

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Campus de Botucatu
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8 (FGF8)
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
BOVINO**

Cinthia Marenza Ormond

Botucatu - SP
2013



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8 (FGF8)
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
BOVINO**

Cinthia Marenza Ormond

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista,
Campus de Botucatu para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas-
Farmacologia

Orientador: Prof.Dr.José Buratini Junior

Botucatu - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ormond, Cinthia Marenza.

Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito bovino / Cinthia Marenza Ormond. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Buratini Junior

Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Bovino - Reprodução. 3. Fertilização *in vitro*. 4. Fibroblasto.

Palavras-chave: Bovino; FGF8; Maturação *in vitro*; Oócito.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8 (FGF8)
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
BOVINO**

CINTHIA MARENZA ORMOND

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU,
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA –
UNESP, PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ÁREA:
FARMACOLOGIA.**

BOTUCATU/SP, 01 de AGOSTO de 2013

Cinthia Marenza Ormond

Botucatu, 01 de Agosto de 2013

Composição da Banca Examinadora

Prof. Dr. José Buratini Jr

Prof(a) Dr(a): Fabíola Freitas de Paula-Lopes

Prof(a) Dr(a): Fernanda da Cruz Landi

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado à minha amada mãe e guerreira **Eliane Marenza Ormond***

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, pois toda casa é construída por alguém, mas somente Ele é o edificador de tudo.*

(Hebreus 3:4)

*À minha mãe, pelo amor, carinho, compreensão, dedicação e orações neste período de tantas dificuldades e mudanças na minha vida, à minha querida vózinha **Maria Marenza** pelas preocupações e mimos quando a vou visitar, ao meu tio-avô **Geraldo Melo** pela preocupação e grande carinho por mim; ao meu irmão **Neemias Marenza Ormond** pelo simples fato de me apoiar na minha escolha e acreditar em mim; ao meu pai **Zaqueu Geraldo Ormond** pela cooperação em tornar este sonho possível.-“Sem vocês, eu não estaria aqui! Amo todos vocês, afinal a família é o bem mais precioso nesta Terra!”*

*Aos meus grandes amigos que mesmo distantes, sempre me deram palavras de incentivo para que eu continuasse a caminhada: **Daniela Yocoyama Pinheiro da Cruz, Ronieudo Felix do Nascimento, Bruna Ramos, Aline Bonilha, Thalloa Longo Rangel e Dante Fernando Ferro**.- “Amigos são a família que Deus nos deu a liberdade de escolher, e eu escolhi os melhores! Amo vocês!”*

*Agradeço à grande amiga e companheira de laboratório **Paula Fernanda de Lima**, por me ensinar as mais diversas tarefas profissionais, sempre com carinho, paciência e dedicação e também me apoiar nos momentos mais difíceis que passei não só profissionalmente. – “Obrigada querida, esse fruto também é seu! Terei sua amizade pro resto da vida!”*

*À pessoa que fez dos meus períodos ociosos em Botucatu não tão solitários assim: **Juliana Agostinho Lopes**.-“ Ju, você é a irmãzinha que Deus separou pra mim em Botuca! Obrigada por sempre se preocupar comigo, e muitas vezes preparar pratos culinários fantásticos! Sentirei falta dos nossos simples porém felizes e inesquecíveis momentos!”*

*Às novas e verdadeiras amizades que fiz em Botucatu, as quais tornaram a caminhada mais amena, com risadas e momentos inesquecíveis: **Fernando Beserra, Larrisa Périco,***

***José Sérgio Possomato**- “Sem vocês tudo seria tão sem graça...Obrigada!”*

*Às companheiras de laboratório **Debora Thais Jardina Sartor e Fernanda Fagali Franchi,***
por todo auxílio nos experimentos, sempre com empenho e dedicação, Obrigada!

*Ao meu orientador **José Buratini Junior,** por me dar a oportunidade de realizar um sonho e acreditar em mim. –“Bura, obrigada! Você é um excelente profissional, te admiro!”*

*Aos professores, funcionários e outros discentes do **Departamento de Fisiologia e Farmacologia** por prontamente disponibilizarem equipamentos e ajuda técnica.*

*À ajuda em processamentos de amostras **Maria Salete Sartor.***

“Suba o Primeiro degrau
com fé. Não é necessário que você
veja toda a escada. Apenas dê o
primeiro passo.”

Martin Luther King

ÍNDICE

RESUMO	1
CAPÍTULO I	3
1.INTRODUÇÃO	4
2.REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1.. Subfamília do FGF8	6
2.2. Expansão das células do cumulus	7
2.3 O desenvolvimento folicular ovariano e a importância da comunicação cumulus-oócito	9
2.4. Aquisição da competência oocitária	9
2.5. Maturação nuclear	10
2.6 A importância do metabolismo energético para expansão das células do cumulus e maturação nuclear	11
3. OBJETIVOS	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO II- EFFECTS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8 (FGF8) DURING <i>IN VITRO</i> MATURATION OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES	23
ABSTRACT	25
INTRODUCTION.....	25
MATERIALS AND METHODS	27
RESULTS.....	29
DISCUSSION.....	30
REFERENCES.....	32
FIGURE LEGENDS	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO I

AMPc = adenosina monofosfato cíclico
AR = aldose redutase
ATP = trifosfato de adenosina
BMP6 = proteína morfogênica óssea 6
BMP15 = proteína morfogênica óssea 15
BSA = albumina sérica bovina
COC = complexo cumulus-oócito
COX2 = ciclooxygenase 2
Cx = conexina
FGF = fatores de crescimento dos fibroblastos
FGF8= fator de crescimento dos fibroblastos 8
FGF17= fator de crescimento dos fibroblastos 17
FGFR2c= receptor de fatores de crescimento dos fibroblastos 2c
FGFR3c= fatores de crescimento dos fibroblastos 3c
FGFR4= fatores de crescimento dos fibroblastos 4
FIV = fecundação *in vitro*
FSH = hormônio folículo estimulante
FSO = fatores secretados pelo oócito
G6PDH = glicose-6-fosfato desidrogenase
GDF9 = fator de crescimento e diferenciação 9
GFPT = L-glicosamina:D-frutose-6-fosfato acetil transferase (GFPT)
GLUT = facilitadores do transporte da glicose
GMPc = monofosfato cíclico de guanosina
HAS2 = hialurona sintetase 2
LDHA= lactato desidrogenase A
LH = hormônio luteinizante
NADPH= nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
NPPC= peptídeo natriurético do tipo C
NPR2= receptor do peptídeo natriurético 2
MIV = maturação *in vitro*
MPF= fator promotor de maturação
PDE3 = fosfodiesterase do tipo 3
PDHA1= piruvato desidrogenase 1
PFK = fosfofrutoquinase
PG= prostaglandina
PGE2 = prostaglandina E2
PPP= via pentose fosfato
PTGS2 = prostaglandina sintetase 2
PTX3 = pentraxina 3
RNA = ácido ribonucléico
RNA_m = ácido ribonucléico mensageiro
RVG = rompimento da vesícula germinativa
SDH = sorbitol desidrogenase
TSG6 = proteína indutora do fator de necrose tumoral 6
TZP = processos citoplasmáticos trans-zonais
VG = vesícula germinativa

CAPÍTULO II

ANOVA = analysis of variance
BMP15 = bone morphogenetic protein 15
BSA = bovine serum albumin
CO₂ = carbon dioxide
COC = cumulus–oocyte complexes
COX2 = cyclooxygenase 2
CYC-A = cyclophilin-A
DNA = deoxyribonucleic acid
FGF = fibroblast growth factor
FGF8= fibroblast growth factor 8
FGF10= fibroblast growth factor 8
FSH = follicle-stimulating hormone
g = gravity
GDF9 = growth and differentiation factor 9
h = hour
MYS2= Y box binding protein 2
MPF= maturation promoter factor
MII = metaphase II
NPPC= C-type natriuretic peptide
Npr2= natriuretic peptide receptor 2
IVM = *in vitro* maturation
LH = luteinizing hormone
LDHA= lactate dehydrogenase
mRNA = messenger ribonucleic acid
NaCl = sodium chloride
OSF = oocyte secreted factors
PBS = phosphate buffered saline
PCR = polymerase chain reaction
PDHA1= pyruvate dehydrogenase 1
PFK = fosfofrutoquinase
RNA = ribonucleic acid
RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction
S.E.M. = error of the mean
TGFb= transforming growth factors β

RESUMO

ORMOND, C.M. **Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito bovino**

Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências- Universidade Estadual Paulista- UNESP.

O fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) é expresso pelo oócito bovino, ativa os receptores expressos por células do cumulus e oócitos, e está envolvido na regulação da glicólise e meiose no CCO de murinos. O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do FGF8 sobre a expansão das células do cumulus, a progressão da meiose e metabolismo energético em CCOs bovinos submetidos à MIV. Uma vez que foram observadas influências sobre a progressão da meiose e no metabolismo energético, os efeitos de FGF8 sobre a abundância de genes que codificam o RNAm que controlam estes processos foram avaliados. O FGF8 não afetou a expansão do cumulus, mas diminuiu a porcentagem de oócitos que alcançaram a metáfase II, consequentemente houve o aumento da porcentagem de oócitos na metáfase I. Tal efeito foi associado com um efeito inibitório do FGF8 sobre os níveis de RNAm que codifica a Ciclina B1 no oócito. Em contraste com os achados anteriores em murinos, o FGF8 leva à diminuição dos níveis de RNAm de NPR2 nas células do cumulus. O FGF8 tende a diminuir a absorção de glicose e produção de lactato, que foi acompanhada por uma redução significativa nos níveis de RNAm para PFKP em células de cumulus. O FGF8 também tende a diminuir a expressão de RNAm para o LDHA, mas não alterou os níveis de RNAm para GLUT1, GLUT4 e PDHA1 nas células do cumulus, enquanto que aumentou a expressão de RNAm para o PDHA1 no oócito. Este estudo apresenta evidências de que o FGF8 pode retardar a progressão da meiose durante a MIV em bovinos por meio de mecanismos que envolvam redução da

expressão de Ciclina B1. Além disso, novamente em contraste com estudos em ratos, os dados sugerem um efeito inibidor modesto de FGF8 sobre o metabolismo glicolítico das células do cumulus durante a maturação *in vitro* de bovinos.

Palavras-Chave: Bovino; FGF8; Maturação *in vitro*; Oócito.

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO

A tecnologia aplicada à pecuária está cada dia mais presente no rebanho brasileiro. Aliada ao desenvolvimento de pesquisa nacional e de técnicas específicas aos sistemas produtivos, ela está impulsionando os índices de produtividade dos animais e colaborando para uma pecuária cada dia mais eficiente e sustentável, havendo a necessidade de obtenção de animais superiores no que diz respeito à conversão alimento/carne e a intensificação da produtividade por área, fazendo da maturação *in vitro* (MIV) e a fertilização *in vitro* (FIV) na espécie bovina, ferramentas necessárias quando a excelência na produtividade passa de utópica para realidade de demanda. Além disso, a melhora do entendimento reprodutivo bovino serve como ferramenta de estudo na reprodução assistida humana. Para tal incremento, é crucial o entendimento primário em outras espécies, já que determinados estudos são vetados à espécie humana por ainda serem considerados contrários à ética legal e moral, infringindo muitas vezes dogmas religiosos. Sendo assim, a utilização de roedores como modelo de estudo para compreensão da fisiologia reprodutiva humana é amplamente empregada, porém a espécie bovina se mostra como modelo valioso, já que se assemelha com mais proximidade à fisiologia da mulher.

