UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU

EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 17 E 18 (FGF-17 E FGF-18) EM FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS

MARIANA FERNANDES MACHADO

BOTUCATU – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 17 E 18 (FGF-17 E FGF-18) EM FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS

MARIANA FERNANDES MACHADO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu para obtenção do título de Mestre na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior

BOTUCATU – SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus Machado, Mariana Fernandes. Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 17 e 18 (FGF-17 e FGF-18) em folículos antrais bovinos / Mariana Fernandes Machado. – Botucatu : [s.n.], 2008 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008. Orientador: José Buratini Junior Assunto CAPES: 50504002 1. Bovino - Reprodução CDD 636.20824 Palavras-chave: Bovinos; FGF-17; FGF-18; Folículo antral

Este trabalho é dedicado à minha Avó Inês Molina Fernandes (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. À todas elas chamamos de amigo. Há muitos tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. Os primeiros que nascem do broto é o amigo pai e a amiga mãe, mostram o que é ter vida. Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós. Passamos a conhecer toda a família de folhas, a qual respeitamos e desejamos o bem. O destino ainda nos apresenta outros amigos, os guais não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho. Muitos desse são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz. Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora. Esses costumam colocar muitos sorrisos na face, durante o tempo que estamos por perto. Falando em perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que ficam nas pontas dos galhos, mas que quando o vento sopra, aparecem novamente entre uma folha e outra. O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações. O que nos deixa mais felizes é quando as folhas que caíram continuam por perto, continuam alimentando as nossas raízes com alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho. Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.

(Autor desconhecido)

5

Agradeço especialmente:

Aos meus pais Eleotério e Maria Aparecida que trilharam comigo este caminho, os mais profundos agradecimentos pelo apoio e carinho. Procuro entre as palavras àquela que gostaria que seus corações ouvissem e só encontro um simples e sincero: Obrigada!

Ao meu Orientador Prof. José Buratini Júnior, exemplo de homem e de pesquisador que muito me ajudou, permitiu-me ir em busca de meus sonhos, revelou-se humano e amigo e contribuiu para o meu crescimento pessoal e intelectual;

Ao Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal pela amizade, paciência e por compartilhar uma parcela do seu vasto conhecimento, além do auxílio na realização deste trabalho.

À minha querida irmã Fabiana e meu cunhado Gelson que sempre me fizeram levantar a cabeça e seguir adiante e, como se não fosse suficiente, presentearam-me com lindos sobrinhos Pedrinho e Matheus;

À meu querido irmão Rafael e minha cunhada Kátia, por sempre torcerem por mim;

Ao Prof. Dr. Alceu Mezzalira, que guiou meus primeiros passos na pesquisa científca;

Ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, sinônimo de integridade e dedicação, que sempre mostrou-se disposto a ajudar ;

Às minhas queridas amigas Raquel, Soraya, Cristina, Priscila, Fabiana e Crisley, que mesmo à distância me fazem lembrar o valor da verdadeira amizade. Aos meus grandes amigos Anthony e Isabela, que me ensinaram a base das técnicas utilizadas neste trabalho, sempre dispostos a ajudar. E também pela amizade que tornou o ambiente de trabalho o melhor possível.

Aos meus queridos amigos Diego, Ines, Paula, Rubia, Ester e Vitor por todos momentos divertidos que passamos juntos.

À amiga leda pela amizade sólida e verdadeira e alegre convivência.

Aos membros da banca Prof. Dr. Guilherme Nogueira e Profa. Dra Mayra Assumpção por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho;

Aos alunos de Pós-graduação do Departamento de Farmacologia Rafael, Thais, Renato e Walter e do Departamento de Reprodução Animal Ana Augusta, Viviane e Bruna e os bons momentos que compartilhamos.

Este trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos transmitidos durante o Curso de Pósgraduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade e colaboração;

Aos funcionários do Departamento de Patologia Animal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu), especialmente à Profa. Dra. Renee Laufer Amorim e Pedro pela ajuda na realização da Imunohistoquímica, e acima de tudo pela amizade e paciência; Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Paulo, Ana Cristina e Luiz pela amizade e apoio;

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UNESP – Araçatuba e à Profa. Dra. Maria Christina Werneck de Avellar do Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP – São Paulo, pelo auxílio no seqüenciamento durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

À funcionária da Empresa Lopes & Ribeiro, Janete Camargo Teixeira, pela amizade e carinho durante os anos em que convivemos;

Aos proprietários e funcionários do Frigorífico Frigol® de Lençóis Paulista-SP, pelo apoio à pesquisa;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

RESUMO

MACHADO, M.F. Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 17 e
18 (FGF-17 e FGF-18) em folículos antrais bovinos. Botucatu, 2008.
Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Fatores de crescimento fibroblástico têm sido descritos como importantes reguladores locais do desenvolvimento folicular. Recentemente, foi relatada a expressão do FGF-8 e seus receptores, FGFR-3c e -4, em folículos antrais bovinos. O FGF-17 e o FGF-18 pertencem à subfamília do FGF-8 e ativam eficientemente o FGFR-3c e FGFR-4. Objetivando identificar outros FGFs capazes de ativar estes receptores, investigou-se (a) os padrões de expressão do FGF-17 e FGF-18 em folículos antrais bovinos; (b) a regulação da expressão do RNAm do FGF-17 pelo FSH e IGF-1 em células da granulosa; (c) a expressão do RNAm do FGF-17 em oócitos imaturos e maturados in vivo e in vitro, e (d) a expressão das proteínas FGF-17 e FGF-18 em folículos antrais bovinos. Amostras de células da teca e células da granulosa foram obtidas de ovários de vacas de abatedouro e o RNA total destas células foi extraído. As concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) no fluido folicular foram mensuradas por Radioimunoensaio (RIA) e os folículos agrupados de acordo com a razão E2:P4 intrafoliculares (atrésicos; <0,01, transicionais; 1-0,01 e saudáveis; >1). "Pools" contendo 20 oócitos foram obtidos pela remoção das células do cumulus de complexos cumulus-oócito (CCOs) e o RNA total extraído. A expressão do FGF-17 e do FGF-18 foi investigada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão dos controles endógenos GAPDH, CYC-A ou Histona (H2a). Células da granulosa de folículos de 4 a 8 mm foram cultivadas em meio livre de soro fetal e tratadas com FSH (0; 0,1; 1; 10 ou 100 ng/mL) ou IGF-1 (0; 5; 10; 50; 100 ng/mL) para avaliar os efeitos dos tratamentos na expressão do RNAm do FGF-17. A presença das respectivas proteínas foi investigada por imunohistoquímica. Os dados foram analisados por ANOVA ou testes não-paramétricos quando a distribuição não foi normal. A expressão do RNAm do FGF-17 mostrou-se maior em células da granulosa do que em células da teca. Em ambos os tipos celulares a expressão do FGF-17

foi maior em folículos atrésicos. O RNAm do FGF-17 também foi detectado em "pools" de oócitos imaturos, mostrando-se reduzida em oócitos maturados in vivo e ausente em oócitos maturados in vitro. O FSH e o IGF-1 inibiram a expressão do RNAm do FGF-17 em células da granulosa cultivadas in vitro. O RNAm do **FGF-18** foi detectado em células da granulosa e. predominantemente, em células da teca, sem variação entre os estágios de desenvolvimento folicular. A análise imunohistoquímica confirmou a presença do FGF-17 e FGF-18 nos tipos celulares em que o RNAm foi detectado. Em conclusão, os dados presentes sugerem a participação do FGF-17 na interação entre oócitos e células do cumulus e do FGF-17 e FGF-18 na modulação da diferenciação e crescimento de folículos antrais bovinos.

Palavras-chave: FGF-17; FGF-18; folículo antral; bovino.

ABSTRACT

MACHADO, M.F. Expression of fibroblast growth factor 17 and 18 (FGF-17 and FGF-18) in bovine antral follicles. Botucatu, 2008. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Fibroblast growth factors have been described as important local regulators of follicle development. FGF-8 and its receptors, FGFR-3c and FGFR-4, have already been reported in bovine antral follicle. Aiming to identify other FGFs capable to activate this receptors, we assessed (a) the spatial and temporal patterns of FGF-17 and FGF-18 gene expression in bovine antral follicles; (b) FGF-17 mRNA regulation by FSH and IGF-1 in cultured granulosa cells ; (c) FGF-17 mRNA expression in immature oocytes and in vivo and in vitro matured oocytes; and (d) FGF-17 and FGF-18 protein expression in bovine antral follicles. Theca and granulosa cells samples were obtained from abattoir ovaries for total RNA extraction. Estradiol (E2) and progesterone (P4) concentrations were measured by RIA in the follicular fluid. Follicles were grouped according to health status based on the E2:P4 ratio (atretic: <0.01; transitional: 0.01-1; healthy: >1). Pools containing 20 oocytes were obtained by removing cumulus cells of cumulus-oocyte complexes (COCs) and total RNA was extracted. FGF-17 and FGF-18 mRNA expression was examined by semiquantitative real time RT-PCR using GAPDH, CYC-A or histone H2a as controls. Granulosa cells from follicles (4-8 mm) were cultured in serum-free medium supplemented with FSH (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL) or IGF-1 (0, 5, 10, 50, 100 ng/mL) to assess effects of treatments on FGF-17 mRNA expression. The presence of FGF-17 and FGF-18 proteins was investigated by immunohistochemistry. Data were analized by ANOVA or non-parametric analysis when not normally distributed. FGF-17 mRNA expression was detected predominantly in granulosa cells but also in theca cells, and was higher in atretic follicles. FGF-17 mRNA was also detected in immature oocytes, was reduced in in vivo matured oocytes and absent in in vitro matured oocytes. FSH and IGF-1 inhibited FGF-17 mRNA expression in cultured granulosa cells. FGF-18 mRNA was detected predominantly in theca cells but also in granulosa cells,

without varying through follicular developmental stages. Imunnohistochemical analysis revealed the presence of FGF-17 and FGF-18 in accordance with mRNA data. In conclusion, present data suggest a role for FGF-17 in oocyte*cumulus* cells interaction and for FGF-17 and FGF-18 in the control of differentiation and growth of bovine antral follicles.

Key-words: FGF-17; FGF-18; antral follicle; bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura dos FGFRs e "splicing" alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR-1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de Eswarakumar *et al.* (2005).
- Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs, adaptado de Eswarakumar *et al.* (2005).
- Figura 3. Modelo matemático da expressão relativa por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em uma amostra em relação à amostra controle e à expressão do gene endógeno. E_{target} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do gene referência; ΔCP_{target} é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCP_{ref} é desvio de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.
- Figura 4. Resultados da amplificação por PCR em tempo real do FGF-17 e FGF-18 em células da granulosa e da teca (a e b: curvas de amplificação do FGF-17 em células da granulosa e da teca, respectivamente; c e d: curvas de amplificação do FGF-18 em células da granulosa e da teca, respectivamente.
- Figura 5. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).</p>

- Figura 6. Valores relativos da expressão gênica do FGF-18 em células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).</p>
- Figura 7. Resultados da amplificação por PCR em tempo real do FGF17 e FGF18 em oócitos (a e b: curva de amplificação do FGF-17 e FGF-18 em oócitos, respectivamente).
- Figura 8. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vivo* (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas representam diferença significativa; p<0,05).</p>
- Figura 9. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em células da granulosa cultivadas com doses crescentes de FSH ou IGF-1. (n=3 réplicas por tratamento; letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).</p>
- Figura 10. Imagem representativa da imunolocalização do FGF-17 e do FGF-18 em folículo antral bovino. A proteína FGF-17 foi detectada em células da granulosa (CG), células da teca (CT) e oócito (O; Painéis A e C). A proteína FGF-18 foi detectada em células da granulosa e células da teca (Painel D). B e E representam os controles negativos para FGF-17 e FGF-18, respectivamente. EO (estroma ovariano) e VS (vaso sanguíneo)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para amplificação do GAPDH, CYC-A, H2A, FGF-17 e FGF-18 utilizando o sistema de detecção Taqman.
- Tabela 2. Tamanho do amplicon, condições e eficiências de amplificação para cada par de primers utilizado nos experimentos.
- Tabela 3. Média de Cts para cada gene nos diferentes tipos celulares estudados.

ABREVIATURAS

- 36HSD 3-beta hidroxiesteróide desidrogenase
- µg micrograma
- µL microlitro
- µm micrômetro
- A antisense
- ANOVA Análise de variância
- BMP proteína morfogênica óssea
- CCO complexo cumulus-oócito
- cDNA ácido desoxirribonucléico complementar
- CIDR-B dispositivo intravaginal de progesterona
- CN controle negativo
- CO₂ gás carbônico
- CP controle positivo
- Ct ciclo threshold (limiar de detecção da fluorescência)
- CYP19A1 aromatase
- CYP17A1 17α-hidroxilase
- CYC-A ciclofilina
- **DEPC** dietilpirocarbonato
- DNA ácido desoxirribonucléico
- DNAse enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
- dNTP nucleotídeos
- E2 estradiol
- EDTA ácido etilenodiaminotetracético
- EGF fator de crescimento epidermal
- EPM erro padrão da média
- FGF fator de crescimento fibroblástico
- FGFBP proteína ligadora de fator de crescimento fibroblástico
- FGFR receptor para fator de crescimento fibroblástico
- FRS2 substrato do receptor de FGF-2
- FSH hormônio folículo estimulante
- FSHR receptor do hormônio folículo estimulante
- **g** força G

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDF - fator de crescimento de diferenciação

Grb2 - proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2

H2a – histona

hCG - gonadotrofina coriônica humana

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBP - proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à Insulina.

