UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10 E 18 (FGFs 10 E 18) SOBRE A ESTEROIDOGÊNESE EM OVÁRIOS FETAIS BOVINOS

RUBIA BUENO DA SILVA

Botucatu – SP
Julho – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10 E 18 (FGFs 10 E 18) SOBRE A ESTEROIDOGÊNESE EM OVÁRIOS FETAIS BOVINOS

RUBIA BUENO DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior

Botucatu – SP
Julho – 2012

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

Silva, Rubia Bueno da.
Efeitos dos fatores de crescimento fibroblástico 10 e 18 (FGFs 10 e 18) sobre a esteroidogênese em ovários fetais bovinos / Rubia Bueno da Silva. – Botucatu : [s.n], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012
Orientador: José Buratini Junior
Capes: 50504002

1. Bovino. 2. Esteroides. 3. Ovários. 4. Enzimas. 5. Fibroblasto – Crescimento.

Palavras-chave: Bovino; Desenvolvimento; Enzimas; Esteroides; FGF; Ovário.

Nome do Autor: Rubia Bueno da Silva

Título: EFEITOS DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10 E 18 (FGFs 10 E 18) SOBRE A ESTEROIDOGÊNESE EM OVÁRIOS FETAIS BOVINOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Buratini Júnior
Presidente e Orientador
Departamento de Fisiologia
IBB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Antônio Visintin
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira
Membro
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
FMVA – UNESP – Araçatuba

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 18 de julho de 2012.

Dedicatória

Dedico a **Deus** por ter me escolhido e me abençoado desde o princípio. “Quando te desviares para a direita e quando te desviares para a esquerda, os teus ouvidos ouvirão atrás de ti uma palavra, dizendo: Este é o caminho, andai por ele.” (Isaías 30.21)

Dedico aos meus pais, **Darci** e **Marisa** por terem me transmitido ao longo destes anos a minha melhor compreensão de vida e de amor. A cada oração feita, a cada palavra amiga por telefone, a cada noite mal dormida... Vocês foram os pilares que me sustentaram até aqui. Toda vitória alcançada eu dedico a vocês, sempre.

Dedico à minha avó **Diva**, que me ensinou a reunir as pedras do caminho para construir um castelo.

Dedico também à minha irmã **Milena** e meu cunhado **Diogo**, pela amizade e companhia nos nossos encontros e por serem exemplos de incentivo e caráter.

Dedico aos meus tios **Magali** e **Eduardo** e aos meus primos **Victor** e **Arthur**, por serem tão queridos e sempre me incentivarem a cada passo dado.

Dedico especialmente ao meu noivo **Fabiano Eburneo** pelo amor e companhia incondicional nesta jornada e por acreditar que, “passo a passo”, tudo daria certo. Seu carinho, alegria e exemplo de vida me são fundamentais.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Buratini Junior** pela experiência compartilhada, pelo profissionalismo e por sempre acreditar no meu potencial, incentivando e autorizando a realização de meu estágio no exterior.

À **UNESP – FMVZ**, pela oportunidade concedida para a realização deste doutorado.

A todos os **docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia, IBB, UNESP**, pelas conversas e experiências trocadas.

Aos **funcionários da Pós-Graduação em Medicina Veterinária**, **José Roberto e Maria**, por todo apoio e pela eficiência no serviço.

À **Profa. Dra. Joanne Fortune** pela amizade, receptividade e oportunidade de realizar estágio em seu laboratório na Universidade de Cornell, Nova Iorque, EUA. Agradeço também ao **Ming Yang** pelos ensinamentos transmitidos que possibilitaram a realização do cultivo de ovários fetais em nosso laboratório.

Ao **Prof. Cristopher A. Price**, do Centro de Pesquisa em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária, (Universidade de Montreal, Canadá) pela colaboração na análise de dados e planejamento de metodologia.

Ao **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros** por permitir a realização das dosagens hormonais em seu laboratório. Agradeço à sua equipe de pós-graduandos pelo convívio e experiências trocadas, em especial aos amigos **Rafael Satrapa e Anthony Castilho** pela mensuração dos esteróides.

A todos docentes, funcionários e pós-graduandos da Patologia Veterinária, FMVZ, UNESP, pelo convívio e experiências trocadas, em especial à **Profa. Dra. Reneé Laufer Amorim** e aos amigos **Breno Salgado e Fabrizio Grandi** pela grande contribuição nas reações de imunohistoquímica.

Ao **Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**, pelo aprendizado, pelo exemplo de profissional e pelo auxílio na interpretação da imunohistoquímica. Em especial ao aluno **Leonardo Mendes** pela atenção.

Às **secretárias do posto FAPESP** localizado na Biblioteca Central da UNESP, pelo pronto e gentil atendimento sempre que solicitado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão de bolsa e auxílio pesquisa ao referido projeto de pesquisa, registrados sob os números 2008/58530-7 e 2009/52300-2, para a realização do experimento e também por permitir minha viagem à Universidade de Cornell para a realização do estágio.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa parcial de doutorado.

Aos novos e velhos amigos do Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana **Anthony Castilho, Cíntia Ormond, Débora Sartor, Diego Guerra, Ester Siqueira, Felipe Dalanezzi, Fernanda, Isabela Bazzo, Mariana Machado e Paula de Lima**, pelo auxílio técnico, risadas e pelos nossos “cafés-terapias” diários.

À **família Eburneo**, da qual já faço parte e cujo convívio tem sido muito importante para a minha caminhada. Em especial à minha sogra **D.Cleide**, por ter me “adotado” e me apoiado em todos os momentos. Agradeço aos **meus familiares de Botucatu**, pela hospedagem e amparo e pela torcida a cada novo desafio profissional.

A **todos amigos brasileiros ou não pela recepção em Ithaca**, Nova Iorque, durante minha estadia. Em especial, agradeço ao Lucas Siqueira e à Marcela Bicalho e suas famílias pelo auxílio especial.

Ao casal de amigos **Gustavo Figueiredo e Paula Ripamonte** pela convivência acolhedora e amizade desde o início.

Aos **amigos da Academia Vida Ativa** pelas corridas, pedaladas, comilanças e conversas jogadas fora ao longo destes anos.

Às “melhores amigas“ **Bela e Sukita** por sempre me lembrarem que a minha casa é o melhor lugar onde eu poderia estar.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este projeto, minha profunda gratidão.

Tocando em frente

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

Almir Sater / Renato Teixeira

Lista de tabelas

Tabela		Páginas
Capítulo 1		
Tabela 1.	Information of specific primers used for amplification in real time PCR.....	**43**
Capítulo 2		
Tabela 1.	Information of specific primers used for amplification in real time PCR.....	**63**

Lista de figuras

Figura **Páginas**

Capítulo 1

Figura 1. Esquema representativo da via Δ5 utilizada para a síntese de esteróides em folículos ovarianos bovinos (adaptado de Conley e Bird, 1997; Bao e Garverick, 1998). O colesterol é transportado para o interior da mitochondria em células da teca ou da granulosa pela StAR e é convertido em pregnenolona (P5) pela CYP11A1 (também denominada P450scc). A pregnenolona pode ser utilizada pela 3β-HSD ou pela CYP17A1 (também chamada de citocromo P45017A1) para a produção de progesterona (P4) ou de DHEA, respectivamente. Em seguida, a DHEA é transformada em androstenediona (A4), a qual é transportada para as células da granulosa, e pode ser metabolizada em estradiol por duas rotas diferentes: transformação em estrona (E1) e subsequentemente em estradiol pelas respectivas enzimas CYP19A1 (aromatase) e 17β-HSD; ou a conversão em testosterona (T4) e sequencialmente em E2 por meio da 17β-HSD e da CYP19A1, respectivamente..... **12**

Capítulo 2

Figura 1. Expression of mRNA steroidogenic enzymes in bovine fetal ovaries at 60, 75, 90, 120, 150 and 210 days of gestation: StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, and HSD17B1 (n=7 fetuses/gestational age). Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values (± S.E.M) relative to a calibrator sample by the ΔΔCt method with efficiency correction. Bars

with different letters are significantly different (P<0.05)…….. **42**

Capítulo 3

Figura 1. Imunohistochemical localization of FGF18 in bovine fetal ovaries at 60 to 210 days of gestation. (A) Presence of FGF18 at day 60 of gestation in cell streams (white circle) and oogonia (white arrowhead); (B) Fetal ovary at 75d with detection of FGF18 in cell streams (white circle), oogonia (white arrowhead) and newly primordial follicle (black arrow); (C) FGF18 is detected in cell streams (white circle) and oocytes from primordial (black arrow) and primary (black arrow head) follicles at day 120 of gestation; (D) Presence of FGF18 in oocytes of secondary follicles (white arrow) and cell streams (white circle) from ovary at 150d of gestation; (E) FGF18 protein in preantral follicles concentrated at cortical portion of fetal ovaries at 210d; (F) No staining was observed in the presence of excess FGF18 blocking peptide **66**

Figura 2. Expression of mRNA FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3 and FGFR4) in bovine fetal ovaries at 60, 75, 90, 120, 150 and 210 days of gestation. Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values (± S.E.M) relative to a calibrator sample by the ΔΔCt method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different (P<0.05) **67**

Figura 3. Effects of grading doses of FGFs 10 and 18 on secretion of estradiol (E_2; A) and progesterone (P_4; B) from fetal ovaries just prior to follicle formation

(fetuses primarily *Bos taurus* at Day 80-90). Ovarian fragments were cultured in serum-free medium for 12 days and treated separately with the stated doses of FGF10 or 18 (0, 50, 100 and 200 ng/mL). Medium was collected and replaced every 48h and samples obtained at 2, 4, 6 of culture were measured by RIA. Data are means values ± S.E.M. of six independent replicates. Bars with different letters are significantly different (P<0.05)……..... **68**

Figura 4. Effect of FGF18 on mRNA abundance enconding proteins critical for steroidogenesis in fetal ovaries during activation process (fetuses primarily *Bos indicus* at 120d of gestation). Ovarian fragments were cultured in serum-free medium for 6 days and treated with the stated doses of FGF18 (0, 50 and 100 ng/mL). Medium was collected and replaced every 48h. Ovarian fragments were collected at 6d and messenger RNA abundance was measured by real-time PCR and expressed relative to a calibrator sample calculated by the ΔΔCt method with efficiency correction. Data are means values ± S.E.M. of three or six independent replicates (relative to steroids measurements or gene expression investigation, respectively). Bars with different letters are significantly different (P<0.05)... **69**

Lista de abreviaturas e símbolos

17β-HSD = 17-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase

3β-HSD = 3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase

A4 = androstenediona

ANOVA = análise de variância

bp = par de bases

CYC-A = ciclofilina A

d = dia

DHEA = desidroepiandrosterona

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNAse = desoxirribonuclease

dNTP = desoxirribonuleotídeo trifosfatado

E1 = estrona

E2 = estradiol

ERs = receptores de estradiol

FGF10 = fator de crescimento fibroblástico 10

FGF18 = fator de crescimento fibroblástico 18

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H2AFZ = histona H2AFZ

L = litro

µg = micrograma

mmol/L = milimols por litro

ng = nanograma

P4 = progesterona

CYP19A1 = citocromo P450 aromatase

CYP17A1 = citocromo P450 17α-hidroxilase

CYP11A1 = citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol

P45017A1 = citocromo P450 17α-hidroxilase

P450scc = citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol

P5 = pregnenolona

PCR = reação em cadeia da polimerase

PGRs = receptores de progesterona

RNA = ácido ribonucleico

RNAm = ácido ribonucleico mensageiro

RNAse = ribonuclease

RT-PCR = transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

StAR = proteína reguladora aguda da esteroidogênese

T4 = testosterona

U = unidade

Sumário

	Páginas
RESUMO	**01**
ABSTRACT	**03**
CAPÍTULO 1	
I. Introdução	**07**
II. Revisão de Literatura	**09**
2.1 Foliculogênese inicial	**09**
2.2 Esteroidogênese ovariana	**11**
2.2.1 Envolvimento dos esteróides na formação dos ovários	**13**
2.3 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)	**15**
2.3.1 Participação dos FGFs na foliculogênese	**17**
CAPÍTULO 2	
Abstract	**22**
Introduction	**22**
Materials and Methods	**25**
Results	**27**
Discussion	**27**
References	**33**
List of abreviations	**39**
Figure legend	**41**
CAPÍTULO 3	
Introduction	**46**
Materials and Methods	**47**
Results	**50**
Discussion	**51**
Conclusions	**54**
Abstract	**54**
References	**56**
Figure legends	**64**

CAPÍTULO 4

I. Discussão geral..... 71

II. Conclusões gerais..... 77

BIBLIOGRAFIA..... 78

ANEXOS..... 87

BUENO DA SILVA, R. **Efeitos dos fatores de crescimento fibroblástico 10 e 18 (FGFs 10 e 18) sobre a esteroidogênese em ovários fetais bovinos.** Botucatu, 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Durante o desenvolvimento ovariano fetal, a formação folicular inicial é decisiva para a fertilidade da fêmea, pois define sua reserva gametogênica. Tem sido proposto que a progesterona e o estradiol desempenham papel regulatório na foliculogênese pré-antral, de forma que sua produção reduzida em ovários fetais bovinos antecede o surgimento de folículos primordiais e primários. Recentemente, os FGFs 10 e 18 foram reportados em folículos ovarianos bovinos como redutores dos níveis de esteróides, o que parece envolver a inibição da expressão de enzimas necessárias à esteroidogênese. Em adição, a expressão do FGF10 foi observada durante o desenvolvimento ovariano fetal bovino, e esteve positivamente associada ao aumento no número de folículos primários. O presente estudo investigou primeiramente o padrão de expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas (StAR, CYP11A1, 3β-HSD, CYP17A1, CYP19A1 e 17β-HSD) em ovários de fetos bovinos em idades gestacionais específicas (60, 75, 90, 120, 150 e 210 dias). Todos os genes investigados se mostraram expressos e regulados ao longo da gestação. Os níveis de RNAm da CYP19A1 diminuíram dos 60 para os 90 dias, sugerindo envolvimento desta enzima com a produção decrescente de estradiol observada previamente durante este período gestacional. A expressão das demais enzimas foi elevada ao longo da gestação, coincidente com o aumento da competência esteroidogênica descrito preliminarmente durante o desenvolvimento folicular inicial. Em adição, foi investigada a participação dos FGFs 10 e 18 na esteroidogênese ovariana fetal bovina. A expressão do FGF18 e de seus receptores (FGFR2C, FGFR3C e FGFR4) foi detectada em ovários fetais bovinos ao longo da gestação (60, 75, 90, 120, 150 e 210 dias). A abundância de RNAm do FGF18 aumentou entre os 90 e 120 dias e declinou aos 210 dias. A expressão do FGFR2C e FGFR4 não foi alterada durante o período

gestacional, enquanto os níveis de RNAm do FGFR3C foram reduzidos dos 120 para os 210 dias. Ao longo do desenvolvimento ovariano, a proteína do FGF18 foi observada nas “células stream” e em algumas oogônias, bem como nos oócitos de folículos a partir do estágio primordial de ovários fetais bovinos. Em adição, o tratamento de fragmentos ovarianos fetais com FGF10 em período anterior à formação folicular não alterou a esteroidogênese, ao passo que o tratamento com FGF18 inibiu a produção de estradiol e progesterona. Além disso, a adição de FGF18 ao cultivo de ovários durante a ativação folicular reduziu a expressão de RNAm das enzimas CYP11A1 e CYP19A1. Em síntese, estas observações sugerem a regulação do FGF18 na esteroidogênese de ovários fetais bovinos ao redor da foliculogênese inicial.

Palavras-chave: FGF; esteróides; enzimas; desenvolvimento; ovário; bovino.

BUENO DA SILVA, R. **Effects of fibroblast growth factors 10 and 18 (FGFs 10 and 18) on steroidogenesis in bovine fetal ovaries.** Botucatu, 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

During fetal ovarian development, early follicular formation is essential to female fertility, when the gametogenic reserve is defined. It has been proposed that progesterone and estradiol play regulatory role on preantral folliculogenesis, once its reduced production in bovine fetal ovaries precedes primordial and primary follicle assembly. Recentlly, FGFs 10 and 18 were reported in bovine ovarian follicles as reducers of steroids levels, and this seems to involve the inhibition of enzymes necessary to steroidogenesis. In addition, FGF10 expression was observed during bovine fetal ovary development, and it was positively associated with the elevation on primary follicles number. The present study first investigated the mRNA expression patterns for steroidogenic enzymes (StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, CYP19A1 and HSD17B1) in bovine fetal ovaries at specific gestational ages (60, 75, 90, 120, 150 e 210 days). Expression of all investigated genes was detected and regulated through gestation. Messenger RNA levels of CYP19A1 decreased from days 60 to 90 of gestation, suggesting involvement of this enzyme on decrescent estradiol production previously observed during this gestational period. The expression of other enzymes was elevated during gestational period, which was coincident with the enhance of steroidogenic competence previously described during early follicular development. In addition, the participation of FGFs 10 and 18 on steroidogenesis in bovine fetal ovaries was investigated. The expression of FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3C and FGFR4) was detected in bovine fetal ovaries through gestation (60, 75, 90, 120, 150 e 210 days). The mRNA abundance of FGF18 enhanced between 90 and 120 days and decreased at 210 days. The expression of FGFR2C and FGFR4 did not vary during gestation, whereas FGFR3C mRNA levels decreased from days 120 to 210 of gestation.

During ovarian development, FGF18 protein was observed in cell streams and in some oogonia, as well as in oocytes of follicles from primordial stage. In addition, the treatment of ovarian fragments with FGF10 before follicular formation did not change steroidogenesis, whereas FGF18 treatment inhibited estradiol and progesterone production. Moreover, the addition of FGF18 in culture ovaries during follicular activation reduced the expression of mRNA of CYP11A1 and CYP19A1. In summary, this observation suggests the FGF18 regulation on steroidogenesis of bovine fetal ovaries around early folliculogenesis.

Key words: FGF; steroids; enzymes; development; ovary; bovine.

A presente tese está organizada em quatro capítulos, os quais compilam os seguintes conteúdos:

Capítulo I. Introdução e Revisão de literatura.

Capítulo II. Trabalho Científico 1: "Expression of mRNA encoding steroidogenic enzymes in bovine fetal ovaries at different times of gestation".

Capítulo III. Trabalho Científico 2: "Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis during fetal ovarian development in cattle".

Capítulo IV. Discussão geral dos resultados e Conclusões Gerais

CAPÍTULO 1

I. INTRODUÇÃO

A reprodução de fêmeas mamíferas pode ser influenciada por diversos fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, sendo a formação ovariana fetal um dos principais gargalos para o estabelecimento da fertilidade (Krysko *et al*., 2008). A reserva de folículos primordiais capazes de se desenvolver até o estágio ovulatório e gerar oócitos fertilizáveis é determinada durante o desenvolvimento gonadal e sofre intensa redução durante a gestação e posteriormente durante a vida reprodutiva (Pepling *et al*., 2006). Como consequência, a disponibilidade de oócitos para as biotécnicas reprodutivas é reduzida e limita a viabilidade e otimização das mesmas. Sendo assim, há interesse crescente em ampliar o conhecimento sobre os mecanismos que modulam o desenvolvimento inicial dos ovários, de forma a explorar o estoque de pequenos folículos que primariamente é reduzido por atresia (Ksiazkiewicz, 2006). Isto beneficiaria fortemente a produção de alimentos de origem animal, bem como a preservação da biodiversidade, além de viabilizar estratégias para o tratamento da infertilidade feminina na espécie humana (Jiang *et al*., 2003).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos para testar o envolvimento de hormônios, fatores de crescimento e outros peptídeos na ativação, desenvolvimento e sobrevivência de folículos pré-antrais (revisado por Figueiredo *et al*., 2007). Nesse sentido, o ovário fetal constitui modelo interessante para investigar a expressão e ação de fatores potencialmente reguladores da foliculogênese pré-antral, pois as distintas categorias foliculares iniciais aparecem sequencialmente durante o desenvolvimento desse órgão ao longo da gestação (Juengel *et al*., 2002; Fortune, 2003). Pode-se, portanto, associar o padrão de expressão de genes candidatos com o surgimento ou o aumento em número de folículos em categorias específicas. Além disso, pode-se ainda testar *in vitro* os efeitos de variados agentes sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na dinâmica folicular inicial nas gônadas em desenvolvimento. Recentemente, foi demonstrado em bovinos que a produção de esteróides em ovários fetais está inversamente associada com a formação folicular e ativação de folículos primordiais, uma vez que baixos níveis de progesterona e estradiol foram detectados nas idades gestacionais em que surgem os folículos primordiais e primários (Yang e Fortune, 2008; Nilsson e

Skinner, 2009). De fato, fragmentos ovarianos bovinos tratados com progesterona mostraram taxa reduzida de folículos primordiais (Nilsson e Skinner, 2009), ao passo que a adição de estradiol ao cultivo inibiu o surgimento dos folículos primários (Yang e Fortune, 2008).