A MIV de complexos cumulus-oócitos (CCO) é uma etapa crucial e limitante para a produção de embriões *in vitro*. Além do que, essa prática oferece várias vantagens importantes, incluindo a possibilidade de observar de forma dinâmica o processo de maturação sob um microscópio e testar a ação dos hormônios, fatores de crescimento e moléculas biologicamente ativas em um sistema simplificado (Eppig *et al.*, 1988). Sabe-se que a competência do desenvolvimento embrionário é maior quando a maturação do CCO ocorre *in vivo* (Prada *et al.*, 2009), o que indica que a MIV pode ser melhorada caso as condições de cultivo reflitam mais fielmente a situação fisiológica.

A competência do CCO adquirida durante a maturação determina o potencial de formação do embrião. Para tanto, a comunicação entre o oócito e

as células do cumulus deve ocorrer de forma coordenada, de modo que ao secretar fatores parácrinos, o oócito regula o metabolismo das células do cumulus, que por sua vez fornecem íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras ao oócito (Albertini *et al.*, 2001). Tais fatores parácrinos solúveis são genericamente chamados de fatores secretados pelo oócito (FSO) (Gilchrist, 2004). Dentre os FSO mais explorados na literatura encontram-se o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e, em menor proporção, a BMP6, todos pertencentes à família dos fatores de crescimento transformantes β (TGF β) (Gilchrist *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2008). Contudo, a inclusão dos fatores de crescimento dos 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 células do cumulus (Sugiura *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009, Zhang e Ealy, 2012; Caixeta *et al.*, 2013). O hormônio folículo estimulante (FSH) estimula a expressão de receptores para FGFs nas células do cumulus, levando a crer que os FGFs podem regular a maturação do CCO bovino durante a MIV (Caixeta *et al.*, 2013).

O FGF8 é expresso nas células da teca, da granulosa e em oócitos bovinos, sendo que nos oócitos a expressão parece diminuir ao longo da maturação do CCO (Buratini *et al.*, 2005, Caixeta *et al.*, 2013).

Em camundongos, o FGF8 age de forma sinérgica com a BMP15 para estimular a glicólise nas células do cumulus (Sugiura *et al.*, 2007). A glicólise ocorre a partir do consumo da glicose pelas células do cumulus, gerando lactato e piruvato, sendo este último a principal fonte de ATP transferida das células do cumulus para o oócito (McDowall, *et al.*, 2004). Além disso, o FGF8, em cooperação com a BMP15, aumenta os níveis do receptor natriurético tipo 2 (NPR2) presente nas células do cumulus e cuja função é inibir a retomada da meiose antes da ovulação (Zhang *et al.*, 2010).

Diante dos dados supracitados, propusemos a hipótese de que a adição do FGF8 ao meio de cultivo altera a diferenciação das células do cumulus bovinas durante a MIV. Este trabalho objetivou testar especificamente os efeitos do FGF8 sobre a expansão das células do cumulus, maturação nuclear e metabolismo energético, a fim de avaliar os mecanismos envolvidos, testou-

se o efeito do FGF8 sobre a expressão de genes que regulam esses parâmetros.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Subfamília do FGF8

A subfamília do FGF8 é constituída por ele, pelo FGF17 e pelo FGF18, sendo também conhecida como família oncogênica fetal (Nezu, 2005). Membros dessa subfamília apresentam semelhantes sequências de aminoácidos (Hoshikawa *et al.*, 1998; Maruoka *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999), características bioquímicas incluindo afinidade pelos mesmos receptores (FGFRs) (Itoh, 2004) e padrões espaciais de expressão (Xu *et al.*, 2000; Maruoka *et al.*, 1998). Esses FGFs ativam preferencialmente os receptores FGFR3c e FGFR4, apresentando ainda afinidade moderada pelo FGFR2c (Xu *et al.*, 2000; Ford-Perriss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

O FGF8 foi primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (Tanaka *et al.*, 1992; Crossley e Martin, 1995). O gene FGF8 origina por “*splicing*” alternativo oito isoformas, sendo dentre elas o FGF8-a e o FGF8-b as mais comuns dentre as espécies (Crossley and Martin, 1995; MacArthur *et al.*, 1994; Blunt *et al.*, 1997), portanto, o FGF8-b é a isoforma de escolha em experimentos de camundongos (MacArthur *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 2009; Sugiura *et al.*, 2010) e bovinos (Price *et al.*, 2013).

Inicialmente, o FGF8 foi detectado como sendo expresso amplamente em todos os tecidos embrionários de roedores, porém em adultos, detectou-se sua expressão somente em tecidos ovarianos e testiculares, sendo que nos ovários, a detecção do FGF8 é especificamente nos oócitos (Valve *et al.*, 1997).

Em bovinos, a expressão gênica do FGF8 foi detectada predominantemente em oócitos, mas também em células da granulosa e células da teca de folículos antrais (Buratini *et al.*, 2005). Em relação aos seus receptores, a expressão do RNAm do FGFR3c foi detectado em células da teca e granulosa, e o RNAm do FGFR4 apenas em células da teca de folículos

antrais bovinos. A expressão do FGFR3c mostrou-se aumentada em células da granulosa de folículos grandes e estrogênicos, enquanto que a expressão do FGFR4 mostrou-se maior em folículos antrais pequenos, o que sugere que esses receptores mediam ações específicas em tipos celulares distintos no controle de fases avançadas ou iniciais do desenvolvimento folicular antral (Buratini *et al.*, 2005). Em presença de FSH, os receptores FGFR2c e FGFR3c aumentaram suas expressões de RNAm durante a MIV ao serem testadas diferentes doses de FSH em 12 horas de cultivo (Caixeta *et al.*, 2012), fazendo com que a expressão de RNAm dos FSOs (FGF8, BMP15 e GDF9) sejam aumentadas em altas doses de FSH, parecendo tornar as células do cumulus mais sensíveis a tais fatores durante a MIV (Sánchez *et al.*, 2010)

O FGF8 tem sido alvo de estudos para o entendimento de suas funções no controle da maturação oocitária e do metabolismo energético no CCO. Em camundongos, o FGF8 age de forma sinérgica com a BMP15 para estimular a glicólise nas células do cumulus ao aumentar a expressão das enzimas glicolíticas PFKP e LDHA em células do cumulus oocetomizadas, desse modo, há a manutenção do suprimento energético para o desenvolvimento oocitário. Além disso, o FGF8 em combinação com a BMP15 e GDF9 mantêm parcialmente a competência de sofrer expansão em células do cumulus oocetomizadas (Sugiura *et al.*, 2010). Adicionalmente, o FGF8 em associação com a BMP15 aumenta a expressão do NPR2 nas células do cumulus (Zhang *et al.*, 2010). O NPR2 é o receptor do NPPC, um peptídeo produzido predominantemente pelas células da granulosa murais que estimula a produção de GMPc no cumulus levando ao aumento de seus níveis também no oócito de forma a manter o bloqueio meiótico (Zhang *et al.*, 2010). Portanto, esses dados em conjunto indicam a participação do FGF8 no bloqueio da meiose em camundongos.

2.2 Expansão das células do cumulus

A expansão das células do cumulus é dependente dos EGF-*like* e requer a expressão da hialurona sintetase 2 (HAS2), da ciclooxygenase 2 (COX2), da proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e da pentraxina 3 (PTX3) (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2006).

Durante a expansão, há secreção de uma matriz rica em ácido hialurônico pelas células do cumulus e a síntese de proteínas com função de estabilizar essa matriz (Buccione *et al.*, 1990; Hess *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2009). A HAS2 é a principal enzima responsável pela síntese de ácido hialurônico no CCO, que é produzido a partir da via metabólica das hexosaminas pelas células do cumulus (Schoenfelder e Einspanier 2003; Chen *et al.*, 1990; (Sutton-McDowall *et al.*, 2010).

A COX2 (ou prostaglandina sintetase 2; PTGS2) é uma enzima necessária para a síntese de prostaglandinas (PG) a partir do ácido araquidônico. A expressão da COX2 aumenta nas células do cumulus e na camada mural de células da granulosa no período periovulatório, o que é fundamental para a indução da expansão do cumulus e da ovulação por meio da PEG2 (Eppig, 1981; Hizaki *et al.*, 1999; Calder *et al.*, 2001).

A TSG6 é necessária para a estabilização do ácido hialurônico na matriz do cumulus expandido (Richards, 2005). A expressão da TSG6 é rapidamente induzida pelo pico de LH nas células da granulosa murais e do cumulus de folículos pré-ovulatórios (Ochsner *et al.*, 2003). Camundongos deficientes em TSG6 são incapazes de estruturar a matriz extracelular, o que compromete a expansão do cumulus e a fertilidade (Fulop *et al.*, 2003).

A PTX3 também é essencial para a estabilidade da matriz do cumulus. Ela tem afinidade pela TSG6 e a interação entre elas parece ser crucial para a estruturação da matriz do cumulus (Richards, 2005).

A expressão da PTX3, HAS2, COX2 e TSG6 mostrou positivamente associada com o potencial de desenvolvimento embrionário e, por isso, esses genes são considerados marcadores da competência do oócito nas células do cumulus (Tesfaye *et al.*, 2009; Assidi *et al.*, 2008; Richards, 2005).

Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, a adição de FGF10 ao meio MIV potencializou a expansão do cumulus em associação ao aumento da expressão da COX2 e estimulação da rota metabólica das hexosaminas (Caixeta *et al.*, 2013). Similarmente, o FGF17, membro da subfamília do FGF8, também estimulou a expansão do cumulus durante a MIV em bovinos, embora os mecanismos envolvidos não tenham sido esclarecidos (Machado, 2012). A

participação do FGF8 no controle da expansão do cumulus durante a MIV não havia sido investigada até a realização do presente estudo.

2.3 O desenvolvimento folicular ovariano e a importância da comunicação cumulus-oócito

A foliculogênese se inicia com a formação do folículo primordial e termina com o folículo pré ovulatório, envolvendo processos de formação, crescimento e maturação folicular (van den Hurk e Zhao, 2005).

O folículo é a unidade funcional do ovário em mamíferos, é constituído por um oócito circundado por células somáticas da teca e da granulosa e tem como finalidade manter as condições ideais para o crescimento e maturação do oócito (Mc Caffery *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) de modo que as células do cumulus fornecem o suporte nutricional essencial para o desenvolvimento do oócito e têm papel fundamental no seu crescimento e metabolismo (Buccione *et al.*, 1990; Haghighat e van Winkle, 1990). Já o oócito, secreta fatores que agem nas células do cumulus e células da granulosa murais, essenciais para a regulação da função ovariana (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004). Um modo de comunicação entre o oócito e as células do cumulus se dá através da projeção citoplasmática transzonal (TZP) das células da granulosa e cumulus que ao atingirem a zona pelúcida do oócito dão origem às junções do tipo *gap* as quais permitirão a constante comunicação entre as células somáticas e o oócito (Albertini *et al.*, 2001). Sendo assim, a inter-relação cumulus-oócito permitirá que o oócito adquira a competência necessária para completar a meiose a qual se encontra estacionada em prófase I até que haja a fecundação (Coticchio *et al.*, 2004).