IM - intra muscular

KDa - kilo-dáltons

KGF - fator de crescimento dos queratinócitos

KL - kit ligante

Km - quilômetro

LH - hormônio luteinizante

LHR - receptor do hormônio luteinizante

M - molar

MAPK - proteína quinase mitógeno ativada

mg - miligrama

MgCl2 - cloreto de magnésio

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar

mm - milímetro

ng – nanograma

nm – nanômetro

nM - nanomolar

°C - grau celsius

P₄ - progesterona

PAPP-A - proteína plasmática associada à gestação A

pb - pares de base

PBS - tampão de fosfato e salina

PCR - reação em cadeia da polimerase

pg – picograma

 $PGF_{2\alpha}$ – prostaglandina $F_{2\alpha}$

pH - potencial hidrogeniônico

PIV – produção in vitro de embriões

RNA - ácido ribonucléico

RNAm - ácido ribonucléico mensageiro

RNAse - enzima que degrada o ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

RT - reação de transcrição reversa

RT-PCR - reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da

polimerase

S - "sense"

SCF - fator de células tronco

SFB – soro fetal bovino

TBE - tris, ácido bórico e EDTA

TCM – meio de cultura de tecido

TGF- β - fator de crescimento transformante beta

TZP - projeções transzonais

U – unidades

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UV - ultravioleta

V – volts

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
ABREVIATURAS	16
SUMÁRIO	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Desenvolvimento folicular	23
2.1.1. Fase Pré-antral	23
2.1.2. Comunicação Oócito- <i>cumulus</i>	24
2.1.2.1. Maturação oócitária	25
2.1.3. Fase Antral	26
2.1.3.1. Recrutamento e seleção folicular	27
2.1.3.2. Fatores de crescimento produzidos localmente	30
2.2. O sistema FGF	31
2.2.1. FGFs e seus receptores (FGFR)	31
2.2.2. FGF-17 e FGF-18	34
2.2.3. O papel dos FGFs no desenvolvimento folicular ovariano	37
3. OBJETIVOS	41
3.1. Geral	41
3.2. Hipóteses	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Obtenção dos folículos antrais	42
4.1.1. Obtenção de células da granulosa e de células da teca	42
4.1.2. Obtenção dos oócitos	43
4.1.2.1 Oócitos Imaturos	43
4.1.2.2. Oócitos maturados in vitro (MIV)	44
4.1.2.3. Oócitos maturados <i>in vivo</i>	44

4.2. Extração do RNA total	45
4.2.1. Extração do RNA total de células da teca e células da	45
granulosa	45
4.2.2. Extração de RNA total dos oócitos	46
4.3. Radioimunoensaio	47
4.4. Classificação folicular	47
4.5. RT-PCR em tempo real	48
4.5.1. Protocolo DNAse I	48
4.5.2. Reação de transcrição reversa (RT)	48
4.5.3. Validação da PCR em tempo real	49
4.6. Cultivo de células da granulosa	53
4.7. Investigação qualitativa da proteína por imunohistoquímica	54
4.7.1. FGF-17	54
4.7.2. FGF-18	54
4.8. Análise dos dados	55
5. RESULTADOS	56
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS	68
ARTIGO CIENTÍFICO	83

1. INTRODUÇÃO

A gônada feminina tem como principal função a diferenciação e ovulação de um oócito maturo. Ao longo da foliculogênese, os oócitos sofrem diversas modificações morfológicas e bioquímicas, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação e são responsáveis por tornar o oócito competente, ou seja, apto para a fertilização e subseqüente desenvolvimento embrionário (Brevini Gandolfi & Gandolfi, 2001). O folículo ovariano é a unidade estrutural que fornece o microambiente necessário para a aquisição da competência de desenvolvimento pelo oócito.

Algumas biotécnicas de reprodução assistida têm sido empregadas com o objetivo de melhor aproveitar a população folicular de fêmeas geneticamente superiores. Entre elas, destacam-se a superovulação e a aspiração folicular aliada à produção *in vitro* de embriões; a maturação oocitária *in vitro* que constitui técnica essencial para a clonagem e transgenia; e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais. Contudo, os mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular ainda não foram completamente esclarecidos e têm sido amplamente investigados por serem pré-requisitos para o melhor aproveitamento do potencial reprodutivo de espécies de interesse econômico.

Sabe-se que além da ação endócrina fundamental das gonadotrofinas, fatores de crescimento produzidos localmente têm importante papel no controle parácrino e autócrino do desenvolvimento folicular, dentre eles, os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs; McNatty *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 2003). Os FGF são necessários para muitos processos biológicos e induzem atividades mitogênicas, quimiotáxicas e angiogênicas de uma grande variedade de células e tecidos.

Alguns membros já foram identificados como potenciais reguladores da função ovariana. A participação do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF ou FGF-2), do FGF-7 e do FGF-10 no controle da foliculogênese já foi relatada (McNatty *et al.*, 1999; Parrott *et al.*, 1994; Buratini *et al.*, 2007). Além disso, a expressão do RNAm do FGF-8 e seus receptores (FGFR-3c e FGFR-4) foi detectada em folículos pré-antrais e antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005ab). Evidências de regulação da expressão gênica desse sistema foram

observadas nesses estudos, indicando sua participação no controle da foliculogênese (Buratini *et al.*, 2005b).

O RNAm que codifica o FGFR-4 foi exclusivamente detectado em células da teca, sendo que a RT-PCR semiquantitativa revelou diminuição da expressão gênica com o aumento do diâmetro folicular, sugerindo o envolvimento deste receptor na regulação da camada da teca em folículos antrais iniciais (Buratini et al., 2005b). Distintamente, o FGFR-3c mostrou-se expresso tanto em células da teca quanto da granulosa, embora evidências da regulação de sua expressão tenham sido observadas somente nas células da granulosa, onde a expressão do FGFR-3c aumentou com o aumento do diâmetro do folículo e a concentração de estradiol no fluido folicular (Buratini et al., 2005b). Constatou-se ainda que o FSH em níveis fisiológicos aumenta a expressão do FGFR-3c em células da granulosa em cultivo, enquanto que o IGF-1 não exerce tal efeito, mesmo em níveis suprafisiológicos (Buratini et al., 2005b). Esses resultados sugerem que o FSH sensibiliza as células da granulosa à ação dos FGFs e que o FGFR-3c contribui para a manutenção do crescimento de folículos dominantes no ambiente pobre em FSH que se sucede ao desvio folicular.

Contudo, a expressão ovariana de outros FGFs capazes de ativar o FGFR-3c e FGFR-4 ainda não foi caracterizada.O FGF-17 e o FGF-18 pertencem à subfamília do FGF-8, ativam eficientemente o FGFR-3c e o FGFR-4 (Chellaiah *et al.*, 1999; Ford-Perris *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006) e têm reconhecida atividade indutora de proliferação e/ou diferenciação celular em processos fisiológicos e patológicos (Xu *et al.*, 1999; Ford-Perriss *et al.*, 2001; Shimokawa *et al.*, 2003; Heer *et al.*, 2004; Nezu *et al.*, 2005). Apesar do RNAm do FGF-17 e FGF-18 ter sido detectado em oócitos e embriões de camundongos (Zhong *et al.*, 2006), até o presente momento, a literatura não dispõe de dados sobre a expressão do FGF-17 e FGF-18 no ovário bovino ou em qualquer outro tecido reprodutivo. Portanto, o presente projeto objetivou investigar a expressão desses FGFs, capazes de ativar o FGFR-3c e o FGFR-4, em folículos antrais bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento folicular

2.1.1. Fase Pré-antral

No início da vida fetal das fêmeas mamíferas, as células germinativas primordiais, originárias do saco vitelínico, migram para a crista genital e povoam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a se multiplicar por divisões mitóticas. Concluída a proliferação mitótica, as oogônias iniciam o processo de divisão meiótica que é interrompido no diplóteno da prófase I. As células germinativas, agora denominadas oócitos, são rodeadas por uma estreita camada de células da granulosa, constituindo os folículos primordiais (revisado por Fortune, 2003). Uma vez estabelecida a população de folículos primordiais, de forma gradual e contínua, alguns destes folículos deixam o grupo dos quiescentes e começam a se desenvolver, assumindo, seqüencialmente, as condições de folículos primários e secundários, até atingirem o estágio antral do desenvolvimento folicular (van den Hurk et al., 1997). Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral ainda não foram esclarecidos. Entretanto, achados recentes indicam que o desenvolvimento folicular pré-antral independe de estímulo gonadotrófico agudo (revisado por McNatty et al., 2006), mesmo estando expressos nestes folículos os receptores para FSH (FSHR; Bao & Garverick, 1998) e para LH (LHR; Webb et al., 2003).

Por outro lado, mecanismos parácrinos de controle desempenham papel hegemônico nesta fase (Gong *et al.*, 1996; Monniaux *et al.*, 1997ab; Webb *et al.*, 2003; Shimazaki *et al.*, 2003; McNatty *et al.*, 2006). Vários peptídeos intraovarianos, dentre os quais o KL ("kit ligand"), membros da família dos fatores de crescimento transformantes β (TGF- β), como o fator de crescimento diferencial 9 (GDF-9) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), a ativina, a inibina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs), fatores de crescimento epidermal (EGFs) e fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) têm sido apontados como fatores reguladores importantes do desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral (revisado por Webb *et al.*, 2006).

2.1.2. Comunicação Oócito-cumulus

Ao longo da foliculogênese, os oócitos sofrem diversas modificações morfológicas e bioquímicas, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação e são responsáveis por tornar o oócito competente, ou seja, apto para a fecundação e subseqüente desenvolvimento embrionário (Brevini Gandolfi & Gandolfi, 2001). O crescimento e a diferenciação do oócito e das células somáticas nos folículos ovarianos dependem de uma comunicação bidirecional essencial para o desenvolvimento dos dois tipos celulares e são orquestrados de forma coordenada e mutuamente dependente (Eppig, 2001).

A comunicação entre o oócito e as células da granulosa é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo *gap* permitem o transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (Albertini *et al.*, 2001). Além das TZPs, a comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre via sinalização parácrina intrafolicular. Diversos fatores de crescimento secretados pelo oócito agem nas células da granulosa vizinhas regulando seu próprio desenvolvimento, determinando assim a competência oócitária (revisado por Gilchrist *et al.*, 2008). A competência adquirida durante a foliculogênese devido a essa comunicação, torna o oócito capaz de completar a meiose, ser fecundado, passar pela transição materno-zigótica e prosseguir seu desenvolvimento (Coticchio *et al.*, 2004).

2.1.2.1. Maturação oócitária

A maturação do oócito *in vivo* é um processo complexo, controlado pelas gonadotrofinas (FSH e LH) e peptídeos intra-ovarianos. As células da teca e da granulosa são o principal alvo das gonadotrofinas, que modulam o crescimento e a maturação do oócito. Por outro lado, o oócito expressa genes que controlam a atividade e a diferenciação das células somáticas adjacentes (Feuerstein *et al.*, 2006; Feuerstein *et al.*, 2007). A maturação nuclear é determinada pela quebra da vesícula germinativa e retomada da meiose. Embora na maioria dos oócitos bovinos ocorra maturação nuclear espontânea quando da retirada de folículos antrais (Sirard *et al.*, 1988), as gonadotrofinas são frequentemente adicionadas aos meios de maturação para induzir a maturação citoplasmática e expansão das células do *cumulus*, além de melhorar o desenvolvimento embrionário (Zuelke & Brackett *et al.*, 1990; Izadyar *et al.*, 1998).

Durante o processo de ovulação as células do cumulus secretam hialurona (HA), que se acumula entre as células formando uma matriz gelatinosa, o que constitui o processo conhecido como expansão do cumulus (Eppig, 1979; Hess et al., 1999). A expansão das células do cumulus e a maturação do oócito são induzidos pelo pico pré-ovulatório de LH in vivo (Diaz et al., 2006). Contudo, as ações do LH na maturação oocitária parecem ser indiretas, devido ao padrão de expressão do seu receptor (LHR). Em bovinos, o RNAm do LHR não foi detectado em células do cumulus e oócitos, mas mostrou-se presente em células da granulosa murais de folículos préovulatórios (van Tol et al., 1996), indicando que fatores parácrinos mediadores devem ser liberados por este tipo celular em resposta ao LH para promover a expansão das células do cumulus e a maturação do oócito (Peng et al., 1991; revisado por Conti, 2006). Dentre esses fatores parácrinos, destacam-se os fatores de crescimento epidermal (EGF), uma vez que os mesmos mostraramse capazes de induzir a expansão das células do cumulus (Diaz et al., 2006; Su et al., 2003) e acelerar a retomada da meiose in vitro (Sakaguchi et al., 2000).