Além da influência esteroidogênica, outras moléculas de ação autócrina/parácrina têm sido reportadas como moduladoras da foliculogênese pré-antral, dentre elas os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs). A presença desses fatores e de seus receptores tem sido demonstrada em oócitos e/ou células somáticas de folículos pré-antrais (Buratini *et al*., 2005; Buratini *et al*., 2007; Machado *et al*., 2009). Nesse sentido, estudos desenvolvidos em roedores e ruminantes mostraram que a adição de tais fatores ao cultivo, sozinhos ou em associação a outros agentes, é benéfica ao desenvolvimento de folículos pré-antrais. Além de aumentar as taxas de integridade e sobrevivência folicular *in vitro*, tais fatores contribuem com o surgimento de folículos primordiais e primários e com o crescimento até o estágio antral (McGee *et al*., 1999; Nilsson *et al*., 2001; Gupta *et al*., 2002; Nilsson e Skinner, 2004; Kezele *et al*., 2005; Matos *et al*., 2007; Chaves *et al*., 2010; Almeida *et al*., 2011). O envolvimento do FGF10 nesse contexto é particularmente sugerido, uma vez que sua expressão elevada em ovários fetais bovinos parece estar associada com o aumento no número de folículos primários (Castilho, 2008), além de estar inversamente associada à baixa produção de estradiol neste momento (Yang e Fortune, 2008; Nilsson e Skinner, 2009; Dominguez *et al*., 1998). Em adição, estudos na espécie bovina têm mostrado que o FGF10 inibe a produção de estradiol em células da granulosa *in vitro* (Buratini *et al*., 2007) e *in vivo* (Gasperin *et al*., 2012) via supressão da expressão da citocromo P450 aromatase (CYP19A1). Os FGFs 17 e 18 mostraram-se capazes de reduzir a produção de estradiol e progesterona (Machado *et al*., 2009; Portela *et al*., 2010), o que parece envolver a inibição de todas as enzimas necessárias à cascata esteroidogênica (Portela *et al*., 2010). Apesar do FGF17 já ter sido identificado em oócitos de folículos pré-antrais (Machado *et al*., 2009), a expressão e localização do FGF18 nessa categoria folicular permanece por ser investigada, assim como

sua participação no controle da esteroidogênese durante a formação e ativação de folículos.

Assim, os objetivos gerais do presente estudo foram investigar os mecanismos envolvidos na produção de esteróides em ovários fetais bovinos ao longo da gestação e avaliar a participação do FGF10 e do FGF18 na regulação da esteroidogênese ovariana fetal antes e durante a ativação folicular. Os padrões temporais de expressão do FGF18 e dos receptores de FGFs, bem como das enzimas esteroidogênicas (StAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese; CYP11A1: citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol; CYP17A1: citocromo P450 17α-hidroxilase, 3β-HSD: 3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase; CYP19A1; 17β-HSD: 17-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase), foram investigados no ovário fetal ao longo da gestação, a fim de identificar eventuais associações entre eles e a dinâmica folicular. Além disso, as hipóteses de que o FGF10 e FGF18 inibem a produção de estradiol e progesterona durante a fase de ativação folicular no ovário fetal e de que este efeito se deve à redução da expressão de enzimas esteroidogênicas foram testadas em sistema de cultivo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Foliculogênese inicial

O início da foliculogênese em mamíferos ocorre durante a vida fetal, quando células germinativas primordiais originárias do saco vitelínico povoam a gônada ainda indiferenciada (Motta *et al*., 1997). Denominadas de oogônias, estas células se multiplicam por mitose e, posteriormente, iniciam o processo de meiose, que logo é interrompido na fase de diplóteno da prófase I. Após iniciarem a primeira divisão meiótica, as oogônias passam a ser denominadas oócitos primários (Su *et al*., 2002), os quais passam a ser individualizados por células somáticas planas originárias do mesonefro e/ou epitélio ovariano, chamadas de células da pré-granulosa (McNatty *et al*., 2000; Juengel *et al*., 2002). O oócito circundado por uma única camada dessas células constitui o

folículo primordial (van den Hurk *et al*., 1997). Quando o folículo primordial deixa o "pool" de reserva, as células da pré-granulosa que o circundam proliferam e adquirem o formato cubóide, sendo chamadas de células da granulosa (CGs), caracterizando o folículo primário. A passagem de folículo primordial para o estágio primário é denominada ativação folicular e pode ocorrer ainda durante a vida fetal ou na fêmea adulta (Wandji *et al*., 1996b). A seguir, as CGs proliferam intensamente e os oócitos aumentam consideravelmente em tamanho, dando origem aos folículos secundários (McNatty *et al*., 1999). Quando os folículos possuem de duas a três camadas de células da granulosa, os precursores das células da teca passam a ser recrutados do estroma ovariano (Parrot e Skinner, 2000). Posteriormente, surgem os folículos antrais, caracterizados por 5 a 6 camadas de CGs e por uma cavidade preenchida por líquido folicular, denominada antro (Fortune, 2003). Com o progresso dos folículos, as CGs continuam a se proliferar enquanto as células da teca passam por alterações morfológicas e funcionais, diferenciando-se em teca interna e externa. Progressivamente, os diâmetros foliculares progridem até culminar com o estágio pré-ovulatório (Wandji *et al*., 1996a).

O aparecimento dos estágios pré-antrais em ovários de mamíferos tem padrão temporal espécie-específico. Em bovinos, existem divergências a respeito do momento específico em que surge cada categoria folicular no ovário ao longo do desenvolvimento fetal. Rüsse (1983) relatou o aparecimento dos folículos primordiais, primários e secundários com aproximadamente 90, 140 e 210 dias de gestação, respectivamente. Em contraste, Tanaka e colaboradores (2001) observaram o surgimento dos mesmos estágios com aproximadamente 74, 91 e 120 de gestação, respectivamente. Observações recentes em fetos primariamente *Bos taurus indicus* revelaram que as mesmas categorias foliculares aparecem pela primeira vez no ovário fetal aos 75, 90 e 150 dias de gestação, sendo que aos 120 dias observa-se aumento pronunciado no número de folículos primários (Castilho, 2008). Parte destas variações pode ser causada pelo uso de longos intervalos de tempo entre as idades gestacionais estimadas, os quais podem levar a margens de erros de 20

a 30 dias. Estas discrepâncias também podem ser causadas devido a variações raciais da espécie bovina.

2.2 Esteroidogênese ovariana

Na espécie bovina, o crescimento de folículos está associado à produção de hormônios esteróides. A síntese esteoridogênica resulta de um trabalho coordenado entre as células da teca, responsáveis pela síntese de andrógenos, e as células da granulosa, responsáveis pela aromatização dos andrógenos em estradiol. Essas ações são diretamente dependentes da expressão de receptores gonadotróficos e das enzimas esteroidogênicas nas células somáticas foliculares (Fortune *et al*., 2001).

Durante a esteroidogênese há o processamento enzimático sequencial do colesterol, que é inicialmente transportado para o interior da mitocôndria pela enzima StAR (Conley e Bird, 1997), expressa tanto em células da teca quanto da granulosa (Braw-Tal e Roth, 2005). No interior da mitocôndria, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima CYP11A1 (também denominada P450scc – P450 “side chain cleavage”), presente em ambos os tipos celulares (Bao e Garverick, 1998). Em bovinos, a via preferencial de síntese de esteróides é a Δ5 (Fig. 1), em que a pregnenolona é metabolizada em desidroepiandrosterona (DHEA) pela enzima CYP17A1 (também chamada de citocromo P45017A1) nas células da teca, e esta é transformada em androstenediona pela enzima 3β-HSD, expressa em células da teca e da granulosa (Bao e Garverick, 1998). A androstenediona pode ser transformada em estradiol nas células da granulosa por dois mecanismos diferentes: 1) conversão a estrona e finalmente desta em estradiol pela CYP19A1 (também denominada aromatase) e 17β-HSD, respectivamente; ou 2) transformação em testosterona pela 17β-HSD e, em seguida, desta em estradiol pela CYP19A1. Nessa cascata esteroidogênica existe uma rota alternativa pela qual a DHEA pode ser transformada diretamente em progesterona por ação da enzima 3β-HSD (Conley e Bird, 1997).

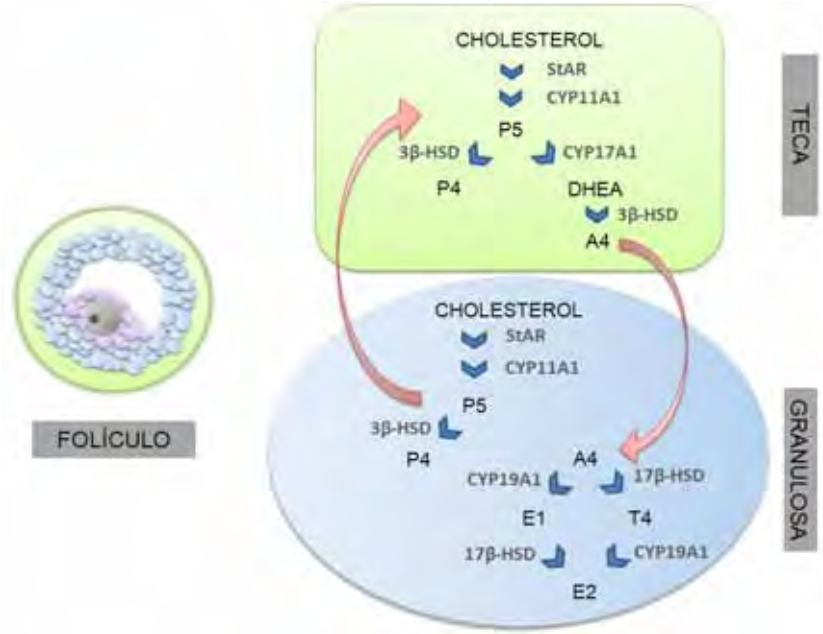


Figura 1. Esquema representativo da via Δ5 utilizada para a síntese de esteróides em folículos ovarianos bovinos (adaptado de Conley e Bird, 1997; Bao e Garverick, 1998). O colesterol é transportado para o interior da mitochondria em células da teca ou da granulosa pela StAR e é convertido em pregnenolona (P5) pela CYP11A1 (também denominada P450scc). A pregnenolona pode ser utilizada pela 3β-HSD ou pela CYP17A1 (também chamada de citocromo P45017A1) para a produção de progesterona (P4) ou de DHEA, respectivamente. Em seguida, a DHEA é transformada em androstenediona (A4), a qual é transportada para as células da granulosa, e pode ser metabolizada em estradiol por duas rotas diferentes: transformação em estrona (E1) e subsequentemente em estradiol pelas respectivas enzimas CYP19A1 (aromatase) e 17β-HSD; ou a conversão em testosterona (T4) e sequencialmente em E2 por meio da 17β-HSD e da CYP19A1, respectivamente.

O crescimento folicular e a esteroidogênese dependem de ações coordenadas do FSH e LH nas células da granulosa e da teca, respectivamente. O modelo de esteroidogênese mais aceito foi proposto por Fortune e Quirk (1988), segundo o qual a ligação do LH aos seus receptores nas células da teca estimula a atividade da CYP17A1 e, portanto, a conversão de pregnenolona em DHEA. Já a metabolização da androstenediona em estradiol depende das enzimas CYP19A1 e 17β-HSD, presentes nas células da granulosa (Bao e Garverick, 1998).

2.2.1 Envolvimento dos esteróides na formação dos ovários

É de amplo conhecimento que folículos em estágio antral têm seu desenvolvimento e regressão associados a variações nas concentrações de esteróides no fluido folicular (Fortune *et al*., 2001) Já a participação dos esteróides sexuais no crescimento de folículos pré-antrais ainda é pouco esclarecida. Todavia, há evidências de que a gônada em desenvolvimento produz esteróides ao longo da gestação (Shemesh *et al*., 1978; Tanaka *et al*., 2001; Quirke *et al*., 2001). Em adição, tem sido proposto que o aumento ou a redução dos níveis esteroidogênicos em idades gestacionais específicas estão associadas a eventos morfológicos ovarianos e ao estabelecimento e ativação dos folículos pré-antrais (Zachos *et al*., 2002; Kezele e Skinner, 2003; Chen *et al*. 2007).

Dos esteróides sintetizados no ovário fetal mamífero, o estradiol se destaca como o de detecção predominante no início da gestação (Quirke *et al*., 2001; Dominguez *et al*., 1988), e é o que tem concentrado a maior parte das investigações. Em ovários de fetos ovinos e bovinos a produção deste esteróide pôde ser identificada a partir do momento da diferenciação sexual (Juengel *et al*., 2002; Shemesh *et al*., 1978). Particularmente em ovários fetais de ovelhas, o pico de produção de estradiol dos 35 aos 45 dias gestacionais, seguido pelo seu declínio acentuado a partir dos 55 dias, coincidem com o surgimento dos cordões ovígeros e com o início da meiose gametogênica, respectivamente (Juengel *et al*., 2002). Adicionalmente, a expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas, bem como dos receptores de estradiol nos ovários de fetos ovinos e bovinos, fortalece a hipótese de que este esteróide possa agir de maneira autócrina/parácrina na formação gonadal (Quirke *et al*., 2001; Juengel *et al*., 2002; Garverick *et al*., 2010; Burkhart *et al*., 2010).

De maneira similar, em camundongos, a queda nos níveis de estradiol parecem ser necessárias para a formação ovariana e folicular. Em cultivo de ovários de ratas e camundongas recém-nascidas, a presença do estradiol em altas concentrações inibiu a ativação dos folículos e a quebra da vesícula germinativa de oócitos neles inclusos (Kezele e Skinner, 2003; Chen *et al*., 2007). Em contraste, estudos em hamsters demonstraram que baixas concentrações de estradiol (1ng/mL) adicionadas ao meio de cultivo foram

necessárias para a formação e ativação de folículos primordiais em fetos e neonatos de hamsters (Wang e Roy, 2007). Da mesma forma, em primatas, a produção esteroidogênica mostrou-se necessária à foliculogênese, uma vez que níveis reduzidos de estradiol, ou ainda o bloqueio na ação da CYP19A1, acarretaram em um menor número de folículos primordiais em ovários fetais, bem como no aumento da quantidade de oócitos presos em redes (Zachos *et al*., 2002; Billiar *et al*., 2003).

Como já mencionado para a espécie ovina, o início da formação gonadal em bovinos é acompanhado de alta produção de estradiol, seguido por um período em que os níveis produzidos localmente são baixos ou quase indetectáveis. Shemesh e colaboradores (1978) relataram maiores níveis de estradiol em ovários fetais bovinos dos 45 aos 65 dias gestacionais e redução dos mesmos a partir deste período. Em adição, Tanaka *et al*., (2001) observaram associação entre baixas concentrações séricas de estradiol em fetos bovinos e o surgimento dos primeiros folículos primordiais. Já Yang e Fortune (2008) reportaram pico de estradiol em ovários fetais bovinos entre os dias 80 e 100 da gestação, seguido por queda drástica entre os dias 141 e 193 e níveis crescentes após os 210 dias. Interessantemente, a diminuição da produção de estradiol coincidiu com o surgimento dos primeiros folículos primários. Além disso, neste mesmo estudo, a adição de estradiol ao cultivo de fragmentos ovarianos de fetos bovinos suprimiu a transição entre folículos primordiais e primários, corroborando a hipótese de que o estradiol atua como fator parácrino inibidor da ativação de folículos primordiais.

Outro esteróide proposto como regulador da foliculogênese inicial em mamíferos é a progesterona. À semelhança do que ocorre com o estradiol em roedores, a progesterona parece inibir a formação dos folículos primordiais, uma vez que sua presença em ovários fetais impede que os oogônias se desprendam dos seus grupos e se individualizem para serem subsequencialmente envolvidas pelas células da pré-granulosa (Kesele e Skinner, 2003; Chen *et al*., 2007). Sabe-se que em roedores o surgimento dos primeiros folículos primordiais ocorre somente após o nascimento, o que é atribuído ao fato de que os ovários de neonatos deixam de receber os efeitos supressores da progesterona materna depois que nascem (Kesele e Skinner,

2003). Coincidentemente, em bovinos, a produção de progesterona ovariana fetal parece cair com o progresso da idade gestacional coincidentemente com o surgimento dos folículos primordiais (Yang e Fortune, 2008; Nilsson e Skinner, 2009). Além disso, a adiçao de progesterona (314 ng/mL) ao cultivo de fragmentos ovarianos bovinos inibiu o aparecimento dessa categoria folicular (Nilsson e Skinner, 2009). Como fetos bovinos também podem ser influenciados pela progesterona placentária e luteal, sugere-se que nesta espécie a redução da produção de progesterona no ovário fetal permite a ativação de folículos primordiais independentemente da influência materna, e que fatores ovarianos são responsáveis pelo controle da esteroidogênese fetal (Nilsson e Skinner, 2009).

Apesar de evidências crescentes demonstrarem a presença de estradiol e progesterona em ovários de fetos bovinos e sua participação na foliculogênese pré-antral, pouco se sabe sobre os mecanismos regulatórios da esteroidogênese nesse período. Curiosamente, relatos anteriores sugerem que folículos pré-antrais bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento são incapazes de sintetizar andrógenos precursores do estradiol, por não expressarem as enzimas CYP11A1, 3β-HSD e CYP17A1, o que ocorreria apenas após a formação da camada da teca (Bao *et al*., 1997; Braw-Tal e Roth, 2005; Xu *et al*., 1995 a,b). Entretanto, análises com microarranjos de RNA relataram a presença da maioria dessas enzimas (exceto para 17β-HSD) em ovários fetais bovinos durante a primeira metade da gestação (Nilsson e Skinner, 2009). Em adição, estudos recentes revelaram em ovários fetais bovinos a presença da proteína CYP19A1 na medula e nas células da granulosa de folículos a partir do estágio primordial. (Garverick *et al*., 2010; Burkhart *et al*., 2010), sugerindo capacidade de converter andrógenos em estradiol antes da formação dos primeiros folículos.

2.3 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

A família dos FGFs é composta por 22 membros (Itoh e Ornitz, 2004) que participam ativamente da organogênese durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos, sendo necessárias para o crescimento e diferenciação celular durante toda a vida (Igarashi *et al*., 1998). Em contraste, a

expressão alterada dos FGFs, bem como mutações que afetem seus mecanismos sinalizadores têm sido relacionadas ao comprometimento da fisiologia (Korc e Friesel, 2009; Itoh, 2010). Consequentemente tem sido incluída em abordagens terapêuticas a utilização de agentes que inibam a expressão e ação dos FGFs em processos patológicos decorrentes de sua ação potencializada (Rusnati e Presta, 2007; Heinzle *et al*., 2011). Além disso, moléculas que estimulam os FGFs têm sido propostas para estimular suas ações quando essas se encontram suprimidas (Huang *et al*., 2011; Du *et al*., 2012)

Os FGFs são polipeptídeos de ação predominantemente extracelular que compartilham um núcleo de 140 aminoácidos e que são agrupados em sete subfamílias de acordo com sua estrutura e função (Itoh e Ornitz, 2004). Para a maioria deles, a sinalização ocorre por meio de quatro receptores (FGFR1 a 4) do tipo tirosina-quinase, localizados na membrana plasmática. Os FGFRs 1, 2 e 3 apresentam variações em seus domínios extracelulares decorrentes de arranjos transcricionais alternativos (“alternative splicing”) que geram as isoformas funcionais “B” e “C”. As diferentes isoformas dos FGFRs apresentam variados graus de afinidade pelos diversos FGFs (Ornitz *et al*., 1996; Zhang *et al*., 2006). Após a ligação do FGF, há dimerização dos FGFRs, que resulta na transforilação de resíduos da tirosina quinase. Isto leva à ativação de cascatas intracelulares envolvidas na migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares (revisado por Dorey e Amaya, 2010).

No que se refere à fisiologia reprodutiva, os FGFs têm sido relacionados a diversas funções teciduais, dentre elas o controle do ambiente intrauterino para a recepção do embrião (Cooke *et al*., 2009) e a homeostase prostática e sua resposta aos estímulos androgênicos (Lin e Wang, 2010). Nos ovários, os FGFs participam do controle do crescimento de folículos antrais até o estágio ovulatório. Dentre suas funções, destacam-se o estímulo à sobrevivência das CGs (Peluso, 2003) e proliferação da teca (Parrot e Skinner, 2000) e os efeitos benéficos à diferenciação dos complexos cumulus-oócito (Cho et la.; 2008; Zhang *et al*., 2010). Em adição os FGFs são reportados como reguladores do desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo (Berisha *et al*., 2004; Guerra *et*

al., 2008), além de inibirem a esteroidogênese folicular (Baird e Hsueh, 1986; Buratini *et al*., 2007; Machado *et al*., 2009; Portela *et al*., 2010).

2.3.1 Participação dos FGFs na foliculogênese

O fornecimento de oócitos fertilizáveis capazes de gerar embriões de boa qualidade está relacionado aos eventos iniciais do desenvolvimento folicular. Tanto o oócito quanto as células somáticas adjacentes produzem fatores parácrinos que controlam a diferenciação do folículo e a maturação do gameta (Scaramuzzi, 2011; Gilchrist *et al*., 2004). Esses fatores intraovarianos, incluem os FGFs.

O FGF2 é membro da subfamília FGF1 e é o FGF mais estudado na foliculogênese pré-antral. Localizado predominantemente nos oócitos desde o estágio primordial (van Wezel *et al*., 1995; Almeida *et al*., 2011), sua adição ao cultivo de folículos pré-antrais de ruminantes melhora a sobrevivência folicular e oocitária (Zhou e Zhang, 2005; Matos *et al*., 2007; Wandji *et al*., 1996a; Taru Sharma*et al*., 2010) e aumenta a proliferação das CGs (Wandji *et al*., 1996a, Matos *et al*., 2007). Além disso, o FGF2 mostrou-se capaz de estimular a ativação folicular *in vitro* em caprinos (Matos *et al*., 2007).

Outra subfamília que tem sido foco de estudos na foliculogênese inicial é a do FGF7, da qual fazem parte os FGFs 3, 7, 10 e 22 (Itoh e Ornitz, 2008), e que ativam os receptores FGFR2B e o FGFR1B (Zhang *et al*., 2006). A adição do FGF7 ao cultivo de ovários de ratas elevou as taxas de ativação, diferenciação e crescimento folicular (McGee *et al*., 1999; Kezele *et al*., 2005). Tais efeitos podem ser associados à interação deste fator com o KITL, uma vez que ovários de ratas cultivados na presença de FGF7 mostraram aumento na expressão relativa do “kit ligand” (KITL) (Kezele e tal., 2005). Este último é reconhecido por beneficiar a proliferação das CGs (Otsuka e Shimasaki, 2002), o crescimento oocitário (Jin *et al*., 2005) e a ativação folicular (Parrott e Skinner, 1999). Em adição, a expressão do FGF7 aumentada pela presença do KITL (Kezele *et al*., 2005), somado ao envolvimento deste no recrutamento das células da teca (Parrot e Skinner, 2000), sugere a influência parácrina do FGF7 no desenvolvimento folicular a partir do estágio primário.

