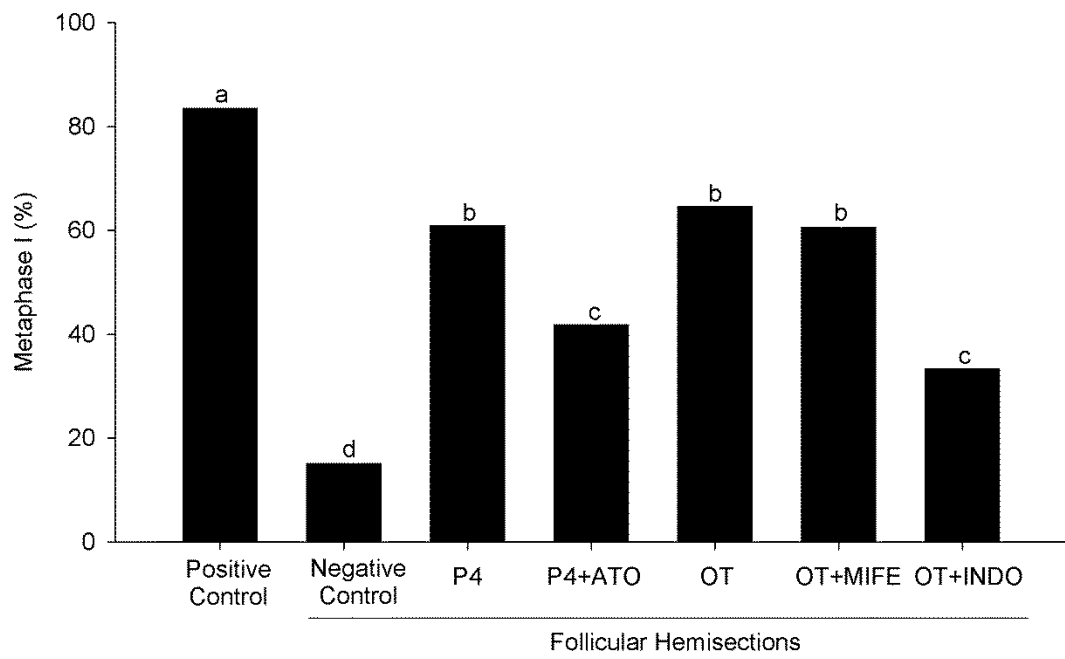


Figure 3

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados fornecem fortes evidências de um novo modelo fisiológico, no qual P4 requer OT e esta necessita PGs, induzindo uma cascata para desencadear a retomada meiótica de oócitos em bovinos.

A hipótese de que a OT é necessária para o reinício da meiose em oócitos bovinos, bem como sua posição no ciclo ovulatório, foram testadas no presente estudo.

Os resultados aqui apresentados complementam descobertas anteriores sobre o reinício da meiose do oócito e a ovulação, evento este intimamente relacionado à maturação do oócito [16, 18, 54]. No entanto, mais pesquisas são necessárias a fim de elucidar a regulação e a importância da OT durante a cascata ovulatória.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Austin CR, Short RV. *Reproduction in mammals*. Cambridge university Press, London. 1982;1.
- [2] Barreta MH, Oliveira JF, Ferreira R, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Sandri LR, et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. *Reproduction*. 2008;136:733-40.
- [3] Benetti L. Receptor de angiotensina II envolvido na regulação da maturação nuclear de oócito bovino. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria. 2008.
- [4] Bridges PJ, Fortune JE. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;263:1-9.
- [5] Bridges PJ, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology*. 2006;147:4713-22.
- [6] Chesnel F, Eppig JJ. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev*. 1995;40:503-8.
- [7] Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*. 1989;39:3-25.
- [8] de Vant'ery C, Gavin AC, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol*. 1996;174:335-44.
- [9] Downs SM. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2010;77:566-85.
- [10] Duggavathi R, Murphy BD. Development. Ovulation signals. *Science*. 2009;324:890-1.
- [11] Duggavathi R, Volle DH, Matakı C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, et al. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev*. 2008;22:1871-6.
- [12] Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001;122:829-38.
- [13] Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod*. 1980;22:73-106.
- [14] Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*. 1995;42:437-42.
- [15] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: acquisition of competence for development. *Rev Bras Reprod Anim*. 2008;32:172-81.
- [16] Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007;134:713-9.
- [17] Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*. 1990;60:487-94.
- [18] Giometti IC, Bertagnolli AC, Ornes RC, da Costa LF, Carambula SF, Reis AM, et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*. 2005;63:1014-25.
- [19] Gordon I. *Laboratory Production of Cattle Embryo*. CAB International, University Press, Cambridge. 1994:640p.