2.4 Aquisição da competência oocitária

A maturação *in vivo* é um processo complexo estimulado por diversos fatores como gonadotrofinas (FSH e LH) e fatores de crescimento (Feuerstein

et al., 2006; Feuerstein *et al.*, 2007). Quando removidos dos folículos, os oócitos perdem a influência dos fatores presentes no fluido folicular e o processo de maturação nuclear e citoplasmática é iniciado, o que pode afetar a competência para o desenvolvimento embrionário (Sirard, 2001). Além disso, outros fatores podem afetar a competência do oócito em formar blastocisto, entre eles o tamanho do folículo de origem (Lonergan *et al.*, 1996), o status folicular e a comunicação entre oócito e células do cumulus (Krisner, 2004).

Nas fêmeas mamíferas, os oócitos se encontram estacionados na prófase I da meiose I ao nascimento. A retomada da meiose acontece na puberdade, quando há o estímulo gonadotrófico pré-ovulatório, culminando no rompimento da vesícula germinativa (RVG) (Schatten e Sun, 2011).

O processo de maturação oocitária tem como finalidade capacitar o gameta feminino a suportar fases de desenvolvimento subsequentes até que ocorra a ativação do genoma embrionário (Ferreira *et al.*, 2009). Para tanto, vários eventos como a condensação da cromatina, redistribuição das organelas e alterações do citoesqueleto são regulados de forma precisa e coordenada (Coticchio, *et al.*, 2012).

2.5 Maturação nuclear

A maturação nuclear depende da comunicação entre as células do cumulus e o ócito (Regassa *et al.*, 2011). Além da comunicação parácrina (Gilchrist *et al.*, 2008), a comunicação intercitoplasmática é fundamental e possibilitada pelas *gap junctions* que são canais hexaméricos compostos por proteínas denominadas conexinas. As conexinas 37 e 43 formam as *gap junctions* entre as células do cumulus e o oócito em bovinos, embora a conexina 43 seja predominantemente. A ausência da conexina 43 compromete o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária onde oócitos de camundongos *knockouts* para tal proteína são incapazes de progredirem meioticamente e serem fertilizados (Teilmann, 2005; Gittens e Kidder, 2005).

A partir do estímulo gonadotrófico, as conexinas se fecham, diminuindo o aporte de AMPc e GMPc provenientes das células do cumulus para o oócito. Sendo assim, a diminuição dos níveis de GMPc, fator inibidor da

fosfodiesterase 3A (PDE3A), permite a fosforilação dessa enzima que degrada o AMPc. A degradação do AMPc permite a síntese do MPF o qual promove a retomada da meiose (revisado por Gilchrist *et al.*, 2011).

O MPF é um heterodímero constituído por duas subunidades: a ciclina B1 ou CDK1 e a subunidade p34^{cdc2} (GONÇALVES *et al.*, 2008). Após a tradução, a p34^{cdc2} se une a ciclina B1 e ambas são desfosforiladas pela fosfatase CDC25 para que o MPF se torne ativo. O MPF tem atividade máxima na MI, seguida de queda e restauração da atividade na MII (Gonçalves *et al.*, 2008).

O MPF é importante para induzir o RVG e promover a condensação dos cromossomos passando então do estado de prófase I para a metáfase I (MI), onde há a formação do fuso meiótico e o alinhamento dos cromossomos no centro do fuso. Em seguida, ocorre a anáfase I que consiste na separação dos cromossomos homólogos. Sequencialmente, inicia-se a telófase I com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O oócito encontra-se em metáfase II quando se dá a formação do segundo fuso meiótico com alinhamento dos cromossomos e permanece nessa fase até que haja a penetração do espermatozoide, cuja continuidade seria a anáfase II, a telófase II e por fim a extrusão do segundo corpúsculo polar (Meinecke *et al.*, 2001; Kishimoto, 2003).

Para que haja a dinâmica meiótica descrita anteriormente de forma ordenada e eficiente, é necessário que haja previamente aporte energético para o oócito na forma de piruvato (Eppig, 1976). Caso haja a diminuição do aporte energético pelas células do cumulus para o oócito, haverá a deficiência de ATP, moeda energética básica para o funcionamento de qualquer tipo celular, resultando no comprometimento da competência oocitária (Krisher e Bavier, 1998; Dumollard *et al.*, 2002). O que leva a crer que a glicose e o piruvato são necessariamente utilizados de maneira similar dentre todas as espécies de mamíferos (Brinster, 1977), e suas deficiências levam ao pobre desenvolvimento da capacidade oocitária (Krisher e Bavier, 1998).

2.6 A importância do metabolismo energético para expansão das células do cumulus e maturação nuclear

A glicose é o substrato energético preferido pelas células do cumulus (Sutton-Mcdowall *et al.*, 2010.), enquanto que os oócitos, na grande maioria das

espécies de mamíferos estudadas consomem pouca glicose e utilizam o piruvato como substrato energético preferido (Eppig, 1976; Rieger e Loskutoff, 1994). Em geral, os oócitos tem menor capacidade de assimilação direta de glicose, bem como expressão limitada de enzimas glicolíticas, utilizando assim o piruvato de forma mais eficiente, (revisado por Purcell e Moley, 2009; Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Contudo, em suínos e macacos Rhesus, a glicose parece ser a principal fonte energética oocitária (Krisher *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007). Sendo assim, nas demais espécies, o piruvato é o substrato oxidável derivado das células do cumulus para a síntese de ATP necessária aos oócitos (Biggers *et al.*, 1967; Johnson *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2009).

Nas células do cumulus a glicose é captada através da ação dos facilitadores do transporte da glicose (GLUT; Morita *et al.*, 1992; Watson e Pessin, 2001). Após ser captada, a glicose influencia vários aspectos da maturação oocitária e o seu metabolismo está relacionado com a capacidade de desenvolvimento do oócito (Sutton-McDowall *et al.*, 2006). Ela tem como função fornecer energia para promover a homeostase celular, a maturação nuclear, além de ser substrato para a produção da matriz extracelular. Quatro vias metabólicas da glicose foram identificadas: a via de biossíntese da hexosamina, a glicólise (produção de energia), a via pentose fosfato, e a via poliol (Sutton-McDowall *et al.*, 2010).

A via da biossíntese da hexosamina é fundamental para a expansão do cumulus, pois permite que a glicose seja utilizada para a síntese de glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). A principal enzima reguladora da via da hexosamina é a L-glicosamina:D-frutose-6-fosfato acetil transferase (GFPT) que converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, permitindo a produção de UDP-N-acetil glicosamina o produto final da via. Nas células do cumulus, a maioria da UDP-N-acetil glicosamina é convertida pela enzima HAS2 em ácido hialurônico, o principal componente da matriz extracelular das células do cumulus (Sutton-McDowall *et al.*, 2006; Sutton-McDowall *et al.*, 2010).

Para a síntese do piruvato, substrato mitocondrial para a obtenção de ATP que levará à síntese de proteínas que darão suporte à conclusão dos

processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (Krisher e Bavister, 1998; Stojkovic, 2001), a via utilizada é a glicólise. A enzima responsável por regular esta via é a fosfofrutoquinase (PFKP), que converte a frutose-6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato, permitindo a produção de piruvato ou lactato, os produtos finais dessa via (Moon *et al.*, 2011). A conversão de piruvato e lactato e vice versa se dá pela enzima lactato desidrogenase (LDHA) (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). O lactato tem como função permitir o estado antioxidante citosólico, conhecido também como estado redox, cuja função é promover a integridade citoplasmática (Dumollard *et al.*, 2007; Dumollard *et al.*, 2009). Já o piruvato serve de substrato para a enzima oxidativa mitocondrial denominada piruvato desidrogenase 1 (PDHA1), presente nas células do cumulus e oócito de camundongos e tem como função catalisar a formação da adenosina trifosfato (ATP) com consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono. O ATP é reconhecido como a moeda energética essencial para a maturação oocitária (Johnson *et al.*, 2007).

A via pentose fosfato (PPP) é menos utilizada do que as outras vias e tem como função captar glicose para a síntese de purinas ou nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH), o que depende do processo ser oxidativo ou não. O NADPH é produzido através da oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfoglucolactona pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DPH) e é utilizado para promover a integridade citoplasmática, contribuindo para a manutenção do estado redox pela redução da glutatona em glutatona reduzida (Sutton-McDowall *et al.*, 2010), promovendo assim um sistema antioxidante celular benéfico (Martins, 2007). Outro produto da via PPP é o fosforibosilpirofosfato, substrato para síntese de purinas, as quais são fundamentais na síntese de nucleotídeos formadores de novos RNAm, controlando assim a maturação nuclear (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Finalmente, a via do poliol leva à oxidação de glicose com geração de sorbitol e frutose através das enzimas aldo-redutase (AR) e sorbitol desidrogenase (SDH). Esses substratos são considerados fontes alternativas de energia para o oócito, embora ainda não se saiba em que circunstâncias e para quais funções elas seriam importantes. A suplementação com esses substratos energéticos é ineficiente em promover a maturação oocitária na ausência de glicose,

demonstrando que a glicose é necessária como fonte energética para que as células do cumulus sustentem a maturação oocitária (Wongsrikeao *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

- 1- Avaliar os efeitos da adição de FGF8 ao meio MIV sobre a expansão do cumulus em CCOs bovinos.
- 2- Avaliar os efeitos da adição de FGF8 ao meio MIV sobre o progresso da meiose em CCOs bovinos.
- 3- Avaliar os efeitos da adição de FGF8 ao meio MIV sobre o consumo de glicose e produção de lactato de CCOs bovinos.
- 4- Avaliar os efeitos da adição de FGF8 ao meio MIV sobre a expressão de genes reguladores do progresso da meiose, consumo de glicose e produção de lactato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, 647-653, 2001.

ASHKENAZI, H.; CAO X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIFI A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146, 77-84, 2005.

ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M.A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. **Biol. Repro**, v.79, p.209-222, 2008.

BIGGERS, J.D., WHITTINGHAM, D.G. and DONAHUE, R.P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Proc Natl Acad Sci US** 1967.

BRINSTER, R.L. and HARSTAD, H. Energy metabolism in primordial germ cells of the mouse. *Exp Cell Res* 109: 111-117, 1977.

BUCCIONE, R., SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v. 43, p. 543-547, 1990.

BURATINI JR., J.; PINTO, M.G.L.; CASTILHO, A.C.; AMORIM, R.L.; GIOMETTI I.C.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. **Biol Reprod.**, v.77, p.745-50, 2007.

BURATINI, J. Jr.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B.; GLAPINSKI, V.F.; PINTO, M.G.L.; GIOMETTI, I.C.; BARROS, C.M.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reprod**, v. 130, p.343-350, 2005.