Já a maturação de oócitos *in vitro* ocorre na presença de FSH, mas não de LH, devido à presença de receptores para FSH (FSHR), mas não para LH (LHR), em células do *cumulus* e da granulosa de folículos de pequeno a médio

tamanho, os quais são utilizados na produção *in vitro* de embriões (van Tol *et al.*, 1996). Além disso, o FSH promove a competência oocitária e é amplamente utilizado em diversos protocolos de maturação *in vitro* a fim de melhorar a expansão das células do *cumulus*, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (Calder *et al.*, 2003).

Compreender os mecanismos que regulam o desenvolvimento oocitário é necessário para melhorar biotécnicas da reprodução que visam maximizar o potencial reprodutivo da fêmea bovina, como a produção *in vitro* de embriões (PIV). Apesar do grande avanço desta técnica, os resultados de maturação oocitária (uma das etapas da PIV) em condições de cultivo são insatisfatórios quando comparado à maturação *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002; Sirard *et al.*, 2006). Provavelmente isso é decorrente da remoção dos oócitos dos folículos e perda da influência de diversos fatores presentes no fluido folicular, dando início a um processo não fisiológico de maturação nuclear e citoplasmática, que pode afetar a competência do oócito (Dode *et al.*, 2006). Além disso, a competência do oócito em originar blastocisto após fecundação *in vitro* varia com o grau de comunicação entre o ele e as células somáticas adjacentes, comprometido quando da retirada do CCO do folículo (Lonergan *et al.*, 1994, Krisher, 2004), o que reflete a importância dos agentes presentes no ambiente folicular.

Portanto, conhecer os mecanismos que controlam a maturação oocitária e os fatores que são liberados em resposta às gonadotrofinas é fundamental para melhorar os resultados das técnicas de produção *in vitro* de embriões.

2.1.3. Fase Antral

Distintamente, mecanismos endócrinos desempenham papel fundamental na regulação do desenvolvimento folicular antral. Durante esta fase, ondas de crescimento folicular se sucedem sob o controle das gonadotrofinas (FSH e LH), hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona) e fatores ovarianos de ação endócrina e parácrina (Fortune, 1994; Gong *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 2003). Evidências demonstram que os fatores ovarianos parácrinos participam da mediação e da modulação das gonadotrofinas (Campbell *et al.*,1999).

26

Os folículos antrais são caracterizados pelo aparecimento de espaços preenchidos de secreção líquida entre as células da granulosa (Callejas, 2001). Estes espaços confluem em uma cavidade denominada antro folicular, cujo tamanho aumentará até o momento da ovulação no folículo pré-ovulatório (Greenwald & Roy, 1994).

As células da granulosa de folículos pré-antrais são diferenciadas em duas populações distintas durante a transição para a fase antral: as células do *cumulus*, que estão diretamente associadas ao oócito, e as células da granulosa murais, que circundam a parede folicular formando um epitélio estratificado com a membrana basal (revisado por Gilchrist *et al.*, 2004). Externamente, ainda existem duas camadas de células da teca: camada interna e externa. Apesar da similaridade desses dois tipos celulares, existem diferenças na produção de transcritos e proteínas (Latham *et al.*, 1999). As células do *cumulus* parecem ser especializadas em oferecer suporte nutricional para o desenvolvimento do oócito e têm papel fundamental no crescimento e metabolismo desse (Haghighat & Van Winkle, 1990). Já o oócito, secreta fatores que agem nas células do *cumulus* e nas células da granulosa murais, essenciais para a regulação da função ovariana (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004).

2.1.3.1. Recrutamento e seleção folicular

Uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento folicular, ou seja, para o crescimento sincronizado de folículos antrais jovens que originam as ondas foliculares (Adams *et al.*, 1992; Fortune, 1994). O número de folículos selecionados dentre os recrutados para dar continuidade ao desenvolvimento folicular rumo à ovulação varia conforme o número de ovulações por ciclo estral característico de cada espécie. Em espécies monovulatórias como a bovina, apenas um folículo é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais que compõem a onda folicular (Ginther *et al.*, 1996). Através da secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante, ocorre redução dos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (Ginther *et al.*, 1996).

A maioria dos folículos recrutados tem o crescimento interrompido durante o declínio das concentrações plasmáticas de FSH (Mihm *et al.*, 2003). Esta fase é definida como desvio folicular, a partir da qual o folículo dominante continua a crescer, enquanto que os folículos subordinados iniciam o processo de atresia (Fortune *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2001).

A atresia é um processo fisiológico responsável pela perda da maioria (99,9%) dos folículos ovarianos (Ireland, 1987; Gordon, 1994) e ocorre pela morte celular programada ou apoptose das células somáticas do folículo e do oócito (Chun & Hsueh, 1998). A presença de fatores de sobrevivência, que promovem o crescimento do folículo e também protegem as células da apoptose, é determinante para o processo de atresia folicular, pois na ausência desses fatores o mecanismo de apoptose dentro do folículo é ativado (revisado por Quirk *et al.*, 2004). Dentre os fatores que promovem a sobrevivência dos folículos e os protegem da apoptose incluem-se, as gonadotrofinas (FSH e LH), o estradiol e os fatores de crescimento como o IGF-1 e o FGF-2 (Amsterdan *et al.*, 2003; Quirk *et al.*, 2004).

Os mecanismos que determinam qual folículo será selecionado ainda não estão completamente esclarecidos. É possível que, durante o recrutamento, o futuro folículo dominante possa diferenciar-se precocemente em relação aos demais por estar em melhor sincronia com o estímulo gonadotrófico e mais responsivo às gonadotrofinas (Fortune, 1994). Além disso, foi sugerido que a refratariedade do folículo dominante aos níveis decrescentes de FSH se deve, ao menos em parte, à aquisição de receptores para o LH, gonadotrofina responsável pelo desenvolvimento e maturação folicular terminal (Ginther *et al.*, 1996).

A principal característica do folículo após o estabelecimento da dominância morfológica é um rápido aumento nas concentrações de estradiol e sabe-se que tanto a síntese de andrógenos, quanto a aromatização de andrógenos para estradiol são dependentes de gonadotrofinas (revisado por Fortune *et al.,* 2004). Portanto foi sugerido inicialmente que a expressão precoce do LHR em células da granulosa seria um evento importante para a seleção folicular (Xu *et al.,* 1995; Bao & Garverick, 1998), tornando o futuro folículo dominante mais responsivo ao LH e consequentemente aumentando sua capacidade esteroidogênica. Contudo, dados discrepantes foram

observados com relação à expressão do LHR em células da granulosa ao redor do desvio folicular em bovinos. Evans & Fortune (1997) não observaram o RNAm do LHR por hibridização in situ nas células da granulosa do folículo dominante ou do maior folículo subordinado no segundo e terceiro dias do início da onda folicular (momento do desvio folicular), corroborando resultados anteriores em que o LHR não foi detectado em células da granulosa antes dos 9mm de diâmetro utilizando a mesma técnica (Xu et al., 1995). Já Beg et al. (2001), utilizando RT-PCR, detectaram expressão do RNAm do LHR em maior concentração em futuros folículos dominantes comparados aos subordinados antes do desvio folicular. Em um estudo recente, a expressão do RNAm do LHR em vacas nelore mostrou-se correlacionada com o diâmetro folicular em células da granulosa, tendo sido observada apenas após o diâmetro de 7mm (Nogueira et al., 2006). Considerando-se que o desvio folicular ocorre ao redor do diâmetro de 6mm na raça Nelore (Sartorelli et al., 2005), esses resultados indicam que a expressão do gene LHR nas células da granulosa ocorre já na fase de dominância, portanto, após a seleção folicular (Nogueira et al., 2006).

Por outro lado, fortes evidências indicam o envolvimento do sistema composto pelos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) como fatores essenciais na seleção do folículo dominante. Os membros deste sistema já caracterizados nos folículos bovinos incluem dois peptídeos (IGF-1 e IGF-2), dois receptores (tipo 1 e tipo 2), seis proteínas específicas de ligação ao IGF (IGFBP-1 a 6), além da proteína plasmática associada à gestação A (PAPP-A) (Spicer & Echternkamp 1995; Rivera *et al.*, 2001; Mazerbourg *et al.*, 2001).

Embora a concentração de IGF total não tenha se mostrado diferente no fluido folicular de folículos dominantes em relação a folículos subordinados (de la Sota *et al.*, 1996), a concentração de IGF-1 livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes mesmo da observação de diferenças na concentração de estradiol ou no diâmetro (Beg *et al.*, 2002), sugerindo uma associação entre a biodisponibilidade de IGF no fluido folicular e a seleção do folículo dominante em bovinos (Poretsky *et al.*, 1999; Fortune *et al.*, 2001 e Ginther *et al.*, 2001). Já as IGFBPs estão presentes em maior concentração no fluido folicular de folículos subordinados em relação ao folículo dominante (Echternkamp *et al.*, 1994; de la Sota *et al.*,

1996; Stewart *et al.*, 1996; Mihm *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2001 e Beg *et al.*, 2001). Essa família de proteínas liga-se com alta afinidade aos IGF-1 e IGF-2 e impedem a ligação dos IGFs aos receptores (IGFR-1 e IGFR-2) regulando assim a biodisponibilidade de IGF (Monget *et al.* 1996).

A seleção folicular está associada ao aumento da biodisponibilidade de IGF no futuro folículo dominante, mediante liberação de IGF-1 devido à degradação da IGFBP-4 e IGFBP-5 pela PAPP-A que é uma enzima específica de degradação da IGFBP-4 e IGFBP-5 em bovinos (Mazerbourg *et al.*, 2001; Mihm *et al.*, 2002; Fortune *et al.*, 2004). Enquanto isso, no folículo subordinado a concentração de IGF livre diminui devido a um aumento nas concentrações de IGFBP-4 e 5, restringindo assim a biodisponibilidade de IGF (Fortune *et al.*, 2004). A redução de IGFBPs e o aumento nos níveis de IGF livre no folículo dominante são considerados essenciais para o desvio e a continuidade do desenvolvimento folicular após a diminuição dos níveis de FSH (Mihm *et al.*, 2002; Fortune *et al.*, 2004).

Finalmente, se a regressão luteal ocorre ainda durante a fase de crescimento do folículo dominante, a queda dos níveis de progesterona permite o aumento da freqüência dos pulsos de LH, culminando no pico de LH necessário à ovulação e à maturação oocitária com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular (revisado por Adams *et al.,* 2008). Caso contrário, o folículo dominante regride e deixa de inibir a secreção de FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (revisado por Adams *et al.,* 2008).

2.1.3.2. Fatores de crescimento produzidos localmente

Conforme já indicado pelo envolvimento do sistema IGF abordado anteriormente, fatores de crescimento produzidos localmente constituem moléculas reguladoras fundamentais para o desenvolvimento de folículos antrais, atuando por meio de mecanismos parácrinos e endócrinos (Ginther *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2004).

Os Membros da superfamília do TGF-β também estão incluídos entre os peptídeos reguladores do desenvolvimento folicular (Findlay *et al.*, 2002; Durlinger *et al.*, 2002; Knight & Glister 2003; Juengel & McNatty, 2005; Visser &

Themmen 2005). Entre os membros da superfamília do TGF- β , destacam-se o GDF-9 e a BMP-15, secretados pelo oócito, que têm sido relatados na regulação de funções celulares como proliferação e diferenciação celular, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do *cumulus*. Além disso, melhoram a competência de desenvolvimento do oócito (Eppig, 2001; Matzuk *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2005). A expressão alterada ou nula desses fatores pode causar danos severos à função ovariana e a fertilidade (McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2004). Outros membros como a BMP-4 e a BMP-7 de origem tecal estimulam a proliferação e modulam a esteroidogênese em células da granulosa bovinas, acentuando as secreções de estradiol, inibina e ativina e suprimindo a secreção de progesterona (Glister *et al.*, 2004). Já a BMP-2 e a BMP-5 produzidas pelas células da granulosa promovem a sobrevivência do folículo pela manutenção da proliferação celular e prevenção da luteinização prematura e/ou atresia (Knight & Glister, 2006).

Os FGFs também têm sido incluídos como importantes peptídeos intraovarianos reguladores do desenvolvimento folicular (Parrot *et al.*, 1994; Parrot & Skinner, 1998ab; McNatty *et al.*, 1999; Berisha *et al.*, 2004; Buratini *et al.*, 2005ab; Buratini *et al.*, 2007)

2.2. O sistema FGF

2.2.1. FGFs e seus receptores (FGFR)

Os FGFs compõem uma família de pelo menos 25 membros (FGF 1-25) (Katoh & Katoh, 2005), sendo que 23 FGFs já foram descritos em mamíferos (Yamashita *et al.*, 2000). São proteínas com peso molecular entre 17 e 34 KDa, altamente conservadas entre as espécies de vertebrados e compartilham mais de 90% de homologia na seqüência de aminoácidos (Ornitz & Itoh, 2001). Esses fatores, apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização e oncogênese (Basilico & Moscatelli, 1992). Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam potente atividade neurotrófica e angiogênica. Estão expressos em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento e também em tecidos adultos, o

que indica que desempenham papel importante como fatores de crescimento e diferenciação celular durante toda a vida (Igarashi *et al.*, 1998). A biodisponibilidade dessas moléculas parece ser regulada por proteínas carreadoras de fatores de crescimento fibroblástico, as FGF-BPs, que são responsáveis por liberar os FGFs imobilizados na matriz extracelular (Abuharbeid *et al.*, 2006).