Recentemente, a participação do FGF10 no desenvolvimento folicular foi evidenciada. Também conhecido como KGF2 (fator de crescimento dos queratinócitos 2), este fator compõe a subfamília FGF7 e possui afinidade primária pelo FGFR2B, apesar de também atuar por intermédio do FGFR1B (Zhang *et al*., 2006). Em folículos antrais bovinos, a expressão gênica e protéica do FGF10 predominante nas células da teca e oócitos (Buratini *et al*., 2007) e do FGFR2B nas CGs (Berisha *et al*., 2004) sugere que este peptídeo seja mediador da comunicação parácrina entre estes tipos celulares. Em adição, níveis reduzidos de RNAm de FGF10 foram detectados em células da teca bovinas provenientes de folículos saudáveis com alta concentração de estradiol (Buratini *et al*., 2007). De fato, um estudo recente demonstrou que a injeção intrafolicular do FGF10 suprime os níveis de estradiol no fluido folicular e diminui a expressão da enzima CYP19A1 (Gasperin *et al*., 2012). Esses dados em conjunto sugerem que o FGF10 de origem tecal e oocitária inibe a produção de estradiol das CGs e que sua expressão reduzida parece ser necessária para a continuidade da esteroidogênese e crescimento foliculares.

O RNAm do FGF10 foi detectado em folículos primordiais, primários e secundários obtidos de fetos bovinos (Buratini *et al*., 2007). Em estudo recente, foi possível observar que a expressão do FGF10 aumenta ao longo do desenvolvimento ovariano em fetos bovinos, simultaneamente ao aumento do número de folículos primários (Castilho, 2008). Em adição, a presença do FGF10 foi detectada em oogônias e oócitos, bem como nas células da granulosa em ovários de fetos bovinos ao longo da gestação (Castilho, 2008). A ativação de folículos primordiais e o aumento do número de folículos primários mostraram-se associados à diminuição da produção de hormônios esteróides no ovário fetal bovino (Yang e Fortune, 2008). Além disso, a adição de estradiol ao cultivo de fragmentos ovarianos inibiu a ativação folicular na espécie bovina (Yang e Fortune, 2008). Interessantemente, o FGF10 parece estimular a foliculogênese pré-antral em caprinos, uma vez que potencializou a ativação crescimento e a integridade dos folículos em cultivo (Chaves *et al*., 2010).

A subfamília do FGF8 também tem sido considerada relevante para a foliculogênese (Itoh e Ornitz, 2008). Ela é composta pelos FGFs 8, 17 e 18, que

ativam preferencialmente os receptores FGFR4 e FGR3C e, em menor intensidade, o FGFR2C (Zhang *et al*., 2006). A expressão dos RNAm do FGF8 e dos receptores FGFR4 e FGFR3C foi detectada em “pools” de folículos primordiais, primários e secundários obtidos a partir de ovários fetais (Buratini *et al*., 2005). A expressão do FGF8 e do FGFR3C pareceu ser coincidente e mais frequente em folículos secundários do que primordiais. Esse padrão sugere que a expressão do FGF8 e de seus receptores é regulada ao longo do desenvolvimento e que o FGFR3C é o receptor predominante em folículos pré-antrais bovinos (Buratini *et al*., 2005). Recentemente, um estudo desenvolvido em ratas demonstrou que o FGF8 é capaz de suprimir a síntese de estradiol em CGs cultivadas, o que parece envolver a redução na expressão da enzima CYP19A1 (Miyoshi *et al*., 2010). Assim como o FGF8, o FGF17 é um candidato à sinalização parácrina intra-folicular. Em folículos antrais bovinos, este fator está expresso nos oócitos e em menor escala nas CGs e da teca (Machado *et al*., 2009). A adição de FGF17 ao cultivo de CGs bovinas inibiu a produção de estradiol e progesterona (Machado *et al*, 2009).

De maneira similar ao FGF17, o FGF18 apresenta ação anti-esteroidogênica em folículos antrais bovinos. Com localização em CGs e da teca, este fator parece reduzir a produção de esteróides em CGs cultivadas por meio da inibição dos receptores de FSH e de todas as enzimas envolvidas na esteroidogênese (Portela *et al*., 2010). Uma vez que níveis reduzidos de progesterona e estradiol ovarianos são necessários para a formação de folículos primordiais e sua ativação (Yang e Fortune, 2008; Nilsson e Skiner, 2009), é possível que o FGF18 estimule tais processos. Contudo, a literatura não dispõe de informações sobre os padrões de expressão do FGF-18 e seus efeitos em folículos pré-antrais.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO 1[1]

Expression of mRNA encoding steroidogenic enzymes in bovine fetal ovaries at different times of gestation

R Bueno da Silva[a], ES Caixeta[a], CA. Price[b]. J Buratini Jr.[a*].

[a]Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-000.

[b]Centre de Reserche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Gran sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil.

*Correspondence: J. Buratini Jr., Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual Paulista, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Brasil; FAX: 55-38116251; email: buratini@ibb.unesp.br.

Article type: Basic Research

Running title: steroidogenesis during ovary development in cattle.

[1] Manuscrito redigido de acordo com as normas do periódico científico Animal Reproduction

Abstract

Development of fetal ovaries during gestational period is critical for reproductive lifespan and fertility in females. Steroids are produced during ovarian development since differentiation sexual and are associated with early folliculogenesis in cattle. Mechanisms involved on steroids production in bovine fetal ovaries remain unknown. We assessed the expression patterns mRNA of steroidogenic enzymes (StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, CYP19A1 and HSD17B1) in bovine fetal ovaries at different ages. With the exception of CYP19A1 mRNA, which levels decreased from 60 to 90 days, abundance of all transcripts increased during gestational period. StAR and HSD3B1 showed expression elevated at 120 and 210 days, whilst CYP11A1 increased at 75 and 210 days. There was elevation of CYP17A1 mRNA levels at 90 and 150 days and HSD17B1 expression increased after 120 days. This study provides evidence that bovine fetal ovary has the enzymatic machinery for steroidogenesis and demonstrates that the enzymes are regulated through gestation.

Key words: gonad / steroids / enzymes/ bovine/ folliculogenesis

INTRODUCTION

During the prenatal period in mammals, the successful development of the ovaries is fundamental to compose the ovarian reserve which determines the longevity of reproductive life. From sexual differentiation, a sequence of key morphological events is initiated in the ovaries to culminate with the formation of early antral follicles. These events include germ cells migration and proliferation, ovigerous cords formation, oogonia meiosis, primordial follicular assembly and appearence of primary (activation

process), secondary and tertiary follicles (Juengel *et al*., 2002; Burkhart *et al*., 2010; Garverick *et al*., 2010). Several studies have provided insights into the regulatory mechanisms of initial folliculogenesis (Fortune 2003; Knight and Glister, 2006; Buratini and Price, 2011; Chaves *et al*., 2012). However, the mechanisms involve the formation of the ovary are still poorly understood.

It is well known that fetal gonads are able to synthesize sex steroids from sexual differentiation until birth in ruminants (Shemesh *et al*., 1978; Shemesh *et al*., 1980; Dominguez *et al*., 1988; Quirke *et al*., 2001; Nilsson and Skinner, 2009). During gestation, the main steroid produced in fetal ovaries is estradiol (Dominguez *et al*., 1988; Quirke *et al*., 2001). Estradiol has been suggested to regulate the formation and function of ovigerous cords and the ovarian vascular network in sheep during early gonadal development (Juengel *et al*., 2002), and the formation of primordial follicles in primates and rodents (Zachos *et al*., 2002; Wang and Roy, 2007). In cattle, low levels of estradiol were detected in fetal ovaries at the time of primordial follicle activation and the presence of estradiol-17β inhibited follicular activation in cultured ovarian fragments (Yang and Fortune, 2008). Similarly, progesterone is also synthetized in the developing ovary and it has been associated with formation of ovigerous cords in sheep (Juengel *et al*., 2002) and regulation of primordial follicle assembly in rodents (Kezele and Skinner, 2003). In cultured fragments of bovine fetal ovaries, progesterone increased the number of oocytes in nests and reduced the pool of primordial follicles (Nilsson and Skinner, 2009). The effects of estradiol and progesterone appear to be mediated by their specific receptors (ERs and PGRs, respectively) in the developing ovary as indicated by gene expression (Pepe *et al*., 2002; Quirke *et al*., 2001, Juengel *et al*., 2006; Garverick *et al*., 2010; Burkhart *et al*., 2010; Juengel *et al*., 2006; Nilsson and Skinner, 2009).

In cows, the expression of steroidogenic enzymes has been well characterized during antral follicle development and expression regulation has been associated with different stages of follicular growth and atresia. Follicle growth and dominance has been associated with high levels of estradiol in the follicular fluid and increased expression of steroidogenic enzymes, whereas the opposite has been shown during follicular atresia (for review see Bao and Garverick, 1998). Although the expression of the key steroidogenic enzimes has been detected in the fetal ovary (Nilsson and Skinner, 2009; Quirke *et al*., 2001), the expression patterns along gestation and the relation with the fetal pre-antral follicle dynamics have been poorly explored. Recent study in bovine fetal ovaries showed CYP19A1 (aromatase) protein is predominant in medulla since differentiation sexual moment until 105d, specifically in cell streams and rete tubules, wich are associated with developing vasculature and small developing follicles, respectively (Garverick *et al*., 2010). This coincids with estradiol production detected in early ovaries and suggests that possible estradiol role in developmental events during early ovarian formation (Shemesh, 1980; Dominguez *et al*., 1988; Yang and Fortune, 2008) is associated with CYP19A1 activity. In addition, CYP19A1 protein location remains exclusively in medulla until 130d, when first primary follicles appear and from this moment staining becomes also apparent in granulosa cells (Burkhart *et al*., 2010). Thus, it is possible that inhibitory estradiol effects on activation follicular process reported on bovine (Yang and Fortune *et al*., 2008) are produced in medullar compartment. However, more information is necessary to understand steoridogenesis during bovine fetal developing. The aim of this study was to assess the temporal expression patterns of mRNA encoding StAR (steroidogenic acute regulatory protein), CYP11A1 (cytochrome P450 side-chain cleavage), HSD3B1 (3β-hydroxysteroid dehydrogenase), CYP17A1 (P450 17α-hydroxylase), CYP19A1 (aromatase) and

HSD17B (17β-hydroxysteroid dehydrogenase) in bovine fetal ovaries between 60 and 210 days of gestation, when different follicular categories appear for the first time in developing ovary.

MATERIALS AND METHODS

Source of ovaries

Females cow fetuses (predominantly *Bos taurus indicus*) were obtained at a local slaughterhouse and fetal age was estimated by the crown-rump lenght (Evans and Sack, 1973). Fetuses were classified into six groups according to gestational age (60, 75, 90, 120, 150 and 210 days of gestation, n=7/group). Immediately postmortem, both ovaries were collected and transported to the laboratory in RNA*later* (Ambion®, USA) for RNA extraction. The transport to the laboratory was performed at room temperature within 1 hour.

To assess the temporal expression patterns of the targeted genes enconding the steroidogenic enzymes (*StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, CYP19A1* and *HSD17B1*) during gestation, total RNA was extracted from fetal ovaries using Trizol reagent (Invitrogen®, Brazil) as recommended by the manufacturer, and RNA concentration was quantified by spectophotometry. After purification, RNA samples were eluted in 8 µl of RNAse free water. Total RNA (1µg/reaction for each sample) was incubated with DNAse I (1 U/µg; Invitrogen®, Brazil) and then reverse transcribed using Oligo-dT primers (1mmol/L), dideoxynucleotide triphosphate- dNTP (0.25 mmol) and RNase inhibitor (1 U/µg; Invitrogen®, Brazil) in a volume of 20 µL, according with the protocol provided by the Omniscript kit (Qiagen®, Canada). Reagents were incubated at 37ºC for 60 min and then at 93ºC for 3 min for enzyme inactivation.

Relative real time RT-PCR analysis was performed in an ABI 7500 thermocycler using Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil). The final volume of the PCR mix was 25 µl and PCR cycling 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 sequences of primers, sizes of amplicons and annealing temperatures for each target gene are shown in Table 1.

Reactions were optimized to provide maximum amplification efficiency for each gene. Each sample was run in duplicates, and the specificity of the PCR products was assessed by melting curve analyses and amplicon size determined by electrophoresis in 2% agarose gels.

To select the most stable housekeeping gene, Cyclophilin-A (*CYC-A*), Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and Histone H2AFZ (*H2AFZ*) amplification profiles were compared using the geNorm applet for Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; Vandesompele *et al*., 2002); the most stable housekeeping gene was *CYC-A*.

Relative expression values for each gene were calculated using the ΔΔCt 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).

Statistical analysis

Gene expression data were transformed to logarithms when not normally distributed. The effects of fetal age on gene expression were tested by analysis of variance (ANOVA), and means were compared by the ortogonal contrast 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 (SEM). Differences were considered significant when $P<0.05$.

RESULTS

Expression of mRNA encoding the key steroidogenic enzymes was detected in bovine fetal ovaries throughout gestation (60, 75, 90, 120, 150 and 210 days). Abundance of mRNA encoding all target genes, except for CYP19A1, increased significantly during ovarian development. Expression of CYP19A1 mRNA decreased significantly until 90d, whereas that of CYP17A1 did not change during the period analyzed (Fig. 1). StAR and HSD3B1 mRNA levels of were lower from 60 to 90 days and increased at 120 and 210 days of gestation, whilst CYP17A1 expression enhanced from 60 to 90 days and at 150 days. CYP11A1 mRNA abundance was initially lower, increased at 75 days and remained unchanged until 210 days, when there was another significant increase. Levels of HSD17B1 were not altered until 120 days, when they increased and remained unchanged until 210 days. In contrast, CYP19A1m mRNA abundance was highest at 60 days and decreased to reach the lowest levels at 90 days, after which it remained unaltered.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study describing temporal expression patterns of steroidogenic enzymes in the bovine fetal ovary during gestation. The estimated gestational ages (60, 75, 90, 120, 150 and 210 days) were chosen based on the follicular dynamics of *Bos indicus* fetal ovaries (Castilho, 2008). In this previous study,

primordial, primary, secondary and early antral follicles were first observed at 75, 90, 150 and 210 days of gestation, respectively, whereas oogonia but no follicles were observed on day 60. In addition, a significant increase in the number of primary follicles was observed on day 120. We demonstrated that mRNA encoding steroidogenic enzymes are expressed in the bovine developing ovary throughout gestation. This suggests that the enzymatic machinery for steroidogenesis is present in bovine fetal ovary and agree with previous reports of production of steroids in ovaries from bovine fetuses since differentiation sexual moment at 45d (Shemesh, 1978; Shemesh, 1980) and during all pregnancy period (gestational day 57-270) (Tanaka *et al*., 2001).

Expression of CYP19A1 mRNA was highest on day 60 and declined thereafter to reach lowest levels on day 90. This is consistent with previous reports of maximum production of estradiol in fetal ovaries around days 60-90 and 80-100 of gestation in cattle (Shemesh, 1980; Yand and Fortune, 2008), coincident with the presence of ovigerous cords and intense mitosis of germ cells. At this phase, ovaries are filled with cell streams (Garverick *et al*., 2010), wich are derived from the fetal glomerulii (Juengel *et al*., 2002) and are apparently involved in the development of the ovarian vascular network and production of steroids as they express CYP19A1 protein in bovine fetal ovaries (Garverick *et al*., 2010) and mRNA of CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1 and CYP19A1 in ovine fetal ovaries (Quirke *et al*., 2001). Therefore, the present data suggest that higher expression of CYP19A1 in the fetal ovary during early gestation supports more vigorous estradiol synthesis and is possibly related to the regulation of germ cell proliferation and formation of ovigerous cords and blood vessels. The decline of CYP19A1 expression is temporally associated with the appearance of primary follicles on day 90. In fact, estradiol production was previously negatively associated with activation of primordial follicles in bovine fetal ovaries and the treatment with

estradiol (10^{-6}M) inhibited follicle activation in cultured fragments of bovine fetal ovaries (Yang and Fortune, 2008). Therefore, the present data suggest that increased CYP19A1 expression holds follicle activation after primordial follicle formation in the bovine fetal ovary.

Both StAR and CYP11A1 mRNA expression was detected at all fetal ages and increased during gestation. This would suggest that the hability to produce pregnenolone increases in the bovine fetal ovary from day 60. However, estradiol and progesterone levels in bovine fetal ovaries peaked around day 60 (Nilsson and Skinner, 2009) and remained high until day 100 (Yang and Fortune, 2008), suggesting that the lower expression of these enzymes at the beginning of gestation is not limiting for steroid production. StAR mRNA abundance increased at 120 and again at 210 days of gestation, coincidently with an increase in number of primary follicles and first appearance of early antral follicles, respectively (Castilho, 2008). In cows, StAR mRNA was previously detected in oocytes, theca and granulosa cells from early antral follicles (Braw-Tal and Roth, 2005). The activation of primordial into primary follicles is marked by the differentiation of granulosa cells (Fortune *et al*., 2000) and the formation of the thecal compartment occurs during the transition from the primary to the early antral stage (Braw-Tal and Yossefi, 1997). Therefore, the consecutive increases in StAR expression might be related to the differentiation and proliferation of granulosa and theca cells, respectively.

On the other hand, CYP11A1 mRNA abundance increased on days 75 and 210, conflicting with a previous report in bovine fetal ovaries showing expression levels of this enzyme were not associated with the gestational age (Nilsson and Skinner, 2009). CYP11A1 mRNA was previously detected in both granulosa and theca cells of bovine and caprine fetal ovaries (cows: Xu *et al*., 1995; goats: Yuan *et al*., 2008). Like StAR,

the increase in CYP11A1 expression appears to be temporally associated and thus possibly due to granulosa and theca cell differentiation during the transition from primordial to early antral stages of development (Fortune, 2003).

In the Δ5 steroidogenic pathway, predominant in the bovine, the conversion of pregnenolone to DHEA is controlled by CYP17A1 (Nguyen *et al*., 2012). In the present study, CYP17A1 mRNA was detected at all fetal, which is consistent with androgen supply for estradiol synthesis reported in bovine fetal ovaries (Shemesh *et al*., 1978; Shemesh *et al*., 1980; Dominguez *et al*., 1988; Nilsson and Skinner, 2009; Yang and Fortune, 2008). During transition from the primary to the secondary stage, stromal cells surrounding primary follicles are recruited and differentiate into theca cells (Parrott and Skinner, 2000). In bovine ovaries, CYP17A1 was exclusively located to theca interna in agreement with the unique capacity of thecal cells to produce androgens (Braw-Tal and Roth, 2005). The detection of CYP17A1 mRNA expression at fetal ages previous to follicle formation and theca differentiation in the present study together with previous reports demonstrating production of androgens and estradiol (Dominguez *et al*., 1988; Yang and Fortune, 2008, Shemesh *et al*., 1980; Nilsson and Skinner, 2009) implies that other cell types are in charge of androgen production in the fetal ovary during early gestation, possibly precursors of theca cells. Interestingly, increasing levels expression of CYP17A1 detected through gestation in this study coincide with progressive decline on progesterone levels observed in bovine fetal ovaries (Nilsson and Skinner, 2009), suggesting the enhance of CYP17A1 activity could trigger on low availability of pregnenolone to be converted into progesterone. Moreover, increasing mRNA abundance CYP17A1 might be involved with primordial follicles appearance, once it was reported that follicles assembly is initiated as ovarian progesterone concentration

declines and the presence of this steroid in culture of bovine fetal ovaries inhibited primordial follicular appearance (Nilsson and Skinner, 2009).

Expression levels HSD3B1 were lowest from 60 to 90 days and increased at 120 and further at 210 days. These results contrast with previously reported negligible mRNA expression in bovine fetal ovaries, although the ovaries were capable to produce progesterone (Nilsson and Skinner, 2009), but are consistent with mRNA and protein detection in ovine fetal ovaries (Quirke *et al*., 2001). In steroidogenic cascade, HSD3B1 converts pregnenolone into progesterone and also DHEA to androstenedione, which is a precursor for estradiol production (Conley and Bird, 1997). In rodents and bovine, progesterone synthesis has been reported in fetal ovaries since early gestation and its reduction is inversely associated with primordial follicle assembly (Kezele and Skinner, 2003; Chen *et al*., 2007; Nilsson and Skinner, 2009. In addition, progesterone inhibited of primordial follicle appearance in cultures of bovine ovarian fragments (Nilsson and Skinner, 2009). Reduced HSD3B1 mRNA abundance observed on days 75 and 90 in the present study seems to coincide with primordial follicle appearance and increase in number (Nilsson and Skinner, 2009). However, similar mRNA levels were also detected before day 75 (pre-activation), when higher progesterone production has been reported (Yang and Fortune, 2008; Nilsson and Skinner, 2009). This suggests that progesterone production is not regulated at the level of HSD3B1 expression around fetal pre-antral follicle activation. On the other hand, the increase of HSD3B1 mRNA levels from 120 to 210 days is in agreement with increasing levels of estradiol at this period (Yang and Fortune, 2008) and is likely related to the presence of more developed follicles in the fetal ovary.

Messenger RNA expression of all enzymes assessed in the present study with the exception of CYP19A1 was lower at the beginning of gestation when higher steroid

production is expected (Yang and Fortune, 2008, Nilsson and Skinner, 2009). This apparent discrepancy might be related to the influence of maternal steroids on levels found in the fetal ovary. However, maternal serum progesterone levels were lower (7ng/mL) than those detected in the bovine fetal ovary (20-150ng/g) between 60 and 75 days of gestation. Moreover serum progesterone concentrations did not change in the maternal blood during this period (Echternkamp *et al*., 2006). Maternal steroids may positively affect the production of estradiol in the fetal ovary as placental androgens may reach the fetal ovary and serve as substrate for aromatization (Hogg *et al*., 2011). In fact, androgens were found in low concentrations in the bovine fetal ovary (Dominguez et al., 1988) suggesting that the maternal supply is important during this period.