BLUNT A.G.; LAWSHE A.; CUNNINGHAM M.L.; SETO M.L.; ORNITZ D.M.; MacARTHUR C.A. Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) receptors by alternatively spliced FGF-8 ligands. **J Biol Chem**; 272:3733–3738, 1997.

CAIXETA, E.S.; MELANIE, L.; SUTTON, Mc.D.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G.; PRICE, C.A.; MACHADO, M.F.; LIMA, P.F.; BURATINI, J. 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. **Socie for Repro and Fertil**, Manuscript REP-13-0079, 2013.

CALDER, M.D.; CAENEY, A.N.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. 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. **Biol Reprod**, v.65, p.135–140. 2001.

CHEN, A. Q., YU, S. D., WANG, G. Z., XU, Z. R., YANG, Z. G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: Effects of follicle stimulating hormone on ovine antral follicles. **Anim. Reprod. Sci.** 111, 391-399, 1990.

CROSSLEY, P.H., MARTIN, G.R. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. **Develop**, v.121, p.439-51, 1995.

COTICCHIO, G., SERENI, E., SERRAO, L., MAZZONE, S., IADAROLA, I., BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality **Ann N Y Acad Sci**. 1034:132-44, 2004.

DE PRADA, J. K., HILL, D. L., CHAFFIN, C. L.; VANDEVOORT, C. A. Nuclear maturation and structural components of nonhuman primate cumulus-oocyte complexes during in vivo and in vitro maturation. **Fertil Steril**, v. 91, 2043-2050, 2009.

DOWNS, S.M.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. **Mol Reprod Dev**, v.62(1):113-23, 2002.

DUMOLLARD, R., CARROLL, J., DUCHEN, M.R., CAMPBELL, K. and SWANN, K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Semin Cell Dev Biol** 20: 346-353, 2009.

DUMOLLARD, R., DUCHEN, M. and CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 77: 21-49, 2007.

DUMOLLARD, R.; CARROLL, J.; DUCHEN, M.R.; CAMPBELL, K.; SWANN, K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Mol Reprod Dev**, v.62(1):113-23, 2002.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reprod**; v.122, p.829-838, 2001.

EPPIG, J.J., DANIEL, S.A., SCHROEDER, A.C. Growth and development of mouse oocytes in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, 541:205-10, 1988.

EPPIG, J.J. Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. **Biol Reprod** 25, 191-195. 1981.

EPPIG, J.J. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. **J Exp Zool** 198: 375-382, 1976.

FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenol**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUÉRIF, F.; ROYÈRE, D. Oocyte-cumulus dialog **Gynecol Obstet Fertil**, v.34, p.793-800, 2006

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUERIF, F.; BIDAULT, R.; ROYERE, D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Hum Reprod**, v.22, p.3069-3077, 2007.

FORD-PERRISS, M., ABUD, H., MURPHY, M. Fibroblast growth factor in the developing central nervous system, **Clin. Exp. Pharmacol.Physiol.**, v.28, p.493–503, 2001.

FÜLÖP, C.; SZÁNTÓ, S.; MUKHOPADHYAY, D.; BÁRDOS, T.; KAMATH, R.V.; RUGG, M.S.; DAY, A.J.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V.C.; GLANT, T.T.; MIKECZ, K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, v.130, p.2253–61, 2003.

GILCHRIST, R.B.Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunitiesfor the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev** 23, 23-31, 2011.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v.14, p 159–177, 2008.

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

GITTENS, J.E.I.; KIDDER, G.M.Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimericreaggregated mouse ovaries.**Jol Cell Scien**.p.5072-5078,2005.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ºed, Editora Roca. 2008 p. 265.

HAGHIGHAT, N., VAN WINKLE, L.J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **J Exp Zool**. 253, 71–82, 1990.

HARRIS, S.E., LEESE, H.J., GOSDEN, R.G. and PICTON, H.M. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. **Molecular Reprod Dev** 76: 231-238, 2009.

HESS, K.A.; CHEN, L.; LARSEN, W.J. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in thecumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. **Biol Reprod** 61, 436-443, 1999.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T. USHIKUBI, F., MATSUOKA, T.; NODA, Y., TANAKA, T.; YOSHIDA, N. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in micelacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, 10501-10506. 1999.

HOSHIKAWA M., OHBAYASHI N., YONAMINE A., KONISHI M., OZAKI K., FUKUI S., ITOH N. Structure and Expression of a Novel Fibroblast Growth

Factor, FGF-17, Preferentially Expressed in the Embryonic Brain. **Biochem Biophys Res Commun.** v.244, p.187–191, 1998.

ITOH, N.; ORNITZ, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet**; v.20, p.563-569, 2004.

JOHNSON, M.T., FREEMAN, E.A., GARDNER, D.K. and HUNT, P.A. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. **Biol Reprod** 77: 2-8. 2007.

KISHIMOTO, T. Cell-cycle control during meiotic maturation. **Current Opin in Cell Biol** ,15:654–663, 2003.

KRISHER, R.L., BRAD, A.M., HERRICK, J.R., SPARMAN, M.L. and SWAIN, J.E. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. **Anim Reprod Sci** 98: 72-96, 2007.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **J Anim Sci**, v.82, p.14-23, 2004.

KRISHER, R.L.; BAVIER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenol** 49:103–114, 1998.

LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biol Reprod.**; 54(6):1420-9, 1996.

MacARTHUR CA, LAWSHE A, XU J, SANTOS-O-CAMPO S, Heikinheimo M, Chellaiah AT, Ornitz DM.FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. **Develop**; 121:3603–3613, 1995.

MACHADO, M. F. **Expressão e função de membros das sub famílias FGF-8 e FGF-9 em folículos antrais bovinos.** 88p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MACHADO, M.F.; PORTELA, V.M.; PRICE. C.A.; COSTA, I.B.; RIPAMONTE, P.; AMORIM, R.L.; BURATINI JR, J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J Endocrinol**, v.202, p.347-353, 2009.

MARTINS, N.M. **Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia.** 119p. Tese (doutorado)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, 2007.

MARUOKA Y, OHBAYASHI N, HOSHIKAWA M, ITOH N, HOGAN BL, FURUTA Y. Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. **Mech Dev**, 74(1–2): p.175–177, 1998.

MCCAFFERY, F.H., LEASK, R., RILEY, S.C., TELFER, E.E. Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. **Biol Reprod**, v.63, p.267-273, 2000.

MCDOWALL, M.L.S.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J.G. *Cumulus* expansion and glucose utilization by bovine *cumulus*-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reprod Research**, v.128, p. 313-319, 2004.

MCNATTY, K.P.; MOORE, L.G.; HUDSON, N.L.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B.; READER, K.; HANRAHAN, J.P.; SMITH, P.; GROOME, N.P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J.L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v.128, p.379-386, 2004.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v. 36, p. 183-188, 2001.

MOON, J.S.; KIM, H.E.; KOH, E.; PARK, S.H.; JIN, W.J.; PARK, B.W.; KIM, K.S. Kru α ppe-like Factor 4 (KLF4) Activates the Transcription of the Gene for the Platelet Isoform of Phosphofructokinase (PFKP) in Breast Cancer. **Jol Biol Chemis**. (27):23808-16, 2011.

MORITA, Y.; TSUTUMI, O.; HOSOYA, I.; TAKETANI, Y.; OKA, Y.; KATO, T. Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. **Biochem Biophys Res Commun** 188, 8-15, 1992.

NEZU M., TOMONAGA T., SAKAI C., ISHII A., ITOGA S., NISHIMURA M., MATSUO Y., TAGAWA M., NOMURA F. Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor-8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors, **Biochem Biophys Res Commun** v.335 p.843–849, 2005.

OCHSNER, S.A.; RUSSELL D.L.; DAY, A.J.; BREYER, R.M.; RICHARDS, J.S. Decreased expression of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. **Endocrinol**, 144, 1008–1019, 2003.

PARK JY, SU Y.Q., ARIGA M, LAW E., JIN S.L., CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, 303, 682-684, 2004.

PURCELL, S.H. and MOLEY, K.H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. **Trends Endocrinol Metab** 20: 483-489, 2009.

PRADA, J.K.N.; HILL, D.L.; CHAFFIN, C.L.; VANDEVOORT, C.A. Nuclear maturation and structural components of nonhuman primate cumulus-oocyte

complexes during in vivo and in vitro maturation. **Mol Cell Endocrinol.**, v.234; p. 75-79, 2009.

REGASSA, A., RINGS, F., HOELKER, M., CINAR, U., THOLEN, E., LOOFT, C., SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, v. 12, p. 57, 2011.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **J Reprod Fertil** 100: 257-262, 1994.

RICHARDS, J.S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Mol and Cell Endocrinol**, v. 24, p. 402-4011, 2005.

SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Different Follicle-Stimulating Hormone Exposure Regimens During Antral Follicle Growth Alter Gene Expression in the Cumulus-Oocyte Complex in Mice. **Biol Reprod.** v.83, p.514-524, 2010.

SCHATTEN, H.; SUN, Q-Y.Centrossome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus an meiotic spindle formation. **Mol Reprod Dev.** DOI:10.1002/MRD.21380, 2011.

SHIMADA, M., HERNANDEZ-GONZALEZ, I., GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. 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**, v. 20, p. 1352-1365, 2006.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANER, R.Expression of hyaluronan synthases and correspondinghyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biol Reprod** 69, 269–277, 2003.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriog**, 55:1241–1254, 2001.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHEKO, P.; GONÇALVES,P.B.; WOLF,E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. **Biol Reprod**, 64, 904–909, 2001.

SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J. Estrogen Promotes the Development of Mouse Cumulus Cells in Coordination with Oocyte-Derived GDF9 and BMP15. **Mol Endocrinol**, v.24(12): 2303-2314, 2010.

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

SUGIURA, K.; EPPIG, J.J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Dev Biol**, v.279, p.20-30, 2005.

SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, 139, 1-12. 2010.

SUTTON-McDOWALL, M.L.; MITCHELL, M.; CETICA, P.; DALVIT, G.; PANTALEON, M.; LANE, M.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Glucosamine supplementation during in vitro maturation inhibits subsequent embryo development: possible role of the hexosamine pathway as a regulator of developmental competence. **Biol Reprod** **74**, 881-888, 2006.

TANAKA, A., MIYAMOTO, K., MINAMINO, N., TAKEDA, M., SATO, B., MATSUO, H., AND MATSUMOTO, K. **Proc Natl Acad Sci. USA** **89**, 8928–8932, 1992.

TEILMANN, S. C. Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. **Mol Cell Endocrinol**, v. 234, p. 27-35, 2005.

TESFAYE, D.; GHANEM, N.; CARTER, F.; FAIR, T. 2009. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either *in vivo* or *in vitro*. **Reprod, Fertil and Develo**, v.21, p. 451-461.

VALVE E, PENTILLA T.L., PARANKO J., HARKONEN P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. **Biochem Biophys Res Commun**, v.232, 173-177, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenol**. v.63, p.1717-1751, 2005.