Cinco genes distintos codificam receptores de alta afinidade que interagem com os membros da família FGF (FGFR1-5) (Sleeman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Os FGFR-1 a -4 codificam receptores do tipo tirosina-quinase localizados na membrana plasmática. Estruturalmente esses receptores são caracterizados por uma porção extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs (Eswarakumar *et al.*, 2005). A porção extracelular é dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (Ig-like); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. Arranjos transcricionais alternativos ("alternative splicing") possibilitam a formação de 3 isoformas (a, b e c) do FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3, que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (Ornitz *et al.*, 1996).. Sendo que os domínios D3 geram isoformas funcionais dos tipos b e c, nos FGFR-1, 2 e 3 (FGFRIIIb e FGFRIIIC; Figura 1; Eswarakumar *et al.*, 2005).

O FGFR-5, descoberto mais recentemente, apresenta dois transcritos alternativos: FGFR-5 γ e ß (Sleeman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Este receptor não apresenta o domínio tirosina quinase intracelular como os outros FGFR, porém os resíduos dos domínios extracelulares importantes para o acoplamento com os ligantes dos FGFs são conservados (Sleeman *et al.*, 2001). Estudos de "binding" demonstraram que o FGFR-5 tem capacidade de ligação ao FGF-2, mas não ao FGF-7. No entanto, sua função biológica permanece desconhecida (Sleeman *et al.*, 2001).



Figura 1. Estrutura dos FGFRs e "splicing" alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR-1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de Eswarakumar *et al.* (2005).

Após interação entre o FGF e o FGFR, ocorre dimerização e transfosforilação do receptor para que o sinal seja traduzido em uma resposta biológica (Johnson & Williams, 1993). Além da fosforilação da tirosina, outros sinais de transdução, como o recrutamento da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK) estão envolvidos na geração do efeito proliferativo dos FGFs (Creuzet *et al.* 1995). A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com heparina ou proteoglicanos (heparan sulfato) conferindo maior estabilidade à ligação e dimerização dos FGFRs . A sinalização intracelular desse complexo (FGF-FGFR-Heparina) é mediada pelo recrutamento de uma família de proteínas sinalizadoras, conhecida como FRS2 (substrato do receptor de FGF 2), até os locais de ligação com as tirosinas fosforiladas. Após essa ligação, complexos do tipo Grb2 (proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2) são responsáveis pela ativação da via intracelular, Ras/Raf/MAP quinase (Eswarakumar *et al.*, 2005).



Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs, adaptado de Eswarakumar *et al.* (2005).

2.2.2. FGF-17 e FGF-18

O FGF-17 e o FGF-18 pertencem à subfamília do FGF-8 (Itoh & Ornitz, 2004), conhecida como família oncogênica fetal (Nezu, 2005). Membros dessa subfamília apresentam semelhantes seqüências de aminoácidos (Hoshikawa *et al.*, 1998; Maruoka *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999), características bioquímicas incluindo afinidade pelos mesmos FGFRs (Itoh & Ornitz, 2004) e padrões espaciais de expressão (Xu *et al.*, 2000; Maruoka *et al.*, 1998). Assim como o FGF-8, o FGF-17 e o FGF-18 ativam preferencialmente os receptores FGFR-3c e FGFR-4, apresentando ainda afinidade moderada pelo FGFR-2c (Xu *et al.*, 2000; Ford-Perriss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006). Devido à similaridade e especificidade desta subfamília foi sugerido que esses FGFs tenham surgido por duplicação de um gene original e que suas funções são redundantes ou acumulativas nos tecidos alvo (Xu *et al.*, 1999). Estes fatores de crescimento induzem proliferação e diferenciação celular em diversos tecidos durante processos fisiológicos e patológicos (Xu *et al.*, 1999; Ford-Perris *et al.*, 2001;

Shimokawa *et al.*, 2003; Heer *et al.*, 2004; Nezu *et al.*, 2005), ações compatíveis com o envolvimento destes fatores no controle do desenvolvimento folicular.

O FGF-17 foi clonado e identificado em humanos após seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA construída a partir de cérebro fetal (Hoshikawa *et al.*, 1998) e detectado por PCR em embriões de ratos (Hoshikawa *et al.*, 1998) e camundongos (Xu *et al.*, 1999). Sua estrutura em camundongos e humanos possui 100% e 98,6%, respectivamente, de aminoácidos idênticos em relação ao FGF-17 do rato (Hoshikawa *et al.*, 1998). O gene foi subseqüentemente isolado e caracterizado em outros tumores humanos como câncer de próstata (Heer *et al.*, 2004) e tumores hematopoiéticos (Nezu *et al.*, 2005).

O FGF-17 apresenta semelhanças estruturais e funcionais em relação ao FGF-8. A seqüência de aminoácidos é 60% idêntica à do FGF-8 e ambos compartilham padrão similar de "splicing alternativo" na região codificadora 5' (MacArthur *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1999). No sistema nervoso, o padrão de expressão do FGF-17 é semelhante ao do FGF-8, o que sugere uma relação funcional entre eles na organização de algumas áreas do cérebro (Ford-Perris *et al.*, 2001). No desenvolvimento do cérebro fetal, o FGF-17 induz proliferação e direciona o crescimento tecidual (Hoshikawa *et al.*, 1998). Em camundongos, a interrupção da sinalização pelo FGF-17 diminuiu a proliferação de células precursoras no sistema nervoso (Xu *et al.*, 2000) e comprometeu o desenvolvimento cerebelar (Ford-Perriss *et al.*, 2001).

O FGF-17 também é expresso no início do desenvolvimento dos membros (Maruoka *et al.*, 1998), durante a diferenciação de células imaturas progenitoras de osteoblastos (Xu *et al.*, 1999). Por ativação do FGFR-3, o FGF-17 inibe a proliferação e a diferenciação dos condrócitos (Naski e Ornitz, 1998). Além disso, o FGF-17 é expresso durante o desenvolvimento arterial (Xu *et al.*, 1999).

O FGF-18 está envolvido no desenvolvimento de vários sistemas (Cormier *et al.*, 2005). Primeiramente, ele foi isolado em humanos e camundongos e caracterizado em estudos funcionais que indicaram atividade proliferativa (Hu *et al.*, 1998). Posteriormente foi detectado em ratos pela técnica de PCR baseado na homologia e identificado após seqüenciamento de

35

uma biblioteca de cDNA construída a partir de rim de rato (Ohbayashi *et al.*, 1998).

Apesar da seqüência de aminoácidos do FGF-18 ser altamente semelhante às do FGF-8 e FGF-17, os padrões temporal e espacial de expressão do RNAm do FGF-18 em embriões diferem em relação ao FGF-8 e FGF-17 (Ohbayashi *et al.*, 1998). Estudos em camundongos indicam menor expressão do FGF-18 no cérebro fetal durante os estágios iniciais do desenvolvimento em comparação ao FGF-8 e o FGF-17 (Xu *et al.*, 2000). Além disso, os locais de expressão predominante também diferem no sistema nervoso (Maruoka *et al.*, 1998).

A atividade proliferativa do FGF-18 se estende tanto a tecidos de origem epitelial quanto mesenquimal, sendo que, no camundongo, os principais órgãos que o expressam são o fígado e o intestino delgado (Hu *et al.*, 1998). Já em ratos adultos, a expressão do FGF-18 foi predominantemente detectada no pulmão (Ohbayashi *et al.*, 1998). O FGF-18 também parece estar associado ao desenvolvimento de tumores, conforme indica a detecção do RNAm no câncer de cólon humano (Shimokawa *et al.*, 2003). Foi isolado também na angiogênese de tecidos cardiovasculares atuando como quimioatrativo para migração de células endoteliais, mas sem atividade proliferativa nesse sistema (Antoine *et al.*, 2006).

O FGF-18 ativa eficientemente o FGFR-4 (Xu *et al.*, 2000) e o FGFR-3c (Davidson *et al.*, 2005; Kapadia *et al.*, 2005). Pela ativação do FGFR-3c, o FGF-18 promove diferenciação de células com potencial condrogênico e produção de cartilagem (Davidson *et al.*, 2005), regulação do crescimento normal do osso endocondral (Ohbayashi *et al.*, 2002) e modulação da proliferação dos condrócitos (Kapadia *et al.*, 2005). Camundongos com interrupção da sinalização do FGF-18 ou do FGFR-3 exibem ossificação defeituosa e proliferação/diferenciação de condrócitos aumentadas (Liu *et al.*, 2002).
2.2.3. O papel dos FGFs no desenvolvimento folicular ovariano

A foliculogênese está incluída dentre os processos fisiológicos dos quais participam os FGFs, sendo o FGF-2 ou bFGF, o membro da família melhor estudado, nesse contexto. Fortes evidências indicam a participação do FGF-2 como elemento mediador de interações químicas entre os tipos celulares que compõem os folículos pré-antrais e antrais (McNatty *et al.*, 1999; Berisha *et al.*, 2004). Os dados sobre expressão gênica e protéica do FGF-2 e a localização de seus respectivos receptores por estudos de "binding", sugerem as células da teca como principal sítio de produção deste fator e as células da granulosa como alvo de sua ação parácrina (Wandji *et al.*, 1992; Berisha *et al.*, 2004).

Similarmente ao FGF-2, a expressão gênica do FGF-1 também foi detectada predominantemente nas células da teca, mas sem sinal de regulação ao longo do desenvolvimento, já que os níveis de RNAm se mostraram constantes. Contrariamente, a proteína foi localizada por imunohistoquímica predominantemente na camada da granulosa, onde provavelmente encontra-se ligada ao seu receptor (Berisha *et al.* 2004).

O envolvimento do FGF-7, alternativamente conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos 1 (KGF-1), no controle da foliculogênese também já foi evidenciado. Parrott *et al.* (1994) detectaram expressão gênica do FGF-7 e produção da proteína em células da teca, mas não em células da granulosa bovinas. Além disso, o FGF-7 induz a proliferação e inibe a esteroidogênese em células da granulosa bovinas em cultivo (Parrot *et al.*, 1994; Parrot & Skinner, 1998a). O FGF-7 apresenta alta afinidade pelo FGFR-2b, que também é chamado de KGFR (Igarashi *et al.*, 1998, Ohuchi *et al.*, 2000). A expressão gênica do FGFR-2b foi detectada em células da granulosa bovinas (Parrott et al., 1994; Parrott & Skinner, 1998a) e é maior em folículos estrogênicos (Berisha *et al.*, 2004). Além disso, o FSH é capaz de estimular a expressão do FGFR-2b em células da granulosa bovinas cultivadas *in vitro* (Buratini *et al.*, 2007).

Outro estudo confirmou a camada da teca como principal sítio de expressão gênica e protéica do FGF-7 em folículos antrais bovinos (Berisha *et al.*, 2004). Os níveis de expressão do RNAm do FGF-7 não apresentaram variação significativa ao longo do desenvolvimento folicular, embora a

expressão gênica do respectivo receptor (FGFR-2b) tenha sido detectada em níveis crescentes conforme o aumento da capacidade esteroidogênica em células da granulosa, sugerindo que as ações parácrinas do FGF-7 são moduladas por meio da expressão do receptor ao longo do desenvolvimento folicular antral (Berisha *et al.,* 2004).

A expressão gênica do FGF-10, também conhecido como KGF-2 foi detectada em oócitos e células da teca de folículos antrais (Buratini *et al.*, 2007). Interessantemente, apesar da similaridade entre o FGF-7 e o FGF-10, estudos indicam alta expressão do RNAm do FGF-10 e ausência do FGF-7 em oócitos bovinos (Buratini *et al.*, 2007). Uma vez que os receptores para o FGF-10 (FGFR-2b) são expressos predominantemente nas células da granulosa (Berisha *et al.*, 2004), estes resultados sugerem o envolvimento do FGF-10 na sinalização parácrina oriunda do oócito e da camada da teca alvejando a camada da granulosa (Buratini *et al.*, 2007).

Níveis decrescentes de RNAm do FGF-10 foram observados com o aumento da concentração intrafolicular de estradiol na camada da teca (Buratini *et al.*, 2007). Isto, combinado à observação de que o FSH estimula a expressão do FGFR-2b em células da granulosa, sugere que o FGF-10 de origem tecal regula especificamente as células da granulosa murais de folículos antrais recém-recrutados (Buratini *et al.*, 2007).

A transcrição do FGF-10 é acompanhada por sua tradução em células da teca e oócitos, já que a proteína foi imunolocalizada nesses tipos celulares e também em células da granulosa (Buratini *et al.*, 2007). Finalmente, o FGF-10 inibiu a produção de estradiol em células da granulosa em cultivo *in vitro*, o que em associação com seu padrão de expressão na camada da teca, sugere que ele atue suprimindo a capacidade esteroidogênica folicular antes da fase de dominância, quando sua transcrição é diminuída (Buratini *et al.*, 2007).

A expressão gênica do FGF-8 e seus receptores (FGFR-3c e FGFR-4) foi detectada em folículos antrais e pré-antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005ab). No que se refere à fase pré-antral do desenvolvimento folicular, a expressão do FGF-8, FGFR-3c e FGFR-4 foi observada em "pools" de folículos primordiais, primários e secundários obtidos de fetos bovinos individualizados (Buratini *et al.*, 2005a). A análise da expressão gênica indicou o FGFR-3c como principal

receptor na fase folicular pré-antral de bovinos e com expressão crescente ao longo do desenvolvimento (Buratini *et al.*, 2005a).