We also detected the expression of HSD17B1 in all fetal ages analyzed, which increased at 120 days of gestation. HSD17B1 converts androstenedione into testosterone or estrone into estradiol (Conley and Bird, 1997) and thus its expression suggests it participation in the synthesis of estradiol in the bovine fetal ovary. However, lower levels of HSD17B1 mRNA were detected before day 90 when high estradiol production is expected (Yang and Fortune, 2008) suggesting that this enzyme is not a major regulator of estradiol synthesis in the bovine fetal ovary. On the other hand, increased HSD17B1 mRNA abundance coincided with the increase in the number of primary follicles and first appearance of secondary follicles, when estradiol production is expected to be lower. The combined increases of CYP17A1 and HSD17B1 expression around day 120 may stimulate preantral follicle development through the enhancement of testosterone synthesis, as this androgen was capable to promote primary to secondary follicle transition in cattle, rodents and primates (Murray *et al*., 1998; Wang *et al*., 2001; Vendola *et al*., 1998; Vendola *et al*., 1999).

In conclusion, we showed here that steroidogenic enzymes are expressed in fetal ovaries through gestational period in cattle and that their regulation at specific fetal ages is partially related to variations on steroidogenesis and early folliculogenesis. The decrease of mRNA CYP19A1 levels from 60 to 90 days was coincident with the reduction of estradiol and the increase of primary follicles number previously reported. Additionally, the pattern of mRNA abundance of the other enzymes during ovarian development suggests their involvement on increase of steroidogenic competence through early folliculogenesis.

REFERENCES

Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. J Anim Sci, 7:1903-1921.

Braw-Tal R, Roth Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. Reproduction, 129:453-461.

Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil, 109:165-171.

Buratini JJr, Price CA. 2011. Follicular somatic cell factors and follicle development. Reprod Fertil Dev, 23:32-39.

Burkhart MN, Juengel JL, Smith PR, Heath DA, Perry GA, Smith MF, Garverick HA. 2010. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. Anim Reprod Sci, 117:43-54.

Castilho, ACS. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. [s.n.], 2008. Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

Chaves RN, Matos MH, Buratini J, Figueiredo JR. 2012. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. Reprod Fertil Dev, 39:249-258.

Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. 2007. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. Endocrinology, 148:3580-3590.

Conley AJ, Bird IM. 1997. The role of cytochrome P450 17α-hydroxylase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ5 and Δ4 pathways of steroidogenesis in mammals. Biol Reprod, 56:789-799.

Dominguez MM , Liptrap RM, Basrur PK. Steroidogenesis in fetal bovine gonads. Can J Vet Res, 52:401-406, 1988.

Echternkamp SE, Vonnahme KA, Green JA, Ford SP. 2006. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses. J Anim Sci, 84:2057-2064.

Evans HE, Sack WO. 1973. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. Anat Histol Embryol, 2:11-45.

Dominguez MM, Liptrap RM, Basrur PK. 1988. Steroidogenesis in fetal bovine gonads. Can J Vet Res, 52:401-406.

Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. 2002. Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. Fertil Steril, 77:167-172.

Fortune JE. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. Biol Reprod, 35:292-299.

Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. 2000. The primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol, 163:53-60.

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activaiton of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim Reprod Sci, 78:135-163.

Garverick HA, Juengel JL, Smith P, Heath DA, Burkhart MN, Perry GA, Smith MF, McNatty KP. 2010. Development of the ovary and ontongeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) alpha and beta during early fetal life in cattle. Anim Reprod Sci, 117:24-33.

Hogg K, McNeilly AS, Duncan WC. 2011. Prenatal androgen exposure leads to alterations in gene and protein expression in the ovine fetal ovary. Endocrinology, 152:2048-2059.

Juengel JL, Heath DA, Quirke LD, McNatty KP. 2006. Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. Reproduction, 131:81-92.

Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. Mol Cell Endocrinol, 191:1-10.

Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction, 132:191-206.

Kezele P, Skinner MK. 2003. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. Endocrinology, 144:3329-3337.

Lun S, Smith P, Lundy T, O'Connell A, Hudson N, McNatty KP. 1998. Steroid contents of and steroidogenesis *in vitro* by the developing gonad and mesonephros around sexual differentiation in fetal sheep. J Reprod Fertil, 114:131-9.

Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener-Victorin E. 2007. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. Endocrinology, 148:3781-3791.

Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. 1998. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing *in vitro*. J Reprod Fertil, 113:27-33.

Nguyen PTT, Lee RSF, Conley AJ, Sneyd J, Soboleva TK. 2012. Variation in 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity and in pregnenolone supply rate can paradoxically alter androstenedione synthesis. J Steroid Biochem Mol Biol, 128:12-20.

Nilsson EE, Skinner MK. 2009. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. Mol Cell Endocrinol, 313:9-16.

Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren SE, Herkimer C. 2010. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. Endocrinology, 151:595-605.

Parrott JA, Skinner MK. 2000. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production.Mol Reprod Dev, 55:55-64.

Pepe GJ, Billiar RB, Leavitt MG, Zachos NC, Gustafsson JA, Albrecht ED. 2002. Expression of estrogen receptors alpha and beta in the baboon fetal ovary. Biol Reprod, 66:1054-1060.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:2002-2007.

Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP. 2001. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. Biol Reprod, 65:216-228.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 339:62-66.

Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Duran C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. Am J Physiol Endocrinol Metab, 289: E801-E806.

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. Reprod Fertil Dev, 23:444-467.

Shemesh M, Ailenberg M, Milaguir F, Ayalon N, Hansel W. 1978. Hormone production by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. Biol Reprod, 19:761-767.

Shemesh M. 1980. Estradiol-17β biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. Biol Reprod, 23:577-582.

Tanaka Y, Nakada K, Moriyoshi M, Sawamukai Y. 2001. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. Reproduction, 121:777-782.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:1-11.

Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. 1998. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. J Clin Invest, 101:2622-2629.

Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. 1999. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. Biol Reprod, 61:353-357.

Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans AC. 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. Physiol Genomics, 44:504-517.

Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, Yamada K, Fatima R, Mizunuma H. 2001. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. Endocrinology, 142:4930-4936.

Wang C, Roy SK. 2007. Development of primordial follicles in the hamster: role of estradiol-17beta. Endocrinology, 148:1707-1716.

Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular age. Endocrinology, 136:981-989.

Yang MY, Fortune JE. 2006. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. Biol Reprod, 75:924-932.

Yang MY, Fortune JE. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. Biol Reprod, 78:1153-1161.

Yuan JH, Wang JZ, Lan GC, Sui HS, Yu JN, Tan JH. 2008. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of steroid hormones during development ovarian follicles in prepubertal goats. Domest Anim Endocrinol, 34:451-460.

Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, Pepe GJ. 2002. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. Biol Reprod, 67:1148-1156.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (grant number: 2009/52300-2). R.B. da Silva was granted with a full tuition FAPESP scholarship (grant number: 2008/03837-0).

LIST OF ABBREVIATIONS

A4 = androstenedione
ANOVA = analysis of variance
bp = base pair
CYC-A = cyclophilin A
CYP19A1 = cytocrome P450 aromatase
CYP17A1 = cytocrome P450 17α-hydroxylase
CYP11A1 = cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage
DHEA = dehydroepiandrosterone
DNA = deoxyribonucleic acid
DNAse = deoxyribonuclease

dNTP = dideoxynucleotide triphosphate

E1 = estrone

E2 = estradiol

ERs = estradiol receptors

GAPDH = glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

H2AFZ = histone H2AFZ

HSD17B1 = 17β-hydroxysteroid dehydrogenase

HSD3B1 = 3β-hydroxysteroid dehydrogenase

L = litre

µg = microgram

mmol/L = millimoles per litre

ng = nanogram

P4 = progesterone

P5 = pregnenolone

PCR = polymerase chain reaction

PGRs = progesterone receptors

RNA = ácido ribonucléico

RNAm = ácido ribonucléico mensageiro

RNAse = ribonuclease

RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction

S.E.M. = error of the mean

StAR = steroidogenic acute regulatory protein

T4 = testosterone

U = unit

FIGURE LEGEND

Fig. 1. Expression of mRNA steroidogenic enzymes in bovine fetal ovaries at 60, 75, 90, 120, 150 and 210 days of gestation: StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, and HSD17B1 (n=7 fetuses/gestational age). Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values (± S.E.M) relative to a calibrator sample by the ΔΔCt method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

Figure 1

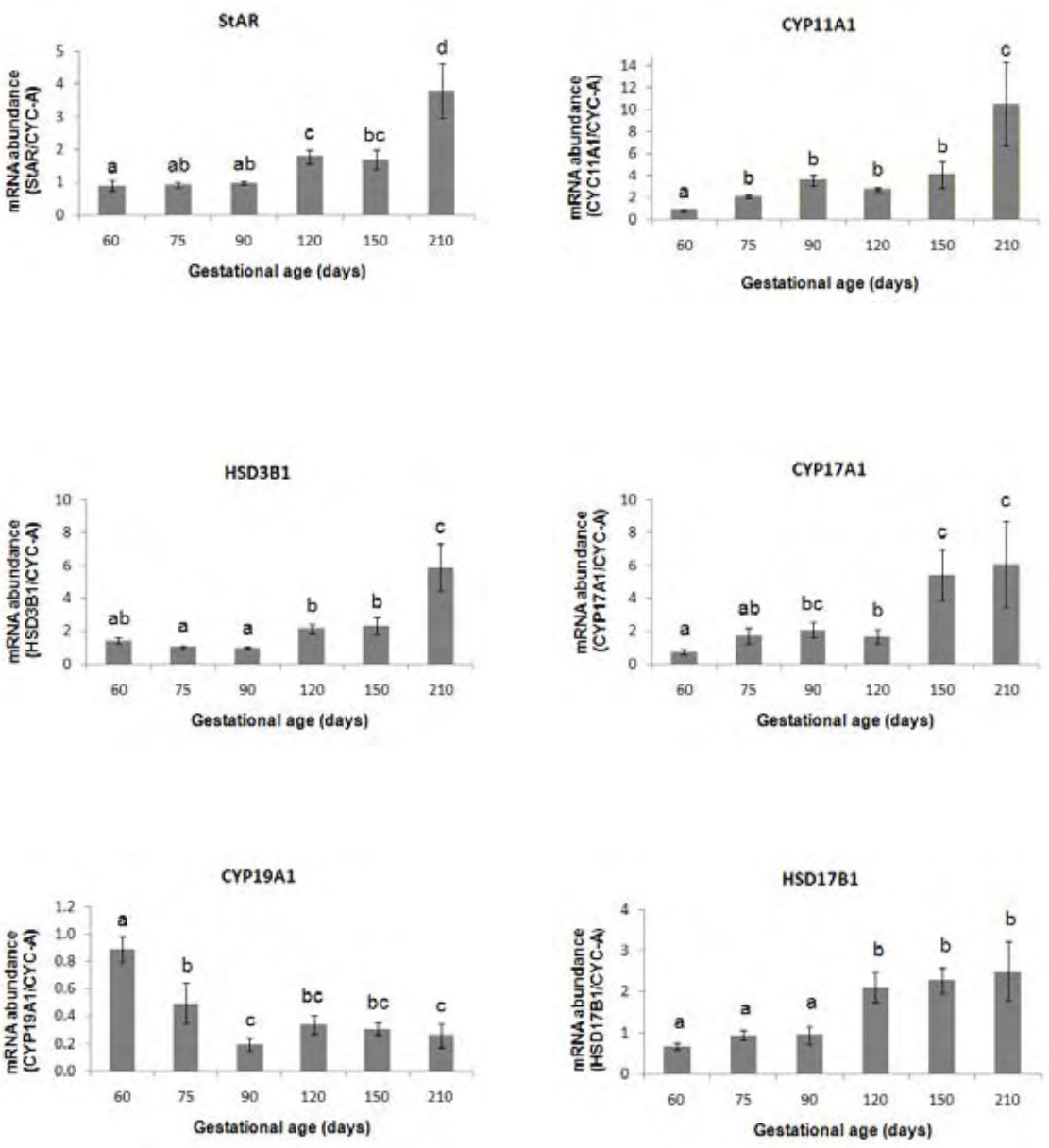

StAR
mRNA abundance (StAR/CYC-A)
a
ab
ab
c
bc
d
60
75
90
120
150
210
Gestational age (days)
CYP11A1
mRNA abundance (CYC11A1/CYC-A)
a
b
b
b
b
c
Gestational age (days)
HSD3B1
mRNA abundance (HSD3B1/CYC-A)
ab
a
a
b
b
c
Gestational age (days)
CYP17A1
mRNA abundance (CYP17A1/CYC-A)
a
ab
bc
b
c
c
Gestational age (days)
CYP19A1
mRNA abundance (CYP19A1/CYC-A)
a
b
c
bc
bc
c
Gestational age (days)
HSD17B1
mRNA abundance (HSD17B1/CYC-A)
a
a
a
b
b
b
Gestational age (days)

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

Genes	Primer Sequence	Fragment size (bp)	Annealing Temperature (°C)
CYC-A	F 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	65	60
GAPDH	F 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	119	62
H2AFZ	F 5'-GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG-3' R 5'-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC-3'	74	60
StAR	F 5'-CCCAGCAGAAGGGTCTCATC-3' R 5'-TGCGAGAGGACCTGGTTGAT-3'	157	62
CYP11A1	F 5'-AGTCCACACCTCTTGCACCTTTCT-3' R 5'-CGCCCATCCCATGAAGGCAATAAA-3'	140	59
CYP17A1	F 5'-GAATGCCTTTGCCCTGTTCA-3' R 5'-CGCGTTTGAACACAACCCTT-3'	330	62
HSD3B1	F 5'-GCCCAACTCCTACAGGGAGAT-3' R 5'-TTCAGAGCCCACCCATTAGCT-3'	135	59
HSD17B1	F 5'-AGTCCACACCTCTTGCACCTTTCT-3' R 5'-CGCCCATCCCATGAAGGCAATAAA-3'	103	58
CYP19A1	F 5'-TGACCAGATCCAAACCAGACACCA-3' R 5'-ATGAGGTTGCTAAGAGTCGGCACA-3'	182	62

F= forward primer; R= reverse primer

CAPÍTULO 3

TRABALHO CIENTÍFICO 2[2]

Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis during fetal ovarian development in cattle.

R Bueno da Silva[a], M Yang[b], ES Caixeta[a], JE Fortune[b], RL Amorim[c], CA Price[d], J Buratini Jr.[a*]

[a]Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-000.

[b]Department of Biomedical Sciences, Cornell University, Ithaca, New York, USA, 14853.

[c]Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-000.

[d]Centre de Reserche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Grand sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil.

*Correspondence: J. Buratini Jr., Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual Paulista, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Brasil; FAX: 55-38116251; email: buratini@ibb.unesp.br.

[2] Manuscrito redigido de acordo com as normas do periódico científico Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

INTRODUCTION

During prenatal life, the pool of oocytes are stocked in primordial follicles (Tingen *et al*., 2009), wich can activate to form primary follicles and enter the growth phase or remain quiescent in the resting pool until adult life (te Velde, 1998). The massive atresia of oocytes and depletion or defficient recruitment of primordial follicles during fetal and adult life are determinant to the reduction of ovarian reserve size and compromises the female reproductive potential (Monget *et al*., 2012). Increasing evidence has shown that fetal ovaries are able to produce steroids since early gestation (Quirke *et al*., 2001; Shemesh, 1980; Dominguez *et al*., 1988), in agreement with the expression of steroidogenic enzymes observed during gonadal development (Quirke *et al*., 2001; Garverick *et al*., 2010; Burkhart *et al*., 2010; Nilsson and Skinner, 2009). In bovine fetal ovary, progesterone and estradiol production is highest at the beginning of gestation followed by a significant decline before around primordial follicle formation and activation (Nilsson and Skinner, 2009; Yang and Fortune, 2008). Moreover, progesterone inhibited primordial follicular assembly (Nilsson and Skinner, 2009), and estradiol inhibited follicle activation in cultures of fragments of bovine fetal ovaries (Yang and Fortune, 2008).

The fibroblast growth factors (FGFs) family includes 22 peptides that modulate embryogenesis (Guillemot and Zimmer, 2011; Marie, 2012) and cellular proliferation and physiology in adult tissues (Itoh and Ornitz, 2011; Wesche *et al*., 2011). They are grouped into 7 subfamilies and act through transmembrane receptors (Ornitz *et al*., 1996; Itoh and Ornitz, 2004). In the ovary, FGFs have been reported to play roles in folliculogenesis (Parrot and Skinner, 1998; Buratini *et al*., 2005), luteinization (Neuvians *et al*., 2004; Guerra *et al*., 2008) and cumulus differentiation (Sugiura *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2010).

FGF10, which belong to FGF7 subfamily, was detected in theca cells and oocytes from antral follicles of cows and in bovine preantral follicles from the primordial stage (Buratini *et al*., 2007). In bovine fetal ovaries, FGF10 mRNA was identified throughout gestation and increased with primary follicle number (data submitted to publication), when levels of steroids are expected to fall (Yang and Fortune, 2008; Nilsson and Skinner, 2009). In bovine antral follicles, FGF10 mRNA levels were inversely associated with intrafollicular estradiol concentrations and FGF10 decreased estradiol production from cultured granulosa cells (Buratini *et al*., 2007). An intrafollicular

injection of FGF10 reduced follicular fluid estradiol contente and CYP19A1 mRNA abundance in granulosa cells (Gasperin *et al*., 2012).

Another FGF group of emerging interest in ovarian activity is the FGF8 subfamily, which includes the prototype FGF8 and FGFs 17 and 18, and activate FGFR2C, FGFR3C and FGFR4 (Ornitz *et al*., 1996). In cattle, these FGFs as well as FGFR3C and FGFR4 were observed in granulosa and theca cells (Buratini *et al*., 2005; Machado *et al*., 2009; Portela *et al*., 2010). In this specie, follicular atresia is marked by increased thecal expression of FGF18 in bovine follicles, which reduced estradiol and progesterone production, as well as mRNA levels of steroidogenic enzymes and FSH receptor in cultured bovine granulosa cells (Portela *et al*., 2010).

In this study we first investigated the temporal expression patterns of mRNA encoding FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3C, FGFR4), as well as the location of FGF18 during ovarian development in cattle. In addition, in order to gain insight into the participation of FGF10 and 18 in the control of fetal ovarian steroidogenesis around folicular activation, we tested the effects of FGF10 and 18 on the production of estradiol and progesterone as well as on the expression of steroidogenic enzymes in cultures of bovine ovarian fragments.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Developing ovaries were dissected from *Bos taurus taurus* or *Bos taurus indicus* bovine fetuses in abattoirs local to the Cornell University (New York State, USA) or to Sao Paulo State University (Campus of Botucatu, Brazil) respectively. Fetal age was estimated by the crown-rump lenght (Evans and Sack, 1973) and ovaries were transported for no more than 2h to the laboratory at 20ºC-22ºC. Ovaries obtained in Cornell were used to assess the effects of FGF10 and FGF18 on estradiol and progesterone production from cultured ovarian fragments, whilst those obtained in Botucatu were used to assess effects of the FGFs on mRNA abundance of steroidogenic enzymes as well as to assess the expression patterns of FGF18 in the developing ovary during gestation. For organ culture, ovaries were collected just prior to follicle formation in *Bos taurus taurus* (days 80-90; Yang and Fortune, 2008) or when follicle

activation is enhanced in *Bos taurus indicus* (Day 120; Castilho, 2008) and were immersed in Leibovitz L-15 medium (Invitrogen) supplemented with 1% fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen) for transportation. For the assessment of expression patterns, samples were grouped according to fetal age (60, 75, 90, 120, 150 and 210 days; n=7fetuses/age), and one ovary from each fetus was placed in buffered 10% formaldehyde solution for 12 hours for immunohistochemical analysis, whereas the other ovary was placed in RNA*later* (Ambion) for 2 hours for RNA extration.

Gene expression analysis

Gene expression was assessed by relative real-time PCR. After extraction with Trizol (Invitrogen), total RNA (1 µg) was first treated with 1 U DNAse I (Invitrogen) and then reverse transcribed using oligo(dT) primer (1 mmol/L), dideoxynucleotide triphosphate- dNTP (0.25 mmol) and RNase Inhibitor (Invitrogen) in a volume of 20 µL, according with the protocol provided by the Omniscript kit (Qiagen). Real time PCR was conducted in an ABI 7500 instrument (Applied Biosystems). The primers sequences, amplicons sizes and annealing temperatures for each target gene are shown in Table 1. Common thermal cycling parameters (95°C for 10 min - 1 cycle, denaturing at 95°C for 10 sec followed by annealing for 1 min - 40 cycles) were used to amplify all transcripts. Melting curve and amplicon size (by electrophoresis in 2% agarose gels) analysis was performed to verify product identity. To select the most stable housekeeping gene, Cyclophilin-A (*CYC-A*), Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and Histone H2AFZ (*H2AFZ*) amplification profiles were compared using the geNorm applet for Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; Vandesompele *et al*., 2002); the most stable housekeeping gene was *CYC-A*. Samples were run in duplicate, and Ct values were expressed relative to CYC-A as housekeeping gene. Data were normalized to a calibrator sample using the ΔΔCt method with correction for amplification efficiency (Pfaffl, 2001). Mean efficiency values for each gene were calculated from the amplification profile of individual samples with LinRegPCR software (Ramakers *et al*., 2003).

