



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Campus de Botucatu**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**EFEITOS DA NEUROTENSINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A  
PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA EM BOVINOS**

**Isabela Lima Gama**

**Botucatu-SP**

**Fevereiro 2020**



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Campus de Botucatu**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**EFEITOS DA NEUROTENSINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A  
PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA EM BOVINOS**

**Isabela Lima Gama**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior

**Botucatu, 21 de fevereiro de 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gama, Isabela Lima.

Efeitos da neurotensina na maturação *in vitro* sobre a  
produção embrionária em bovinos / Isabela Lima Gama. -  
Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: José Buratini Junior

Capes: 21001006

1. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 2.  
Neurotensina. 3. Metáfase. 4. Bovinos.

Palavras-chave: Expansão do cumulus; Maturação *in vitro*;  
Metáfase II; Neurotensina.

**ISABELA LIMA GAMA**

Efeitos da neurotensina na maturação *in vitro* sobre a produção embrionária em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia

**Comissão Examinadora**

---

**Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior**

---

**Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira**

---

**Profa. Dra. Denise Rangel da Silva Sartori**

**Botucatu, 21 de fevereiro de 2020**

***“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar.”***

***Esopo***

## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado à Universidade  
Estadual Paulista e ao Instituto de Biociências*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a **Deus** por toda sabedoria concedida e por me proporcionar mais esse aprendizado.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. José Buratini Junior**, pelos incentivos e pela oportunidade de realizar esse trabalho. Tenho por você grande admiração, gratidão e respeito.

Ao colaborador **Prof. Dr. Alberto Maria Luciano** do Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão/Itália, pela constante ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de luz quando os resultados não faziam sentido.

Aos meus pais **Eden e Leide** por todo amor e compreensão.

Ao meu irmão **Eden José**, agradeço por sempre me apoiar, me ouvir e por estar presente nos momentos difíceis.

Ao meu tio **Augusto**, que sempre me incentivou durante essa caminhada.

Em especial a minha avó **Raymunda** pelo carinho, pelo apoio financeiro e pelas orações neste período de tantas dificuldades e mudanças na minha vida.

A minha querida amiga **Ana Keila Monteiro**, que mesmo à distância me fez lembrar o valor da verdadeira amizade.

As parceiras de laboratório **Carol, Thaisy e Isabella** por estarem sempre juntas comigo e me ajudando com o que fosse preciso.

Ao Laboratório FitoFarmaTec, em especial, **Fernanda, Priscila e Sarah** pela amizade e por estarem sempre presentes.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, em especial, **Cardoso (Garboso)** por me ajudar a estudar para o processo seletivo e também pelos aprendizados em estatística e em farmacologia.

Aos proprietários e funcionários do **Frigorífico Frigonobre** em Torrinha/SP, pelo apoio à pesquisa.

A **CAPES e FAPESP** nº 2017/07588-4 pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1.** Basic maturation medium (bMM) contained TCM199 supplemented with 4 mg/mL bovine serum albumin, 75 µg/mL amikacin, 22 µg/mL sodium pyruvate and 1 mM cysteamine. The 1-FSH group was composed by bMM and  $10^{-1}$  UI/mL r-hFSH. The 2-FSH + NTS group contained  $10^{-1}$  UI/mL r-hFSH and 1 µM NTS. The composition of the 3-FS group was  $10^{-2}$  UI/mL r-hFSH, 50 ng/mL  $17\beta$ -estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL insulin-like growth factor (IGF)-1 and 100 ng/mL AREG. The 4-FS + NTS group was supplemented with  $10^{-2}$  UI/mL r-hFSH, 50 ng/mL  $17\beta$ -estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL insulin-like growth factor (IGF)-1, 100 ng/mL AREG and 1 µM NTS..... 33

**Fig. 2.** (A) Schematic representation of the experiment 1. Pools of 30-35 COCs were divided in four groups: FSH, FSH+NTS, FS and FS+NTS. COCs were submitted to IVM for 24 h and after culture, the degrees of expansion were evaluated. At the end of this analysis, was performed IVF. After 18 h, COCs were submitted to IVC for 8 days and the blastocyst rate and number of embryonic cells were evaluated. (B) Schematic representation of the experiment 2. Pools of 15-20 COCs were divided in the same groups: FSH, FSH+NTS, FS and FS+NTS. COCs were submitted to IVM for different times of culture: 18, 20 and 22 hours. At the end IVM, the meiotic progression was evaluated..... 34

**Fig. 3.** Effects of NTS associated to the medium FSH (A) and combined with FS (B) on cumulus expansion. COCs exhibiting different degrees of cumulus expansion. The bar graphs represent the mean  $\pm$  standard deviation (s.d.) of the % COCs grade 1/ total oocytes, % COCs grade 2/ total oocytes, and % COCs grade 3/ total oocytes in six replicates for each treatment. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ )..... 35

**Fig. 4.** *In vitro* development of bovine embryos derived from COCs matured in the presence of NTS combined with FSH (A) and FS (B). The bar graphs represent the mean  $\pm$  s.d. of the % blastocysts in relation to total oocytes, % expanded and hatched blastocysts in relation to total blastocysts and blastocyst cell number. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) in six replicates with 186, 199, 196, 201 COCs in the FSH, FSH + NTS, FS and FS+ NTS groups respectively. .... 36

**Fig. 5.** Effects of NTS associated or not to FSH and FS on meiosis progression. COCs were subjected to IVM in different times of culture, after 18 h, 20 h and 22 h. GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; ANATEL: anaphase/telophase; MII: metaphase II and DEG: degenerated. Data derived from six independent replicates for each treatment. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). .... 37



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADAMs** = família desintegrina e metaloproteinases

**AMPc** = adenosina monofosfato cíclico

**ANA/TEL** = anáfase/telófase

**AREG** = ampirregulina

**ATP** = adenosina tri-fosfato

**bMM** = meio básico de maturação

**BMP15** = proteína morfogênica óssea 15

**BSA** = albumina sérica bovina

**BTC** = betacelulina

**CC** = células do cumulus

**CG** = células da granulosa

**CIV** = cultivo *in vitro*

**COC** = complexo cumulus-oócito

**COX 2** = ciclooxigenase 2

**Cx43** = conexina 43

**DEG** = degenerado

**DPBS** = solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco

**EGF** = fator de crescimento epidermal

**EGF-like** = fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal

**EGFR** = receptor de EGF

**EREG** = epirregulina

**ERK** = quinases reguladas por sinais extracelulares

**ERK1/2** = quinases reguladas por sinais extracelulares do tipo 1 e 2

**FGFs** = fatores de crescimento de fibroblastos

**FIV** = fecundação *in vitro*

**FSH** = hormônio folículo estimulante

**FSO** = fatores secretados pelo oócito

**GDF9** = fator de crescimento e diferenciação 9

**GMPc** = guanosina monofosfato cíclico

**HA** = ácido hialurônico

**HAS2** = hialurona sintetase 2

**IGF-1** = fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

**IP<sub>3</sub>** = trifosfato de inositol

**LH** = hormônio luteinizante

**MAPK** = proteína quinase ativada por mitógenos

**MI** = metáfase I  
**MII** = metáfase II  
**MIV** = maturação *in vitro*  
**MPF** = fator promotor da maturação  
**NPPC** = peptídeo natriurético tipo C  
**NPR2** = receptor peptídeo natriurético tipo 2  
**NTS** = neurotensina  
**NTSR** = receptor da neurotensina  
**P4** = progesterona  
**PBS** = tampão fosfato-salina  
**PDE3** = fosfodiesterase 3  
**PDE3A** = fosfodiesterase do tipo 3A  
**PG** = prostaglandinas  
**PGE2** = prostaglandina E2  
**PIV** = produção *in vitro* de embriões  
**PKA** = proteína quinase A  
**PKC** = proteína quinase C  
**PTGS2** = prostaglandina sintetase 2  
**PTX3** = pentraxina 3  
**RNA** = ácido ribonucleico  
**RNA<sub>m</sub>** = ácido ribonucleico mensageiro  
**SD** = desvio padrão  
**SF** = sistema folicular  
**TSG6** = proteína indutora do fator de necrose tumoral 6  
**TNFAIP6** = fator de necrose tumoral 6  
**TZP** = projeções trans-zonais  
**VG** = vesícula germinativa  
**VGBD** = quebra da vesícula germinativa

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Interação cumulus-oócito .....	5
2.2 Maturação oocitária .....	7
2.3 Controle da retomada meiótica .....	8
2.4 Expansão das células do cumulus .....	10
2.5 Neurotensina .....	10
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
3.1 Específicos .....	11
3.2 Hipóteses .....	11
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>19</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. RESULTS.....</b>	<b>28</b>
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURES .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>38</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>41</b>

## RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos em bovinos é ineficiente e há grande interesse no desenvolvimento de abordagens para melhorar as taxas de maturação e fertilização. Fatores intrafoliculares estão sendo explorados como potenciais aditivos para o sistema *in vitro*. Um desses fatores é a neurotensina (NTS), neuropeptídeo que estimula a maturação e aprimora a competência para o desenvolvimento oocitário. Em suínos, a NTS potencializa a ativação da via de quinases reguladas por sinais extracelulares do tipo 1 e 2 (ERK1/2) como resultado da expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) nas células do cumulus (CC), dessa forma favorecendo a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da NTS sobre a expansão das CC e progresso da meiose em dois cenários atuais da MIV, induzida com hormônio folículo estimulante (FSH), método convencional ou utilizando componentes que mimetizam a condição fisiológica, denominado de sistema folicular (SF). Em adição, foram investigados os efeitos da NTS sobre a produção e cinética embrionária na espécie bovina. Na MIV induzida com FSH, a NTS aumentou a porcentagem de complexos cumulus-oócito (COCs) totalmente expandidos após 24 horas de cultivo. A mesma tendência foi observada na taxa de metáfase II (MII) após 18, 20 e 22 horas de cultivo. Distintamente, a adição da NTS em COCs cultivados no SF, não afetou a porcentagem de oócitos expandidos, nem a taxa de MII às 20 e 22 horas da MIV, embora tenha aumentado a mesma após 18 horas de cultivo. Contudo, a adição de NTS ao sistema de cultivo *in vitro* induzido com FSH ou SF não alterou a taxa de blastocisto nem a cinética embrionária avaliada pelo número total de células. No entanto, o presente estudo fornece novas evidências, pela primeira vez em bovinos, de que a NTS melhora a expansão do cumulus e regula a dinâmica da retomada meiótica durante a MIV, que podem favorecer a aquisição de competência no desenvolvimento e contribuir para a compreensão do papel da NTS na regulação da maturação do COC.