Já em folículos antrais, a expressão do FGF-8 foi detectada em oócitos e em baixo grau em células da teca e da granulosa (Buratini *et al.*, 2005b). Recentemente, o FGF-8 foi apontado como fator importante para promover a glicólise em células do *cumulus* (Sugiura *et al.*, 2007). O co-tratamento com BMP-15 e FGF-8 aumentou a expressão de enzimas glicolíticas e promoveu glicólise em células do *cumulus* cultivadas na ausência do oócito, demonstrando que esses dois fatores cooperam no controle da glicólise nestas células (Sugiura *et al.*, 2007).

Com relação aos receptores, o RNAm do FGFR-4 foi exclusivamente detectado em células da teca, sendo que o RT-PCR semiquantitativo revelou diminuição da expressão com o aumento do diâmetro folicular, sugerindo o envolvimento deste receptor na regulação da camada da teca em folículos antrais iniciais (Buratini *et al.*, 2005b). Distintamente, o FGFR-3c mostrou-se expresso tanto em células da teca quanto nas células da granulosa, embora evidências de regulação da expressão tenham sido observadas somente nas células da granulosa, nos quais os níveis de RNAm aumentaram com o diâmetro do folículo e concentração de estradiol no fluido folicular (Buratini *et al.* 2005b).

Constatou-se ainda que o FSH aumenta a expressão do FGFR-3c em células da granulosa em níveis fisiológicos, enquanto que o IGF-1 não exerce efeito semelhante mesmo em níveis suprafisiológicos (Buratini *et al.* 2005b). Sendo assim, esses resultados sugerem que o FSH sensibiliza as células da granulosa aos FGFs e que o FGFR-3c contribui para a manutenção do crescimento de folículos dominantes no ambiente pobre em FSH em que eles completam seu desenvolvimento até a ovulação (Buratini *et al.* 2005b).

Uma vez que o FGFR-3c e 4 são expressos em folículos antrais bovinos e os níveis dos RNAm são regulados ao longo do desenvolvimento, seria importante determinar se outros FGFs capazes de ativar estes receptores estão expressos nestes folículos.

Apesar do RNAm do FGF-17 e FGF-18 ter sido detectado em oócitos e embriões de camundongos (Zhong *et al.*, 2006), até o presente momento, a

39

literatura não dispõe de dados sobre a expressão do FGF-17 e FGF-18 no ovário bovino ou em qualquer outro tecido reprodutivo. Isto, somado às características funcionais desses FGFs descritas em outros tecidos e à expressão de seus receptores (FGFR-3c e FGFR-4) em folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005b), motivou a realização deste projeto.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a expressão do FGF-17 e do FGF-18 em folículos antrais bovinos e sua regulação ao longo do desenvolvimento folicular.

3.2. Hipóteses

• Os RNAm do FGF-17 e do FGF-18 são expressos em folículos antrais bovinos e a expressão varia ao longo do desenvolvimento folicular antral;

• O FSH e o IGF-1 regulam a expressão do RNAm do FGF-17 em células da granulosa cultivadas *in vitro*.

A expressão do mRNA do FGF-17 varia ao longo da maturação oocitária
 e é alterada quando realizada *in vitro;*

• A transcrição do FGF-17 e do FGF-18 é acompanhada pela tradução da proteína em folículos antrais bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos folículos antrais

4.1.1. Obtenção de células da granulosa e de células da teca

Amostras de RNA total de células da teca e da granulosa foram recuperadas separadamente de folículos antrais individualizados. Para tanto, ovários bovinos foram coletados em abatedouro* situado a 50Km de Botucatu-SP e transportados em solução fisiológica em gelo (cerca de 5° C) até o laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP.

Folículos antrais com diâmetros \geq 5 mm foram dissecados, sendo então realizada a aspiração do fluido folicular com agulha 26G (seringa de 1mL) e este congelado em freezer a -80°C para posterior análise das concentrações de esteróides por radioimunoensaio. Sem que a agulha fosse retirada do folículo, solução fisiológica estéril a 4°C foi injetada e retirada da cavidade folicular repetidamente (cerca de 8 vezes) para recuperação das células da granulosa, em seguida, a solução foi centrifugada (5000 X g por 2 min) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. O sedimento de células da granulosa resultante foi imerso em 1 mL de solução Trizol (Invitrogen®) e congelado a -80°C, até a extração do RNA total.

Logo após a recuperação das células da granulosa, o folículo foi dividido ao meio em uma placa de Petri estéril com auxílio de uma lâmina de bisturi e a camada de células da teca destacada da face interna da parede folicular com o auxílio de pinças oftálmicas e lavada em solução fisiológica estéril mediante aspirações e ejeções sucessivas com seringa de 1mL, a fim de eliminar células da granulosa remanescentes. Em seguida, a camada da teca foi imersa em 1mL de solução Trizol® (Invitrogen[™]) e congelada a -80°C, até a extração do RNA total.

* Frigorífico Frigol® de Lençóis Paulista

A fim de detectar a contaminação cruzada de células da granulosa e células da teca, investigou-se a expressão do RNAm da citocromo P450 aromatase (CYP19A1) em células da teca e 17α-hidroxilase (CYP17A1) em células da granulosa, conforme descrito anteriormente (Buratini *et al.,* 2005b). A detecção do RNAm da CYP19A1 em células da teca ou de CYP17A1 em células da granulosa indicou contaminação, e estas amostras foram descartadas (resultados não apresentados).

4.1.2. Obtenção dos oócitos

4.1.2.1 Oócitos Imaturos

Ovários bovinos de fêmeas adultas foram coletados em abatedouro, lavados e transportados em solução fisiológica até o laboratório, onde se procedeu a aspiração dos folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. A aspiração foi realizada com auxílio de seringa e agulha 18G e o líquido folicular obtido, depositado em tubo cônico de 15ml para a sedimentação dos complexos cumulus-oócito (CCOs). Após 10 minutos, o sedimento foi transferido para placas de petri 100X20 mm para a busca e recuperação dos CCOs, sob lupa estereomicroscópica com aumento de 25 vezes. Os CCOs recuperados foram lavados três vezes em solução fisiológica e distribuídos em grupos de 20. Em seguida, procedeu-se o desnudamento completo em todos os grupos, por meio de agitação mecânica em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, por 3 a 4 minutos. Os oócitos desnudos foram novamente recuperados e lavados em solução fisiológica até ficarem completamente livres de células do cumulus. Cada grupo de 20 oócitos desnudos foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 300 µL de solução RLT + 3 µL de ß-Mercaptoetanol do "kit" RNeasy® (Qiagen). Este tubo sofreu agitação mecânica leve por 3 minutos e a amostra foi estocada a -80°C para posterior extração do RNAm.

4.1.2.2. Oócitos maturados in vitro (MIV)

CCOs contendo oócitos imaturos foram aspirados de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm e foram maturados em TCM 199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL), 0,5µg de FSH/mL, 50µg de LH/mL e 1µg de estradiol/mL em microgotas de 100µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (20 oócitos por gota). A incubação foi feita sob temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa de 5% CO₂ em ar e máxima umidade. Durante as 24 horas da maturação, grupos de 20 oócitos foram retirados a cada 3 horas ao longo da maturação (momentos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de maturação) e foram estocados a -80°C, para posterior extração de RNAm.

Para complementar a investigação da expressão gênica em oócitos, amostras de oócitos maturados *in vivo* obtidas em nosso laboratório no projeto de pós-doutorado da Dra Paula Ripamonte foram utilizadas. Segue a metodologia utilizada para obtenção dessas amostras.

4.1.2.3. Oócitos maturados in vivo

Os oócitos maturados *in vivo* foram coletados de 10 vacas mestiças sincronizadas em dias aleatórios do ciclo estral (considerando o estro dia 0; D0), com dispositivo intravaginal de progesterona (1,9 g, CIDR-B) durante 8 dias e aplicação via intra-muscular (IM) de 2 mg benzoato de estradiol (D0). Após o quinto dia (D4), iniciou-se o tratamento com FSH em doses decrescentes (total de 200 mg, IM) durante 4 dias consecutivos. Setenta e duas horas após o início do tratamento com FSH (D7), as vacas receberam uma dose de PGF₂(25 mg, IM) e após 48 h (D9) do tratamento com PGF₂, procedeu-se a remoção do CIDR-B e a aplicação de uma dose de LH (25 mg, IM). De 15 a 18 horas após a aplicação do LH foi realizada a coleta dos oócitos por punção folicular com auxílio de ultra-som. Os oócitos foram desnudados mecanicamente com PBS acrescido de 1% de soro fetal bovino por 4 minutos. Do total de 156 oócitos aspirados, 29 oócitos desnudos foram fixados entre

lâmina e lamínula por 24 horas em etanol e ácido acético (3:1). Após a fixação foram corados com lacmóide 0,004% e analisados em microscópio de contraste de fase para avaliar a maturação nuclear. Além da coloração lacmóide para avaliação da maturação, parâmetros morfológicos, como expansão das células dos *cumulus*, também foram considerados durante a seleção dos oócitos. Os oócitos visivelmente não maturados foram descartados dos grupos que foram submetidos a análises moleculares. Os demais oócitos (grupos de 20), foram estocados a -80°C, para posterior extração de RNAm.

4.2. Extração do RNA total

4.2.1. Extração do RNA total de células da teca e células da granulosa

Depois de trituradas e homogeneizadas em Politron (Ultraturrax®), as amostras de células da teca e granulosa foram submetidas ao protocolo Trizol® (Invitrogen[™]) para extração de RNA total. Este protocolo foi realizado em quatro etapas seqüenciais descritas a seguir: separação, precipitação, lavagem e dissolução do RNA total.

Na etapa de separação do RNA total, as amostras armazenadas em freezer a -80°C foram primeiramente mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C). Após este período, as amostras foram acrescidas de 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol® utilizado na homogeneização e agitadas manual e vigorosamente durante 15 segundos. A agitação foi seguida de uma nova "incubação" à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos e centrifugação a 11000 X g por 15 minutos à temperatura de 2 a 8°C. A adição do clorofórmio promove a separação da amostra em duas fases, sendo uma orgânica e a outra inorgânica ou aquosa. O RNA total permanece solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo (polipropileno de 1,5mL – Eppendorf®) e acrescida de álcool isopropílico na proporção de 0,5 mL de isopropanol para cada 1mL de Trizol® utilizado na homogeneização. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugada a 11000 X g durante 10

minutos à temperatura entre 2 a 8°C. O álcool isopropílico promoveu a precipitação do RNA total.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e 1mL de etanol a 75% foi acrescido ao tubo para cada 1mL de Trizol® utilizado na homogeneização. A amostra foi lavada com auxílio de agitador (Vórtex®) e centrifugada a 7500 G durante 5 minutos à temperatura de 2 a 8°C. Na etapa de dissolução do RNA total, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo com auxílio de uma ponteira de pipeta, o sedimento foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em 10µL de água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,1%) por meio de repetidas aspirações e ejeções com auxílio de uma pipeta (Gilson®), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600®) e, finalmente, armazenado a - 80°C. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®). O RNA total extraído foi congelado à -80°C, até o momento da reação de transcrição reversa.

4.2.2. Extração de RNA total dos oócitos

A extração do RNA total dos "pools" de 20 oócitos foi realizada por meio do kit RNeasy® (Qiagen). As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas com auxílio de um pipetador. Após centrifugação de 3 minutos a 14000 x g, o sobrenadante (300 μ L) contendo o RNA foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e desprezou-se o tubo contendo o sedimento com resíduos da lise celular. Àquele tubo adicionou-se álcool etílico 70%, sendo homogeneizado com pipetador de 1000 μ L. Este líquido foi transferido para a coluna do kit e centrifugado a 8000 x g por 15 segundos. O líquido remanescente no tubo coletor foi desprezado, e o tubo novamente acoplado à coluna, quando também adicionou-se 700 μ L do líquido RW1 do Kit na superfície da coluna para nova centrifugação a 8000g por 15 segundos. Em seguida, substituiu-se o tubo coletor e adicionou-se 500 μ L do líquido RPE do kit à superfície da coluna, repetindo o procedimento de centrifugação e

descarte do líquido. Outros 500 µL de RPE foram adicionados à coluna, sendo submetidos agora a uma centrifugação de 1 minuto a 8000g. Após nova substituição do tubo coletor, 30 µL de água RNAse free foram depositadas na superfície da coluna, que, após 5 minutos de espera, foi centrifugada por 2 minutos a 14000 x g para a eluição do RNA total. Este tubo foi identificado e estocado a - 80°C, ou submetido imediatamente ao protocolo de transcrição reversa. As amostras de RNA total de oócitos não foram quantificadas, uma vez que a concentração obtida fica abaixo do limite de detecção do espectrofotômetro.