Immunohistochemistry

To assess the localization of FGF18, ovaries were collected from zebuine fetuses at different gestational ages (60, 75, 90, 120, 150, 210 days; n=3 fetus/age) and fixed in buffered 10% formaldehyde solution for 12 hours. Samples were then dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene, and embebed in paraffin. Serial 4-µm sections were cut and mounted on poly-L-lysine coated slides, which were deparaffinized in xylene and rehydrated in graduated ethanol washes. Antigen retrieval was achieved by heating to 96ºC for 30 min in 0.5 M Tris EDTA buffer (pH 9.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide in methanol for 20 min. Nonspecific binding were blocked with 5% milk in PBS for 30 min, and endogenous avidin and biotin activities were eliminated with blocking protein solution (DAKO) for 20 min. FGF18 polyclonal goat antibody (SC-16830; Santa Cruz Biotechnology) was incubated with sections at 1:50 for 2h at 4ºC. After washing, sections were incubated with secondary antibody antigoat (DAKO) and subsequently treated for 30 min with avidin-peroxidase (Vecstain ABC, Vector Laboratories), and diamino/benzoate staining was performed (DAB, DAKO). Sections were counterstained with hematoxylin ans eosin. Negative controls were performed by preincubating FGF18 antibody with 32X blocking peptide (SC-16830P; Santa Cruz Biotechnology)

Culture method

Ovaries were dissected from surrounding fat tissue and ligaments, cut manually into pieces of approximately 0.5 to 1 mm^3 and randomly distributed in 24-well culture plates with 300 µl of culture medium/well (two pieces per well; two wells per treatment). Control medium consisted of Waymouth medium MB 752/1 (Invitrogen) supplemented with 2.5 mg/l pyruvic acid (Sigma), antibiotics (50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin; Invitrogen) and ITS + [ITS Premix: 6.25 µg insulin, 6.25 µg transferrin, 6.25 ng selenous acid (BD Biosciences), 1.25 mg BSA (Sigma), 5.35 µg linoleic acid per milliliter (Sigma)]. Cultures were maintained at 38.5ºC in a humidified incubator with 5% CO_2 in air for 6 days; 300 µl of medium were replaced every 2 days. To determine the effects of FGF10 or 18 on steroid production and mRNA expression of steroidogenic enzymes, culture medium was supplemented with grading doses (0, 50, 100 and 200 ng/ml) of recombinant human FGF10 (R&D Systems) or 18 (Peprotech).

Medium was collected every 2 days during 6 days to meausure steroids and mRNA expression was assessed after 6 days of culture.

Steroids measurement

Estradiol and progesterone concentrations were measured by radioimmunoassay (RIA) in duplicates. The antiserum and RIA protocol were as previously described (Berndtson *et al*., 1995; Yang and Fortune, 2008). The inter and intrassay coefficients of variation (mean ± SEM) for RIAs were 6.88 ± 0.97 and 9.7 ± 1.1 (estradiol) and 5.18 ± 1.21 and 5.9 ± 0.9 (progesterone), respectively. The limits of detection of these assays were 5 and 6.25 pg for estradiol and progesterone, respectively.

Statistical analysis

Data were transformed to logarithms when not normally distributed. Analysis of variance (ANOVA) was used to test the effects of gestational age on mRNA expression of steroidogenic enzymes and to test the effects of FGFs 10 and 18 on steroids production and mRNA abundance in cultured ovarian fragments. Means comparisons were performed with the orthogonal contrast test. The analysis was performed with the JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA). To test the effects of FGF10 and 18 specifically in ovarian fragments from taurine fetuses, sets of data were log transformed if Hartley test indicated heterogeneity of variance among the means differences among individual means were tested using Duncan multiple range test. Differences between means were considered significantly different when $P < 0.05$.

RESULTS

FGF18 was localized inside the cytoplasm in cell streams and some but not in all oogonias at days 60 (Fig. 1-A), and in these cells and in oocytes of primordial follicles at 75 days of gestation (Fig. 1-B). At days 90 and 120 of gestation (Fig. 1-C), FGF18 protein was still localized to cell streams but also in the cytoplasm of oocytes from primordial follicles. At day 150, the localization of FGF18 was similar except for the inclusion of oocytes from secondary follicles, observed for the first time at this age (Fig. 1-D). At day 210, FGF18 protein was detected in oocytes from preantral follicles concentrated in the cortical portion and weakly in medulla (Fig. 1-E). No staining was

observed when FGF18 antibody was preincubated with specific blocking peptide (Fig. 1-F).

Messenger RNA expression of FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3C and FGFR4) was detected in bovine ovaries throughout gestation (Fig. 2). FGFR18 increased between days 90 and 150 and decreased at day 210 of gestation. Abundance of mRNA enconding FGFR2C and FGFR4 did not vary during gestation, whereas FGFR3C mRNA levels decreased from days 120 to 210 of gestation.

To assess the possible roles of FGFs 10 and 18 on steroidogenesis during gonadal development, fragments from bovine fetal ovaries just prior to follicular activation were cultured in the presence of graded doses of these FGFs (0, 50, 100 and 200 ng/mL). FGF18 inhibited steroidogenesis (Fig. 3); estradiol accumulation was decreased by FGF18 in a dose-dependent manner cultures lasting for 2 or 6 days (Fig. 3-A), whereas progesterone levels were reduced by FGF18 after 6 days of culture (Fig. 3-B). In contrast, FGF10 had no effect on estradiol or progesterone production.

To gain insight into the mechanisms by which FGF18 suppress steroids production, we examined the expression of key enzymes involved in the steroidogenic cascade in cultures of bovine fetal ovaries during follicular activation treated with FGF18 (0, 50 and 100 ng/mL). FGF18 did not affect abundance of mRNA encoding StAR, HSD3B1, CYP17A1 and HSD17B1 (Fig. 4), but decreased CYP19A1 and CYP11A1 mRNA levels in a dose-dependent manner.

DISCUSSION

Previous studies have reported that FGF10 and FGF18 inhibit steroid production in bovine antral follicles (Buratini *et al*., 2007; Portela *et al*., 2010; Gasperin *et al*., 2012) and that a decrease in estradiol and progesterone production in the developing ovary is associated with appearance of primordial and primary follicles (Yang and Fortune, 2008; Nilsson and Skinner, 2009). The present study reports the expression patterns of FGF18 in the bovine fetal ovary and provides evidence that FGF18 but not FGF10 regulates steroidogenesis around the onset of primordial follicle activation in the developing bovine ovary.

The immunohistochemical analysis demonstrated the presence of FGF18 in stream cells from day 60 of gestation and in some oogonia and in oocytes from all

preantral stages. Cell streams form at early fetal ovarian development from the migration of mesangial and epithelial cells from the regressing glomerulli. They are predominantly found in the ovarian medulla but also branch into the inner cortex closed to ovigerous cords, and appear to be involved in vascular development (Juengel *et al*., 2002). Interestingly a recent study demonstrated that CYP19A1 localization is denser in the ovarian medulla and concentrated in cell streams in fetal ovaries from 75 to 105 days of gestation (Garverick *et al*., 2010). The apparent colocalization of CYP19A1 and FGF18 in cell streams suggest that FGF18 mediates an autocrine/paracrine loop that inhibits aromatization of androgens early in fetal development. However, bovine fetal ovaries from 110 days of gestation showed CYP19A1 is localized in granulosa cells of preantral and early antral follicles (Burkhart *et al*., 2010), whilst the present study detected FGF18 in oocytes of same follicular categories. These data point to FGF18 paracrine role on aromatization process in granulosa cells from follicular assembly. In bovine adult ovaries, high FGF18 RNAm levels were associated with follicular atresia and the addition of this FGF to granulosa cell cultures altered cellular cycle progression, resulting in elevated number of dead cells, which was observed by an increase in DNA fragmentation (Portela *et al*., 2010). It is possible that presence of FGF18 protein in oogonia is associated with massive atresia occurring in these cells during early gestation (Juengel *et al*., 2002, Sawyer *et al*., 2002).

FGF18 appears to activate FGFR3C and FGFR4 more efficiently, although it can also bind to FGFR2C (Ornitz *et al*., 1996; Zhang *et al*., 2006). In this study, while FGFR2C and FGFR4 mRNA expression did not vary throughout gestation, whereas FGFR3C mRNA levels decreased at day 150 of gestation. Low levels of FGFR3C from this age is temporally associated with increasing levels of steroidogenic eznymes (not published data) observed in bovine fetal ovaries. It is possible that the low expression of FGFR3C may weak FGF18 antisteroidogenic action during this period. The transitory increase in FGF18 mRNA abundance at 120 and 150 days appears to coincide with an increase in number of primary follicles number and first appearance secondary follicles in bovine fetal ovaries, as previously observed (Castilho, 2008). This agrees with previous studies suggesting that FGFs may benefit activation and follicular growth from primary stage (Nilsson and Skinner, 2001; Matos *et al*., 2007). Interestingly, reduced levels of estradiol and progesterone were detected around the period of enhanced FGF18 expression in bovine fetal ovaries (Yang and Fortune, 2008). In contrast, low

expression of this factor was observed at 210 days of gestation, when the first antral follicles are detected (Castilho, 2008) and an elevation of steroidogenesis is observed (Yang and Fortune, 2008). In addition, greater FGF18 mRNA abundance was observed when the expression of CYP19A1 is expected to be reduced; CYP19A1 levels were highest at 60 days of gestation and declined thereafter (data not published). FGF18 inhibited estradiol and progesterone production of granulosa cells from antral follicles, which was accompanied by decreased expression of steroidogenic enzymes including CYP19A1 (Portela *et al*., 2010). Therefore the mRNA expression pattern of FGF18 is compatible with a role in the regulation of steroidogenesis in the bovine fetal ovary and may be associated with the appearance of different preantral follicle categories.

Although FGFs have been reported to enhance follicle activation (Kezele *et al*., 2005; Matos *et al*., 2007; Chaves *et al*., 2010), the mechanisms involved are not clear. In ovine and bovine fetal ovaries, higher levels of estradiol and progesterone are detected at early gestation (Shemesh, 1980; Dominguez *et al*., 1998; Qurike *et al*., 2001, Yang and Fortune, 2008), and a reduction in the production of these steroids has been associated with follicle formation and activation (Zachos *et al*., 2002; Kezele and Skinner, 2003; Chen *et al*., 2007; Yang and Fortune, 2008; Nilsson and Skinner, 2009). We therefore tested the effects of FGF10 and FGF18 on the production of estradiol and progesterone by fragments of bovine fetal ovaries obtained just prior to follicle formation. Production of estradiol and progesterone were not significantly affected by FGF10, in contrast with the inhibitory effect of FGF10 on antral follicle steroidogenesis (Buratini *et al*., 2010; Gasperin *et al*., 2012). Reduced estradiol production seems to coincide with increases in FGF10 mRNA expression and number of primary follicles in bovine fetal ovaries at 120 days of gestation (Castilho, 2008). It is possible FGF10 is able to inhibit follicular steroidogenesis, but do not affect ovarian stromal steroid production. As the cultured ovaries were obtained before follicular formation in taurine fetuses, that absence of FGF10 inhibitory effects might be due to use of precocious animals.

In contrast with FGF10, FGF18 inhibited estradiol and progesterone production from bovine fetal ovaries in the present study. This agrees with previously reported inhibitory actions of FGF8 family members on antral follicle steroidogenesis in rodents and cattle (Portela *et al*., 2008; Machado *et al*., 2009; Miyhoshi *et al*., 2010). To investigate the mechanisms by which FGF18 inhibits steroidogenesis, we assessed the

effects of FGF18 on the expression of major steroidogenic enzymes for the production of progesterone and estradiol in cultures of ovarian fragments from *Bos indicus* fetuses at 120 days of gestation. This period is marked by increase of FGF18 mRNA and number of primary follicles. FGF18 decreased the abundance of mRNA enconding CYP11A1 and CYP19A1 as previously reported in cultures of bovine granulosa cells (Portela *et al*., 2010), but did not alter the expression of StAR, HSD3B1, CYP17A1, HSD17B1, which were also inhibited in granulosa cells from bovine antral follicles. Therefore, the decrease in progesterone production induced by FGF18 in the present study appears to be related to the suppression of CYP11A1 expression by FGF18, which would limit the amount of pregnenolone available for progesterone convertion. Furthermore, decreased pregnenolone levels might impact the androgens availability and explain reduced estradiol levels after FGF18 treatment. Although some studies demonstrate the androgenic synthesis in bovine fetal ovaries (Yang and Fortune, 2008; Dominguez *et al*., 1988), maternal androgens may be provided by placental vascularization (Hogg *et al*., 2011), ensuring substrate for local aromatization. On the other hand, the downregulation of CYP19A1 mRNA expression by FGF18 appears to mediate the reduction of estradiol production.

CONCLUSIONS

In summary, we have demonstrated that FGF18 mRNA levels were increased when steroid production is expected to fall and follicle activation to be enhanced; FGF18 protein was detected in cell streams, oogonia and oocytes in all types of preantral follicles, coincident or very close to cells previously reported to express CYP19A1; FGF18 inhibited production of estradiol and progesterone and decreased mRNA expression of CYP19A1 and CYP11A1. Taken together, these data suggest a physiological role for FGF18 in the control of steroidogenesis around follicular formation time in bovine fetal ovaries.

ABSTRACT

During development of fetal ovaries, structural and physiological events occurrence culminates with the follicular establishment. In mammals, steroid hormones

have been pointed as regulator of ovarian formation and early folliculogenesis. It was previously demonstrated that FGF10 and FGF18 are negatively associated with steroids and reduce steroidogenic enzymes mRNA expression in bovine antral follicles. In the present study, we evaluated FGF10 and FGF18 effects on steroidogenesis in bovine fetal ovaries. Localization of FGF18 protein was demonstrated to the cell streams and some oogonia, and to the oocytes of follicles from primordial stage. mRNA enconding FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3C and FGFR4) were detected through gestation. FGF18 expression elevated between days 90 and 150 and descreased at day 210 of gestation, and FGFR3C expression was reduced from 120 to 210d. *In vitro*, exposing the ovarian fragments before follicular formation to FGF10 did not affect steroidogenesis, whilst estradiol and progesterone production was decreased by FGF18. We then investigated the effects of FGF18 on steroidogenic enzymes (StAR, CYP11A1, HSD3B1, CYP17A1, CYP19A1 and HSD17B1) expression in bovine fetal ovaries during activation process. Abundance of mRNA enconding CYP11A1 and CYP19A1 was decreased after FGF18 treatment. We conclude that FGF18 is a potential inhibitor of steroidogenic synthesis during ovarian development in cattle.

Key words: FGF10, FGF18, steroidogenesis, fetal ovary, bovine.

RESUMO

Durante o desenvolvimento de ovários fetais, a ocorrência de eventos estruturais e fisiológicos culmina com o estabelecimento folicular. Em mamíferos, os hormônios esteróides têm sido apontados como reguladores da formação ovariana e da foliculogênese inicial. Foi demonstrado previamente que o FGF10 e o FGF18 estão negativamente associados com os esteróides e reduzem a expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas em folículos antrais bovinos. No presente estudo, nós avaliamos os efeitos do FGF10 e FGF18 na esteroidogênese em ovários fetais bovinos. A localização da proteína do FGF18 foi demonstrada nas "células stream" e em algumas oogônias, e nos oócitos de folículos a partir do estágio primordial. O RNAm que codifica o FGF18 e seus receptores (FGFR2C, FGFR3C e FGFR4) foram detectados durante a gestação. A expressão do FGF18 foi elevada entre os 90 e 150 dias de gestação e diminuiu aos 210d, e a expressão do FGFR3C foi reduzida dos 120 para os

210d. *In vitro*, a exposição de fragmentos ovarianos ao FGF10 anteriormente à formação folicular não afetou a esteroidogênese, enquanto a produção de estradiol e progesterona foi reduzida pelo FGF18. Nós então investigamos os efeitos do FGF18 na expressão das enzimas esteoridogênicas (StAR, CYP11A1, 3β-HSD, CYP17A1, CYP19A1 e 17β-HSD) em ovários fetais bovinos durante o processo de ativação. A abundância de RNAm codificador para a CYP11A1 e CYP19A1 foi reduzida após o tratamento com FGF18. Nós concluímos que o FGF18 é um potencial regulador da síntese esteroidogênica durante o desenvolvimento ovariano em bovinos.

Palavras-chave: FGF10, FGF18, esteroidogênese, ovário fetal, bovino.

REFERENCES

ALMEIDA A. P.; SARAIVA M. V.; ALVES FILHO J. G.; SILVA G. M.; GONÇALVES R. F.; BRITO I. R.; SILVA A. W.; LIMA A. K.; CUNHA R. M.; SILVA J. R.; FIGUEIREDO J. R. Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.1, p.20-25, 2012.

BERISHA B.; SINOWATZ F.; SCHAMS D. Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular, Reproduction and Development**, v.67, n.2, p.162-171, 2004.

BURATINI J. JR.; PRICE C. A. Follicular somatic cell factors and follicle development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, n.1, p.32-39, 2011.

BURATINI J. JR.; PINTO M. G. L.; CASTILHO A. C.; AMORIM R. L.; GIOMETTI I. C.; PORTELA V. 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. **Biology of Reproduction**, v.77, n.4, p.743-750, 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. **Reproduction,** v.130, n.6, p.343-350, 2005.

BURKHART M. N.; JUENGEL J. L.; SMITH P. R.; HEATH D. A.; PERRY G. A.; SMITH M. F.; GARVERICK H. A. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.43-54, 2010.

CASTILHO A. C. S. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. [s.n.]. Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

CHAVES R. N.; LIMA-VERDE I. B.; CELESTINO J. J.; DUARTE A. B.; ALVES A. M.; MATOS M. H.; CAMPELLO C. C.; NAME K. P.; BÁO S. N.; BURATINI J. JR.; FIGUEIREDO J. R. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.39, n.4, p.249-258, 2010.

CHEN Y.; JEFFERSON W. N.; NEWBOLD R. R.; PADILLA-BANKS E.; PEPLING M. E. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology**, v.148, n.8, p.3580-3590, 2007.

DOMINGUEZ M. M.; LIPTRAP R. M.; BASRUR P. K. Steroidogenesis in fetal bovine gonads. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, n.4, p.401-406, 1988.

EVANS H. E.; SACK W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomie, Histologie, Embryologie**, v.2, n.1, p.11-45, 1973.

FORTUNE J. E.; CUSHMAN R. A.; WAHL C. M.; KITO S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, n.1-2, p.53-60, 2000.

FORTUNE J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.135-163, 2003.

GARVERICK H. A.; JUENGEL J. L.; SMITH P.; HEATH D. A.; BURKHART M. N.; PERRY G. A.; SMITH M. F.; MCNATTY K. P. Development of the ovary and ontogeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) alpha and beta during early fetal life in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.24-33, 2010.

GASPERIN B.; FERREIRA R.; ROVANI M. T.; SANTOS J. T.; BURATINI J. JR.; PRICE C.; GONÇALVES P. B. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol production *in vivo* in cattle. **Reproduction**, v.143, n.6, p.815-823, 2012.

GUERRA D. M.; GIOMETTI I. C.; PRICE C. A.; ANDRADE P. B.; CASTILHO A. C.; MACHADO M. F.; RIPAMONTE P.; PAPA P. C.; BURATINI J. JR. Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.20, n.6, p.659-664, 2008.

GUILLEMOT F.; ZIMMER C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. **Neuron**, v.71, n.4, p.574-588, 2011.

HOGG K.; MCNEILLY A. S.; DUNCAN WC. Prenatal androgen exposure leads to alterations in gene and protein expression in the ovine fetal ovary. **Endocrinology**, v.152, p.2048-2059, 2011.

ITOH N.; ORNITZ D. M. Evolution of the FGF and FGFR gene families. **Trends in Genetics**, v.20, n.11, p.563-569, 2004.

ITOH N.; ORNITZ D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **The Journal of Biochemistry**, v.149, n.2, p.121-130, 2011.

JUENGEL J. L.; HEATH D. A.; QUIRKE L. D.; MCNATTY K. P. Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. **Reproduction**, v.131, n.1, p.81-92, 2006.

JUENGEL J. L.; SAWYER H. R.; SMITH P. R.; QUIRKE L. D.; HEATH D. A.; LUN S.; WAKEFIELD S. J.; MCNATTY K. P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, n.1, p.1-10, 2002.

KEZELE P.; NILSSON E. E.; SKINNER M. K. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. **Biology of Reproduction**, v.73, n.5, p.967-973, 2005.

KEZELE P.; SKINNER M. K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. **Endocrinology**, v.144, n.8, p.3329-3337, 2003.

KNIGHT P. G.; GLISTER C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, n.2, p.191-206, 2006.

LU W.; LUO Y.; KAN M.; MCKEEHAN W. L. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.18, p.12827-12834, 1999.

MACHADO M. F.; PORTELA V. M.; PRICE C. A.; COSTA I. B.; RIPAMONTE P.; AMORIM R. L.; BURATINI J. JR. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **The Journal of Endocrinology**, v.202, n.3, p.347-353, 2009.

MARIE P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. **Gene**, v.498, n.1, p.1-4, 2012.

MATOS M. H.; VAN DEN HURK R.; LIMA-VERDE I. B.; LUQUE M. C.; SANTOS K. D.; MARTINS F. S.; BÁO S. N.; LUCCI C. M.; FIGUEIREDO J. R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs Journal**, v.186, n.2, p.112-20, 2007.

MIYOSHI T.; OTSUKA F.; YAMASHITA M.; INAGAKI K.; NAKAMURA E.; TSUKAMOTO N.; TAKEDA M.; SUZUKI J.; MAKINO H. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.325, n.1-2, p.84-92, 2010.

MONGET P.; BOBE J.; GOUGEON A.; FABRE S.; MONNIAUX D.; DALBIES-TRAN R. The ovarian reserve in mammals: A functional and evolutionary perspective. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.356, n.1-2, p.2-12, 2012.

NILSSON E.; PARROTT J. A.; SKINNER M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, n.1-2, p.123-130, 2001.

NEUVIANS T. P.; BERISHA B.; SCHAMS D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. **Molecular reproduction and Development**, v.67, n.4, p.389-395, 2004.