**Palavras Chave:** maturação *in vitro*, neurotensina, expansão do cumulus, metáfase II.

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

A população folicular no ovário da fêmea bovina é estabelecida ainda na vida fetal e o animal já nasce com a reserva de gametas que será utilizada durante toda a sua vida reprodutiva. Ao longo da foliculogênese, a vasta maioria dos folículos sofre degeneração atrésica, enquanto apenas uma pequena parcela atinge o estágio ovulatório (Fortune 2003; Gandolfi & Gandolfi 2001).

Algumas biotécnicas de reprodução assistida tem sido empregadas com objetivo de maximizar e explorar o potencial reprodutivo das fêmeas bovinas, além do aumento na produtividade dos rebanhos de corte e leite (Farsi et al. 2013; Yang et al. 1998). Entre elas, destaca-se a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV) que tende a ser intensamente pesquisada e os protocolos aperfeiçoados para melhorar cada vez mais as taxas de produção. A PIV compreende a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Apesar do grande avanço desta técnica, os índices de maturação do complexo cumulus-oócito (COC) no sistema *in vitro* são deficitários quando comparado a condições fisiológicas (Rizos et al. 2002; Sirard et al. 2006).

Esse desempenho inferior da PIV está associado a diversos fatores como a perda da sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática durante a MIV pela remoção dos oócitos dos folículos (Dode et al. 2006). Além disso, o crescimento e a diferenciação do oócito e das células somáticas nos folículos ovarianos dependem de uma comunicação bidirecional e essencial para o desenvolvimento do COC e, conseqüentemente, para a fecundação e geração de um embrião com alto potencial de desenvolvimento (Eppig 2001).

O microambiente folicular permite que oócito se mantenha em parada meiótica, denominada também como estado de vesícula germinativa (VG). Posteriormente, fatores intrafoliculares induzidos pelo pico ovulatório do hormônio luteinizante (LH) iniciam a retomada da meiose e a diferenciação do cumulus (Gilchrist 2011). Portanto, o aprofundamento dos conhecimentos sobre os mecanismos que controlam a maturação oocitária e os fatores que são liberados em resposta as gonadotrofinas é fundamental para ajustar as condições de cultivo para que se aproximem da situação fisiológica, proporcionando melhores resultados na PIV.

Estudo em suínos mostrou que a adição de um neuropeptídeo denominado neurotensina (NTS) ao meio de cultura no momento da MIV contribuiu para a melhoria da expansão do cumulus, a expressão gênica relacionada a esse desenvolvimento, a proporção de metáfase II (MII) e a taxa de mórula (Nagamura et al. 2014; Okamoto et

al. 2016). Adicionalmente a NTS permite a ativação sustentada do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e quinases reguladas por sinas extracelulares do tipo 1 e 2 (ERK1/2) em células do cumulus (CC) durante o processo de ovulação suína, e é um fator para garantir a maturação do oócito e subsequente embriogênese (Okamoto et al. 2016).

Objetivou-se investigar no presente estudo os efeitos da NTS sobre a expansão das CC e progresso da meiose em dois cenários atuais da maturação *in vitro*, induzida com hormônio folículo estimulante (FSH), método convencional ou utilizando componentes de ordem fisiológica encontradas no ambiente folicular, denominado de sistema folicular (SF). Paralelamente, os efeitos da NTS sobre a produção e cinética embrionária na espécie bovina também foram investigados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Interação cumulus-oócito**

A foliculogênese se inicia com a formação do folículo primordial e finaliza com o folículo pré-ovulatório, envolvendo etapas de formação, desenvolvimento e maturação folicular (Van den Hurk & Zhao 2005). Em fêmeas de mamíferos, o folículo é a unidade funcional do ovário e tem como finalidade manter as condições ideais para o crescimento e maturação do oócito (McCaffery et al. 2000).

Para o crescimento e a diferenciação do oócito e das células somáticas nos folículos ovarianos, deve haver comunicação bidirecional entre os dois tipos celulares (Eppig 2001) proporcionando um microambiente que assegura o sucesso da maturação e o desenvolvimento posterior. As CC fornecem suporte nutricional para o desenvolvimento do oócito e tem papel fundamental no seu crescimento e metabolismo (Buccione et al. 1990; Haghghat & Van Winkle 1990). Em contrapartida, o efeito do oócito sobre as CC inclui prevenir contra apoptose e secretar fatores parácrinos que agem nas CC e nas células da granulosa (CG) murais, essenciais para a regulação da função ovariana (Eppig 2001; Gilchrist et al. 2004; McNatty et al. 2004).

A comunicação entre o oócito e as células adjacentes pode ser por projeções trans-zonais (TZP), pelas junções do tipo *gap* e também ocorre via sinalização parácrina intrafolicular (Albertini et al. 2001; Lodde et al. 2007; Santiquet et al. 2012). As TZP são extensões das células adjacentes que penetram na zona pelúcida do oócito, onde junções do tipo *gap* permitem o transporte de metabólitos, íons,

aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (Albertini et al. 2001). A presença de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) nas TZP e sua transferência das CC para o oócito, reforçam a importância das TZP na comunicação intercelular do COC e indicam a regulação promovida pelas CC no estoque de RNAm e a síntese proteica do oócito após a queda da sua atividade transcricional (Macaulay et al. 2014).

As junções do tipo *gap* são compostas por seis unidades idênticas (hexamêros de proteínas pertencentes à família das conexinas), que se arranjam formando um túnel comunicante com um poro central (Santiquet et al. 2012). Isso permite a passagem de moléculas pequenas e hidrofílicas como adenosina monofosfato cíclico (AMPC), guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e o piruvato, que são fundamentais para o crescimento, metabolismo e controle da maturação do oócito. O oócito é dependente da fosforilação oxidativa da adenosina tri-fosfato (ATP) e não possui capacidade de oxidar a glicose. Já as CC tem uma significativa habilidade em captar e utilizar a glicose (Cetica et al. 2002; Gilchrist et al. 2008; Sutton-McDowall et al. 2004). O metabolismo da glicose dentro das CC fornece substrato para fosforilação oxidativa dentro do oócito (Gilchrist et al. 2008; Sutton et al. 2003).

Além das TZP e das junções do tipo *gap*, a comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre via sinalização de fatores parácrinos. Diversos fatores secretados pelo oócito (FSO) agem nas CG vizinhas regulando seu próprio desenvolvimento (Gilchrist et al. 2008). Dentre os FSO, destacam-se o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) e a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15). Esses fatores participam da regulação da maturação oocitária e da diferenciação das células da granulosa em CC além de serem fundamentais para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais (Juengel & McNatty 2005; Li et al. 2000). A inclusão dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) dentre os FSO também tem sido sugerida em função de seus padrões de expressão e influência sobre o metabolismo energético e expansão das CC (Buratini et al. 2007; Buratini et al. 2005; Caixeta et al. 2013; Machado et al. 2009; Sugiura et al. 2005). A competência adquirida pelo oócito em completar a meiose, ser fertilizado e progredir na embriogênese depende da interação cumulus-oócito regulada através desses mecanismos de comunicação intercelular (Coticchio et al. 2004; Dumesic et al. 2015).



## 2.2 Maturação oocitária

A maturação oocitária tem como finalidade capacitar o gameta feminino a suportar fases de desenvolvimento subsequentes até que ocorra a ativação do genoma embrionário (Farsi et al. 2013; Ferreira et al. 2009). O processo de maturação oocitária compreende a maturação do núcleo e do citoplasma, sendo que estas devem acontecer em sincronia para não haver prejuízo celular. O descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática pode comprometer a fecundação e subsequente embriogênese (Xu & Greve 1988). A maturação nuclear é caracterizada pela progressão da meiose no oócito, que inclui diversos eventos, como remodelagem da cromatina, quebra da vesícula germinativa (VGBD), desaparecimento do nucléolo, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico e após a fertilização a extrusão do segundo corpúsculo polar finalizando a meiose (Meinecke et al. 2001). Na maturação citoplasmática ocorre reorganização de organelas, acúmulo de proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e fatores transcricionais (Watson 2007).

Em fêmeas de mamíferos, os oócitos se encontram bloqueados no estágio de dictióteno da prófase I ao nascimento. A retomada da meiose acontece a partir da puberdade, induzida *in vivo* pelo pico ovulatório do LH, culminando no rompimento da VG (Pincus & Enzmann 1935; Schatten & Sun 2011). A maturação nuclear progride até MII, estágio no qual é bloqueada novamente e só será retomada após fecundação (Pincus & Enzmann 1935).

Como descrito (Lodde et al. 2007), a condensação da cromatina de oócitos bovinos no estágio de VG ocorre de maneira gradual até a VGBD. A VG apresenta quatro estágios independentes de configuração da cromatina, classificados como VG0, VG1, VG2 e VG3. A fase VG0 é caracterizada por um padrão de cromatina difusa filamentosa em toda a área do núcleo, que representa a grande maioria dos oócitos em folículos antrais precoces. Os oócitos em estágio VG0 são transcricionalmente ativos, mas incapazes de progredir até o estágio de MII da divisão meiótica. De acordo com (Lodde et al. 2007; Lodde et al. 2008), no estágio VG1 a cromatina apresenta alguns focos de condensação, o que representa um estado de estabilidade transcricional e, apesar da competência meiótica completa, o oócito apresenta uma capacidade limitada para completar o desenvolvimento. Em contrapartida, os estágios VG2 e VG3 mostram uma maior capacidade de desenvolvimento. Em VG2, ocorre a formação de aglomerados distintos de cromatina condensada, enquanto que em VG3 o nível máximo de condensação é alcançado com a cromatina organizada em um único aglomerado (Lodde et al. 2007).

Durante a foliculogênese o oócito adquire capacidade de retomar a meiose (Albertini et al. 2003). Conforme descrito (Sirard 2001), quando os oócitos são removidos dos folículos, perdem a influência dos fatores presentes no fluido folicular, dentre eles os inibidores da meiose, sem os quais o processo de maturação nuclear e citoplasmática são iniciados, o que pode afetar a competência para o desenvolvimento embrionário. Com a retomada da progressão meiótica, ocorre bloqueio gradual da maturação citoplasmática e do acúmulo de transcritos e proteínas, que acontece no oócito em estágio inicial de VG, quando os cromossomos encontram-se descondensados. Desse modo, quando o oócito é retirado do ambiente folicular antes da onda pré-ovulatória de LH, ocorre o descompasso entre maturação citoplasmática e nuclear, essa assincronia influencia negativamente a competência oocitária (Sirard 2001).