4.3. Radioimunoensaio

A técnica de radioimunoensaio foi utilizada para a mensuração das concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular, conforme protocolo revisado (Buratini *et al.,* 2005b). Para a dosagem de estradiol utilizouse o Kit de 3^a Geração DSL-39100 (Diagnostic Systems Laboratories®, Inc., Webster, Texas) e para a dosagem de progesterona utilizou-se o Kit DSL-3400 (Diagnostic Systems Laboratories®, Inc., Webster, Texas). As curvas padrão foram diluídas em PBS gelatin utilizando-se estradiol liofilizado (Sigma®) e progesterona liofilizada (Sigma®).

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 7,4% e 13,5%, respectivamente, para estradiol e 6,8% e 7,0%, respectivamente, para progesterona. A sensibilidade do ensaio foi de 10 pg e 4 pg por tubo para estradiol e progesterona, o que equivale a 0,3 e 20 ng/lg de proteína, respectivamente.

4.4. Classificação folicular

Para avaliar a regulação da expressão gênica ao longo do desenvolvimento folicular, foram testados os efeitos do diâmetro folicular e das concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular. Além disso, os folículos foram classificados como saudáveis, transicionais e altamente atrésicos, de acordo com a razão entre as concentrações de estradiol e

progesterona no fluido folicular (>1, 0,01-1 e < 0,01; Ireland et al., 1994), para saudáveis, transicionais e altamente atrésicos, respectivamente; Grimes & Ireland, 1986).

4.5. RT-PCR em tempo real

Após a extração do RNA total, a expressão dos RNAm codificadores do FGF-17 e FGF-18 foi investigada por RT-PCR em tempo real em células da teca e da granulosa provenientes de folículos antrais individualizados e em "pools" de 20 oócitos. A expressão do gene constitutivamente expresso gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle interno da reação de transcrição reversa.

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA total interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNAse antes de serem submetidas ao RT-PCR em tempo real.

4.5.1. Protocolo DNAse I

Conforme as instruções do protocolo DNAse I - Amplification Grade (Invitrogen[™]), o RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, sendo acrescentado 1µL de tampão DNAse, 1µL de DNAse I (1U/mL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µL de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram transferidas para gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

4.5.2. Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa, utilizou-se o kit SuperScript III (Invitrogen™), cujo protocolo iniciou-se pela adição em microtubo estéril de 8µL da solução de RNA total resultante do tratamento com DNAse I, contendo 1µg

de RNA total de células da teca e da granulosa e o RNA total contido em 8 µL do "pool" de oócitos. Ao RNA total, adicionou-se 1µL de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt) (500µg/µL) e 1µL de dNTP Mix (10µM). Esta solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, incubada em gelo por 1 minuto e meio. Após a última incubação, adicionou-se à solução 2µL de tampão "First Strand" 5X, 4µL de MgCl2 (25mM), 2µL de DTT (0,1M) e 1µL de "RNAseOUT Inhibitor" (40U/mL). Na seqüência, a solução foi incubada a 42°C por 2 minutos e acrescida de 1µL (200U) de Superscript III (transcriptase reversa). Seguiram-se então três incubações sucessivas. Primeiramente, a solução permaneceu a 42°C por 50 minutos, depois, a 70°C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. Após a incubação, as amostras foram mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas a - 20°C.

4.5.3. Validação da PCR em tempo real

Inicialmente, para a amplificação de fragmentos dos genes FGF-17 e FGF-18 foram delineados oligonucleotídeos iniciadores para reconhecer regiões idênticas entre as seqüências de ratos, camundongos e humanos disponíveis no banco de dados GeneBank, uma vez que seqüências bovinas não estavam disponíveis. A identidade dos produtos da PCR para amplificação do FGF-17 e do FGF-18 foi confirmada por seqüenciamento do DNA extraído dos géis utilizando-se o kit QIAquick gel extraction (Qiagen®). O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP-Araçatuba.

Devido ao insucesso na tentativa de validação da PCR semi-quantitativa para o FGF-17 e FGF-18 utilizando-se o Sistema SYBR™ Green optou-se por utilizar o Sistema TaqMan - Assay by Design (Applied Biossystems®), onde sondas foram delineadas utilizando sequências bovinas agora disponibilizadas no banco de dados Genbank. As seqüências dos oligonucleotídeos e sondas delineadas estão descritas na Tabela 1. **Tabela 1.** Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para amplificação do GAPDH, CYC-A, H2A, FGF-17 e FGF-18 utilizando o sistema de detecção Taqman (Applied Biosystems®).

Genes-alvo	Seqüências	Fragmentos		
	S 5' ggc gtg aac cac gag aag tat aa 3'			
GAPDH	A 5' ccc tcc acg atg cca aag t 3'	119pb		
	S 5' gcc atg gag cgc ttt gg 3'			
CYC-A	A 5' cca cag tca gca atg gtg atc t 3'			
	S 5' gag gag ctg aac aag ctg ttg 3'	74pb		
H2A	A 5' ttg tgg tgg ctc tca gtc ttc 3'			
	S 5'ccg ggt gcg cat caa g 3'			
FGF-17	A 5' gct tgc ccc tct tat tca tac aga t 3'	62pb		
	Sonda FAM 5'ctg aga gtg aga aat ac 3'			
	S 5' cct gct gct gtg ctt cca 3'			
FGF-18	A 5' tgc gga agt cca cgt tct c 3'	59pb		
	Sonda FAM 5'gta cag gtg ctg gcg g 3'			

S = "sense"; A = "antisense"; pb = pares de bases

Para amplificação dos RNAm do FGF-17 e FGF-18 utilizou-se o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystem®). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, sendo 12,5 µL do kit TaqMan PCR Universal Master Mix (Applied Biosystem®), 1,25 µL de sonda Taqman (Assay-by-Design), 0,5 µL de cDNA e água para completar o volume final. Água em substituição ao cDNA foi utilizado como controle negativo e as condições cíclicas da PCR foram: 95°C por 10 min, 50 ciclos a 95°C por 10 segundos seguido de anelamento por 1 minuto.

As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a especificidade dos produtos da PCR foi determinada pela análise da curva de melting e determinação do tamanho do amplicon em gel de agarose. O tamanho do amplicon, condições e eficiências de amplificação para cada par de primers utilizado nos experimentos estão descritos na Tabela 2.

Os genes GAPDH, Ciclofilina (CYC-A) e Histona (H2A) foram testados pelo programa geNorm (Microsoft®; Ramakers et al., 2003) para seleção do controle endógeno mais estável para cada tipo celular analisado. A CYC-A foi o melhor controle endógeno para células da teca e oócitos. Para as células da granulosa e granulosa cultivada foram escolhidos GAPDH e H2A, respectivamente.

A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método ΔΔCt e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (Pfaffl, 2001; Figura 3). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de amostras individualmente pelo programa LinRegPCR software (Ramakers et al., 2003). Para cada primer, o limiar de detecção da fluorescência foi fixado no ponto médio da janela de linearidade, determinada pelos valores mínimos e máximos de fluorescência. Uma amostra foi escolhida aleatóriamente para cada gene em cada tipo celular analisado e foi utilizada como controle. **Tabela 2.** Tamanho do amplicon, condições e eficiências de amplificação paracada par de primers utilizado nos experimentos.

		Tomonho	Tomporatura		Eficiência de
Genes			A malarmanta	[final] primer	amplificação
	analisado	Amplicon	Anelamento		(%)
FGF-17	Granulosa		60°C	Assay-by- Design	97
	Granulosa				
	cultivada com				101
	FSH	62nh			
	Granulosa	0200			
	cultivada com				82
	IGF				
	Teca				70
	Oócito				92
FGF-18	Теса	59nh	60°C	Assay-by-	96
	Granulosa	5500		Design	89
CYC-A	Teca	65nh	60°C	300nM	99
	Oócito	0000	0000	3001101	100
GAPDH	Granulosa	118pb	62°C	150nM	96
H2A	Granulosa				
	cultivada com				92
	FSH	71nh	60°C	300nM	
	Granulosa	<i>i</i> 4µ0			
	cultivada com				96
	IGF				

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control - sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control - sample)}}$$

Figura 3. Modelo matemático da expressão relativa por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em uma amostra em relação à amostra controle e à expressão do gene endógeno. E_{target} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do gene referência; ΔCP_{target} é desvio de Ct do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCP_{ref} é desvio de Ct do controle – amostra do gene referência transcrito.

4.6. Cultivo de células da granulosa

Para a investigação da regulação da expressão gênica do FGF-17 pelo FSH e IGF-1, folículos pequenos (2-5 mm de diâmetro) foram isolados de ovários de vacas obtidos em abatedouro e as células da granulosa colocadas em meio sem soro suplementado com insulina e diferentes doses de FSH bovino (AFP-5332B, NIH - 0; 0,1; 1; 10 e 100 ng/ml) ou IGF-1 (LR3; Sigma-Aldrich - 0, 5, 10, 50 e 100 ng/ml; Buratini *et al.*, 2007). As células foram cultivadas por 6 dias, com troca de meio a cada 2 dias. No sexto dia, as células foram recuperadas em Trizol (Invitrogen[™]) para extração de RNA total. O cDNA foi produzido por reação de transcrição reversa conforme já descrito anteriormente.

As amostras de cDNA de células da granulosa cultivadas foram produzidas no laboratório do Prof. Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal, por sua equipe.

4.7. Investigação qualitativa da proteína por imunohistoquímica

4.7.1. FGF-17

Para a investigação da proteína FGF-17 em folículos antrais, ovários obtidos em abatedouro, seccionados e fixados bovinos foram em paraformaldeído. O tecido fixado foi mergulhado em parafina e cortes de 3 µm foram colocados em lâminas com poli-L-lisina e desparafinizados em xilol duas vezes por 20 minutos e hidratados em banhos sucessivos de 3 min em etanol 95% e 85%. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em solução TRIS EDTA (pH 9.0) a 96°C em banho maria por 30 min. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com uma solução 95% metanol e 5% peróxido de hidrogênio por 10 min, seguida de duas lavagens por 5 min em água destilada e uma lavagem em uma solução de Tris 0,5 M (pH 7.4). Em seguida os cortes de tecidos foram incubados em câmara úmida com o anticorpo humano policional produzido em coelho anti-FGF-17 (1:200; Cat. 500-P152 Peprotech Inc.®) por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, lâminas foram lavadas duas vezes por cinco minutos em Tris (pH 7.4) e depois incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase (EnVision Dual Link System; DakoCytomation®). A imunomarcação foi detectada com DAB líquido (DakoCytomation®). O controle negativo foi realizado pela incubação do anticorpo primário (1.25µg/mL) com FGF-17 recombinante (2,5µg/mL) (Cat.100-27: Peprotech Inc®.), por 2 horas a temperatura ambiente antes de aplicar nas lâminas.

4.7.2. FGF-18

A investigação da proteína FGF-18 foi realizada conforme o protocolo supracitado. O anticorpo humano policional produzido em cabras anti-FGF-18 (200 µg/µL; Cat. SC-16830; Santa Cruz BioTechnology®) foi biotinilado (EZ-Link, Pierce Biotechnology®) e incubado com o tecido na diluição 1:50 por 2 horas a temperatura ambiente seguido por lavagem e incubação com avidina-peroxidase (ABCVecstain - Vector Laboratories®) por 30 minutos. Não foi utilizado o anticorpo secundário anti-cabra para marcação do anticorpo

primário, pois gera marcação inespecífica em tecido bovino. O controle negativo foi realizado pela incubação do anticorpo primário com 4 vezes o volume do peptídeo bloqueador FGF-18 (200 µg/mL; Cat. SC-16830 P; Santa Cruz®).

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ-UNESP, sob supervisão da Prof. Dra. Renée Laufer Amorim.

4.8. Análise dos dados

Os efeitos do estágio de desenvolvimento dos folículos, do diâmetro e da concentração de estradiol; do FSH e IGF-1 em células da granulosa cultivadas e da maturação oocitária sobre a expressão gênica do FGF-17 e/ou FGF-18 foram testados por Análise de Variância (ANOVA). Havendo efeito, os grupos acima propostos foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer HSD ou por teste não paramétrico, quando a variabilidade entre os grupos não foi homogênea. Foi utilizada uma análise descritiva, utilizando-se medidas de tendência central, para avaliar o padrão de expressão do RNAm do FGF-17 e FGF-18 nos diferentes tipos celulares analisados.

As análises foram realizadas pelo programa JMP (SAS Institute, Cary, USA). Os resultados estão apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM). Consideraram-se significativas as diferenças com p<0,05.

5. RESULTADOS

Utilizando o Sistema TaqMan, o RNAm do FGF-17 foi detectado predominantemente em células da granulosa (Figura 4) e oócitos (Figura 7), enquanto que o RNAm do FGF-18 foi encontrado predominantemente em células da teca (Figura 4).



Figura 4. Resultados da amplificação por PCR em tempo real do RNAm do FGF-17 e FGF-18 em células da granulosa e da teca (curvas de amplificação do FGF-17 em células da granulosa [a] e da teca [b]; curvas de amplificação do FGF-18 em células da granulosa [c] e da teca [d]).

Esses resultados sugerem que a camada da granulosa e os oócitos são os principais sítios de expressão do FGF-17, e que a camada da teca é o principal sítio de expressão do FGF-18 em folículos antrais bovinos, como demonstrado por uma análise descritiva, através das médias de Ct (Ciclo threshold) apresentadas na Tabela 3.