NILSSON E. E.; SKINNER M. K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.313, n.1-2, p.9-16, 2009.

OKTEM O.; URMAN B. Understanding follicle growth *in vivo*. **Human Reproduction**, v.25, n.12, p.2944-2954, 2010.

ORNITZ D. M.; XU J.; COLVIN J. S.; MCEWEN D. G.; MACARTHUR G. A.; COULIR F.; GAO G.; GOLDFARB M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.25, p.15292-15297, 1996.

PARROTT J. A.; SKINNER M. K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v.139, n.1, p.228-35, 1998.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PORTELA V. M.; MACHADO M.; BURATINI J. JR.; ZAMBERLAM G.; AMORIM R. L.; GONCALVES P.; PRICE C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.83, n.3, p.339-346, 2010.

QUIRKE L. D.; JUENGEL J. L.; TISDALL D. J.; LUN S.; HEATH D. A.; MCNATTY K. P. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. **Biology of Reproduction**, v.65, n.1, p.216-228, 2001.

RAMAKERS C.; RUIJTER J. M.; DEPREZ R. H.; MOORMAN A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). **Neuroscience Letters**, v.339, n.1, p.62-66, 2003.

SAWYER, H. R.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1134–1150, 2002.

SHEMESH M.; AILENBERG M.; MILAGUIR F.; AYALON N.; HANSEL W. Hormone production by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. **Biology of Reproduction**, v.19, n.4, p.761-767, 1978.

SHEMESH M. Estradiol-17β biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. **Biology of Reproduction**, v.23, n.3, p.577-582, 1980.

SMITZ J.; DOLMANS M. M.; DONNEZ J.; FORTUNE J. E.; HOVATTA O.; JEWGENOW K.; PICTON H. M.; PLANCHA C.; SHEA L. D.; STOUFFER R. L.; TELFER E. E.; WOODRUFF T. K.; ZELINSKI M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Human Reproduction Update**, v.16, n.4, p.395-414, 2010.

SUGIURA K.; SU Y. Q.; 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, n.14, p.2593-2603, 2007.

SHARMA G. T.; DUBEY P. K.; SAI KUMAR G. Effects of IGF-1, TGF-α plus TGF-β1 and bFGF on *in vitro* survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (Bubalis bubalus) preantral follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, v.20, n.4, p.319-325, 2010.

TE VELDE E. R.; SCHEFFER G. J.; DORLAND M.; BROEKMANS F. J.; FAUSER B. C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, n.1-2, p.67-73, 1998.

TINGEN C.; KIM A.; WOODRUFF T. K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p.795-803, 2009.

VALVE E.; PENTTILÄ T. L.; PARANKO J.; HÄRKÖNEN P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.232, n.1, p.173-177, 1997.

VANDESOMPELE J.; PRETER K. D.; PATTYN F.; POPPE B.; ROY N. V.; PAEPE A. D.; SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p.1-11, 2002.

WANDJI S. A.; EPPIG J. J.; FOTUNE J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, n.4, p.817-832, 1996.

WESCHE J.; HAGLUND K.; HAUGSTEN E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. **The Biochemical Journal**, v.437, n.2, p.199-213, 2011.

YANG M. Y.; FORTUNE J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, n.6, p.1153-1161, 2008.

ZACHOS N. C.; BILLIAR R. B.; ALBRECHT E. D.; PEPE G. J. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. **Biology of Reproduction**, v.67, n.4, p.1148-1156, 2002.

ZHANG K.; HANSEN P. J.; EALY A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. **Reproduction**, v.140, n.6, p.815-826, 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. The **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.23, p.15694-15700, 2006.

ZHOU H.; ZHANG Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, n.3, p.235-242, 2005.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. W. R. Scarano for technical assistance in immunohistochemistry analysis.

FUNDING

This research was supported by grant from FAPESP (grant number 2009/52300-2). R Bueno da Silva was a recipient of grants from CAPES and FAPESP (grant number: 2008/58530-7 - Brazil).

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

Genes	Primer Sequence	Fragment size (bp)	Annealing Temperature (°C)
CYC-A	F 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	65	60
GAPDH	F 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	119	62
H_2AFZ	F 5'-GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG-3' R 5'-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC-3'	74	60
FGF18	F 5'-CGCCCAGCGATGTATTCAG-3' R 5'-TGCGGAAGTCCACGTTCTC-3'	112	60
FGFR1b	F 5'-ACGTCCTGGTGACGGAGG-3' R 5'-CCGGTGCCATCCATTTGA-3'	126	60
FGFR2b	F 5'-TGTGGTTGGAGGTGATGT-3' R 5'-CGAGTGCTTCAGAACCTTG-3'	141	58
FGFR2c	F 5'-CACCACGGACAAAGAAAT-3' R 5'-ATGCAGAGTGAAAGGATATCC-3'	84	60
FGFR3c	F 5'-ACTGGTACAACACCTATGCCTCCA-3' R 5'-TCTGGACATGGTGGGCAACTTAGA-3'	84	59
FGFR4	F 5'-TGGCTTTGATCGTGTTCCTGTT-3' F 5'-AAAGCGAGACAACTTCTGCACG-3'	130	62
StAR	F 5'-CCCAGCAGAAGGGTCTCATC-3' R 5'-TGCGAGAGGACCTGGTTGAT-3'	157	62
CYP11A1	F 5'-AGTCCACACCTCTTGCACCTTTCT-3' R 5'-CGCCCATCCCATGAAGGCAATAAA-3'	140	59
CYP17A1	F 5'-GAATGCCTTTGCCCTGTTCA-3' R 5'-CGCGTTTGAACACAACCCTT-3'	330	62
3β-HSD	F 5'-GCCCAACTCCTACAGGGAGAT-3' R 5'-TTCAGAGCCCACCCATTAGCT-3'	135	59
17β-HSD	F 5'-AGTCCACACCTCTTGCACCTTTCT-3' R 5'-CGCCCATCCCATGAAGGCAATAAA-3'	103	58
CYP19A1	F 5'-TGACCAGATCCAAACCAGACACCA-3' R 5'-ATGAGGTTGCTAAGAGTCGGCACA-3'	182	62

F= forward primer; R= reverse primer

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Imunohistochemical localization of FGF18 in bovine fetal ovaries at 60 to 210 days of gestation. (A) Presence of FGF18 at day 60 of gestation in cell streams (white circle) and oogonia (white arrowhead); (B) Fetal ovary at 75d with detection of FGF18 in cell streams (white circle), oogonia (white arrowhead) and newly primordial follicle (black arrow); (C) FGF18 is detected in cell streams (white circle) and oocytes from primordial (black arrow) and primary (black arrow head) follicles at day 120 of gestation; (D) Presence of FGF18 in oocytes of secondary follicles (white arrow) and cell streams (white circle) from ovary at 150d of gestation; (E) FGF18 protein in preantral follicles concentrated at cortical portion of fetal ovaries at 210d; (F) No staining was observed in the presence of excess FGF18 blocking peptide.

Fig. 2. Expression of mRNA FGF18 and its receptors (FGFR2C, FGFR3 and FGFR4) in bovine fetal ovaries at 60, 75, 90, 120, 150 and 210 days of gestation. Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values (± S.E.M) relative to a calibrator sample by the ΔΔCt method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

Fig. 3. Effects of grading doses of FGFs 10 and 18 on production of estradiol (E_2; A) and progesterone (P_4; B) from fetal ovaries just prior to follicle formation (fetuses primarily *Bos taurus* at Day 80-90). Ovarian fragments were cultured in serum-free medium for 12 days and treated separately with the stated doses of FGF10 or 18 (0, 50, 100 and 200 ng/mL). Medium was collected and replaced every 48h and samples obtained at 2, 4, 6 of culture were measured by RIA. Data are means values ± S.E.M. of six independent replicates. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

Fig. 4. Effect of FGF18 on mRNA abundance enconding proteins critical for steroidogenesis in fetal ovaries during activation process (fetuses primarily *Bos indicus* at 120d of gestation). Ovarian fragments were cultured in serum-free medium for 6 days and treated with the stated doses of FGF18 (0, 50 and 100 ng/mL). Medium was collected and replaced every 48h. Ovarian fragments were collected at 6d and

messenger RNA abundance was measured by real-time PCR and expressed relative to a calibrator sample calculated by the ΔΔCt method with efficiency correction. Data are means values ± S.E.M. of three or six independent replicates (relative to steroids measurements or gene expression investigation, respectively). Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).

Figure 1

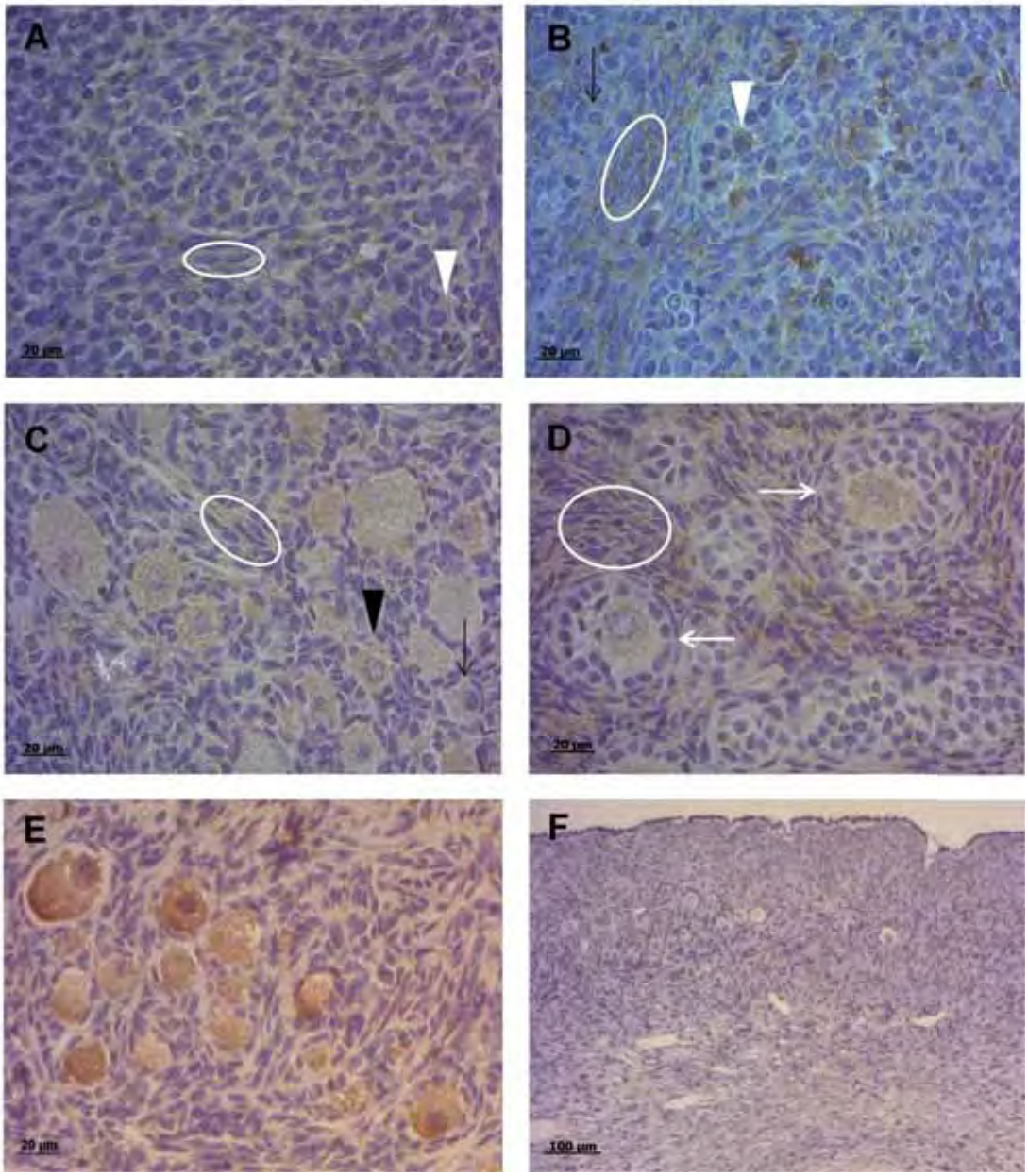


Figure 2

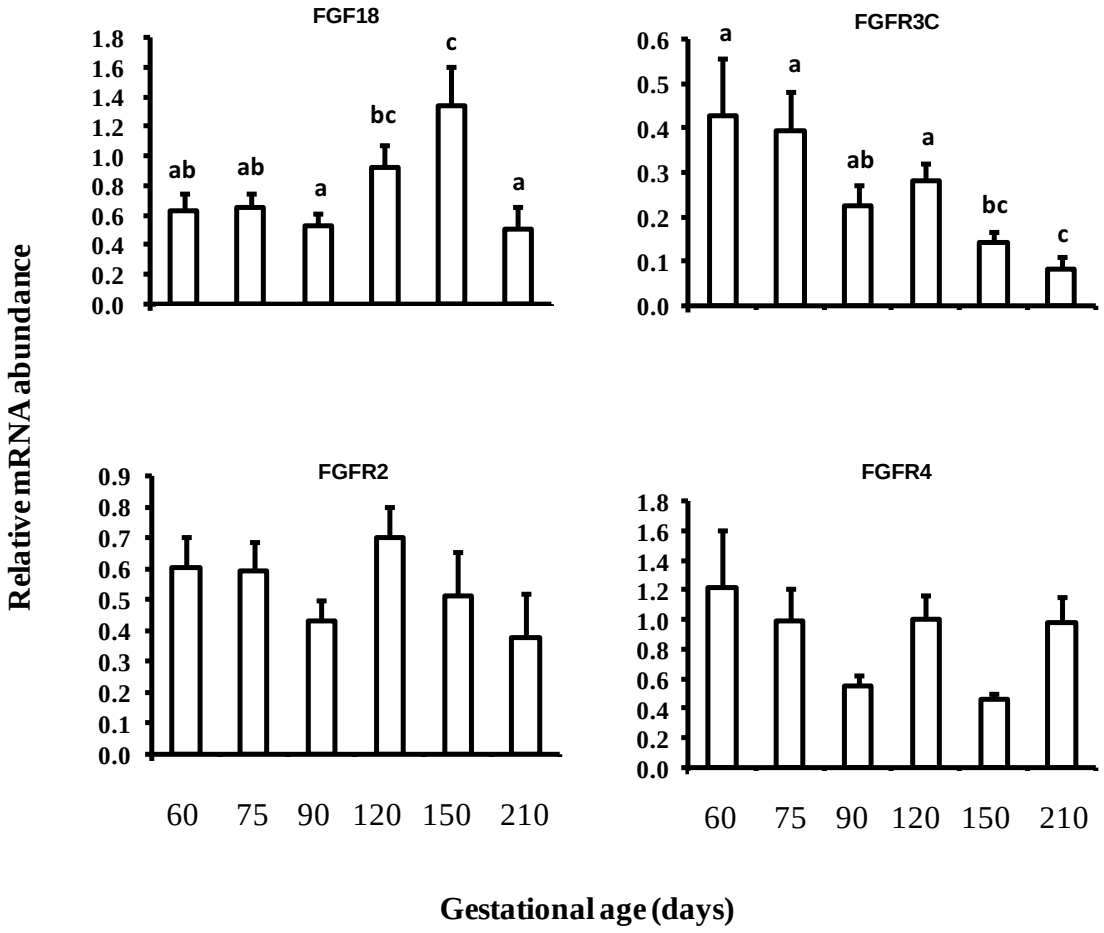

FGF18
FGFR3C
FGFR2
FGFR4
Relative mRNA abundance
ab
ab
a
bc
c
a
a
a
ab
a
bc
c
60
75
90
120
150
210
Gestational age (days)

Figure 3

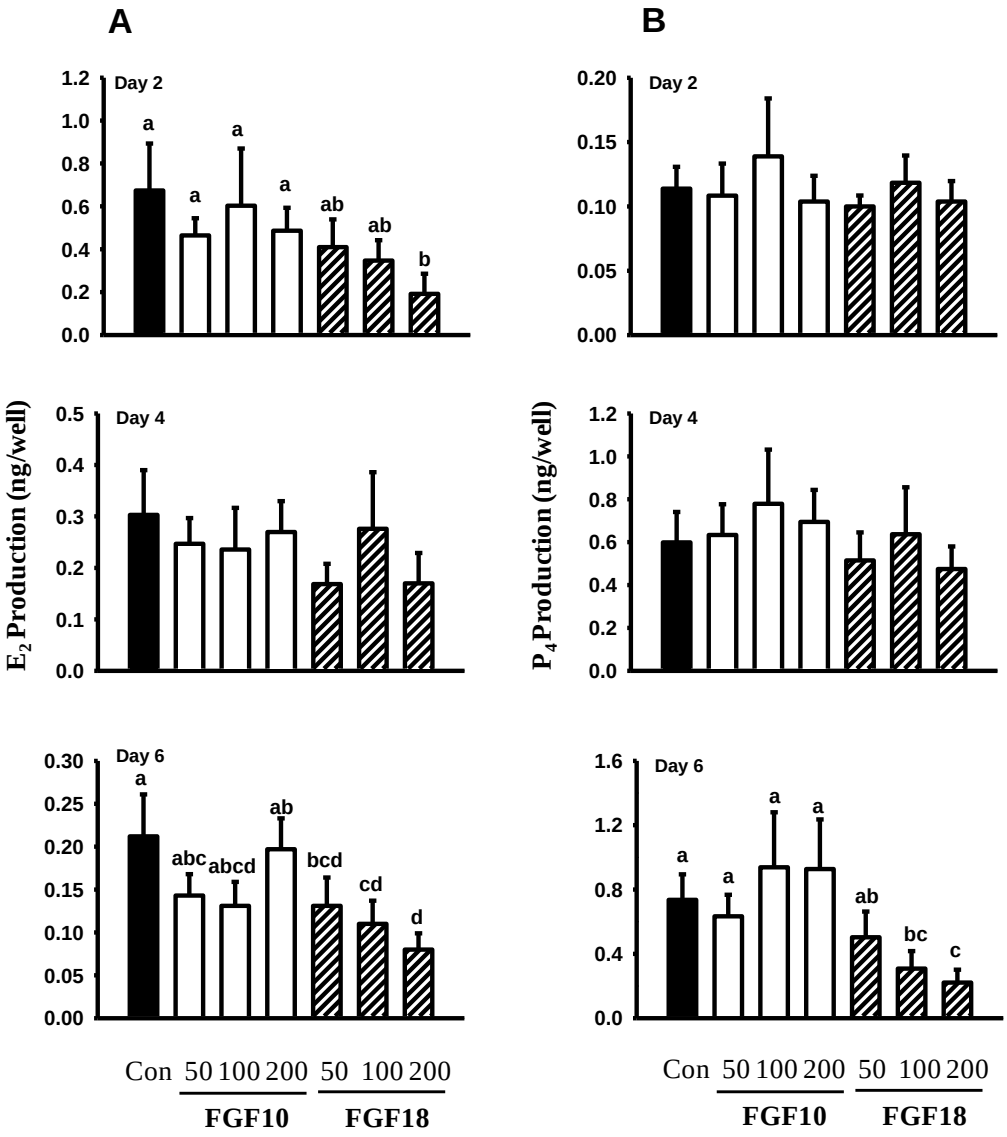
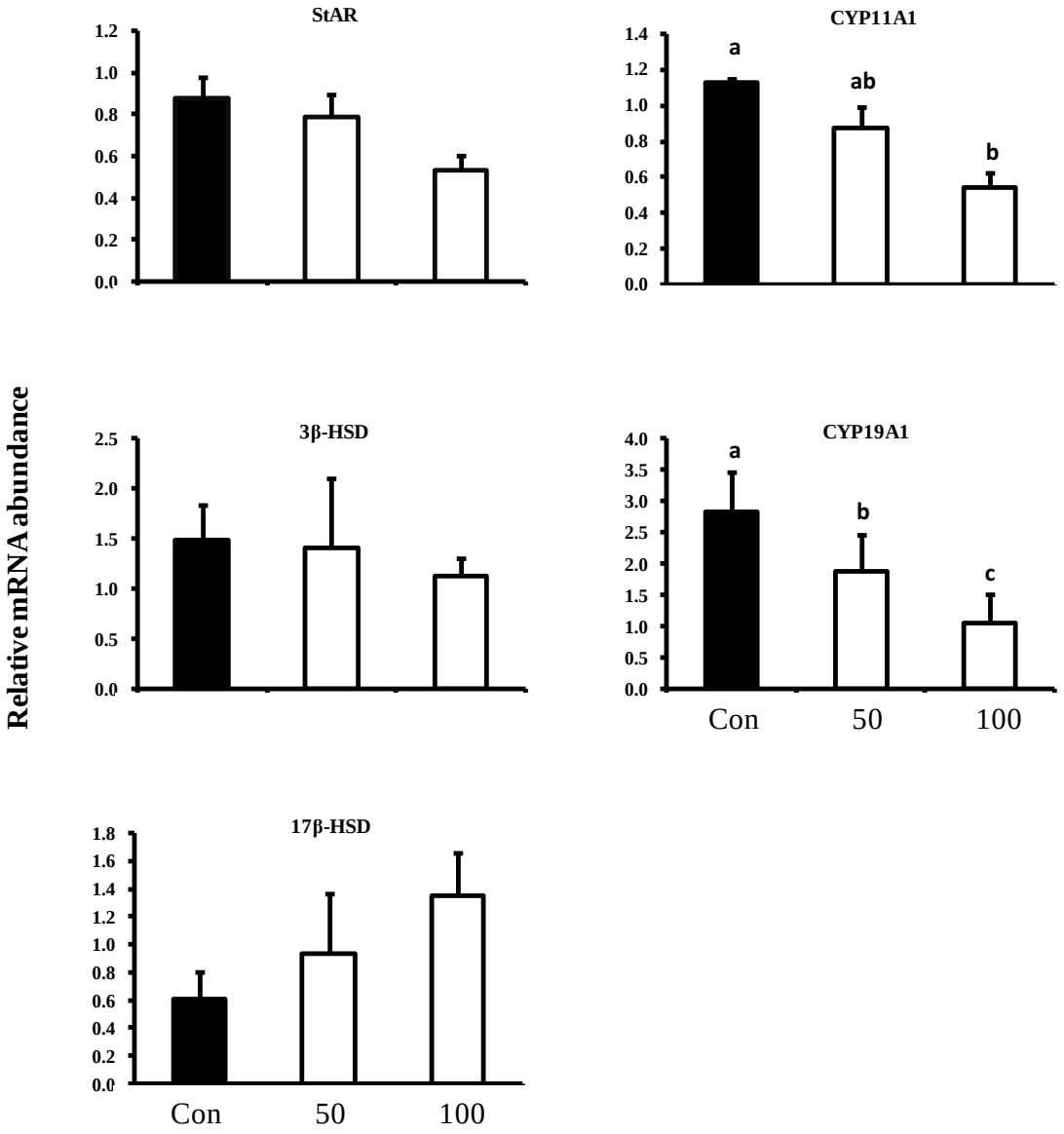

A
B
Day 2
Day 4
Day 6
E_2 Production (ng/well)
P_4 Production (ng/well)
Con 50 100 200 50 100 200
FGF10
FGF18
FGF dose (ng/mL)

Figure 4


StAR
CYP11A1
3β-HSD
CYP19A1
17β-HSD
a
ab
b
a
b
c
Con
50
100
Con
50
100
Relative mRNA abundance
FGF18 dose (ng/mL)

CAPÍTULO 4

I. DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, grandes esforços têm sido direcionados para aumentar a eficiência reprodutiva em fêmeas. Na espécie bovina, a exequibilidade e otimização de biotécnicas dependem do fornecimento de um grande número de oócitos, cuja disponibilidade em folículos antrais é limitada (Lonergan, 2007). Nesse sentido, o conhecimento sobre os mecanismos moduladores da foliculogênese pré-antral possibilitaria explorar a reserva de pequenos folículos que primariamente é reduzida por atresia durante a vida fetal e adulta (Erickson, 1966).