XU, J., LIU, Z., ORNITZ, D.M. Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures, **Development** v.27, 1833–1843, 2000.

XU, J., LAWSHE, A., MACARTHUR, C.A., ORNITZ, D.M. Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17, **Mech Dev** .v. 83, 165–178, 1999.

YAMASHITA, Y.; HISHINUMA, M.; SHIMADA, M. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-

like factor and TACE/ADAM17 gene expression during *in vitro* maturation of porcine COCs. **J Ovarian Res** 2, 1-20, 2009.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; TANIGUCHI, M.; KARJA, N.W.; AGUNG, B.; NII M & NAGAI T. Effects of hexoses on *in vitro* oocyte maturation and embryo development in pigs. **Theriogenol.** 65 332–343, 2006.

ZHANG, K, EALY A. D. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation reduces subsequent embryonic development. **Domes. Anim Endocrinol.** Accept Manuscript, 2012.

ZHANG, M.; SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, p.366-369, 2010.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMORI, H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D. M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v.281, p.15694-15700, 2006.

ZHENG, P. Effects of *in vitro* maturation of monkey oocytes on their developmental capacity. **Anim Reprod Sci** 98: 56-71, 2007.

CAPÍTULO II
EFFECTS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8 (FGF8) DURING *IN VITRO*
MATURATION OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES

O presente artigo foi submetido para publicação no periódico *The Journal of Reproduction Fertility and Development* e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas pelo periódico

EFFECTS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8 (FGF8) DURING *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES

Short Title: FGF8 regulate cumulus-oocyte differentiation

Cinthia Marenza Ormond¹, Paula F. Lima¹, Debora Jardina-Sartor¹, Fernanda F. Franchi¹, Christopher A. Price², José Buratini¹

¹ Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brazil

²Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada

Correspondence:

José Buratini

Departamento de Fisiologia, IB, Universidade Estadual Paulista

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

Telephone/Fax: (55) 14.38800330

E-mail: buratini@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Fibroblast growth factor 8 (FGF8) is expressed by the bovine oocyte, activate receptors expressed by cumulus cells and oocytes, and is involved in the regulation of glycolysis and meiosis in the murine COC. The first aim of this study was to assess the effects of FGF8 on cumulus expansion, meiosis progression and energy metabolism in bovine COCs submitted to IVM. Then, once influences on meiosis progression and energy metabolism were observed, effects of FGF8 on abundance of mRNA encoding genes that control these processes were assessed. FGF8 did not affect cumulus expansion but decreased the percentage of oocytes reaching metaphase II, while increasing the percentage of oocytes in metaphase I. This was associated with an inhibitory effect of FGF8 on levels of mRNA encoding *Cyclin B1* in the oocyte. In contrast with previous findings in mice, FGF8 decreased mRNA levels of *NPR2* in cumulus cells. FGF8 tended to decrease glucose uptake and lactate production, which was accompanied by a significant reduction in *PFKP* mRNA abundance in cumulus cells. FGF8 also tended to decrease *LDHA* mRNA expression, but did not change *GLUT1*, *GLUT4* and *PDHA1* mRNA levels in cumulus cells, while it increased *PDHA1* mRNA abundance in the oocyte. This study presents novel evidence that FGF8 can slow meiosis progression during IVM in cattle through mechanisms involving reduction of *Cyclin B1* expression.

INTRODUCTION

In vitro maturation (IVM) of cumulus-oocyte complexes (COC) is a crucial and limiting step for *in vitro* production of embryos and has become an important tool in the context of ART (Assisted Reproduction Technologies) applied to human medicine and livestock production. Embryo developmental competence is higher when COC maturation occurs *in vivo* (Prada *et al.*, 2009), which indicates that IVM can be improved to reflect more closely the physiological conditions.

The communication between cumulus cells and the oocyte is essential to achieve COC maturation and developmental competence of the oocyte. This is provided by direct transfer of ions, metabolites, amino acids and small molecules from cumulus cells to the oocyte, which in turn regulates cumulus cells metabolism through the secretion of paracrine factors, known as oocyte secreted factors (OSFs) (Albertini *et al.*, 2001). BMP15 and GDF9, both members of the transforming growth factor β (TGF β) family, are the OSFs more extensively investigated to date. They regulate cumulus cell differentiation and improve developmental competence when added to the IVM medium in rodents and

cattle (Gilchrist *et al.*, 2004, Gilchrist *et al.*, 2008, Elvin *et al.*, 2000). More recently, fibroblast growth factors (FGFs) have also been pointed as important OSFs based on their expression patterns and capacity to regulate pyruvate metabolism and expansion of cumulus cells (Sugiura *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009, Caixeta *et al.*, 2013). In addition, FSH stimulates the expression of FGF receptors in bovine cumulus cells during IVM, which corroborates the hypothesis that they are involved in the control of cumulus cells differentiation (Caixeta *et al.*, 2013).

In cattle, FGF10 enhances cumulus expansion during IVM and can increase blastocyst rates following IVF (Caixeta *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). Its positive effect on cumulus expansion appears to result from the stimulation of PTGS2 expression and hyaluronic acid production (Caixeta *et al.*, 2013). Another strong candidate as a regulator of COC differentiation is FGF8.

In adult mouse ovaries, FGF8 is expressed exclusively in oocytes of growing follicles (Valve *et al.*, 1997). In cattle, FGF8 expression was detected predominantly in oocytes but also in granulosa and theca cells of antral follicles (Buratini *et al.*, 2005). In mice, FGF8 acts synergistically with BMP15 to promote glycolysis in cumulus cells by increasing expression and activity of glycolytic enzymes phosphofructokinase (*PFKP*) and lactate dehydrogenase A (*LDHA*). Also in murine cumulus cells, FGF8 enhances expression of natriuretic peptide receptor 2 (*NPR2*), for natriuretic peptide precursor C (*NPPC*), a peptide predominantly produced by mural granulosa cells that stimulates the production of cGMP in cumulus cells leading to meiotic arrest (Zhang *et al.*, 2010). The involvement of FGF8 in the regulation of COC maturation has not been investigated in cattle.

The first objective of this study was to examine the effects of FGF8 on cumulus expansion, meiosis progression and energy metabolism in bovine COCs submitted to IVM. Secondly, to gain insight into the mechanisms by which FGF8 alters meiosis progression and energy metabolism, effects of FGF8 on mRNA expression of Cyclin B1 (*Cyclin B1*), Y box binding protein (*MYS2*), natriuretic peptide precursor type C (*NPPC*), natriuretic peptide receptor 2 (*NPR2*), phosphofructokinase (*PFKP*), lactate dehydrogenase A (*LDHA*), facilitator of glucose transport 1 (*GLUT1*), facilitator of glucose transport- 4 (*GLUT4*) and pyruvate dehydrogenase 1 (*PDHA1*) were assessed.

MATERIALS AND METHODS

In vitro maturation

Ovaries of adult cows (predominantly Nellore, *Bos indicus*) were obtained at an abattoir local to the Sao Paulo State University campus in Botucatu and transported to the laboratory in saline solution (0.9% NaCl) containing antibiotics (penicillin G; 100 IU/ml and streptomycin; 100ug/ml) at 35-37°C). COCs were aspirated from 3 to 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 homogeneous cytoplasm and at least 5 compact layers of cumulus cells were used. COCs were washed and transferred in groups of 20 to a 200 µL drop of maturation medium, TCM199 containing Earle's salts supplemented with 1 µg/mL porcine FSH (equivalent to 0.002 IU; Folltropin-VR 118 Bioniche Animal Health, Belleville ON, Canada), 10 IU/mL LH (Lutropin-V R119, Bioniche Animal Health), 22 µg/mL sodium pyruvate, 75 µg/mL ampicillin, 4 mg/mL BSA and FGF8 (see below). Drops were covered with mineral oil and incubated at 38.5°C in 5% CO₂ in humidified air.

The effects of graded doses of human FGF8-b (PeproTech, Rocky Hill NJ; 0, 1, 10 and 100 ng/mL; 4 replicates/dose) on cumulus expansion and meiosis progression were tested after 22 hours of culture. Cumulus expansion was visually assessed according to a subjective scoring system. Grades 1 to 3 were attributed to increasing degrees of expansion (1-poor expansion, characterized by few morphological changes compared with before maturation; 2-partial expansion, characterized by fair expansion but notable clusters lacking expansion; 3-complete or nearly complete expansion (Zhang *et al.*, 2010).

To assess meiosis progression, oocytes were mechanically denuded, stained with Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and visualized in an epifluorescence microscope under UV light.

Gene expression analysis

To assess effects of FGF8 on gene expression, COCs were cultured as above for 12 and 22 hours. After culture, cumulus cells and oocytes were mechanically separated from all 20 COCs cultured per group by repeated pipetting in PBS. Cumulus cells were transferred to 1.5 mL tubes, washed twice by centrifugation for 5 min at 700g, and 350 µL of the RNA extraction lysis buffer was added to the cell pellets. The oocytes were transferred to 1.5 mL tubes and 350 µL of the RNA extraction lysis buffer was added. Samples were stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from cumulus cells

and respective pools of 20 oocytes using the RNeasyR kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as recommended by the manufacturer. After purification, RNA samples were eluted in 30 μ L of RNase free water. Total RNA concentrations were measured by spectrophotometer using a NanoDrop NDR 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Total RNA (100 ng/reaction) was incubated with DNase I to prevent interference of DNA contamination in the PCR analysis (1 U/ μ g; Invitrogen, Sao Paulo, Brazil) and then reverse transcribed using Oligo-dT primers and Omniscript (cumulus cells) or Sensiscript (oocytes) reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON, CA). The reagents were incubated at 37 °C for 60 min and then at 93°C for 3 min for enzyme inactivation. Relative real time RT-PCR analysis was performed with an ABI 7500 thermocycler using Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Sao Paulo, Brazil). The final volume of the PCR mix was 25 μ L and thermocycling conditions were: 95°C for 10 min (1 cycle), denaturing at 95°C for 10 sec followed by annealing for 1 min (40 cycles). The primers sequences, amplicons sizes and annealing temperatures for each target gene are shown in Table 1. Reactions were optimized to provide maximum amplification efficiency for each gene. The specificity of the PCR products was assessed by melting curve analyses and amplicon size determined by electrophoresis in 2% agarose gels. Cyclophilin-A (CYCA) was used as the housekeeping gene as previously validated in our laboratory (Caixeta *et al.*, 2012). Relative expression values for each gene were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction and using one control sample as calibrator (Pfaffl 2001). Mean efficiency values for each gene were calculated from the amplification profile of individual samples with LinRegPCR software (Ramakers *et al.*, 2003). Each sample was run in duplicate.

Glucose metabolism

Glucose and lactate concentrations were determined in spent media (including media which was not used for IVM), following 12 and 22h culture with FGF8 (100ng/mL). At the completion of culture, spent media was collected and stored at -80°C. Glucose and lactate levels were measured by chemical dry automatic method with the equipment VITROS®Fusion 5.1 FS (JOHNSON &JOHNSON, Ontario, Canada).from four and six experimental replicates for 12 and 22 hours respectively. To determine glucose uptake, the measured glucose concentration was subtracted from the concentration of glucose in media blanks (drops of media, cultured without cells). The base medium (TCM199) did not contain lactate. Glucose uptake and lactate production were expressed as pmol/COC/h (Sutton-McDowall *et al.*, 2012).