- [20] Gore-Lengton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. . In: KNOBIL, E; NEIL, JD (Eds) *The Physiology of reproduction* 2 ed New York: Raven. 1994:571-627. .
- [21] Greenwald GS, Terranova PF. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven; 1988.
- [22] Hafez B, Hafez ESE. *Reproduction in farm animals* 7. ed. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. 2000;5. ed:68- 81.
- [23] Hewitt DA, England GC. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997;51:83-91.
- [24] Hewitt DA, England GC. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci*. 1999;55:63-75.
- [25] Hewitt DA, Watson PF, England GC. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*. 1998;49:1083-101.
- [26] Hunter RHF. *Physiology and technology of reproduction in female domestic animals*. . Academic Press, London. 1980:393p.
- [27] Jo M, Fortune JE. Oxytocin inhibits LH-stimulated production of androstenedione by bovine theca cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;188:151-9.
- [28] Jo M, Fortune JE. Changes in oxytocin receptor in bovine preovulatory follicles between the gonadotropin surge and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;200:31-43.
- [29] Komar CM, Berndtson AK, Evans AC, Fortune JE. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2001;64:1797-805.
- [30] Kumagai A, Dunphy WG. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*. 1992;70:139-51.
- [31] Liu L, Yang X. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod*. 1999;61:1-7.
- [32] Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod Nutr Dev*. 2000;40:505-12.
- [33] Maller JL. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Seminars in Developmental Biology*. 1994;5:183-90.
- [34] Motta PM, Nottola SA, Makabe S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997;75:5-10.
- [35] Murdoch WJ, Peterson TA, Van Kirk EA, Vincent DL, Inskoop EK. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod*. 1986;35:1187-94.
- [36] Noden DM, Lahunta A. *Embriologia de los animales domesticos*. Zaragoza: Acribia. 1990:399p.
- [37] Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*. 2000;54:535-42.
- [38] Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*. 1997;48:769-74.
- [39] Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol*. 2008;22:924-36.
- [40] Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 2004;303:682-4.

- [41] Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med.* 1935;62:665-75.
- [42] Portela VM, Goncalves PB, Veiga AM, Nicola E, Buratini J, Jr., Price CA. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology.* 2008;149:5004-11.
- [43] Portela VM, Zamberlam G, Goncalves PB, de Oliveira JF, Price CA. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro. *Biol Reprod.* 2011.
- [44] Priddy AR, Killick SR. Eicosanoids and ovulation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993;49:827-31.
- [45] Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* 1980;60:51-89.
- [46] Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 1994;15:725-51.
- [47] Richards JS, Pangas SA. New insights into ovarian function. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;3-27.
- [48] Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:69-92.
- [49] Romero S, Smitz J. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. *Fertil Steril.* 2010;93:936-44.
- [50] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod.* 2001;65:1403-9.
- [51] Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 2006;20:1352-65.
- [52] Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1989;40:1257-63.
- [53] Sirotkin AV. Transcription factors and ovarian functions. *J Cell Physiol.* 2010;225:20-6.
- [54] Stefanello JR, Barreta MH, Porciuncula PM, Arruda JN, Oliveira JF, Oliveira MA, et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 2006;66:2068-76.
- [55] Tsafirini A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. Cap. 15. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.). *The Physiology of Reproduction*, New York, Raven. 1994;2:817-60.
- [56] Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989;39:269-75.
- [57] Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1997;56:253-9.
- [58] Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod.* 1992;46:853-8.
- [59] Zhou J, Chin E, Bondy C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology.* 1991;129:3281-8.