Tem sido proposto em mamíferos que a formação de folículos pré-antrais durante o desenvolvimento gonadal é regulada por esteróides (Zachos e al., 2002; Kezele e Skinner, 2003; Chen *et al*. 2007). Em ovários de fetos bovinos, enquanto níveis elevados durante a gestação inicial estão associados com a formação do estroma ovariano e a neovascularização (Garverick *et al*., 2010), o declínio na produção de progesterona e de estradiol parece ser necessário para a foliculogênese pré-antral (Nilsson e Skinner, 2009; Yang e Fortune, 2008). Todavia, os mecanismos envolvidos na produção de esteróides em ovários fetais bovinos permanecem obscuros, bem como os agentes que regulam a variação em sua produção.

No presente trabalho, demonstramos que os RNAm das enzimas necessárias à produção de esteróides (StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3β-HSD, CYP19A1 e 17β-HSD; Conley e Bird, 1997; Bao e Garverick, 1998) estão presentes em ovários fetais bovinos ao longo da gestação. Esses resultados sugerem que a gônada bovina em desenvolvimento possui o maquinário enzimático para a produção de esteróides e reforçam dados anteriores que demonstraram produção de esteróides em ovários fetais bovinos desde o momento da diferenciação sexual aos 45 dias (Shemesh *et al*., 1978; Shemesh *et al*., 1980; Tanaka *et al*., 2001).

Exceto para a CYP19A1, as outras enzimas esteroidogênicas analisadas apresentaram menor abundância relativa de RNAm aos 60 dias gestacionais seguidos por seu aumento durante a prenhez. Esses resultados contrastam com a produção máxima de estradiol e progesterona detectada no início da

prenhez e com o declínio progressivo destes esteróides até níveis mínimos ao redor do segundo terço gestacional (Nilsson e Skinner, 2009, Yang e Fortune, 2008). Isso sugere que a menor expressão da maioria das enzimas estudadas não é fator limitante para a esteroidogênese no início da gestação. Em contrapartida, a elevada abundância de RNAm destas enzimas aos 210d concorda com um novo aumento nos níveis de esteróides registrado nos ovários fetais bovinos (Yang e Fortune, 2008). É possível que o surgimento dos primeiros folículos antrais observado nesta idade (Castilho, 2008) esteja relacionado ao aumento da produção de esteróides, uma vez que a expressão das enzimas esteroidogênicas é maior nesses folículos (Braw-Tal e Yossefi, 1997).

A expressão do RNAm das enzimas StAR e 3β-HSD aumentou aos 120 e 210 dias, ao passo que a expressão da CYP11A1 aumentou aos 75 e 210 dias. Embora faltem informações a respeito da localização destas enzimas durante o desenvolvimento gonadal bovino, é conhecido que elas estão presentes em células da granulosa e da teca de folículos antrais em ovários de vacas (Xu *et al*., 1995; Bao e Garverick, 1998; Braw-Tal e Roth, 2005). Durante o crescimento do ovário fetal, o surgimento dos folículos primordiais aos 75 dias e o aumento do número de folículos primários aos 120 dias (Castilho, 2008) são marcados, respectivamente, pelo surgimento da primeira camada de células da granulosa e pelo desenvolvimento deste compartimento celular (Fortune, 2000). Já os folículos antrais, que surgem ao redor dos 210 dias da gestação (Castilho, 2008), são caracterizados por mais de seis camadas de células da granulosa e pela teca interna claramente definida (Braw-Tal e Yossefi, 1997). É provável que a multiplicação e o desenvolvimento das células foliculares que expressam as enzimas supracitadas estejam associados ao aumento na expressão das mesmas.

Investigações prévias em roedores e bovinos demonstraram que o surgimento de folículos primordiais no ovário em desenvolvimento está relacionado a níveis reduzidos de progesterona (Kezele e Skinner, 2003; Chen *et al*., 2007, Nilsson e Skinner, 2009). Em vacas, a pregnenolona pode ser convertida diretamente em progesterona por meio da 3β-HSD, ou ainda ser metabolizada subsequencialmente em DHEA e androstenediona pelas enzimas

CYP17A1 e 3β-HSD, respectivamente (Conley e Bird, 1997). No presente estudo, foi observada a menor abundância relativa de RNAm da CYP17A1 aos 60 dias seguida por seu aumento aos 75 dias. É possível que a menor expressão inicial da CYP17A1 esteja associada à maior disponibilidade de pregnenolona nos ovários fetais bovinos e, portanto, aos níveis mais altos de progesterona anteriores ao surgimento dos folículos primordiais (Nilsson e Skinner, 2009).

Para a produção de estradiol é necessária a ação da 17β-HSD na conversão da androstenediona em testosterona ou da estrona em estradiol (Conley e Bird, 1997). A abundância de RNAm desta enzima aumentou aos 120 dias da gestação, quando é observado aumento no número de folículos primários nos ovários fetais. Nesse sentido, níveis reduzidos de estradiol são encontrados durante a ativação folicular, o que indica que a 17β-HSD não é o fator determinante para a produção deste esteróide neste momento. Contudo, o aumento em sua expressão a partir dos 120 dias pode estar relacionado ao surgimento dos folículos secundários que se inicia a partir desta idade. A 17β-HSD leva à produção de testosterona que estimula a transição de primários para secundários (Murray *et al*., 1998; Wang *et al*., 2001; Vendola *et al*., 1998; Vendola *et al*., 1999).

Diferentemente das demais enzimas, a abundância relativa do RNAm da CYP19A1 foi máxima aos 60 dias da gestação e declinou até alcançar níveis mínimos aos 90 dias. Esse achado concorda com os relatos de máxima produção de estradiol em ovários fetais bovinos ao redor desta fase da gestação (Nilsson e Skinner, 2009; Yang e Fortune, 2008). A coincidência entre o decréscimo da expressão da CYP19A1 e o declínio na produção de estradiol sugere que a disponibilidade desta enzima seja o fator determinante do perfil de produção do estradiol em ovários fetais bovinos no início da gestação.

Em estudos prévios, a queda acentuada do estradiol observada durante o desenvolvimento gonadal em bovinos foi coincidente com o surgimento dos folículos primordiais (Nilsson e Skinner, 2009) e primários (Yang e Fortune, 2008). Em adição, o cultivo de fragmentos ovarianos bovinos na presença de estradiol exógeno apresentou taxa reduzida de ativação folicular (Yang e Fortune, 2008). Curiosamente, dados prévios do nosso laboratório mostram

que folículos primordiais e primários aparecem pela primeira vez no ovário de fetos bovinos zebuínos aos 75 e 90 dias da gestação, respectivamente, coincidindo com a queda na expressão da CYP19A1. Essas evidências em conjunto indicam a influência da CYP19A1 no aparecimento de folículos pré-antrais, bem como na sua ativação durante o desenvolvimento ovariano bovino via redução do estradiol.

O perfil de expressão da CYP19A1 observado neste estudo se opõe ao demonstrado para o FGF10 (Castilho, 2008). Enquanto os níveis de RNAm para a enzima se encontram reduzidos a partir dos 120 dias gestacionais, a expressão do FGF10 se eleva nesta idade. Uma vez que este momento gestacional é marcado pelo aumento do número de folículos primários (Castilho, 2008) e pela queda nos níveis de estradiol no ovário fetal (Yang e Fortune, 2008), sugere-se que o FGF10 possa estimular a ativação folicular por inibir a expressão da CYP19A1. De fato, o tratamento de células da granulosa de ovários de vaca com FGF10 reduziu a produção de estradiol (Buratini *et al*., 2007). Em adição, a injeção intrafolicular deste fator diminuiu a concentração de estradiol no fluido folicular e a expressão da CYP19A1 nestas células (Gasperin *et al*., 2012).

Essas observações estimularam a investigação dos efeitos do FGF10 sobre a esteroidogênese fetal. Fetos taurinos entre 80 e 90 dias de gestação foram utilizados nesse experimento uma vez que a produção de estradiol é maior nesse período que antecede o aparecimento dos folículos primordiais e sua ativação (Yang & Fortune, 2008). Contudo, contrariando a hipótese do estudo, a adição de FGF10 ao cultivo de fragmentos ovarianos fetais não alterou a produção de estradiol ou progesterona. Como já citado anteriormente, níveis reduzidos de estradiol e a expressão elevada do FGF10 coincidem temporalmente com o tempo de ativação folicular aumentada. Sendo assim, o uso de animais em idade gestacional anterior à formação folicular pode justificar a ausência de efeitos inibitórios deste fator no experimento. É possível que o FGF10 exerça ação anti-esteroidogênica somente após constituição folicular, uma vez que seu principal receptor (FGFR2B) está localizado em células da granulosa (Buratini *et al*., 2007).

Estudos recentes revelaram que os membros da família do FGF8 (FGF8, FGF17 e FGF18) também inibem a esteroidogênese em ovários adultos de vacas e ratas (Machado *et al*., 2009; Portela *et al*., 2008; Miyoshi *et al*., 2010). Observou-se ainda que o FGF18 diminui a expressão das enzimas esteroidogênicas, incluindo a CYP19A1, em células da granulosa bovinas (Portela *et al*., 2008). Sendo assim, investigou-se o padrão de expressão do FGF18 e de seus receptores (FGFR2C, FGFR3C e FGFR4) no ovário fetal bovino ao longo da gestação, bem como seus efeitos sobre a produção de estradiol e progesterona e expressão de enzimas esteroidogênicas em cultivo de fragmentos de ovários fetais bovinos. Níveis aumentados do RNAm do FGF18 foram observados entre os 120 e 150 dias da gestação, enquanto que a expressão do RNAm do FGFR3C foi reduzida aos 150 dias. Os baixos níveis de FGFR3C a partir desta idade estão temporalmente correlacionados com o os níveis crescentes da maioria das enzimas esteroidogênicas observados no presente trabalho. É possível que a expressão reduzida do FGFR3C enfraqueça a ação antiesteroidogênica do FGF18 a partir deste momento gestacional. Já os níveis aumentados da expressão do RNAm do FGF18 aos 120 e 150 dias coincidem com a elevação no número de folículos primários e com o surgimento dos folículos secundários nos ovários de fetos bovinos zebuínos (Castilho, 2008). A partir dessas idades gestacionais, o FGF18 passou a se localizar também nos oócitos de folículos primários e secundários, o que pode explicar o aumento dos níveis de RNAm no ovário fetal.

Os estudos de imunohistoquímica revelaram a presença do FGF18 concentrada nas chamadas “células stream”, aparentemente envolvidas na vascularização dos ovários em formação, e ocasional em oogônias em ovários fetais no início do desenvolvimento (Garverick *et al*., 2010). Em idades gestacionais iniciais, a co-localização da CYP19A1 e do FGF18 nas “células stream” pode indicar ação autócrina deste fator no controle da expressão da CYP19A1. No entanto, em idade próxima ao segundo terço gestacional, as proteínas da CYP19A1 (Burkhart *et al*., 2010) e do FGF18 passam também a ser detectadas em células da granulosa e oócitos de folículos pré-antrais, respectivamente. Isto sugere efeito parácrino deste fator na aromatização nas células da granulosa a partir deste momento. Em adição, a presença inicial do

FGF18 em algumas oogônias pode indicar sua participação na intensa atresia deste tipo celular que ocorre durante o desenvolvimento ovariano inicial (Juengel *et al*., 2002). Isto é reforçado pela influência do FGF18 no processo atrésico demonstrada em folículos antrais bovinos (Portela *et al*., 2010).

A ação antiesteroidogênica do FGF18 no ovário fetal foi efetivamente demonstrada pelos estudos utilizando o sistema de cultivo. A adição de FGF18 ao cultivo de fragmentos de ovários com idades anteriores à formação folicular reduziu a produção de estradiol e progesterona, em concordância com os relatos prévios em folículos antrais (Portela *et al*., 2010). Esses resultados estimularam a investigação de mecanismos envolvidos na inibição da esteroidogênese fetal pelo FGF18. Para tanto, fragmentos ovarianos de fetos zebuínos de cerca de 120 dias de idade foram desafiados com FGF18 e a expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas foi avaliada. O FGF18 reduziu a expressão das enzimas CYP19A1 e a CYP11A1, concordando com a redução esteroidogênica provocada por este fator. É provável que os níveis reduzidos de RNAm da CYP19A1 sejam responsáveis pela supressão na produção do estradiol, enquanto que a expressão reduzida da CYP11A1 pode ter influenciado tanto o produção de estradiol quanto de progesterona. Todavia, esses resultados discordam parcialmente da ação do FGF18 sobre células da granulosa de ovários bovinos adultos, onde a expressão de todas as enzimas esteroidogênicas foi suprimida (Portela *et al*., 2008). As razões para tal discrepância são desconhecidas, mas não se pode descartar a possibilidade de que o baixo número de réplicas do experimento (n=3) possa ter sido insuficiente para observar efeitos inibitórios do FGF18 sobre as demais enzimas.

II. CONCLUSÕES GERAIS

1. O RNAm das enzimas esteroidogênicas (StAR, CYP11A1, 3β-HSD, CYP17A1, CYP19A1 e 17β-HSD) é expresso em ovários de fetos bovinos ao longo da gestação.

2. A expressão decrescente da CYP19A1 entre os 60 e 90 dias da gestação indica envolvimento desta enzima no declínio da produção de estradiol relatado previamente nesse período da gestação.

3. O FGF18 e seus receptores (FGFR2C, FGFR3C e FGFR4) estão expressos no ovário fetal bovino ao longo da gestação.

4. A expressão do RNAm do FGF18 aumenta entre os dias 120 e 150 da gestação, o que sugere intensificação da participação do FGF18 na inibição da produção de esteróides nesse período.

5. O FGF18, mas não o FGF10, inibe a produção de estradiol e progesterona em cultura de fragmentos ovarianos fetais no início da gestação, antes da formação e ativação folicular.

6. O FGF18 inibe a expressão das enzimas CYP11A1 e CYP19A1 no ovário fetal bovino cultivado durante a fase de intensificação da ativação folicular.

BIBLIOGRAFIA[3]

As referências bibliográficas abaixo relacionadas são referentes aos capítulos 1 e 4, sendo que a bibliografia dos capítulos 2 e 3 encontram-se inseridas nos mesmos.

ALMEIDA A.P.; SARAIVA M.V.; ALVES FILHO J.G.; SILVA G.M.; GONÇALVES R.F.; BRITO I.R.; SILVA A.W.; LIMA A.K.; CUNHA R.M.; SILVA J.R.; FIGUEIREDO J.R. Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Reprod. Domest. Anim*., v.47, n.1, p.20-25, 2011.

BAIRD A.; HSUEH A.J. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul. Pept*., v.16, n.3-4, p.243-250, 1986.

BAO B.; GARVERICK H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci*., v.7, p.1903-1921, 1998.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod*., v.56, p.1158-1168, 1997.

BASILICO C.; MOSCATELLI D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res*., v.59, p. 115-165, 1992.

BERISHA B.; SINOWATZ F.; SCHAMS D. Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev*., v.67, p.162-171, 2004.

BILLIAR R.B.; ZACHOS N.C.; BURCH M.G.; ALBRECHT E.D.; PEPE G.J. Up-regulation of alpha-inhibin expression in the fetal ovary of estrogen-suppressed

[3]ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

baboons is associated with impaired fetal ovarian folliculogenesis.*Biol. Reprod*., v.68, n.6, p.1989-1996, 2003.

BRAW-TAL R.; ROTH Z. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and earlyantral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*, v.129, p.453-461, 2005.

BURATINI J. JR., GLAPINSKI V.F., GIOMETTI I.C., TEIXEIRA A.B., COSTA I.B., AVELLAR M.C., BARROS C.M., PRICE C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and-4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev*., v.70, n.3, p.255-261, 2005.

BURATINI J. JR.; PINTO M.G.; CASTILHO A.C.; AMORIM R.L.; GIOMETTI I.C.; PORTELA V.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, n.4, p.743-750, 2007.

BURKHART M.N.; JUENGEL J.L.; SMITH P.R.; HEATH D.A.; PERRY G.A.; SMITH M.F.; GARVERICK H.A. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. *Anim. Reprod. Sci*.; v.117, p.43-54, 2010.

CASTILHO, A.C.S. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. [s.n.], 2008. Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

CHAVES R.N.; LIMA-VERDE I.B.; CELESTINO J.J.; DUARTE A.B.; ALVES A.M.; MATOS M.H.; CAMPELLO C.C.; NAME K.P.; BÁO S.N.; BURATINI J. JR.; FIGUEIREDO JR. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles.*Domest. Anim. Endocrinol*., v.39, n.4, p.249-258, 2010.

CHEN Y.; JEFFERSON W.N.; NEWBOLD R.R.; PADILLA-BANKS E.; PEPLING M.E. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, v.148, p.3580-3590, 2007.

CHO J.H.; ITOH T.; SENDAI Y.; HOSHI H. Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Mol. Reprod. Dev*., v.75, p.1736–1743, 2008.

CONLEY A.J.; BIRD I.M. The role of cytochrome P450 17α-hydroxylase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the ∆5 and ∆4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod*., v.56, p.789-799, 1997.

COOKE F.N.; PENNINGTON K.A.; YANG Q.; EALY A.D. Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm.*Reproduction*, v.137, n.2, p.259-269, 2009.

DOMINGUEZ M.M.; LIPTRAP R.M.; BASRUR P.K. Steroidogenesis in fetal bovine gonads. *Can. J. Vet. Res.*, v.52, p.401-406, 1988.

DOREY K.; AMAYA E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*, v.137, p.3731-3742, 2010.

DU X.; XIE Y.; XIAN C.J.; CHEN L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J. Cell. Physiol*. 2012.

ERICKSON B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci*., v.25, n.3, p.800-805, 1966.

FIGUEIREDO J.R.; CELESTINO J.J.H.; RODRIGUES A.P.R.; SILVA J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Rev. Bras. Reprod. Anim*., v.31, n.2, p.143-152, 2007.

FORTUNE J.E. The early stages of follicular development: activaiton of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci*., v.78, p.135-163, 2003.

FORTUNE J.E.; RIVERA G.M.; EVANS A.C.; TURZILLO A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*., v.65, n.3, p.648-654, 2001.

FORTUNE, J.E.; QUIRK, S.M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci*., v.66, p.1-8, 1988.

GARVERICK H.A.; JUENGEL J.L.; SMITH P.; HEATH D.A.; BURKHART M.N.; PERRY G.A.; SMITH M.F.; MCNATTY K.P. Development of the ovary and

ontongeny of mRNA and protein for P450 aromatase (arom) and estrogen receptors (ER) alpha and beta during early fetal life in cattle. *Anim. Reprod. Sci*., v.117, p.24-33, 2010.

GASPERIN B.G.; FERREIRA R.; ROVANI M.T.; SANTOS J.T.; BURATINI J. PRICE C.A.; GONÇALVES P.B. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol production *in vivo* in cattle.*Reproduction*, v.143, n.6, p.815-823, 2012.

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.

GUERRA D.M.; GIOMETTI I.C.; PRICE C.A.; ANDRADE P.B.; CASTILHO A.C.; MACHADO M.F.; RIPAMONTE P.; PAPA P.C.; BURATINI J. JR. Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum.*Reprod. Fertil. Dev*., v.20, n.6, p.659-664, 2008.

GUPTA P.S.; NANDI S.; RAVINDRANATHA B.M.; SARMA P.V. *In vitro* culture of buffalo (Bubalus bubalis) preantral follicles.*Theriogenology*, v.57, n.7, p.1839-1854, 2002.

HEINZLE C.; SUTTERLÜTY H.; GRUSCH M.; GRASL-KRAUPP B.; BERGER W.; MARIAN B. Targeting fibroblast-growth-factor-receptor-dependent signaling for cancer therapy.*Expert. Opin. Ther. Targets*, v.15, n.7, p.829-846, 2011.