		Média de Ct em	Amostras que
Genes	Tipo celular analisado	amostras	expressaram
		positivas	(%)
FGF-17	Granulosa	36.88	67
	Granulosa cultivada com FSH	31.68	100
	Granulosa cultivada com IGF	31.17	100
	Теса	39.42	62
	Oócitos Imaturos	36.14	100
	Oócitos maturados <i>In vivo</i>	42.98	43
FGF-18	Теса	36.13	92
	Granulosa	38.23	62
CYC-A	Теса	18.77	100
	Oócito	25.35	100
GAPDH	Granulosa	18.59	100
H2A –	Granulosa cultivada com FSH	23.57	100
	Granulosa cultivada com IGF	21.19	100

 Tabela 3. Média de Cts para cada gene nos diferentes tipos celulares estudados.

Ao investigar a expressão gênica ao longo do desenvolvimento folicular, não foi observado efeito do diâmetro folicular ou concentração de estradiol no fluido folicular. No entanto, constatou-se que o RNAm do FGF-17 é significativamente mais expresso em células da granulosa e da teca de folículos atrésicos em relação aos saudáveis e transicionais (Figura 5). Em sintonia com esses achados, a média de Ct foi menor em células da granulosa de folículos atrésicos (35,34) em comparação com transicionais (36,61) e saudáveis (39,06). Quanto menor o Ct, menos ciclos uma amostra necessita para detectar a fluorescência, portanto maior a expressão. Além disso, todas as células da granulosa de folículos atrésicos expressaram o RNAm do FGF-17, o que não ocorreu nos demais grupos.

Células da Granulosa

Células da Teca



Figura 5. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).

Com relação à expressão do RNAm do FGF-18, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos. Porém, observou-se um aumento numérico na expressão gênica do FGF-18 em células da teca, conforme o folículo se aproxima da atresia (Figura 6). Como os dados não tiveram distribuição normal, não foi possível testar a correlação entre a expressão gênica do FGF-18 e os valores de E2, P4 ou E2/P4.



Células da Teca



Figura 6. Valores relativos da expressão gênica do FGF-18 em células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).

Utilizando a CYC-A como controle endógeno para a normalização da expressão oocitária, detectou-se a expressão gênica do FGF-17, mas não do FGF-18, em oócitos bovinos (Figura 7).





Oócitos imaturos expressaram maiores níveis de RNAm do FGF-17 em relação aos maturados *in vivo* (Figura 8). Já os oócitos maturados *in vitro* não apresentaram expressão do FGF-17.



Estágios de desenvolvimento

Figura 8. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vivo* (número entre parênteses representa o número de amostras, letras distintas representam diferença significativa; p<0,05).

Em células da granulosa cultivadas, tanto o FSH quanto o IGF-1 diminuíram a expressão gênica do FGF-17 (Figura 9). Como a expressão do RNAm do FGF-18 em células da granulosa foi baixa e sem sinais de regulação, não avaliou-se sua expressão em células da granulosa cultivadas.



Figura 9. Valores relativos da expressão gênica do FGF-17 em células da granulosa cultivadas com doses crescentes de FSH ou IGF-1. (n=3 réplicas por tratamento; letras distintas indicam diferença significativa; p<0,05).

A imunohistoquímica revelou a presença das proteínas FGF-17 e FGF-18 nos mesmos tipos celulares onde o RNAm foi detectado (Figura 10).



Figura 10. Imagem representativa da imunolocalização do FGF-17 e do FGF-18 em folículo antral bovino. A proteína FGF-17 foi detectada em células da granulosa (CG), células da teca (CT) e oócito (O; Painéis A e C). A proteína FGF-18 foi detectada em células da granulosa e células da teca (Painel D). B e E representam os controles negativos para FGF-17 e FGF-18, respectivamente. EO (estroma ovariano) e VS (vaso sanguíneo)

6. DISCUSSÃO

Fatores de crescimento produzidos no ovário têm sido relatados como mediadores parácrinos da interação entre os diferentes tipos celulares no desenvolvimento folicular. O envolvimento de diferentes membros da família dos FGFs no desenvolvimento folicular tem sido evidenciado, incluindo o FGF-2 (Nilsson *et al.*, 2001; Berisha *et al.*, 2000), o FGF-7 (Parrott & Skinner, 1998ab; Berisha, *et al.*, 2004) o FGF-8 (Buratini *et al.*, 2005ab) e o FGF-10 (Buratini *et al.*, 2007). O presente trabalho apresenta evidências inéditas do envolvimento do FGF-17 e do FGF-18 no controle do desenvolvimento folicular ovariano bovino.

Demonstrou-se a expressão gênica do FGF-17 predominantemente em células da granulosa e oócitos, enquanto que o RNAm do FGF-18 foi encontrado predominantemente em células da teca e mostrou-se ausente em oócitos. Esses resultados sugerem a camada da granulosa e oócitos como principais sítios de expressão do FGF-17, e a camada da teca como principal sítio de expressão do FGF-18 em folículos antrais bovinos. Portanto, apesar da similaridade estrutural e funcional, o FGF-17 e o FGF-18 parecem apresentar padrões espaciais de expressão distintos, como já descrito no desenvolvimento embrionário de ratos (Ohbayashi *et al.*, 1998).

A expressão do RNAm do FGF-17 mostrou-se regulada ao longo do desenvolvimento folicular em células da teca e da granulosa, tendo sido maior em folículos atrésicos em relação aos saudáveis e transicionais. Em sintonia com esses achados, uma análise descritiva demonstrou que a média de Ct (Ciclo threshold) foi menor em células da granulosa de folículos atrésicos (35,34) em comparação com transicionais (36,61) e saudáveis (39,06). Além disso, todas as células da granulosa de folículos atrésicos expressaram o RNAm do FGF-17, o que não ocorreu nos demais grupos. Essas observações são compatíveis com os resultados do cultivo de células da granulosa, que demonstraram que, tanto o IGF-1 quanto o FSH, são capazes de suprimir a expressão do RNAm do FGF-17.

O IGF-1 é um fator pró sobrevivência do folículo (Li *et al.,* 1999) e tem sua biodisponibilidade reduzida em folículos subordinados em relação aos dominantes no momento do desvio folicular, quando o folículo subordinado

inicia o processo de atresia (revisado por Fortune *et al.*, 2004). Portanto, a detecção de maiores níveis de RNAm do FGF-17 em folículos atrésicos está em concordância com a supressão do sistema IGF nesse estágio do desenvolvimento folicular.

As gonadotrofinas também são fatores de sobrevivência de folículos antrais (Markstrom et al. 2002), capazes de inibir a apoptose em células da granulosa, induzindo a expressão de genes pró-sobrevivência e diminuindo a expressão de genes pró apoptóticos (Kim et al., 1999; Robles et al., 1999; Wang et al., 2002). A perda do suporte gonadotrófico leva à redução da forma fosforilada de uma proteína quinase específica (MAPK), determinando o início da apoptose de células da granulosa (Gebauer et al., 1999; Peter & Dhanasekaran, 2003). Sendo assim, os resultados deste estudo sugerem que a falta de suporte gonadotrófico também pode levar à atresia e apoptose pela perda da modulação de fatores inibidores do crescimento e da esteroidogênese, como parece ser o caso FGF-17 e FGF-18. De fato, dados ainda não publicados produzidos em colaboração pela equipe do Prof. Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal indicam que o FGF-18 inibe a esteroidogênese folicular via supressão da aromatase, da 3BHSD e de FSHR, o que sustenta essa hipótese. De acordo com o padrão de expressão observado, as células da teca exerceriam essa função moduladora principalmente via FGF-18 enquanto que as células da granulosa o fariam principalmente via FGF-17.

É possível que o FGF-17 tenha ação moduladora da apoptose em folículos ovarianos bovinos, já que a expressão desse fator é maior em folículos atrésicos e níveis baixos são mantidos pela ação do FSH e IGF-1 em folículos em crescimento. Ações compatíveis com o papel dos FGFs na modulação da apoptose já foram descritas. Nesse estudo, o FGFR-2b têm sua expressão aumentada no corpo lúteo em estágio de luteólise estrutural, o que sugere um papel modulador para o FGFR-2b na apoptose ou no remodelamento do corpo lúteo em regressão (Castilho *et al.,* 2007). De fato, fatores de crescimento têm sido descritos como os principais fatores de sobrevivência para folículos ovarianos inibindo a ativação de vias celulares indutoras da apoptose (Amsterdan *et al.,* 2003). Contudo, o fator de crescimento de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento

63

transformante (TGF) e o fator de crescimento de keratinócitos (FGF-7) não têm efeito protetor contra a apoptose e não alteram a proliferação celular (Quirk *et al.*, 2000).

Embora diferenças significativas não tenham sido encontradas, os valores numéricos relativos da expressão do FGF-18 indicam padrão de expressão temporal semelhante ao padrão de expressão do FGF-17, com expressão máxima em células da teca de folículos atrésicos. Como a expressão foi baixa e sem sinais de regulação na camada da granulosa, a expressão do FGF-18 não foi avaliada em cultivo de células da granulosa.

É interessante o fato de que a expressão do FGFR-3c, um dos principais receptores para FGF-17 e FGF-18, aumenta em células da granulosa de folículos saudáveis com o aumento das concentrações de estradiol. Além disso, o FGFR-3c teve sua expressão aumentada pelo FSH em cultivo de células da granulosa (Buratini *et al.*, 2005). Em contraste, o FSH inibiu a expressão do FGF-17 no presente estudo, o que indica que ao mesmo tempo que estimula a expressão do receptor (FGFR-3c), o FSH inibe a expressão do ligante FGF-17. Essa ação aparentemente paradoxal do FSH torna as células da granulosa mais sensíveis ao FGF-17, que assim como o FGF-10, parece suprimir a produção de estradiol dessas células (Buratini *et al.*, 2007) e níveis baixos de FGF-17 devem ser mantidos para que o folículo continue o seu crescimento.

Já em células da teca, o FGFR-3c é expresso de forma estável ao longo do desenvolvimento, mantendo-se presente também em folículos atrésicos, o que indica que esse receptor nas células da teca é o mediador de ações parácrinas do FGF-17 na atresia.

Curiosamente, um estudo demonstrou que o FGF-17 inibiu a proliferação e diferenciação dos condrócitos por ativação do FGFR-3 (Naski & Ornitz, 1998), o que indica que ações inibitórias desse fator são possíveis na proliferação e diferenciação celular através da ativação do FGFR-3c.

Ações sobre as células da teca via FGFR-4 também são possíveis. Contudo o FGFR-4 é mais expresso em folículos antrais pequenos quando o FGF-17 está baixo e é praticamente nula em folículos atrésicos (Buratini *et a*l., 2005b) onde o FGF-17 está altamente expresso, conforme resultados do presente estudo. Acredita-se que o FGF-17 e FGF-18 compartilhem as mesmas funções na foliculogênese devido à similaridade quanto às propriedades de ligação e ativação de receptores. É provável que o FGF-17 e o FGF-18 ajam conjuntamente na modulação da atividade e diferenciação das células da teca e da granulosa, uma vez que ambas as camadas expressam os receptores (FGFR-2c, FGFR-3c e FGFR-4; Berisha *et al.*, 2004; Buratini *et al.*, 2005b).

Neste estudo detectou-se pela primeira vez, a expressão gênica do FGF-17, mas não do FGF-18, em oócitos bovinos. Em contraste, o RNAm do FGF-18 foi detectado em oócitos e embriões murinos (Zhong *et al.*, 2006), demonstrando que a expressão desse gene parece seguir um padrão específico em cada espécie. Similarmente, a expressão gênica do FGF-8, membro da mesma subfamília que o FGF-17 e FGF-18, foi detectada exclusivamente em oócitos no ovário murino (Valve *et al.*, 1997), enquanto que em bovinos, o RNAm do FGF-8 foi detectado em oócitos, células da teca e da granulosa (Buratini *et al.*, 2005b).

Com relação ao FGF-17 de origem oocitária, merece destaque o provável envolvimento na interação parácrina entre o oócito e as células da granulosa. Vale lembrar que o FGF-8 oocitário coopera com a BMP-15 na indução da expressão de enzimas glicolíticas e promoção da glicólise em células do *cumulus* (Sugiura *et al.*, 2007). Como o FGF-17, ativa os mesmos receptores que o FGF-8, é lógico sugerir sua participação no controle do metabolismo energético das células do *cumulus*.

Outra possível função do FGF-17 oocitário via comunicação parácrina seria na maturação do CCO atuando sinergicamente com o EGF na indução da expansão das células do *cumulus*. Ações sinérgicas entre EGF e FGFs já foram descritas na modulação da proliferação de uma linhagem celular de queratinócitos (Gospodarowwicz *et al.*, 1990) e na diferenciação de células tronco da retina de camundongos (Giordano *et al.*, 2007).

Oócitos imaturos expressaram níveis significativamente maiores de RNAm do FGF-17 em relação aos maturados *in vivo*, sugerindo regulação da expressão ao longo do processo de maturação. Já os oócitos maturados *in vitro* não apresentaram expressão do FGF-17, o que indica que o sistema de cultivo não contém todos os elementos necessários à indução dos níveis fisiológicos da expressão do FGF-17. Esse resultado reflete o fato já conhecido de que as técnicas atuais de maturação *in vitro* induzem expressão gênica oocitária anormal associada ao menor potencial de desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* (Wrenzycki *et al.*, 2007; Boelhauve *et al.*, 2005). A menor expressão do FGF-17 em oócitos maturados *in vitro* pode estar relacionada ao menor potencial de desenvolvimento do oócito, embora estudos funcionais sejam necessários para confirmar essa hipótese.