### **2.3 Controle da retomada meiótica**

A maturação meiótica depende das concentrações dos nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc (Cho et al. 1974). A produção de GMPc pelas CC é dependente da sinalização entre o peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e o seu receptor peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) (Vaccari et al. 2009; Zhang et al. 2010; Zhang et al. 2011). O NPPC é um inibidor fisiológico da retomada da meiose e mantém a funcionalidade das junções do tipo *gap* permitindo a passagem do GMPc e, este por sua vez, controla a atividade da fosfodiesterase do tipo 3A (PDE3A), que são enzimas que degradam o AMPc (Franciosi et al. 2014; Tsafiriri et al. 1996), dessa forma o AMPc se mantém elevado e não ocorre a retomada da meiose, mas uma vez que essa sinalização é interrompida ocorre a redução do AMPc no oócito e conseqüentemente a retomada da meiose (Gilchrist et al. 2016). O pico de LH reduz os níveis de RNAm de NPPC e a sinalização do NPPC com seu receptor NPR2 é interrompida, resultando na diminuição do GMPc dentro das CC, não sendo transferido para o oócito (Liu et al. 2014). A ausência de GMPc eleva os níveis de PDE3A que promove a hidrólise de AMPc, permitindo a retomada da meiose (Zhang et al. 2010; Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2014).

A expressão dos fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-*like*): ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) nas CG é desencadeada pelo pico de LH que gera uma elevação nos níveis de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (Freimann et al. 2004; Park et al. 2004).

Estudos demonstraram que os fatores EGF-*like* parecem mediar as ações do FSH, agente indutor da MIV, já que este estimula a expressão da AREG e EREG em CG humanas (Freimann et al. 2004) e em CC bovinas (Caixeta et al. 2013). O FSH é amplamente utilizado em diversos protocolos de maturação *in vitro* devido a presença de receptores para FSH em CC e em CG de folículos de pequeno a médio tamanho (Van Tol et al. 1996). Estudos anteriores demonstraram que a substituição do FSH no meio MIV pelo peptídeo AREG, um indutor fisiológico da maturação do COC, mostrou-se eficiente em melhorar a qualidade embrionária e aumentar o número de blastocistos (Albuz et al. 2010; Richani et al. 2013). Adicionalmente, a suplementação do meio MIV com fatores do tipo EGF pode melhorar a competência de desenvolvimento de oócitos em relação à MIV induzida exclusivamente com gonadotrofinas (Prochazka et al. 2011; Richani et al. 2013).

Para serem liberados da superfície celular na sua forma ativa os fatores EGF-*like* devem ser clivados pelos membros da família desintegrina e metaloproteinases (ADAMs) (Ben-Ami et al. 2006). Assim que liberados, esses fatores se ligam aos receptores EGFR nas CG e nas CC e estimulam a maturação do COC (Ashkenazi et al. 2005; Conti et al. 2006; Diaz et al. 2006; Su et al. 2003). A ligação dos fatores EGF-*like* aos seus receptores EGFR induzem a fosforilação das ERK1/2 (Sakaguchi et al. 2000) e ativação de vias que induzem a fosforilação da conexina 43 (Cx43), causando o fechamento das junções do tipo *gap* com consequente redução dos efeitos inibitórios do AMPc e GMPc provenientes das CC sobre a meiose. Quando presentes, o AMPc e o GMPc mantêm o bloqueio meiótico pela inibição do fator promotor da maturação (MPF) e da regulação da PDE3A, respectivamente (Gilchrist et al. 2011). A diminuição do fluxo intercelular de GMPc oriundo das CC e hidrólise do AMPc produzido pelo oócito através da PDE3A, resulta na desfosforilação e consequente ativação do MPF (Miller 1992). A proteína MPF é responsável pelo início da maturação oocitária e é ativada concomitantemente à VGBD. Essa proteína é um complexo formado pela ciclina B (subunidade regulatória) e quinase p34 cdc2 (subunidade catalítica). Quando ativo, o MPF fosforila as proteínas que circundam o envelope nuclear alterando a condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto, resultando na retomada meiótica (Van den Hurk & Zhao 2005). Portanto, conhecer os mecanismos que controlam a maturação oocitária e os fatores que são liberados em resposta as gonadotrofinas é fundamental para melhorar os resultados das técnicas de PIV.

## 2.4 Expansão das células do cumulus

O processo de expansão das CC é caracterizado pela produção de uma matriz extracelular formada pela deposição de ácido hialurônico (HA) e pela síntese de proteínas que organizam e estabilizam essa matriz (Yokoo & Sato 2004). Durante o período pré-ovulatório, a expansão das CC é induzida pelo pico de LH, ativando a expressão dos fatores *EGF-like*, da hialurona sintetase 2 (HAS2), da ciclooxygenase 2 (COX2), da proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e da pentraxina 3 (PTX3) (Ashkenazi et al. 2005; Park et al. 2004; Shimada et al. 2006).

A HAS2 é a principal enzima responsável pela síntese de HA no COC a partir de produtos do metabolismo das CC como as hexosaminas, glicosaminas e glicose (Chen et al. 1990; Schoenfelder & Einspanier 2003). A COX2 (ou prostaglandina sintetase 2; PTGS2) é necessária para a síntese de prostaglandinas (PG). Ela é produzida pelas CC e pelas CG murais, onde regula a expansão do cumulus e a ovulação por meio da prostaglandina E2 (PGE2) (Calder et al. 2001; Eppig 1981; Hizaki et al. 1999). A TSG6 e PTX3 são essenciais para a estabilização do HA na matriz do cumulus expandido (Richards 2005). A PTX3 tem afinidade pela TSG6, e a interação entre elas parece crucial para a estruturação da matriz do cumulus (Richards 2005). A expressão da HAS2, COX2, TSG6 e PTX3 mostrou-se positivamente associada com o potencial de desenvolvimento embrionário e, por isso, esses genes são considerados marcadores da competência do COC para a fecundação (Assidi et al. 2008; Tesfaye et al. 2009).

## 2.5 Neurotensina

A NTS é um neuropeptídeo estimulado pelo pico de LH, e ao se ligar a seu receptor acoplado à proteína G, induz a rotatividade do trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e a mobilização de cálcio intracelular, estimulando várias vias de transdução de sinal como a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), ERKs e isoformas de proteína quinase C (PKC) (Ehlers et al. 2000; Wang et al. 2006). Além disso, a NTS é conhecida por alterar as concentrações de GMPc e AMPc nas células que contém seus receptores (Vincent 1995).

A NTS é um modulador chave da fertilização e concepção em bovinos (Umezu et al. 2019). Dados funcionais e de expressão de mRNA no oviduto e no útero, indicam

a participação da NTS na capacitação espermática e na reação do acrossoma em touros e camundongos (Hiradate et al. 2014; Umezu et al. 2016). A taxa de clivagem, o número de células da massa celular interna e o número total de células embrionárias aumentaram significativamente pela adição de NTS ao meio de fertilização (Umezu et al. 2019). Esses resultados sugeriram que a NTS melhorou a eficiência do desenvolvimento embrionário e qualidade do blastocisto na espécie bovina (Umezu et al. 2019).

Estudos anteriores em suínos mostraram que a adição de NTS ao meio de cultivo MIV melhora a expansão do cumulus e modula a expressão de genes (HAS2, TSG6, PTX3), relacionados a este processo, além de aumentar as taxas de MII e produção embrionária (Nagamura et al. 2014; Okamoto et al. 2016). Adicionalmente, a NTS potencializa a ativação da via ERK1/2 como resultado do aumento da expressão dos EGFRs nas CC, dessa forma favorecendo a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário (Okamoto et al. 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Específicos**

- Investigar os efeitos da NTS sobre a expansão das CC e da progressão meiótica bovina durante a MIV na presença de FSH, ou na presença de componentes que mimetizam a condição fisiológica.
- Investigar os efeitos do tratamento com NTS na MIV sobre a produção e cinética embrionária após a FIV em bovinos.

#### **3.2 Hipóteses**

- A adição de NTS ao meio MIV melhora a competência oocitária e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário após a FIV.
- Efeito positivo da adição de NTS ao meio MIV está associado a melhorias na expansão do cumulus e mudanças na dinâmica da maturação nuclear.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertini, D. F., A. Sanfins, and C. M. Combelles, 2003: Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive biomedicine online*, 6, 410-415.

Albertini, D. F., C. M. Combelles, E. Benecchi, and M. J. Carabatsos, 2001: Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121, 647-653.

Albuz, F. K., M. Sasseville, M. Lane, D. T. Armstrong, J. G. Thompson, and R. B. Gilchrist, 2010: Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human reproduction*, 25, 2999-3011.

Ashkenazi, H., X. Cao, S. Motola, M. Popliker, M. Conti, and A. Tsafiriri, 2005: Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, 146, 77-84.

Assidi, M., I. Dufort, A. Ali, M. Hamel, O. Algriany, S. Dielemann, and M. A. Sirard, 2008: Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of reproduction*, 79, 209-222.

Ben-Ami, I., S. Freimann, L. Armon, A. Dantes, R. Ron-El, and A. Amsterdam, 2006: Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Molecular human reproduction*, 12, 413-419.

Buccione, R., B. C. Vanderhyden, P. J. Caron, and J. J. Eppig, 1990: FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Developmental biology*, 138, 16-25.

Buratini, J., Jr., M. G. Pinto, A. C. Castilho, R. L. Amorim, I. C. Giometti, V. M. Portela, E. S. Nicola, and C. A. Price, 2007: Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biology of reproduction*, 77, 743-750.

Buratini, J., Jr., A. B. Teixeira, I. B. Costa, V. F. Glapinski, M. G. Pinto, I. C. Giometti, C. M. Barros, M. Cao, E. S. Nicola, and C. A. Price, 2005: Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, 130, 343-350.

Caixeta, E. S., M. L. Sutton-McDowall, R. B. Gilchrist, J. G. Thompson, C. A. Price, M. F. Machado, P. F. Lima, and J. Buratini, 2013: Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*, 146, 27-35.

Calder, M. D., A. N. Caveney, M. E. Westhusin, and A. J. Watson, 2001: Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biology of reproduction*, 65, 135-140.

Cetica, P., L. Pintos, G. Dalvit, and M. Beconi, 2002: Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 124, 675-681.

Chen, L., S. E. Wert, E. M. Hendrix, P. T. Russell, M. Cannon, and W. J. Larsen, 1990: Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*, 26, 236-247.

Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974: Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *The Journal of experimental zoology*, 187, 383-386.

Conti, M., M. Hsieh, J. Y. Park, and Y. Q. Su, 2006: Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular endocrinology*, 20, 715-723.

Coticchio, G., E. Sereni, L. Serrao, S. Mazzone, I. Iadarola, and A. Borini, 2004: What criteria for the definition of oocyte quality? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034, 132-144.