Statistical Analysis

Cumulus expansion and meiosis progression data were transformed to radians using arcsine transformation, and gene expression data were transformed to base 10 logarithms when not normally distributed. The effects of treatments with FGF8 on cumulus cell expansion, meiosis progression, gene expression and glucose and lactate levels were tested by analysis of variance (ANOVA), and means were compared with the Fisher Protected test. The analyses were performed with JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA) and the results are presented as means standard error of the mean ($\pm$ SEM). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Values of P between 0.05 and 0.08 were considered to indicate tendency of difference.

RESULTS

Cumulus-oocyte complexes were exposed to graded doses of FGF8 and cumulus expansion and meiosis progression were assessed. FGF8 did not affect the percentage of COCs achieving complete, partial and poor cumulus expansion (Fig. 1). On the other hand, FGF8 decreased the percentage of oocytes reaching metaphase II at 100ng/mL (36%) in relation to the control (0ng/mL; 70%), while it increased the percentage of oocytes in metaphase I (64% at 100 ng/mL vs. 30% at 0ng/mL) after 22 hours of culture (Fig. 2).

The effective dose of FGF8 to alter meiosis progression (100ng/mL) was then used to test the effect of FGF8 on glucose metabolism. FGF8 did not alter glucose uptake or lactate production at 12 hours of culture, but tended to decrease glucose uptake and lactate production after 22 hours of culture ($P=0.07$; Fig. 3)

To gain insight into the mechanisms by which FGF8 alters meiosis progression and possibly influences glucose metabolism of bovine COC during IVM, the effects of FGF8 on abundance of mRNA encoding proteins that regulate these processes were tested at 12 and 22 hours of culture. FGF8 did not change mRNA abundance of genes regulating meiosis progression or glucose metabolism at 12 hours of culture (Fig. 4 & 5). Nevertheless, after 22 hours of IVM, FGF8 decreased mRNA levels of *Cyclin B1* and *NPR2* in the oocyte and cumulus cells, respectively (Fig 4). FGF8 treatment did not affect mRNA

abundance of *MSY2* in the oocyte or *NPPC* in cumulus cells at either 12 or 22 hours of IVM (Fig. 4). Moreover, FGF8 decreased mRNA levels of *PFKP* and tended to decrease mRNA levels of *LDHA*, but did not alter the expression of *GLUT1* and *GLUT4* in cumulus cells cultured for 22 hours (Fig. 5). Finally, FGF8 did not change mRNA abundance of *PDHA1* in cumulus cells at either 12 or 22 hours of IVM, but increased *PDHA1* mRNA levels in oocytes after at 22 hours of culture (Fig. 6).

DISCUSSION

Fibroblast growth factor 8 is an OSF known to regulate cumulus cell phenotype in the mouse (Buratini *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). In this study, we tested the effects of addition of FGF8 to the IVM medium on expansion, nuclear maturation and energy metabolism of the bovine COC. We present novel evidence that FGF8 inhibits meiosis progression and glycolytic metabolism during IVM in cattle, contrasting with previous findings in mice.

FGF8 did not affect cumulus expansion in the present study. Although culture systems differ, this is somehow in agreement with previous studies in mice where FGF8, unlike BMP15 and GDF9, did not alter the competence of the COC to undergo expansion (Sugiura *et al.*, 2010). The lack of influence of FGF8 on cumulus expansion contrasts with the stimulatory effect of FGF10 during IVM of bovine COCs (Zhang *et al.*, 2010; Caixeta *et al.*, 2013). This difference is likely due to the fact that FGF8 and FGF10 activate different receptors; while FGF10 activates FGFR1B and FGFR2B, FGF8 activates preferably FGFR3C, FGFR4 and FGFR2C (Xu *et al.*, 2000; Perriss-Ford *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

In the present study, FGF8 decreased the proportion of oocytes reaching metaphase II, denoting an inhibitory action upon meiosis progression. In mice, FGF8 appears to contribute for meiotic arrest by stimulating the expression of natriuretic peptide receptor type 2 (*NPR2*), which signals to increase the production of cGMP in cumulus cells (Zhang *et al.*, 2010). However, in the present study, FGF8 decreased the expression of *NPR2* in bovine cumulus cells from COCs submitted to 22 hours of IVM. This discrepancy may reflect species-specific mechanisms of meiosis control or differences in the culture systems. It is noteworthy that in mice, FGF8 enhanced *NPR2* expression in a gonadotropin-free culture system, the same where *NPPC* promoted meiotic arrest (Zhang *et al.* 2010). The capacity of the

NPPC/NPR2 system to hold or slow meiosis progression during gonadotropin-induced IVM has not been assessed. On the other hand FGF8 decreased abundance of *CyclinB1* mRNA in the oocyte. Cyclin B1 is a functional subunit of the maturation promoting factor (MPF), the direct inducer of meiosis resumption (Gilchrist *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2013). Therefore, these data suggest that the inhibitory effect of FGF8 on meiosis progression may be at least in part mediated by suppression of *CyclinB1* expression in the oocyte. We have also assessed the effects of FGF8 on mRNA levels of *MYS2*, a gene essential for mRNA stability, spindle formation and chromosome congression (Medvedev *et al.*, 2011), which expression is directly associated with oocyte competence to resume meiosis (Yu *et al.*, 2001). However, against our hypothesis, FGF8 did not significantly alter *MSY2* expression.

To investigate if FGF8 influences the metabolism of glucose for energy production in bovine COCs submitted to IVM, we assessed effects of the addition of FGF8 to the IVM medium on glucose consumption, lactate production and mRNA expression of genes regulating glucose transport, glycolysis and utilization of pyruvate for energy production. FGF8 tended to decrease glucose uptake and lactate production during IVM, which was associated with an inhibitory effect on *PFKP* mRNA abundance and a tendency to decrease *LDHA* mRNA levels. As *PFKP* is the rate limiting enzyme of the glycolytic pathway (Sutton-McDowall *et al.*, 2010), these data combined suggest a modest inhibitory influence of FGF8 on pyruvate production by bovine COCs submitted to IVM. This contrasts with previous studies in mice, in which FGF8 was demonstrated to cooperate with BMP15 to promote glycolysis in cumulus cells by increasing expression and activity of *PFKP* and *LDHA* (Sugiura *et al.*, 2007). As discussed above, this contrast may reflect differences between species or culture systems once Sugiura *et al.*, (2007) use oocytomized cumulus cells and to induce the cumulus expansion were add 5% of fetal bovine serum and epidermal growth factor.

Pyruvate and lactate are the interchangeable final products of the glycolytic pathway (Sutton-McDowall *et al.*, 2010), and pyruvate availability to the oocyte is required for meiosis completion (Biggers, 1967). Therefore, the potential inhibitory influence of FGF8 on the glycolytic pathway may contribute for its inhibitory effect on meiosis progression. The oxidative metabolism of pyruvate culminates in ATP production and is initially catalyzed by the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), a mitochondrial multi-enzyme complex, (Brinster *et al.*, 1971; Eppig, 1976). *PDHA1* encodes a subunit of PDC, and knockout of *PDHA1* compromises meiosis resumption leading to abnormalities in the meiotic spindle and subfertility in mice (Jhonson *et al.*, 2007).

Against our hypothesis, FGF8 increased *PDHA1* mRNA levels in the oocyte after 22 hours of IVM. Therefore, despite its inhibitory influence on meiosis progression, FGF8 appears to enhance the capacity of the oocyte to oxidize pyruvate for energy production.

In summary, this study presents novel findings from functional and gene expression studies that allow a better understanding of the actions of FGF8 in the regulation of COC maturation in cattle. We have demonstrated that FGF8 inhibits meiosis during IVM of bovine COCs, and provided evidence that the mechanisms involve suppression of *CyclinB1* expression in the oocyte.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

FUNDING

This work was supported by the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP) and the Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superiores (CAPES Brazil).

REFERENCES

- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, 647-653, 2001.
- BIGGERS, J.D.; WHITTINGHAM, D.G.; DONAHUE, R.P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 58:560–567, 1967.
- BRINSTER, R.L. Oxidation of pyruvate and glucose by oocytes of the mouse and rhesus monkey. **J Reprod Fertil**, 24:187–191, 1971.
- BURATINI JR., J.; PINTO, M.G.L.; CASTILHO, A.C.; AMORIM, R.L.; GIOMETTI I.C.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. **Biol Reprod.**, v.77, p.745-50, 2007.
- CAIXETA, E.S.; MELANIE, L.; SUTTON, Mc.D.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G.; PRICE, C.A.; MACHADO, M.F.; LIMA, P.F.; BURATINI, J. 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. **Socie for Repro and Fertil**, Manuscript REP-13-0079, 2013.
- CHO, J.H.; ITOH, T.; SENDAI, Y & HOSHI, H. Fibroblast growth factor 7 stimulates 351 in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Mol Repro and Develop** 75 1736–1743, 2008.
- EPPIG, J.J. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. **J Exp Zool**, 198:375–382, 1976.

FORD-PERRISS, M., ABUD, H., MURPHY, M. Fibroblast growth factor in the developing central nervous system, **Clin. Exp. Pharmacol.Physiol.**, v.28, p.493–503, 2001.

GILCHRIST, R.B.Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunitiesfor the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev** 23, 23-31, 2011.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v.14, p 159–177, 2008.

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

HIRADATE, Y.; HOSHINO, Y.; TANEMURA, K.;SATO, E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption.**Cambridge Univ Press**. 2013.

JOHNSON, M.T., FREEMAN, E.A., GARDNER, D.K. and HUNT, P.A. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. **Biol Reprod** 77: 2-8. 2007.

MA, J.Y.; OU-YANG, Y.C.; LUO, Y.B.; WANG, Z.B.; HOU, Y.; HAN, Z.M.; LIU, Z.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Cyclin O regulates germinal vesicle breakdown in mouse oocytes.**Biol Reprod**, 88(5):110, 2013.

MACHADO, M.F.; PORTELA, V.M.; PRICE. C.A.; COSTA, I.B.; RIPAMONTE, P.; AMORIM, R.L.; BURATINI JR, J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J Endocrinol**, v.202, p.347-353, 2009.[

MEDVEDEV, S.; HUAN, P.; SHCULTZ,R.M. Absence of MSY2 in Mouse Oocytes Perturbs Oocyte Growth and Maturation,RNA Stability, and the Transcriptome. **Biol Reprodu**, 85, 575-583, 2011.

RAMAKERS, C.; RUJITER, J.M.; DEPREZ, R.H & MOORMAN AF 2003. Assumption-397 free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters** 339 62-66.

SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M.M.; EPPIG, J. Estrogen Promotes the Development of Mouse Cumulus Cells in Coordination with Oocyte-Derived GDF9 and BMP15. **Mol Endocrinol**, v.24(12): 2303-2314, 2010.

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

SUGIURA, K.; EPPIG, J.J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Dev Biol**, v.279, p.20-30, 2005.