IGARASHI M.; FINCH P.W.; AARONSON S.A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF7). *J. Biol. Chem*., v.273, p.13230-13235, 1998.

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

ITOH N.; ORNITZ D.M. Functional evolutionary history of the mouse FGF gene family.*Dev. Dyn*., v.237, n.1, p.18-27, 2008.

ITOH, N. Hormone-like (endocrine) FGFs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell. Tissue Res*., v.342, n.1, p.1-11, 2010.

JIANG J.Y.; CHEUNG C.K.; WANG Y.; TSANG B.K. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front .Biosci*., v.1, n.8, p.222-37, 2003.

JIN X.; HAN C.S.; YU F.Q.; WEI P.; HU Z.Y.; LIU Y.X. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol. Reprod. Dev*., v.70, p.82-90, 2005.

JUENGEL J.L.; SAWYER H.R.; SMITH P.R.; QUIRKE L.D.; HEATH D.A.; LUN S.; WAKEFIELD S.J.; MCNATTY K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol*., v.191, p.1-10, 2002.

KEZELE P.; NILSSON E.E.; SKINNER M.K. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod*., v.73, n.5, p.967-973. 2005.

KEZELE P.; SKINNER M.K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, v.144, p.3329-3337, 2003.

KORC M.; FRIESEL R.E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr. Cancer Drug. Targets*., v.9, n.5, p.639-651, 2009.

KRYSKO D.V.; DIEZ-FRAILE A.; CRIEL G.; SVISTUNOV A.A.; VANDENABEELE P.; D'HERDE K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. Apoptosis, v.13, n.9, p.1065-1087, 2008.

KSIAZKIEWICZ L.K. Recent achievements in *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reprod. Biol.*, v.6, n.1, p.3-16, 2006.

LONERGAN P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl*., v.64, p.315-325, 2007.

LIN Y.; WANG F. FGF signalling in prostate development, tissue homoeostasis and tumorigenesis.*Biosci Rep*., v.30, n.5, p.285-291, 2010.

MACHADO M.F.; PORTELA V.M.; PRICE C.A.; COSTA I.B.; RIPAMONTE P.; AMORIM R.L.; BURATINI J. JR. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles.*J. Endocrinol*., v.202, n.3, p.347-353, 2009.

MATOS M.H.; VAN DEN HURK R.; LIMA-VERDE I.B.; LUQUE M.C.; SANTOS K.D.; MARTINS F.S.; BÁO S.N.; LUCCI C.M.; FIGUEIREDO J.R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles.*Cells Tissues Organs*, v.186, n.2, p.112-120, 2007.

MCGEE E.A.; CHUN S.Y.; LAI S.; HE Y.; HSUEH A.J. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles.*Fertil. Steril*., v.4, p.732-738, 1999.

MCNATTY K.P.; FIDLER A.E.; JUENGEL J.L.; QUIRKE L.D.; SMITH P.R.; HEATH D.A.; LUNDY T., O´CONNELL A.; TISDALL DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol. Cell. Endocrinol*., v.163, p.11-20, 2000.

MIYOSHI T.; OTSUKA F.; YAMASHITA M.; INAGAKI K.; NAKAMURA E.; TSUKAMOTO N.; TAKEDA M.; SUZUKI J.; MAKINO H. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells.*Mol. Cell. Endocrinol*., v.325, n.1-2, p.84-92, 2010.

MOTTA P.M.; NOTTOLA S.A.; MAKABE S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development.*Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*., v.75, n.1, p.5-10, 1997.

NILSSON E.; PARROTT J.A.; SKINNER M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Mol. Cell. Endocrinol., v.175, n.1-2, p.123-130, 2001.

NILSSON E.E, SKINNER M.K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. Mol. Cell. Endocrinol., v.313, p.9-16, 2009.

NILSSON E.E.; SKINNER M.K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endocrinol*., v.214, n.1-2, p.19-25, 2004.

ORNITZ D.M.; XU J.; COLVIN J.S.; MCEWEN D.G.; MACARTHUR G.A.; COULIR F.; GAO G.; GOLDFARB M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem*., v.271, p.15292-15297, 1996.

OTSUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosecell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.

PARROTT J.A.; SKINNER M.K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol. Reprod. Dev.*, v.55, p.55-64, 2000.

PARROTT J.A.; SKINNER M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis.*Endocrinology*., v.140, n.9, p.4262-4271, 1999.

PELUSO J.J. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action.*Biochem Pharmacol*., v.66, n.8, p.1363-1369, 2003.

PEPLING M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, v.44, n.12, p.622-632, 2006.

PORTELA V.M.; MACHADO M.; BURATINI J. JR.; ZAMBERLAM G.; AMORIM R.L.; GONCALVES P.; PRICE C.A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle.*Biol. Reprod.*, v.83, n.3, p.339-346, 2010.

QUIRKE L.D.; JUENGEL J.L.; TISDALL D.J.; LUN S.; HEATH D.A.; MCNATTY K.P. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol. Reprod*., v.65, p.216-228, 2001.

RUSNATI M.; PRESTA M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies.*Curr. Pharm. Des*., v.13, n.20, p.2025-2044, 2007.

SAWYER H.R.; SMITH P.; HEATH D.A.; JUENGEL J.L.; WAKEFIELD S.J.; MCNATTY K.P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod*., v.66, n.4, p.1134-1150, 2002.

RÜSSE I. Oogenesis in cattle and sheep.*Bibl. Anat*., v.24, p.77-92, 1983.

SCARAMUZZI R.J.; BAIRD D.T.; CAMPBELL B.K.; DRIANCOURT M.A.; DUPONT J.; FORTUNE J.E.; GILCHRIST R.B.; MARTIN G.B.; MCNATTY K.P.; MCNEILLY A.S.; MONGET P.; MONNIAUX D.; VIÑOLES C.; WEBB R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev*., v.23, p.444-467, 2011.

SHEMESH M.; AILENBERG M.; MILAGUIR F.; AYALON N.; HANSEL W. Hormone production by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. *Biol. Reprod*., v.19, p.761-767, 1978.

SU Y.Q.; WIGGLESWORTH K.; PENDOLA F.L.; O'BRIEN M.J.; EPPIG J.J. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for

gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, v.143, p.2221-2232, 2002.

TANAKA Y.; NAKADA K.; MORIYOSHI M.; SAWAMUKAI Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction*, v.121, p.777-782, 2001.

TARU SHARMA G.; DUBEY P.K.; SAI KUMAR G. Effects of IGF-1, TGF-α plus TGF-β1 and bFGF on *in vitro* survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (Bubalis bubalus) preantral follicles. *Growth Horm. IGF Res*., v.20, p.319-325, 2010.

VAN DEN HURK R.; BEVERS M.M.; BECKERS J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.

VAN WEZEL I.L.; UMAPATHYSIVAM K.; TILLEY W.D.; RODGERS R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol*., v.115, n.2, v.133-140, 1995.

VERNON R.K.; SPICER L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulose cells. *J. Anim. Sci*., v.72, n.10, p.2696-2702, 1994.

WANDJI S.A.; EPPIG J.J.; FOTUNE J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.45, p.817-832, 1996a.

WANDJI S.A.; SRSEN V.; VOSS A.K.; EPPIG J.J.; FORTUNE JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles.*Biol. Reprod*., v.55, n.5, p.942-948, 1996b.

WANG C, ROY SK. Development of primordial follicles in the hamster: role of estradiol-17beta. *Endocrinology*, v.148, p.1707-1716, 2007.

XU Z.; GARVERICK H.A.; SMITH G.W.; SMITH M.F.; HAMILTON S.A.; YOUNGQUIST R.S. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular age. *Endocrinology*, v.136, p.981-989, 1995b.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing

hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod*., v.53, p.951-957, 1995a.

YANG M.Y.; FORTUNE J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod*., v.78, p.1153-116, 2008.

ZACHOS N.C.; BILLIAR R.B.; ALBRECHT E.D.; PEPE G.J. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol. Reprod*., v.67, p.1148-1156, 2002.

ZHANG K.; HANSEN P.J.; EALY A.D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*, v.140, p.815–826, 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, 15694–15700, 2006.

ZHOU H.; ZHANG Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domestic Animal Endocrinology*, v.28, n.3, p.235-242, 2005.

ANEXOS

Os manuscritos 1 e 2 foram redigidos nas normas dos Jornais Animal Reproduction e Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, respectivamente.



1) ANIMAL REPRODUCTION

Instructions to authors

The Animal Reproduction–AR publishes original scientific papers and invited literature reviews, with a goal of contributing to a better understanding of phenomena related to animal reproduction.

All correspondence should be sent to:
Editor
Animal Reproduction
Alameda das Princesas 1275 – Bairro São José
31275-180 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Tel.: +55 (31) 3491-7122 - Fax: +55 (31) 3491-7025
E-mail: animreprod@cbra.org.br

Submission of Manuscripts
All manuscripts must be original and copyright should be transferred to the AR. The authors are entirely responsible for all data, concepts and information contained in the article. Manuscripts should be sent preferentially by email or by regular post on a PC readable CD-ROM, properly identified and accompanied by a copy of the written manuscript. Illustrations should be sent as separate files.

All manuscripts must be written in Standard American English. We recommend Merriam-Webster's Dictionary (Merriam-Webster's Online: http://www.m-w.com/) for spelling check. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a reviewer familiar with scientific language and vocabulary. Manuscripts not written in acceptable

Standard English will be returned to the author before being sent to the scientific reviewers. Manuscripts accepted for publication will be submitted to a final review of English by the Journal and the final version will be sent to the author for approval. The manuscripts that are not accepted will be returned to the authors. The AR Editors goal is to have the first decision about the acceptance or not of the manuscript in a time period of thirty days.

Units of measurements, Abbreviations and Symbols
Units of measurements must be used according to the international System of Units. Abbreviations and Symbols – Avoid them unless using standard units of measurement.

Complementary Information
The author is entitled to ten reprints. Copies and translation of any article for commercial use are prohibited and publication in other scientific journals must be approved by the AR.

Revision Process
Manuscripts will be submitted to at least two reviewers and will be returned to the authors for final editing according to the reviewers suggestions. The revised manuscript should be sent to the Editor.

Preparation of Manuscripts
1. Text Format and Files: Type all pages to A4 (21.0 x 29.7), with 3 cm margins, Times New Roman source 12, continuously and without formatting, double spaced, with numbered lines and numbered pages. The electronic file (.doc) should be formatted to MICROSOFT WORD (6.0 version or superior).

2. Manuscript Sections
i. Title page
ii. Abstract
iii. Introduction
iv. Materials and Methods
v. Results
vi. Discussion
vii. References
viii. Acknowledgements
ix. List of abbreviations used
x. Tables
xi. Figures

3. Title page: The title should be succinct but include the study design and major topics.
a. Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in upper case.
b. Author names are to be listed below the title, only the surname in full (first and middle names will be represented by the first letter followed by a period). Follow each name with exponents in Arabic numerals to indicate affiliations and addresses (e.g.: R.A. Hess1; K. Carnes2).

c. Addresses should be listed below the author names and in numerical order.
d. Corresponding author should be listed next with complete mailing address, phone and fax number, and email address.
e. Article type: indicate the area in which the article fits best: Basic Research, Biotechnology or Applied Research.
f. Running title: no more than 50 letters, including spaces.

4. Abstract: State clearly the purpose of the work, indicate the methods used and summarize conclusions. Limit: 300 words. Keywords should be listed after the abstract. Maximum of 5 keywords.

5. Introduction: This section should provide background information leading up to the hypothesis tested. The section should end with a very brief statement of the objectives of the work.

6. Methods: Should include the design of the study, type of materials involved, number of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to published methods, and the type of analysis used.

7. Results: The results section may be broken into subsections with short, informative headings. State clearly and objectively the main results found.

8. Discussion: This section may be broken into subsections with short, informative headings. The discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

9. Acknowledgments: Should be briefly expressed. Grant support with the author initials (i.e., DHP) should be indicated in this section.

10. Tables: A set of alphanumerical data that is organized in lines and columns. Begin each table on a new page. Tables must be as simple as possible and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. The table legend, at the top, must receive initially the word Table, followed by its number in Arabic numerals and referred to in the text as Table. The legends of the tables must be sent separately.

12. Figures and figure legends: Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, fluxograms etc. are considered as figures. They should be identified and sent in separate file. The list of table titles and figure legends should begin on a new page within the text. In the text refers to the figures in the numerical order that they are listed; i.e., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc. The legends of the figures must be sent separately.

13. References: Begin the reference list on a new page. Please see below examples for references cited in the text and for the reference list.

TEXT CITATION - Indication of the source parenthetically after the citation in order to avoid interruption in the sequence of the text. In case the names of the authors are integrated in the text, the date of publication is mentioned between parenthesis, after the name of the author, according to the examples:
a) sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992).
b) two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990).
c) more than two authors: (Quintero *et al*., 2000) or Quintero *et al*. (2000).
d) more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal *et al*., 1999a; b; Quintero *et al*., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal *et al*., (1999a; b); Quintero *et al*. (2000), always cited in ascending chronological order.

REFERENCE LIST - Cite only referred, published work. Use "in press" only when formal acceptance has been granted. References must be listed in alphabetical order.

• For PERIODICALS

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. 1999a. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. Biol Reprod, 61:724–730.

Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. 1999b. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. Theriogenology, 52:803-814.

Hess RA, Carnes K. 2004. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. Anim Reprod, 1:5-30.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim Reprod, 1:86-90, 2004.

Varley MA, Foxcroft GR. 1990. Endocrinology of lactating and weaned sow. J Reprod Fertil Suppl, 40:47-61.

• For OTHER DOCUMENTS than periodicals

Basrur PK, Yusoff RBH. 1997. Sex anomalies in goats. In Youngquist, RS (Ed.). Current therapy in large animal theriogenology. Philadelphia, USA: WB Saunders. pp.553-290

Ginther OJ. 1992. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing. pp.105-172.

Leal MC. 2004. Morphometric and functional analyses of testis and spermatogenic efficiency in the marmoset (Callithrix penicillata) [in Portuguese]. Belo Horizonte, Brazil: Federal University of Minas Gerais. Thesis.

Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. 2000. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction, 2000, Stockholm, Sweden. Stockholm: ICAR. pp .290.

• For ELECTRONIC DOCUMENTS

CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. 2002. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Journal article on the Internet

Abood S. 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet], 102: 3pp. Available in: http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm. Accessed in: Aug 12th 2002.

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H. (Eds.). 2001. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press. Available from: http://www.nap.edu/books/0309074029/html/. Accessed in: July 9th. 2002.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. 2002. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc. Available in: http://www.cancer-pain.org/. Accessed in: Jul 9th. 2002.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. 2001. Chicago: The Association. Available from: http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html. Accessed in: Aug 12th. 2002.

Database on the Internet

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. 2000. Evanston, IL: The American Board of Medical Specialists. Available from: http://www.abms.org/newsearch.asp. Accessed in: Mar 8th. 2001.

Closed database:

Jablonski S. 2001. Online Multiple Congential Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) syndromes [database on the Internet]. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html. Accessed in: Aug 12th. 2002.

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. 2002. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Meta-analysis; unique ID: D015201; [3pp.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html Files updated weekly. Accessed in: Jun 10th. 2003.

• NON PUBLISHED WORK – Should be mentioned only in the text and not in the list of references.

• VERBAL INFORMATION- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list but should be mentioned in the text. After the information, the author must put the expression “verbal information" or "personal communication")

13. There is no page charges and figures limit. Particularly in case of colorful pictures please contact the editors.

14. If you have any question please report to the Animal Reproduction Website (http//www.cbra.org.br/animreprod) and see previously published articles



2) BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH AND ANIMAL SCIENCE

Diretrizes para Autores

O periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* é publicado bimestralmente e destina-se a publicar trabalhos científicos sobre medicina veterinária e ciências afins. O processo de avaliação do BJVRAS segue os princípios da revisão por pares (peer review). Todo trabalho é submetido a uma avaliação inicial pelos editores, quanto aos padrões mínimos de exigências e normas da revista e após é encaminhado aos editores de área. O manuscrito é então enviado para, pelo menos, três assessores ad hoc que o avaliam fazendo comentários e sugestões de mudanças e emitindo um parecer quanto à aprovação para publicação. É mantido o anonimato entre autores e assessores. Os editores de área, de posse das recomendações dos assessores, tomarão a decisão final. Quando forem sugeridas modificações, estas serão encaminhadas aos autores para resposta e, em seguida, retornam aos editores de área para que verifiquem se as exigências foram atendidas. Os artigos serão aceitos levando em consideração originalidade, relevância e contribuição científica do trabalho para o conhecimento da área. A lista de colaboradores (relatores) é publicada no último fascículo/ano de cada volume. No momento da submissão do trabalho à revista é obrigatório apresentar a aprovação do protocolo experimental por Comitê de Ética. Qualquer que seja o tipo do trabalho deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente a esse periódico, sendo obrigatório anexar declaração assinada por todos os autores expressando concordância no pagamento de tarifa como condicionante à sua publicação.

Artigo completo

1 - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, dentro da estrutura do item cinco, não sendo contadas as páginas onde constem tabelas e ilustrações. **2 -** Ser escrito em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3 -** Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4 –** Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão; e) Conclusões; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Key-words. **5 -** Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinqüenta) palavras, seguidos das

palavras-chave, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Nota prévia

1 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas**. 2 -** Ser escrita em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3 -** Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4 -** Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Artigos de revisão

Só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da Comissão Editorial. Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Apresentação dos trabalhos

1 - Digitação: original devidamente identificado com o título do artigo e nome do(s) autor(es), inclusive suas tabelas e referências; deve ser digitado, obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço simples, margens de 2,5cm, fonte Times New Roman tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas. Ilustrações e legendas devem ser relacionadas em folhas separadas. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se o editor de texto Microsoft Word. **2 - Página de rosto**: elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo, nome(s) do(s) autor(es), instituição, cidade, estado e país de origem. **Observar que unicamente nesta página conste a identificação dos autores, para o devido sigilo e imparcialidade.** No rodapé da página deve-se mencionar o endereço completo (inclusive e-mail) do autor para correspondência e os e-mails dos demais autores. Se o artigo for subvencionado, mencionar a instituição que o patrocinou, assim como os agradecimentos; **3 - Tabelas**: devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular**. 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da Comissão Editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra Tabela (por extenso). **4 - Ilustrações** (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras no texto. As ilustrações devem ser identificadas e com resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Aceitar-se-á um número máximo de nove ilustrações por artigo, sugerindo-se a seguinte

distribuição: três fotografias, três gráficos e três desenhos/esquemas. Acima deste limite, as despesas com reprodução correrão por conta do autor. Ilustrações coloridas, independentemente do número, serão cobradas. No texto devem ser indicadas pela palavra Figura (por extenso). **5 - Referências**: devem ser organizadas em ordem alfabética, ao final do artigo. Os títulos de periódicos devem ser mencionados todos por extenso. As referências seguem a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados.

Exemplos de Apresentação dos Autores nas Referências:
BONAGURA, J. D. (**um autor**)
SANTOS, J. A.; MELLO, M. R. (**dois ou mais autores - citar todos**)

Exemplo de periódico
1 KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeatibility on shelflife of sliced vacuum-pocked cooked ham. **Meat Science**, v. 42, n. 3, p. 333-345, 1996.

Exemplo de livro
2 HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology**. London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

Exemplo de autor diferente para o livro e capítulo
3 FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

Exemplo de mesmo autor para o livro e capítulo
4 THORTON, H. Deleterius changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection**. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Exemplo de tese
5 BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (***Capra hircus***, L.) normais criados no Estado de São Paulo**: influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

Exemplo de evento
6 OLIVEIRA, C. A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

Exemplo de livro eletrônico
7 POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle**. North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service, 1994. Disponível em: <http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>. Acesso em: 23 abr. 2007.

Exemplos de artigos de periódicos eletrônicos
8 MENDONÇA JR., C. X.; MARTINS, A. P.; MORI, A. V.; SILVA, A. B.; MORI, C. S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípides plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi_bin/wxis.exe/iach/scielo>. Acesso em: 31 jan. 2001

6 - Citações: utilizar o Sistema Autor/Data. A citação será pelo sobrenome de cada autor ou pelo nome da entidade responsável que aparece na respectiva referência. Quando se tratar de até três autores, todos devem ser citados. No caso de mais de três autores, a citação deve ser acompanhada pelo sobrenome do primeiro autor seguido da expressão *et al*. (sem itálico). Se a citação estiver inserida no texto utilizar letras maiúsculas e minúsculas; se estiver entre parênteses utilizar somente letras maiúsculas.

Exemplos:
Um autor
Segundo Yanaguita, 2003 ou (YANAGUITA, 2003)
Dois autores
Soares e Alves, 2004 ou (SOARES; ALVES, 2004)
Três autores
Bennett, Abee e Henrickson, 1999 ou (BENNETT; ABEE; HENRICKSON, 1999)
Quatro ou mais autores
Vilela *et al*., 2008
(VILELA *et al*. 2008)

Tarifa de publicação: A tarifa de publicação de R$ 40,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.
* Os artigos deverão apresentar, na submissão, o nome completo e endereço eletrônico de todos os autores

Condições para submissão
Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.
A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
URLs para as referências foram informadas quando possível.
O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

Declaração de Direito Autoral
Direitos Autorais para artigos publicados nesta revista são do autor, com direitos de primeira publicação para a revista. Em virtude da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

Política de Privacidade
Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Taxas para autores
Este periódico cobra as seguintes taxas aos autores.
Publicação de artigo: 40.00 (BRL)
Caso este documento seja aceito para publicação, será necessário o pagamento de uma taxa de publicação de artigo para auxiliar nos custos de publicação. R$ 40,00 por página. Consulte a política de isenção de taxas.
Caso não possa arcar com as taxas descritas, notifique a equipe editorial por meio do campo Comentários, pois não é de interesse da revista que quaisquer taxas impeçam a publicação de trabalhos de alta relevância para o público.

ISSN: 1678-4456