Diaz, F. J., M. J. O'Brien, K. Wigglesworth, and J. J. Eppig, 2006: The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Developmental biology*, 299, 91-104.

Dode, M. A., I. Dufort, L. Massicotte, and M. A. Sirard, 2006: Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular reproduction and development*, 73, 288-297.

Dumesic, D. A., D. R. Meldrum, M. G. Katz-Jaffe, R. L. Krisher, and W. B. Schoolcraft, 2015: Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*, 103, 303-316.

Ehlers, R. A., Y. Zhang, M. R. Hellmich, and B. M. Evers, 2000: Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 269, 704-708.

Eppig, J. J., 1981: Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biology of reproduction*, 25, 191-195.

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

Farsi, M. M., N. Kamali, and M. Pourghasem, 2013: Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2, 99-109.

Ferreira, E. M., A. A. Vireque, P. R. Adona, F. V. Meirelles, R. A. Ferriani, and P. A. Navarro, 2009: Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71, 836-848.

Fortune, J. E., 2003: The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal reproduction science*, 78, 135-163.

Franciosi, F., G. Coticchio, V. Lodde, I. Tessaro, S. C. Modena, R. Fadini, M. Dal canto, M. M. Renzini, D. F. Albertini, and A. M. Luciano, 2014: Natriuretic peptide precursor C

delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biology of reproduction*, 91, 61.

Freimann, S., I. Ben-Ami, A. Dantes, R. Ron-El, and A. Amsterdam, 2004: EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 324, 829-834.

Gandolfi, T. A., and F. Gandolfi, 2001: The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, 55, 1255-1276.

Gilchrist, R. B., 2011: Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, fertility, and development*, 23, 23-31.

Gilchrist, R. B., L. J. Ritter, and D. T. Armstrong, 2004: Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science*, 82-83, 431-446.

Gilchrist, R. B., M. Lane, and J. G. Thompson, 2008: Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*, 14, 159-177.

Gilchrist, R. B., M. De Vos, J. Smits, and J. G. Thompson, 2011: IVM media are designed specifically to support immature cumulus-oocyte complexes not denuded oocytes that have failed to respond to hyperstimulation. *Fertility and sterility*, 96, e141; author reply e142.

Gilchrist, R. B., A. M. Luciano, D. Richani, H. T. Zeng, X. Wang, M. D. Vos, S. Sugimura, J. Smits, F. J. Richard, and J. G. Thompson, 2016: Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 152, R143-157.

Haghighat, N., and L. J. Van Winkle, 1990: Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *The Journal of experimental zoology*, 253, 71-82.

Hiradate, Y., H. Inoue, N. Kobayashi, Y. Shirakata, Y. Suzuki, A. Goth, S. G. Roh, T. Uchida, K. Katoh, M. Yoshida, E. Sato, and K. Tanemura, 2014: Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biology of reproduction*, 91, 53.

Hizaki, H., E. Segi, Y. Sugimoto, M. Hirose, T. Saji, F. Ushikubi, T. Matsuoka, Y. Noda, T. Tanaka, N. Yoshida, S. Narumiya, and A. Ichikawa, 1999: Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10501-10506.

Juengel, J. L., and K. P. McNatty, 2005: The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human reproduction update*, 11, 143-160.

Li, R., R. J. Norman, D. T. Armstrong, and R. B. Gilchrist, 2000: Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of reproduction*, 63, 839-845.



- Liu, X., F. Xie, A. M. Zamah, B. Cao, and M. Conti, 2014: Multiple pathways mediate luteinizing hormone regulation of cGMP signaling in the mouse ovarian follicle. *Biology of reproduction*, 91, 9.
- Lodde, V., S. Modina, C. Galbusera, F. Franciosi, and A. M. Luciano, 2007: Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Molecular reproduction and development*, 74, 740-749.
- Lodde, V., S. Modina, P. Maddox-Hyttel, F. Franciosi, A. Lauria, and A. M. Luciano, 2008: Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Molecular reproduction and development*, 75, 915-924.
- Macaulay, A. D., I. Gilbert, J. Caballero, R. Barreto, E. Fournier, P. Tossou, M. A. Sirard, H. J. Clarke, E. W. Khandjian, F. J. Richard, P. Hyttel, and C. Robert, 2014: The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biology of reproduction*, 91, 90.
- Machado, M. F., V. M. Portela, C. A. Price, I. B. Costa, P. Ripamonte, R. L. Amorim, and J. Buratini, Jr., 2009: Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *The Journal of endocrinology*, 202, 347-353.
- McCaffery, F. H., R. Leask, S. C. Riley, and E. E. Telfer, 2000: Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of reproduction*, 63, 267-273.
- McNatty, K. P., L. G. Moore, N. L. Hudson, L. D. Quirke, S. B. Lawrence, K. Reader, J. P. Hanrahan, P. Smith, N. P. Groome, M. Laitinen, O. Ritvos and J. L. Juenge, 2004: The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*, 128, 379-386.
- Meinecke, B., U. Janas, E. Podhajsky, and S. Meinecke-Tillmann, 2001: Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 36, 183-188.
- Miller, J. B., and P. Russell, 1992: The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, v.68, p.407-410.
- Nagamura, Y., A. Okamoto, M. Shimada and Y. Yamashita, 2014: Expression of Neurotensin (NTS) and its role during in vitro culture of porcine cumulus cell egg complex (COC). Japan Breeding Biology Association, 107-8.
- Okamoto, A., Y. Namamura, M. Shimada and Y. Yasushita, 2016: Neurotensin (NTS) expressed in porcine cumulus cells increases expression of EGFR receptor (EGFR) and induces sustained activation of EGFR-ERK 1/2 system. Japan Breeding Biology Association, 109-11.
- Park, J. Y., Y. Q. Su, M. Ariga, E. Law, S. L. Jin, and M. Conti, 2004: EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 303, 682-684.
- Pincus, G., and E. V. Enzmann, 1935: The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *The Journal of experimental medicine*, 62, 665-675.

Prochazka, R., M. Petlach, E. Nagyova, and L. Nemcova, 2011: Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction*, 141, 425-435.

Richani, D., L. J. Ritter, J. G. Thompson, and R. B. Gilchrist, 2013: Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence. *Molecular human reproduction*, 19, 500-509.

Richards, J. S., 2005: Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and cellular endocrinology*, 234, 75-79.

Rizos, D., T. Fair, S. Papadopoulos, M. P. Boland, and P. Lonergan, 2002: Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular reproduction and development*, 62, 320-327.

Sakaguchi, M., T. Dominko, M. L. Leibfried-Rutledge, T. Nagai, and N. L. First, 2000: A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology*, 54, 1327-1342.

Santiquet, N. W., Y. Develle, A. Laroche, C. Robert, and F. J. Richard, 2012: Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biology of reproduction*, 87, 46.

Schatten, H., and Q. Y. Sun, 2011: Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. *Molecular reproduction and development*, 78, 757-768.

Schoenfelder, M., and R. Einspanier, 2003: Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of reproduction*, 69, 269-277.

Shimada, M., I. Hernandez-Gonzalez, I. Gonzalez-Robayna, and J. S. Richards, 2006: 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. *Molecular endocrinology*, 20, 1352-1365.

Sirard, M. A., 2001: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1241-1254.

Sirard, M. A., F. Richard, P. Blondin, and C. Robert, 2006: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136.

Su, Y. Q., J. M. Denegre, K. Wigglesworth, F. L. Pendola, M. J. O'Brien, and J. J. Eppig, 2003: Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Developmental biology*, 263, 126-138.

Sugiura, K., F. L. Pendola, and J. J. Eppig, 2005: Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology*, 279, 20-30.

- Sutton-McDowall, M. L., R. B. Gilchrist, and J. G. Thompson, 2004: Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*, 128, 313-319.
- Sutton, M. L., P. D. Cetica, M. T. Beconi, K. L. Kind, R. B. Gilchrist, and J. G. Thompson, 2003: Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, 126, 27-34.
- Tesfaye, D., N. Ghanem, F. Carter, T. Fair, M. A. Sirard, M. Hoelker, K. Schellander, and P. Lonergan, 2009: Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reproduction, fertility, and development*, 21, 451-461.
- Tsafiriri, A., S. Y. Chun, R. Zhang, A. J. Hsueh, and M. Conti, 1996: Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Developmental biology*, 178, 393-402.
- Umezu, K., Y. Hiradate, T. Oikawa, H. Ishiguro, T. Numabe, K. Hara, and K. Tanemura, 2016: Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *The Journal of reproduction and development*, 62, 409-414.
- Umezu, K., R. Yajima, Y. Hiradate, R. Yanai, T. Numabe, K. Hara, T. Oikawa, and K. Tanemura, 2019: Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *The Journal of reproduction and development*, 65, 147-153.
- Vaccari, S., J. L. Weeks, 2nd, M. Hsieh, F. S. Menniti, and M. Conti, 2009: Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of reproduction*, 81, 595-604.
- Van den Hurk, R., and J. Zhao, 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717-1751.
- Van Tol, H. T., M. J. Van Eijk, C. L. Mummery, R. Van den Hurk, and M. M. Bevers, 1996: Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular reproduction and development*, 45, 218-224.
- Vincent, J. P., 1995: Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. *Cellular and molecular neurobiology*, 15, 501-512.
- Wang, X., Q. Wang, K. L. Ives, and B. M. Evers, 2006: Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12, 5346-5355.
- Watson, A. J., 2007: Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science*, 85, E1-3.
- Xu, K. P., and T. Greve, 1988: A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 82, 127-134.

Yang, X., C. Kubota, H. Suzuki, M. Taneja, P. E. Bols, and G. A. Presicce, 1998: Control of oocyte maturation in cows--biological factors. *Theriogenology*, 49, 471-482.

Yokoo, M., and E. Sato, 2004: Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *International review of cytology*, 235, 251-291.

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

Zhang, M., Y. Q. Su, K. Sugiura, K. Wigglesworth, G. Xia, and J. J. Eppig, 2011: Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, 152, 4377-4385.

Zhang, M., Y. Tao, G. Xia, H. Xie, H. Hong, F. Wang, and L. Lei, 2005: Atrial natriuretic peptide negatively regulates follicle-stimulating hormone-induced porcine oocyte maturation and cumulus expansion via cGMP-dependent protein kinase pathway. *Theriogenology*, 64, 902-916.

Zhang, W., Q. Chen, Y. Yang, W. Liu, M. Zhang, G. Xia, and C. Wang, 2014: Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. *Molecular reproduction and development*, 81, 1030-1041.