SUTTON-McDOWALL, M.L.; MOTTERSDEAD, D.G.; GARDNER, D.K.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. **Bio of Reprod** 87 1-8, 2012.

SUTTON-McDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B., THOMPSON,J.G. The pivotal role of glucosemetabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, 139, 1-12. 2010.

VALVE E, PENTILLA T.L., PARANKO J., HARKONEN P. FGF-8 is expressed during specificphases of rodent oocyte and spermatogonium development. **Biochem Biophys Res Commun**,v.232, 173-177, 1997.

XU, J., LIU, Z., ORNITZ, D.M. Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures, **Development** v.27, 1833–1843, 2000.

YU, J.; HECHT, N.B.; SCHULTZ, R.M. Expression of MSY2 in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos. **Biol Reproduc**, 65, 1260-1270, 2001.

ZHANG, K, EALY A. D. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domes. Anim Endocrinol**. Accept Manuscript, 2012.

ZHANG, M.; SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, p.366-369, 2010.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMORI, H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D. M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v.281, p.15694-15700, 2006.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. –Effects of graded doses of FGF8 (0, 1, 10 and 100 ng/mL) on expansion of bovine cumulus cells submitted to IVM. COCs were culture for 22 hours (n=4).

Figure 2 –Effects of FGF8 on meiosis progression after 22 hours of IVM. Different letters indicate different proportions of oocytes reaching meiosis I (a, b) and meiosis II (x, y; $P < 0.05$, n=5).

Figure 3 – Effects of FGF8 on glucose metabolism of bovine COCs submitted to IVM. COCs were cultured for 12 and 22 hours with (100 ng/mL) or without FGF8, and glucose uptake and lactate production were measured at the end of culture. Data were derive from four and six independent replicates for each treatment.

Figure 4- Effects of FGF8 (100ng/mL) on mRNA abundance of *Cyclin B1*, and *MYS2* in the oocyte, and mRNA levels of *NPPC* and *NPR2* mRNA abundance in cumulus cells. COCs were cultured for 12 and 22 hours. Messenger RNA abundance was measured by real-time RT-PCR. Data are presented as means ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample, calculated by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5 - Effects of FGF8 (100ng/mL) on *GLUT1*, *GLUT4*, *PFK* and *LDHA* mRNA abundance in cumulus cells. COCs were cultured for 12 and 22 hours. Messenger RNA abundance was measured by real-time RT-PCR. Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample, calculated by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). Data were derived from four and six independent replicates for each time point.

Figure 6- Effects of FGF8 (100ng/mL) on *PDHA1* mRNA abundance in cumulus cells and oocytes. COCs were cultured for 12 and 22 hours. Messenger RNA abundance was measured by real-time RT-

PCR. Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample, calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$). Data were derived from four and six independent replicates for each time point.