## **CAPÍTULO 2**

**Artigo preparado para ser submetido para publicação  
na revista Theriogenology**

O artigo está apresentado de acordo com as normas de submissão exigida  
pela revista

**Título: Effects of Neurotensin on cumulus expansion, meiotic progression  
and embryo production during IVM/IVF in cattle**

**Effects of Neurotensin on cumulus expansion, meiotic progression and embryo production during IVM/IVF in cattle**

Isabela Lima Gama <sup>a</sup>, Ana Caroline Silva Soares <sup>a</sup>, Thaisy Tino Dellaqua <sup>a</sup>, Alberto Maria Luciano <sup>b</sup>, Valentina Lodde <sup>b</sup> Jose Buratini <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Ovarian Molecular Physiology Laboratory, Department of Physiology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, São Paulo, Brazil.

<sup>b</sup> Reproductive and Developmental Biology Laboratory, Department of Health, Animal Science and Food Safety, University of Milan, Milan, Italy.

Correspondence:

Isabela Lima Gama

Departamento de Fisiologia, IB, Universidade Estadual Paulista

Rubião Junior, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970

Telephone/Fax: (55) 14.38800330

E-mail: [isalimagama@gmail.com](mailto:isalimagama@gmail.com)

## **Abstract**

*In vitro* maturation (IVM) of oocytes is a critical step of *in vitro* embryo production (IVP) in cattle and depends on direct and indirect the communication among mural granulosa cells (GC), cumulus cells (CC) and the oocyte. Neurotensin (NTS) expression is stimulated by luteinizing hormone (LH) in GC and CC in pigs, favoring oocyte maturation and subsequent embryogenesis. In the present study, we first tested the hypothesis that the addition of NTS to the IVM medium, would improve oocyte competence and consequently, embryonic development. The specific objectives of the study were to test the effects of NTS in two different current scenarios of IVM: with supraphysiological levels of follicle stimulating hormone (FSH), conventional method, or in the presence of the follicular system (FS) that has components (steroid hormones, growth factor, amphiregulin and lower concentrations of FSH), that mimic an approximate physiological condition. Bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 - 8 mm diameter follicles and submitted to IVM containing or not NTS. In IVM induced with FSH, NTS increased the percentage of fully expanded COCs. The same tendency was observed for metaphase II (MII) rate after 18, 20 and 22h of culture. However, supplementation with NTS during IVM with physiological components did not affect cumulus expansion or meiotic progression. Also, in neither culture systems, addition of NTS was able to improve blastocyst production or embryonic quality, as assessed by the number of embryo cells. Nevertheless, in conclusion the present study provides evidence, for the first time in cattle that NTS may participate in the mechanisms regulating cumulus expansion and meiotic resumption.

**Keywords:** *in vitro* maturation, neurotensin, cumulus expansion, metaphase II, cattle.



## 1. Introduction

Oocyte quality is crucial for assisted reproductive technologies applied to animals and humans [1]. *In vitro* matured oocytes are less competent to become fertilized and advance to the blastocyst stage in relation to *in vivo* matured oocyte [2]. Successful oocyte maturation dependent on direct and indirect interaction among mural granulosa cells (GC), cumulus cells (CC) and the oocyte. This interaction stimulates oocyte growth and gradual acquisition for oocyte development competence [1].

*In vivo* final maturation is triggered by the luteinizing hormone (LH) surge, which causes the release of the epidermal growth factor (EGF)-like molecules amphiregulin (AREG), epiirregulin (EREG) and betacellulin (BTC) from GC by increasing cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and protein kinase A (PKA) activation [3, 4]. Most *in vitro* maturation (IVM) protocols stimulate final maturation with supraphysiological levels of the follicle stimulating hormone (FSH), which strongly stimulates expression and secretion of EGF-like factors mainly AREG and EREG from CC [4].

EGF-like ligands are synthesized as transmembrane precursors and must be cleaved by members of the disintegrin family and metalloproteinases (ADAMs) to be released from the cell surface in their active form [5]. Once released, EGF-like factors activate their receptors (EGFR) on GC, CC and trigger meiotic resumption and cumulus expansion via mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) [4, 6, 7]. Cumulus expansion requires increased expression of several genes, including prostaglandin synthetase 2 (PTGS2), induced tumor necrosis factor- stimulated

gene 6 (TNFAIP6), pentraxin 3 (PTX3) and hyaluronan synthase 2 (HAS2) [6, 8].

The intracellular mechanisms following EGFR activation and ERK1 / 2 phosphorylation leading to meiosis resumption are not completely known, but include phosphorylation of connexin 43 (Cx43), which causes gap junction closure with consequent loss of the inhibitory effects of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from CC on meiosis. cGMP maintains meiotic arrest by inhibiting phosphodiesterase 3 (PDE3) thus preserving cAMP which prevents the activation of the maturation promoting factor (MPF) [9-11].

Another factor also stimulated by the LH surge is neurotensin (NTS), a neuropeptide that binds to a G-protein-coupled receptor (NTSR) to induce inositol triphosphate (IP3) turnover and mobilization of intracellular calcium, stimulating various signal transduction pathways such as MAPK / ERKs and protein kinase C (PKC) isoforms [12, 13]. In addition, NTS is known to alter cGMP and cAMP concentrations in cells containing their receptors [14].

A previous study in pigs suggest that NTS and AREG act synergistically to promote cumulus expansion, meiotic resumption and embryo development [15, 16]. NTS maintains EGFR expression in CC during ovulation in sows, a process that is sustained by activation of EGFR-ERK1/2 [16].

Considering that NTS is expressed by GC and CC after LH stimulation, and that the addition of NTS to the IVM medium improved swine oocyte maturation [15], we first tested the hypothesis that the addition of NTS to the IVM medium, would improve oocyte competence and consequently, embryonic development. The specific objectives of the study were to test the effects of NTS in two different current scenarios of IVM: with supraphysiological levels of

follicle stimulating hormone (FSH), conventional method, or in the presence of physiological components, denominated follicular system (FS), on the dynamics of cumulus expansion, meiotic progression and, finally, embryonic development after *in vitro* fertilization (IVF).

## **2. Materials and methods**

Unless specified, all chemicals and reagents were purchased from Sigma.

### *2.1 Ovaries and COC collection*

Ovaries of adult cows (predominantly Nellore, *Bos indicus*) were obtained at a slaughterhouse near Sao Paulo State University- Campus of Botucatu (Frigonobre) and transported to the laboratory in sterile saline solution (0.9% NaCl) at 38°C. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3 - 8 mm diameter follicles with an 18 gauge needle and pooled in a 15 mL conical tube. After sedimentation, COCs were recovered and selected using a stereomicroscope. Only COCs with homogenous cytoplasm and at least five compact layers of cumulus cells were used (grades 1 and 2). COCs were washed in TCM199 with Earle's salts and 25 mM HEPES, supplemented with 75 µg/mL ampicillin and 4 mg/mL bovine serum albumin (BSA).

### *2.2 In vitro maturation*

COCs were cultured in basic maturation medium (bMM) consisting TCM199 containing Earle's salts supplemented with 4 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 75 µg/mL ampicillin, 22 µg/mL sodium pyruvate and 1 mM cysteamine (Fig. 1). COCs cultured in FSH (control), conventional method, were

matured in bMM supplemented with  $10^{-1}$  UI/mL r-hFSH (Fig. 1). COCs cultured in FS, medium containing components at concentrations found in the follicular environment, were matured in bMM supplemented with  $10^{-2}$  UI/mL r-hFSH, 50 ng/mL  $17\beta$ -estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL insulin-like growth factor (IGF)-1 and 100 ng/mL AREG observed in bovine follicles after the LH surge [17-19] (Fig. 1). To measure the effects of NTS associated to the treatments, the FSH (control) and FS medium was supplemented or not with 1  $\mu$ M NTS (FSH + NTS and FS + NTS, respectively) (Fig. 1). The COCs were matured for 18, 20, 22 e 24 hours in the respective groups, 1-FSH, 2- FSH + NTS, 3- FS and 4- FS + NTS; and cultured in four-well dishes at 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified air. The experiment was performed on six independent replicates.

After IVM, some parameters were evaluated, such as the cumulus expansion degrees and meiosis progression. The NTS concentration used in the present study is the concentration that neuropeptide acts as a key modulator of swine maturation and embryogenesis [16].

### *2.3 Experiment 1- Cumulus expansion assessment, IVF, in vitro culture (IVC) and assessment of embryo total cell number*

At the end of the IVM, cumulus expansion was visually assessed at 24 h of culture according to a subjective scoring system. Grades 1 to 3 were attributed to increasing degrees of expansion: 1– small expansion, characterized by some morphological changes compared to before maturation; 2– intermediate expansion, characterized by fair expansion but notable clusters lacking expansion; 3– complete or almost complete expansion [20]. At the end

of this analysis, was performed IVF as described previously Lodde *et al.* 2007 [21] (Fig. 2A).

The content of a straw of cryopreserved bull spermatozoa (only one batch from the same bull was used throughout the study) was thawed and the cells separated on a 45%–90% Percoll gradient. Sperms were counted and diluted to a final concentration of  $2 \times 10^6$  spermatozoa/mL in fertilization medium that was a modified Tyrode solution supplemented with 0.6% BSA (fatty acid-free), 10  $\mu\text{g/mL}$  heparin, 20  $\mu\text{M}$  penicillamine, 1  $\mu\text{M}$  adrenaline, and 100  $\mu\text{M}$  hypotaurine. COCs and spermatozoa were incubated in 400  $\mu\text{L}$  of IVF medium for 18 h in four-well dishes at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub> in humidified air. Supposed zygotes were then washed, and cumulus cells removed by vortex (2 min, 35 Hz) in 500  $\mu\text{L}$  modified synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with 0.3% BSA fraction V (fatty acid free), minimum essential medium (MEM) essential and nonessential amino acids and 0.72 mM sodium pyruvate and buffered with 10 mM Hepes and 5 mM NaHCO<sub>3</sub>. Presumptive zygotes were transferred in embryo culture medium, which was SOF buffered with 25 mM NaHCO<sub>3</sub> supplemented with MEM essential and nonessential amino acids, 0.72 mM sodium pyruvate, 2.74 mM myoinositol, 0.34 mM sodium citrate and 5% bovine calf serum (Gibco, Invitrogen). Incubation was performed at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> in humidified air for 8 days [22].

After IVC the blastocyst rate were assessed under a stereomicroscope, and blastocysts were morphologically classified as not expanded, expanded, and hatched [23]. The embryos were then fixed in 60% methanol in dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), and cell nuclei were counted under a fluorescence microscope after staining with 1  $\mu\text{g/mL}$  Hoechst 33342.

#### 2.4 Experiment 2- Assessment of meiotic progression

At the end of IVM, the patterns of large-scale chromatin configuration and the meiotic progression after germinal vesicle breakdown (GVBD) were evaluated after different times of culture: 18, 20 and 22 hours (Fig. 2B). All the oocytes were denuded by pipetting in phosphate buffered saline (PBS) fixed in 60% methanol and stained with 1 µg/mL Hoechst 33342. Chromatin status and meiotic staging were determined by epifluorescence microscopy. Oocytes at the GV stage were classified according to the degree of chromatin condensation as described previously Lodde *et al.* 2007 [21]. The meiotic staging was classified in metaphase I (MI), anaphase/telophase (ANA/TEL), metaphase II (MII), or degenerated (DEG) [24, 25].

#### 2.5 Statistical analysis

Data in percentages were arcsine transformed before analysis. The effects of treatment with NTS on cumulus cell expansion, meiosis progression, embryo development rates and blastocyst cell number levels were tested by Shapiro-Wilk's test to verify normality. Means were compared with Student *t* test (parametric data) or Wilcoxon test (non-parametric data). These analyses were performed using JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA) and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

In experiment 1, the combination NTS + FSH promoted a significant increase in the percentage of fully expanded COCs (Fig. 3A), which was not observed when the NTS was added FS group (Fig. 3B). NTS supplementation

in both IVM scenarios did not alter blastocyst production rates neither affect embryonic quality, as assessed by the number of cells on day 8 after IVF (Fig. 4A, B). The addition of the IVM medium with NTS in the FS group, significantly reduced the percentage of expanded and hatched blastocysts (Fig. 4B), this tendency was not observed when NTS was added to the control group (Fig. 4A).

In experiment 2, the addition of NTS to the IVM medium with FSH increased MII rates after 18, 20 and 22 hours of culture (Fig. 5A), which was not observed when the NTS was added FS group after 20 and 22 hours of culture, but it increased after 18 hours of culture (Fig. 5B).

#### **4. Discussion**

Previous study has shown that NTS is expressed by GC and CC after LH stimulation in swine, suggesting a role for NTS in the mechanisms underlying COC maturation [15]. In the present study, we provide evidence for the first time that NTS may play a role in the regulation of cumulus expansion and meiotic progression, although it does not seem to largely impact on the efficiency of *in vitro* embryo production (IVP) in cattle.

In a recent study utilizing the porcine model, COC diameter was increased by the addition of NTS to a medium containing FSH and AREG, suggesting that NTS and AREG pathways interact for full expression of oocyte developmental competence [15]. In the present study, we assessed whether NTS can improve cumulus expansion in two different current scenarios of IVM in cattle. We explore the potential interaction of NTS in the conventional scenario or with a combination of steroid hormones, AREG and IGF-1 at

physiological concentrations in the regulation of cumulus expansion. NTS supplementation in the conventional method promoted a significant increase in the percentage of fully expanded COCs. However, NTS did not alter the competence of the COC in expansion to expand during IVM with physiological components in cattle, contrasting with previous findings in the pig [15]. This discrepancy may be due to species-specific mechanisms regulating cumulus of expansion control or differences in the culture systems.

Previous study has shown that NTS is a key modulator of fertilization and conception in cattle [26]. Functional data and mRNA expression in the oviduct and uterus indicate the participation of NTS in sperm capacitation and acrosome reaction in bulls and mice [27, 28]. Cleavage rate, cell number of internal cell mass and total number of embryonic cells were significantly increased by the addition of NTS to the fertilization medium in cattle [26]. Against our hypothesis, herein we show that the supplementation of the IVM culture medium with NTS did not improve blastocyst production or quality, as assessed by the number of cells after IVF, contrasting with previous findings in cattle [26]. We interpret this discrepancy as a consequence of the addition of NTS in two different stages from IVP. Taken together, the study reported by Umezu *et al.* 2019 [26] suggests that the addition of NTS to the fertilization medium may be a potential cooperative mechanism for the embryo development and blastocyst quality in cattle. However, considering the results obtained in the present study, this capability was not effective by NTS when it was added to IVM medium.

In pig, NTS stimulates the expression of the NTSR in CC, which induces activation of the EGFR-ERK 1/2 system, contributing for resumption of meiosis



and oocyte maturation [16]. In the present study, NTS increased the proportion of bovine oocytes reaching MII, denoting a stimulatory action upon meiosis progression. However, this increase in meiotic competence occurred only in relation to treatment with FSH. The addition of NTS to FS did not alter meiotic dynamics. The important finding of this study is that FS is effective alone in promoting meiosis progression. Aiming for a more physiological induction of oocyte maturation, COCs cultured in FS was induced in the presence of AREG and FSH at concentrations lower than the supraphysiological levels commonly used [29, 30]. It is speculated that the administration of low concentrations of FSH appear to be effective in promoting intercellular communication within the COC, probably by regulating Cx43 phosphorylation in a way that favours gap junctions coupling [31-33]. Previous studies have shown that FSH, AREG and EREG activate cascades required for oocyte developmental competence [34-36]. Supplementation of the IVM medium with EGF-like factors can improve oocyte developmental competence in relation to IVM induced exclusively with gonadotrophins [34, 35]. A recent study in cattle suggest that AREG promotes meiosis progression up to MII more rapidly than FSH [36]. In the same study, embryo production after 24 hours of IVM with AREG or FSH promoted similar blastocyst rates. The present data reinforces and confirm these preliminary results.

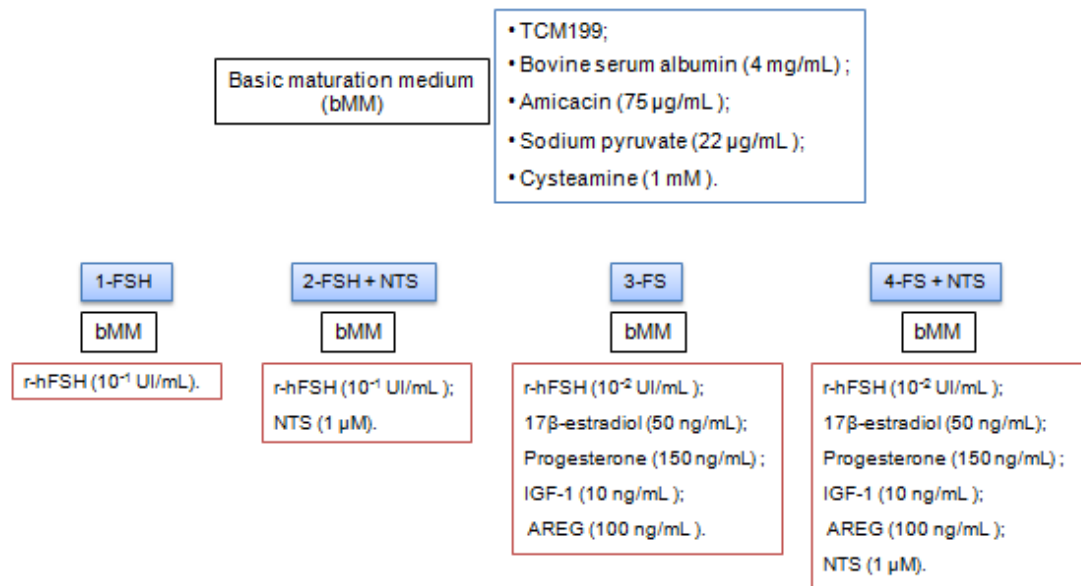
In conclusion, the present study provides novel evidence, that NTS improves cumulus expansion and regulates the dynamics of meiotic resumption during IVM in cattle. Other studies are required to assess whether NTS can be used to improve IVF outcomes in cattle.

## **Acknowledgements**

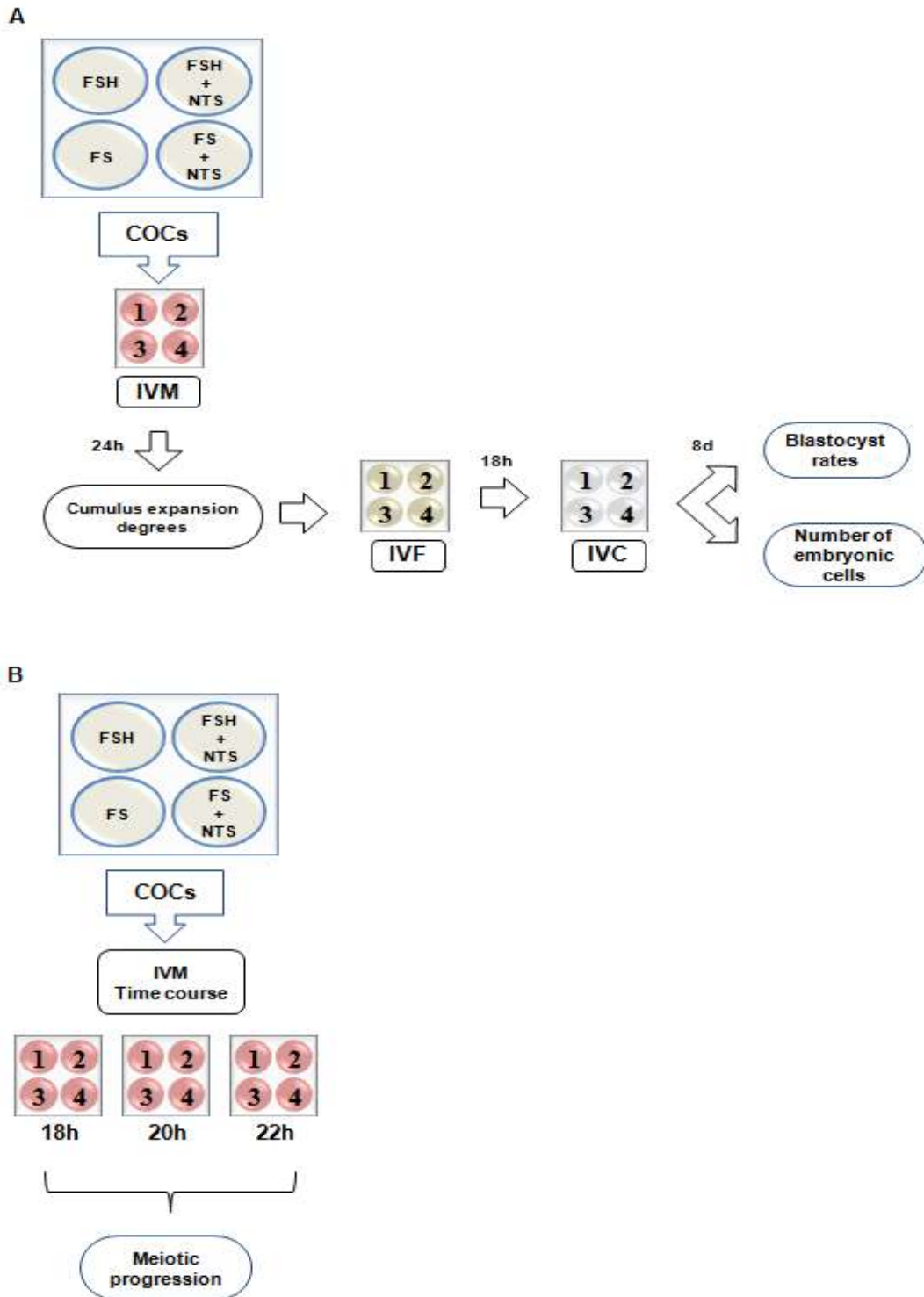
The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- nº 2017/07588-4) for financial support.