Figure 1

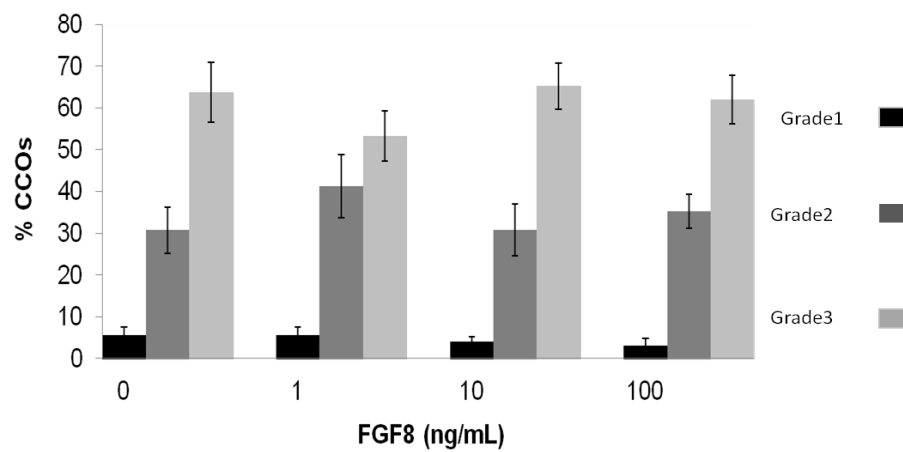


Figure 2

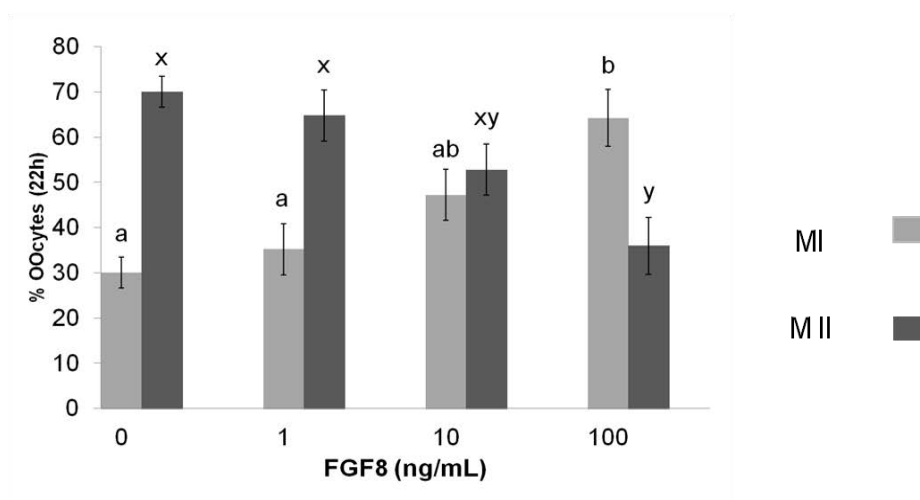


Figure 3

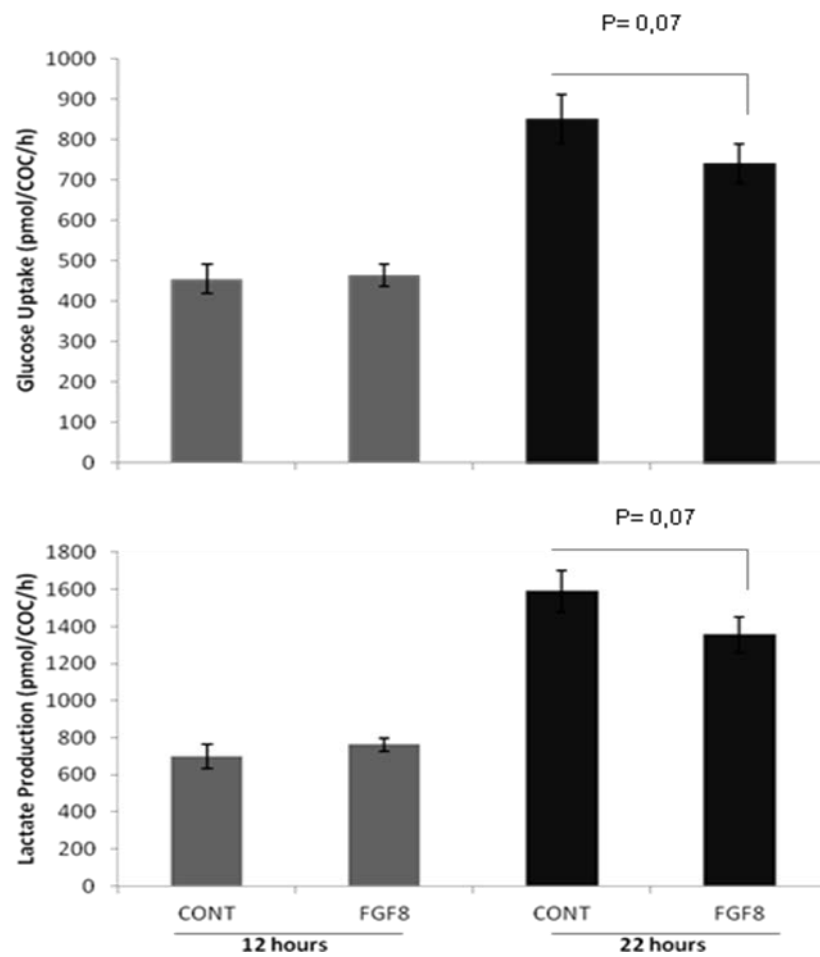


Figure 4

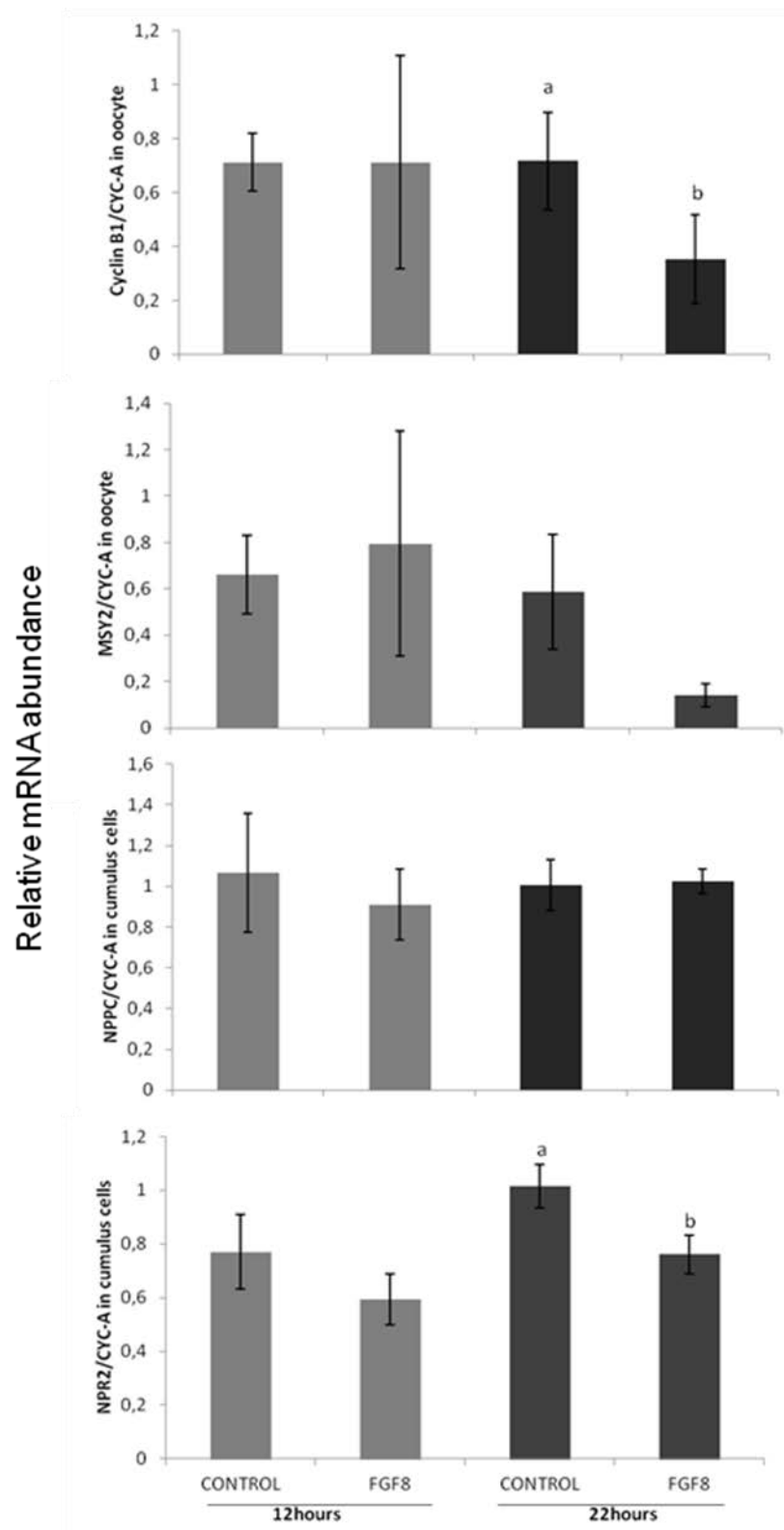


Figure 5

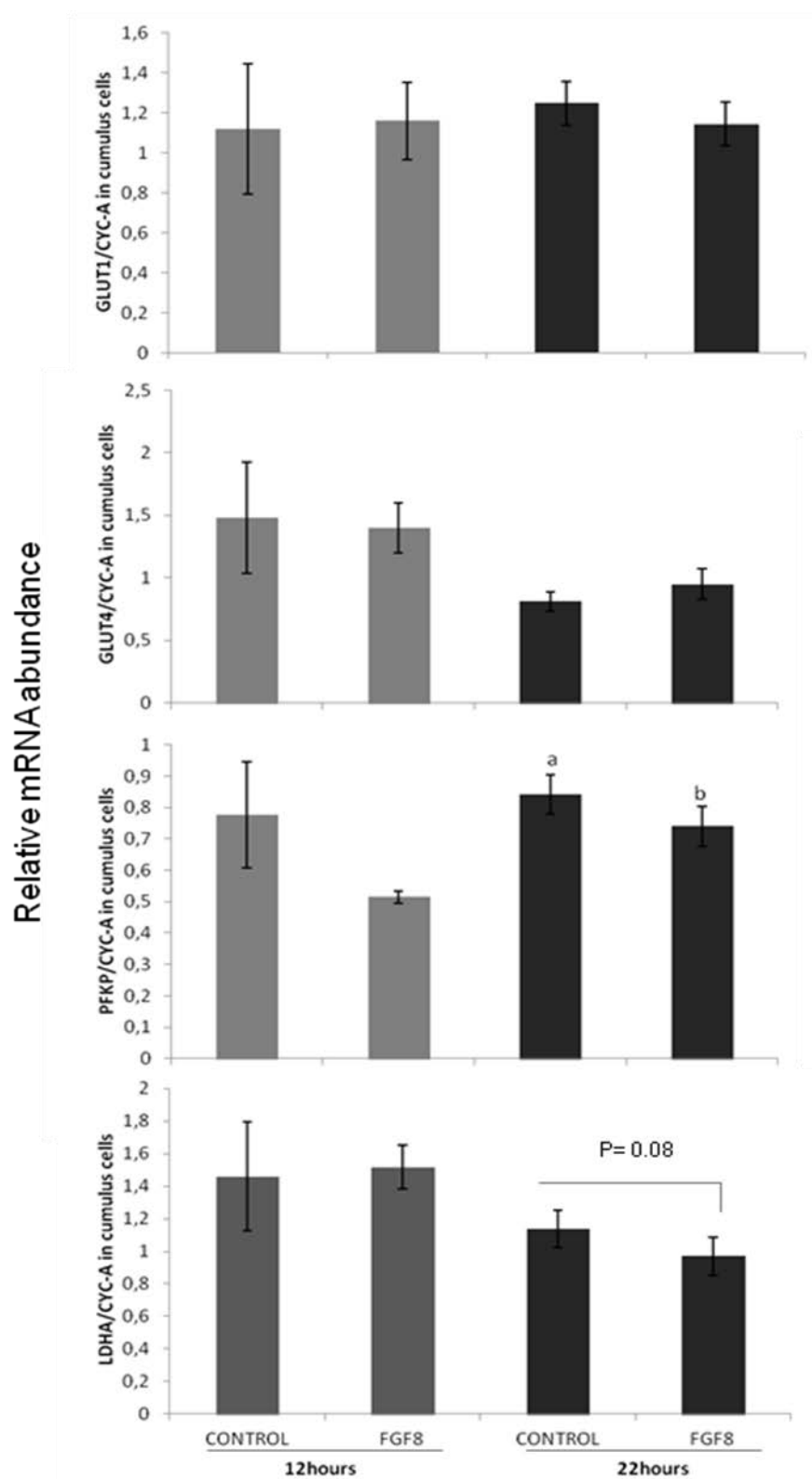


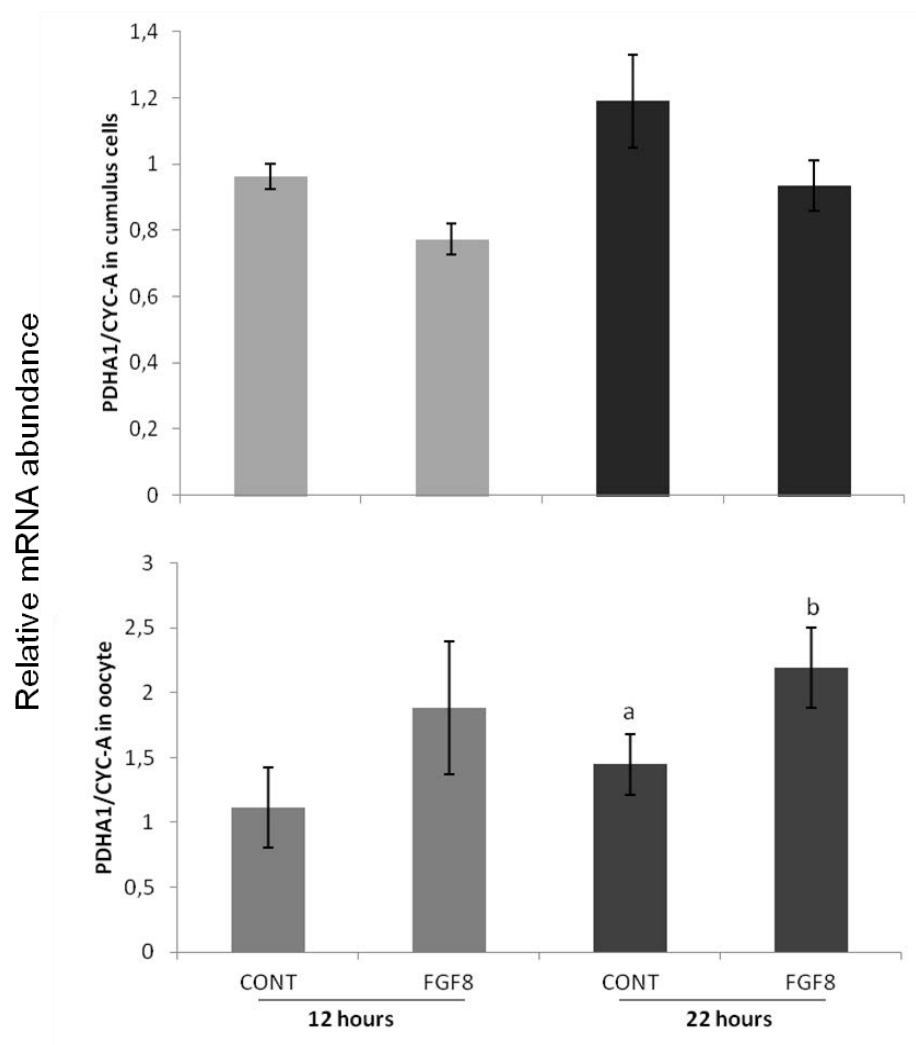
Figure 6

Table 1. Information of specific primers used for amplification in real time PCR.

Genes	Primer Sequence (5' - 3')	Fragment Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	References
CYC-A	F- GCCATGGAGCGCTTTGG	65bp	60°C	Machado <i>et al.</i> (2009)
	R- CCACAGTCAGCAATGGTGATCT			
CyclinB1	F- GGATACCTATGTGCCCAAGAAG	96bp	60°C	NM_001045872.1
	R- CCGATTTCTGGAGGGTACATTT			
MYS2	F- GTGCTGGCAATCCAAGTCC	118bp	60°C	NM_001098126.2
	R- CTTCTCTCCTTCCACGACATC			
NPPC	F- TCAGCCTCCTCGCATCT	101bp	60°C	NM_174125.2
	R- ACAGCTGGTGTTGTATCC			
NPR2	F-ATGACAGCATCAACCTGGACTGGA	145pb	60°C	NM_174126.2
	R-AGCACGAAACGACTATCCACCACA			
PDHA1	F- ACAGCCTAGGAATGGTTTG	106bp	60°C	NM_001101046.2
	R- AGGAGCAGCGAACAGATAAAG			
GLUT1	F- CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC	258bp	59°C	BC119940.1
	R- CACAAATAGCGACACGACAGT			
GLUT4	F- ATTGTGGCCATCTTTGGCTTCGTG	160bp	60°C	AY458600.1
	R- AACCCATGCCGATGATGAAGTTGC -			
PFKP	F- TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA	112pb	59°C	NM_001193220.1
	R- TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT			
LDHA	F- TCTGGATTTCAGCTCGCTTCCGTTA	147bp	60°C	BC146210.1
	R-TTCTTCAGGGAGACACCAGCAACA			

F= forward primer; R= reverse primer

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de evidências crescentes acerca da importância entre a comunicação entre as células do cumulus e oócito, bem como o efeito dos fatores secretados pelo oócito sobre a regulação da diferenciação nas células do cumulus e maturação oocitária, sendo o FGF8 um desses fatores, este trabalho testou a influência da adição de FGF8 sobre a expansão das células do cumulus, a progressão da meiose e metabolismo energético em CCOs bovinos submetidos à MIV e, uma vez observada a influência sobre a progressão da meiose e metabolismo energético, os genes que controlam tais processos foram avaliados. Demonstramos que o processo pelo qual o FGF8 inibe a progressão da meiose possivelmente envolve a supressão da expressão gênica da Ciclina B1. Além disso, tal processo está relacionado à tendência da diminuição do consumo de glicose e síntese de lactato, o qual é reforçado pela redução significativa da expressão da enzima limitante para a síntese de piruvato, a PFKP.

Vale ressaltar que a pesquisa básica é fundamental para o avanço na compreensão do eixo regulador entre o oócito e as células do cumulus, bem como os eventos moleculares reguladores de processos como a expansão do cumulus e a maturação oocitária. Tal conhecimento é valioso para o aperfeiçoamento da maturação *in vitro*, que tem sido largamente empregada na produção *in vitro* de embriões bovinos em nosso país, e que também interessa à reprodução assistida humana. O progresso da MIV deve impactar fortemente sobre todas as tecnologias ligadas à produção de embriões que dependem do controle da maturação do oócito fora do ambiente folicular como a clonagem e a transgenia.