## FIGURES

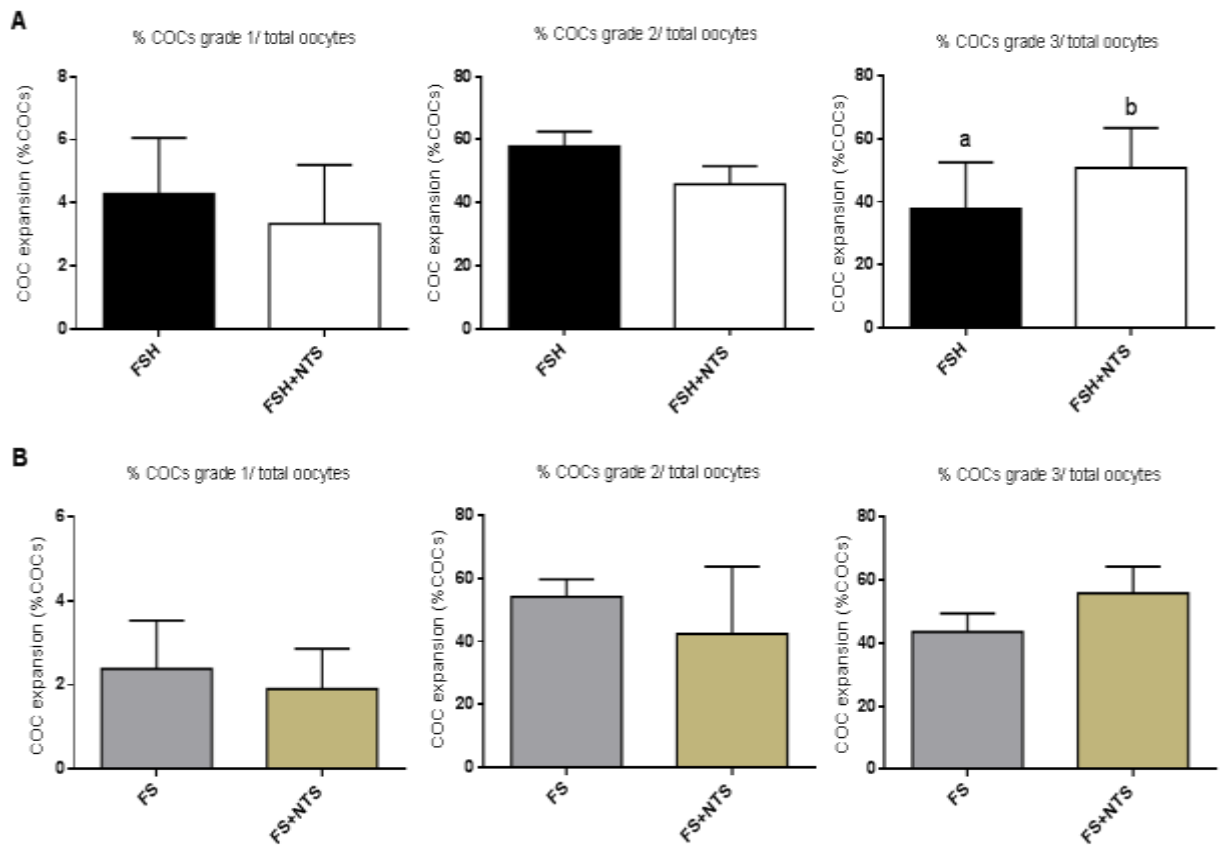
### Composition of experimental groups



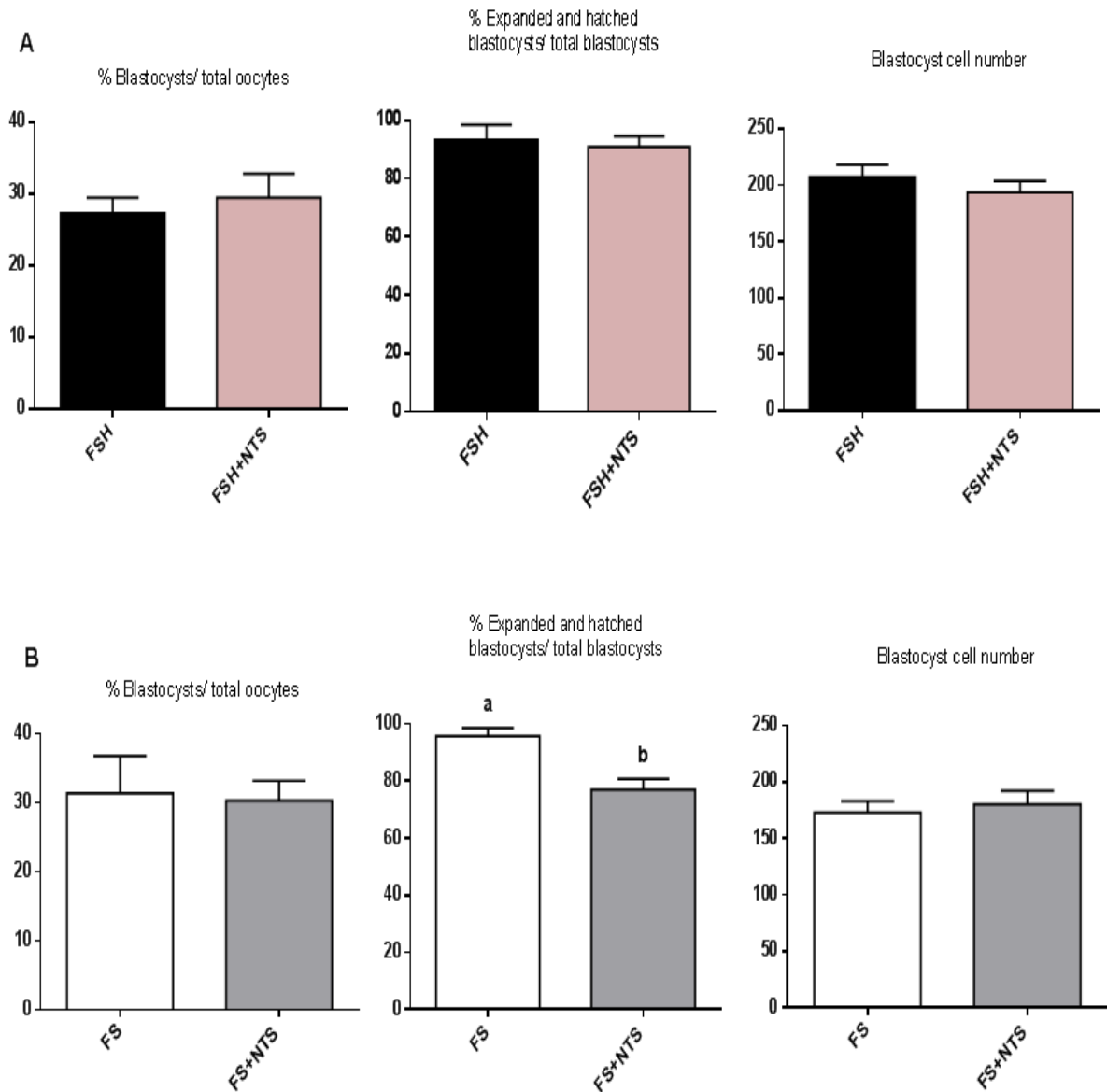
**Fig. 1.** Basic maturation medium (bMM) contained TCM199 supplemented with 4 mg/mL bovine serum albumin, 75 µg/mL amikacin, 22 µg/mL sodium pyruvate and 1 mM cysteamine. The 1-FSH group was composed by bMM and  $10^{-1}$  UI/mL r-hFSH. The 2-FSH + NTS group contained  $10^{-1}$  UI/mL r-hFSH and 1 µM NTS. The composition of the 3-FS group was  $10^{-2}$  UI/mL r-hFSH, 50 ng/mL 17β-estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL insulin-like grown factor (IGF)-1 and 100 ng/mL AREG. The 4-FS + NTS group was supplemented with  $10^{-2}$  UI/mL r-hFSH, 50 ng/mL 17β-estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL insulin-like grown factor (IGF)-1, 100 ng/mL AREG and 1 µM NTS.



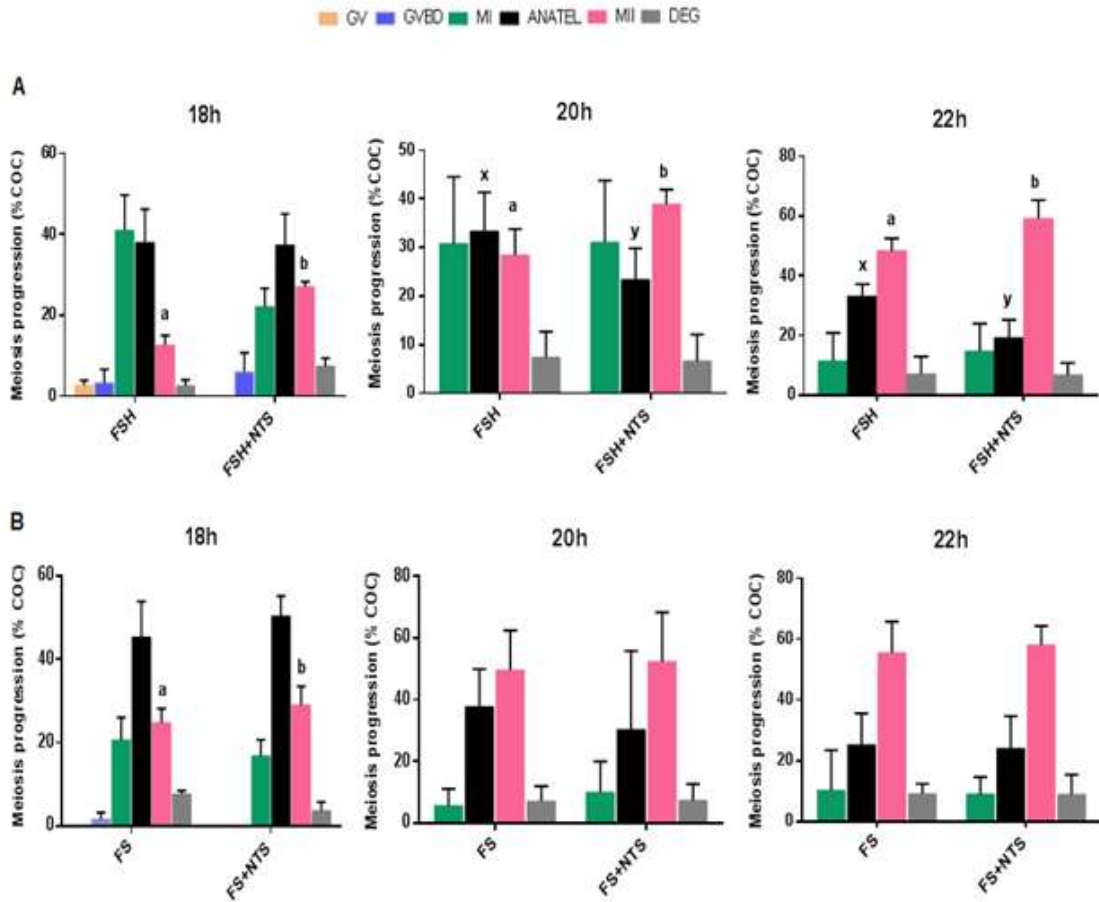
**Fig. 2.** (A) Schematic representation of the experiment 1. Pools of 30-35 COCs were divided in four groups: FSH, FSH+NTS, FS and FS+NTS. COCs were submitted to IVM for 24 h and after culture, the degrees of expansion were evaluated. At the end of this analysis, was performed IVF. After 18 h, COCs were submitted to IVC for 8 days and the blastocyst rate and number of embryonic cells were evaluated. (B) Schematic representation of the experiment 2. Pools of 15-20 COCs were divided in the same groups: FSH, FSH+NTS, FS and FS+NTS. COCs were submitted to IVM for different times of culture: 18, 20 and 22 hours. At the end IVM, the meiotic progression was evaluated.



**Fig. 3.** Effects of NTS associated to the medium FSH (A) and combined with FS (B) on cumulus expansion. COCs exhibiting different degrees of cumulus expansion. The bar graphs represent the mean  $\pm$  standard deviation (s.d.) of the % COCs grade 1/ total oocytes, % COCs grade 2/ total oocytes, and % COCs grade 3/ total oocytes in six replicates for each treatment. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** *In vitro* development of bovine embryos derived from COCs matured in the presence of NTS combined with FSH (A) and FS (B). The bar graphs represent the mean  $\pm$  s.d. of the % blastocysts in relation to total oocytes, % expanded and hatched blastocysts in relation to total blastocysts and blastocyst cell number. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) in six replicates with 186, 199, 196, 201 COCs in the FSH, FSH + NTS, FS and FS+NTS groups respectively.



**Fig. 5.** Effects of NTS associated or not to FSH (A) and FS (B) on meiosis progression. COCs were subjected to IVM in different times of culture, after 18 h, 20 h and 22 h. GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; ANATEL: anaphase/telophase; MII: metaphase II and DEG: degenerated. Data derived from six independent replicates for each treatment. The bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## References

- [1] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*. 2008;14:159-77.
- [2] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*. 2002;61:234-48.
- [3] 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.
- [4] Freimann S, Ben-Ami I, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324:829-34.
- [5] Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Molecular human reproduction*. 2006;12:413-9.
- [6] Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular endocrinology*. 2006;20:715-23.
- [7] Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 2005;146:77-84.
- [8] 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. *Molecular endocrinology*. 2006;20:1352-65.
- [9] Gilchrist RB, Ritter LJ. Differences in the participation of TGFB superfamily signalling pathways mediating porcine and murine cumulus cell expansion. *Reproduction*. 2011;142:647-57.
- [10] Gilchrist RB, De Vos M, Smits J, Thompson JG. IVM media are designed specifically to support immature cumulus-oocyte complexes not denuded oocytes that have failed to respond to hyperstimulation. *Fertility and sterility*. 2011;96:e141; author reply e2.
- [11] Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23:23-31.
- [12] Ehlers RA, Zhang Y, Hellmich MR, Evers BM. Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;269:704-8.
- [13] Wang X, Wang Q, Ives KL, Evers BM. Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12:5346-55.
- [14] Vincent JP. Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. *Cellular and molecular neurobiology*. 1995;15:501-12.
- [15] Nagamura Y OA, Shimada M, Yamashita Y. . Expression of Neurotensin (NTS) and its role during in vitro culture of pig cumulus cell egg complex (COC). *Japanese Society for Reproductive Biology* 2014;107:8.
- [16] Okamoto A NY, Shimada M, Yamashita Y. Neurotensin (NTS) expressed in porcine cumulus cells increases expression of EGFR receptor (EGFR) and induces sustained activation of EGFR-ERK 1/2 system. *Japanese Society for Reproductive Biology*. 2016;109:11.
- [17] Soares ACS, Lodde V, Barros RG, Price CA, Luciano AM, Buratini J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29:2217-24.



- [18] Fortune JE, Hansel W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biology of reproduction*. 1985;32:1069-79.
- [19] 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 17 $\alpha$ -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biology of reproduction*. 2001;64:1797-805.
- [20] Zhang K, Hansen PJ, Ealy AD. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction*. 2010;140:815-26.
- [21] Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 2007;74:740-9.
- [22] Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev*. 2005;71:389-97.
- [23] Jakobsen AS, Thomsen PD, Avery B. Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 2006;65:870-81.
- [24] Roth Z, Hansen PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*. 2005;129:235-44.
- [25] Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. *Biol Reprod*. 2009;81:1064-72.
- [26] Umezu K, Yajima R, Hiradate Y, Yanai R, Numabe T, Hara K, et al. Improvement in blastocyst quality by neurotensin signaling via its receptors in bovine spermatozoa during in vitro fertilization. *The Journal of reproduction and development*. 2019;65:147-53.
- [27] Umezu K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, et al. Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *The Journal of reproduction and development*. 2016;62:409-14.
- [28] Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, et al. Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biology of reproduction*. 2014;91:53.
- [29] Richani D, Wang X, Zeng HT, Smitz J, Thompson JG, Gilchrist RB. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 2014;81:422-35.
- [30] Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod*. 2014;20:499-513.
- [31] Atef A, Francois P, Christian V, Marc-Andre S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*. 2005;71:358-67.
- [32] Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biology of reproduction*. 2011;85:1252-9.
- [33] El-Hayek S, Clarke HJ. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis. *Biology of reproduction*. 2015;93:47. [38] Prochazka R, Petlach M, Nagyova E, Nemcova L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction*. 2011;141:425-35.

- [34] Prochazka R, Petlach M, Nagyova E, Nemcova L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction*. 2011;141:425-35.
- [35] Richani D, Ritter LJ, Thompson JG, Gilchrist RB. Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence. *Molecular human reproduction*. 2013;19:500-9.
- [36] Demeestere I, Streiff AK, Suzuki J, Al-Khabouri S, Mahrous E, Tan SL, et al. Follicle-stimulating hormone accelerates mouse oocyte development in vivo. *Biol Reprod*. 2012;87:3, 1-11.
- [37] Soares ACS LV, Luciano AM, Buratini J. . Effects of follicle stimulating hormone (FSH) and amphiregulin (AREG) on meiosis dynamics and embryo production of bovine oocytes cultured in vitro. 2016. p. 258.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca na melhoria da eficiência da maturação *in vitro* em bovinos por motivos econômicos e sociais estimula a pesquisa científica para o desenvolvimento de novas abordagens técnicas para o desenvolvimento de novos meios de cultivo para reduzir a perda de oócitos durante o processo de maturação e aumentar a competência do oócito em suportar etapas subsequentes a maturação e evoluir para o desenvolvimento embrionário.

Este trabalho testou a influência da adição de NTS sobre a expansão das CC e a progressão da meiose em COCs bovinos submetidos em dois cenários atuais da MIV, induzida com FSH, método convencional ou utilizando componentes que mimetizam a condição fisiológica, denominado de SF. Adicionalmente, foram investigados os efeitos da NTS sobre a produção e cinética embrionária. Apesar da NTS não impactar na eficiência da PIV, demonstramos que a participação da NTS no cenário convencional melhora a expansão do cumulus e regula a dinâmica da retomada meiótica durante a MIV. O que não foi observado quando a NTS foi adicionada ao grupo SF. Em síntese, os dados do presente trabalho sugerem que o SF é eficaz sozinho em promover a competência do oócito. Visando uma indução mais fisiológica da maturação dos oócitos, os COCs cultivados no SF foram induzidos na presença de AREG e FSH em concentrações inferiores aos níveis suprafisiológicos comumente utilizados (Richani et al. 2014; Sugimura et al 2014). Nossa intenção é aproximar o sistema de cultivo do processo natural de maturação oocitária, favorecendo a competência oocitária para a fecundação e desenvolvimento. A partir disso surgiram algumas especulações. Concentrações suprafisiológicas de FSH, usualmente utilizadas nos protocolos de MIV, precipitam o fechamento das junções do tipo gap, enquanto que concentrações mais baixas de FSH permitem a manutenção da comunicação intercelular entre o oócito e as células do cumulus (Ali & Sirard 2002). A suplementação com fatores do tipo EGF durante a MIV pode melhorar a competência de desenvolvimento de oócitos em relação à MIV induzida exclusivamente com gonadotrofinas (Prochazka et al. 2011; Richani et al. 2013).

O entendimento dos mecanismos regulatórios da maturação oocitária no bovino se faz necessária. A comunicação entre o oócito e as células do cumulus é de extrema importância para o desencadeamento da maturação do COC. Mas o sucesso da técnica depende do conhecimento dos mecanismos fisiológicos que regulam a competência do oócito. Tal conhecimento é relevante para o aperfeiçoamento da MIV, além disso, os protocolos permitem a manipulação dos mecanismos intracelulares para obter melhores resultados após a fertilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, A., & Sirard, M.A. (2002) The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote***10**(1), 65-71

Prochazka R, Petlach M, Nagyova E, Nemcova L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction*. 2011;141:425-35.

Richani D, Ritter LJ, Thompson JG, Gilchrist RB. Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence. *Molecular human reproduction*. 2013;19:500-9.

Richani D, Wang X, Zeng HT, Smitz J, Thompson JG, Gilchrist RB. Prematuration with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 2014;81:422-35.

Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod*. 2014;20:499-513.