Os resultados de imunohistoquímica indicam a presença do FGF-17 em células da granulosa, células da teca e oócitos de ovários bovinos. Sendo assim, conclui-se que o FGF-17 não é apenas transcrito, mas também traduzido no ovário bovino, o que reforça a hipótese de seu envolvimento no controle da foliculogênese. Esses resultados foram compatíveis com a expressão predominante do FGF-17 em oócitos e células da granulosa, indicada na análise do RNAm. A imunomarcação do FGF-18 também foi compatível com dados de expressão do RNAm. A menor intensidade de marcação pode ser decorrente da abordagem técnica utilizada, com biotinilação do anticorpo primário, já que só estava disponível comercialmente o anti-FGF-18 produzido em cabras. O anticorpo secundário anti-cabra gera muita marcação inespecífica no tecido bovino, provavelmente devido à similaridade entre as proteínas de ruminantes e por isso não foi utilizado.

Em síntese, os dados do presente trabalho sugerem a participação do FGF-17 na interação entre oócitos e células do *cumulus* e do FGF-17 e FGF-18 na modulação da diferenciação e crescimento de folículos antrais bovinos.

7. CONCLUSÕES

 O FGF-17 e o FGF-18 apresentam padrões espaciais de expressão distintos entre células da granulosa, células da teca e oócitos de folículos antrais bovinos. Sendo que o RNAm do FGF-17 é expresso predominantemente em células da granulosa e oócito, enquanto que o RNAm do FGF-18 é expresso predominantemente em células da teca e ausente em oócitos de folículos antrais bovinos.

 A expressão do RNAm do FGF-17 é regulada ao longo do desenvolvimento folicular em células da teca e da granulosa, sendo maior em folículos atrésicos em relação aos saudáveis e transicionais.

 Tanto o IGF-1 quanto o FSH são capazes de suprimir a expressão do RNAm do FGF-17.

 Oócitos imaturos expressam níveis significativamente maiores de RNAm do FGF-17 em relação aos maturados *in vivo* e a maturação oocitária *in vitro* suprime a expressão gênica do FGF-17.

 Os FGF-17 e FGF-18 não são apenas transcritos, mas também sintetizados no ovário bovino e a presença das respectivas proteínas é compatível com dados de expressão do RNAm.

 Em síntese, os dados do presente trabalho sugerem a participação do FGF-17 na interação entre oócitos e células do *cumulus* e do FGF-17 e FGF-18 na modulação da diferenciação e crescimento de folículos antrais bovinos.

67

8. REFERÊNCIAS

- ABUHARBEID, S., CZUBAYKO, F., AIGNER, A., The fibroblast growth factorbinding protein FGF-BP. Int. J. Biochem. Cell Biol. v.38, p.1463–1468, 2006.
- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fertil., v.94, p.177-88, 1992.
- ADAMS G.P., JAISWAL R., SINGH J., MALHI P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology. v. 69, p. 72–80, 2008.
- ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M.H., BENECCHI, E., CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-53, 2001.
- AMSTERDAM A., KEREN-TAL I., AHARONI D., DANTES A., LAND-BRACHA A., RIMON E., SASSON R., HIRSH L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. Steroids v. 68, p. 861–867, 2003.
- ANTOINE, M., WIRZ, W., TAG, C.G., GRESSNER, A.M., WYCISLO, M., MULLER, R., KIEFER, P. Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation **Biochem Biophys Res Commun.** V.346, p. 224–233, 2006.
- AUSTIN, E. J., MIHM M., EVANS A. C. O., KNIGHT P. G., IRELAND J. L. H., IRELAND J. J., ROCHE J. F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod**. v. 64, p. 839–848, 2001.
- 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.76, p.1903-21, 1998.
- BASILICO, C. & MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv. Cancer Res.**, v.59, p. 115-65, 1992.
- BEG, M. A., BERGFELT D. R., KOT K., WILTBANK M. C., O. J. GINTHER. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biol. Reprod.** v. 64, p. 432–441, 2001.

- BEG MA, BERGFELT DR, KOT K, GINTHER OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. Biol Reprod, v.66, p.120-126, 2002.
- BERISHA B, SCHAMS D, KOSMANN M, AMSELGRUBER W, EINSPANIER R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) during the final growth of bovine ovarian follicles. J Endocrinol. v.167, p. 371–382, 2000.
- BERISHA, B., SINOWATZ, F., SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.67, p.162-71, 2004.
- BOELHAUVE, M., SINOWATZ, F., WOLF, E., PAULA-LOPES, F.F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biol Reprod.**, 73(4), 737-44, 2005.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L., GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. Theriogenology, v. 55, p. 1255-1276, 2001.
- BURATINI JR., J., GLAPINSKI, V.F., GIOMETTI, I.C., TEIXEIRA, A.B., COSTA,
 I. B., AVELLAR, M.C.W., 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, p.255-61, 2005a.
- BURATINI JR., J., 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 (FGFR) -3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v.130, p.343-50, 2005b.
- BURATINI JR., J., PINTO, M.G.L., CASTILHO, A.C., AMORIM, R.L., GIOMETTI I.C., CAO, M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. **Biol. Reprod.**, v.77, p.745-50, 2007.
- CALDER MD, CAVENEY AN, SMITH LC, WATSON AJ Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and

Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.11, p.1-14, 2003.

- CALLEJAS, S.S. Fisiología del ciclo estral. In: PALMA, G. (Ed.). **Biotecnología de la reproducción**. Buenos Aires: INTA, p. 37-59, 2001.
- CAMPBELL B. K. The Modulation of Gonadotrophic Hormone Action on the Ovary by Paracrine and Autocrine Factors. **Anat. Histol. Embryol**. v. 28, p. 247-251, 1999.
- CASTILHO A.C., GIOMETTI I.C., BERISHA B., SCHAMS D., PRICE C.A., AMORIM R.L., PAPA P.C., BURATINI JR J. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in the bovine corpus luteum. **Mol Reprod Develop.** v. 75, p. 940-945, 2007.
- CHELLAIAH A., YUAN W., CHELLAIAH M., ORNITZ, D.M., Mapping ligand binding domains in chimeric fibroblast growth factor receptor molecules, J. Biol. Chem., v.274, p.34785–34794, 1999.
- CHUN, S.Y. & HSUEH A. J. W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. J. Reprod. Immunol. v. 39, 63–75, 1998.
- CONTI, M., HSIEH, M., PARK, J.Y., SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**., v. 20(4), p.715-23, 2006.
- CORMIER S., LEROY C., DELEZOIDE A. L., SILVE C., Expression of fibroblast growth factor 18 and 23 during human embryonic and fetal development, Gene Expression Patterns, v.5, p.569-573, 2005.
- COTICCHIO, G., SERENI, E., SERRAO, L., MAZZONE, S., IADAROLA, I., BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality **Ann N Y Acad Sci**. v. 1034, p. 132-44, 2004.
- CREUZET, C., LOEB, J., BARBIN, G. Fibroblast growth factors stimulate protein tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase activity in primary cultures of hippocampal neurons. J. Neurochem., v.64, p.1541-7, 1995.
- DAVIDSON D., BLANC A., FILION D., WANG H., PLUT P., PFEFFER G., BUSCHMANN M. D., HENDERSON J., Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals though FGF Receptor 3 to promote Chondrogenesis. J. Biol. Chem, v.280 (21), p.20509-20515, 2005.

- DE LA SOTA, R. L., SIMMEN F. A., DIAZ T., THATCHER W. W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. Biol. Reprod. v. 55, p. 803–812, 1996.
- DIAZ, F.J., O'BRIEN, M.J., WIGGLESWORTH, K., EPPIG, J.J. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. **Dev Biol**. v. 299, p. 91-104, 2006.
- DODE, M.A., DUFORT, I., MASSICOTTE, L., SIRARD, M.A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Mol Reprod Dev**. v. 73 (3), p. 288-297, 2006.
- DURLINGER A.L., GRUIJTERS M.J., KRAMER P., KARELS B., INGRAHAM H.A., NACHTIGAL M.W., UILENBROEK J.T., GROOTEGOED J.A., THEMMEN A.P. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.143, p.1076–1084, 2002.
- ECHTERNKAMP, S. E., HOWARD H. J., ROBERTS A. J., GRIZZLE J., WISE T. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biol. Reprod**. v. 51, p. 971–981, 1994.
- EPPIG, J.J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature**, v. 11, p. 483-484, 1979.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. V. 122, p. 829-838, 2001.
- ESWARAKUMAR V.P., LAX I., SCHLESSINGER J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** v.16, p. 139–149, 2005.

EVANS ACO & FORTUNE JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, p.2936-2971, 1997.

FEUERSTEIN, P., CADORET, V., DALBIES-TRAN, R., GUÉRIF, F., ROYÈRE, D. Oocyte-cumulus dialog **Gynecol Obstet Fertil**. v. 34(9), p. 793-800, 2006.

- FEUERSTEIN, P., CADORET, V., DALBIES-TRAN, R., GUERIF, F., BIDAULT, R., ROYERE, D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. Hum **Reprod.** v. 22(12), p. 3069-3077, 2007.
- FINDLAY J.K., DRUMMOND A.E., DYSON M.L., BAILLIE A.J., ROBERTSON D.M., ETHIER J.F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. **Mol. Cel. Endocrin.**, v.191, p. 35–43, 2002.
- FORD-PERRISS, M., ABUD, H., MURPHY, M., Fibroblast growth factor in the developing central nervous system, Clin. Exp. Pharmacol.Physiol., v.28, p.493–503, 2001.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225-32, 1994.
- FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., EVANS, A. C. O., TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. Biol. Reprod. v. 65, p. 648–654, 2001.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim. Reprod. Sci. v. 78, p. 135–163, 2003.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. Anim. Reprod. Sci., v.82-83, p.109-26, 2004.
- GEBAUER G., PETER A.T., ONESIME D., DHANASEKARAN N. Apoptosis of ovarian granulosa cells: correlation with the reduced activity of ERKsignaling module. J Cell Biochem, v.75, 547–554, 1999.
- 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.431-46, 2004.
- GILCHRIST R. B., LANE M., THOMPSON J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum. Reprod. Updat., v.14, p. 159–177, 2008.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.
GINTHER O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.**, v.65, p.638-47, 2001.

- GIORDANO F., DE MARZO A., VETRINI F., MARIGO V. Fibroblast growth factor and epidermal growth factor differently affect differentiation of murine retinal stem cells in vitro **Molecular Vision** v. 13, p. 1842-1850, 2007.
- GLISTER C., KEMP C.F., KNIGHT P.G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v.127, p.239–254, 2004.
- GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol. Reprod.**, v.55, p.68-74, 1996.
- GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford: Cab International, p. 130-142, 1994.
- GOSPODAROWICZ D. Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. **Clin Orthop Relat Res.** v. 257, p. 231-248, 1990.
- GREENWALD, G.S. & ROY, S.K. Follicular development and its control. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.). The physiology of reproduction. New York: Raven Press, p.629-724, 1994.
- GRIMES RW & IRELAND JJ. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. **Biol Reprod**. v. 35, p. 725–732, 1986.
- HAGHIGHAT, N. & VAN WINKLE, L.J.. Developmental change in follicular cellenhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **J. Exp. Zool.**, v. 253, p. 71–82, 1990.
- HEER, R., DOUGLAS, D., MATHERS, M.E., ROBSON, C.N., LEUNG, H.Y., Fibroblast growth factor 17 is over-expressed in human prostate cancer, J. Pathol. v.204, p.578–586, 2004.
- HESS, K.A., CHEN, L., LARSEN, W.J. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes **Biol Reprod**. v. 61, p. 436-443, 1999.

- HOSHIKAWA M., OHBAYASHI N., YONAMINE A., KONISHI M., OZAKI K., FUKUI S., ITOH N., Structure and Expression of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-17, Preferentially Expressed in the Embryonic Brain. Biochem Biophys Res Commun. v.244, p.187–191, 1998.
- HU, M.C., QIU, W.R., WANG, Y.P., HILL, D., RING, B.D., SCULLY, S., BOLON,
 B., DEROSE, M., LUETHY, R., SIMONET, W.S., ARAKAWA, T.,
 DANILENKO, D.M., FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation, Mol. Cell. Biol. v.18, p. 6063–6074, 1998.
- HUSSEIN, T.S., FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G. GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent *cumulus* cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J. Cell Sci,** v. 118, p. 5257-5268, 2005.
- IGARASHI, M., FINCH, P. W., AARONSON, S. A., Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). J. Biol. Chem., v.273, p. 13230-13235, 1998.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. J. Reprod. Fertil., v. 34, p. 39-54, 1987.
- IRELAND J, GOOD T, KNIGHT P, IRELAND J. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. Biol Reprod. v. 50, p.1265–1276, 1994.
- ITOH, N. & ORNITZ, D.M. Evolution of the FGF and FGFR gene families. **Trends Genet**; v. 20(11), p. 563-9, 2004.
- IZADYAR F, ZEINSTRA E, BEVERS MM. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., v.51(3), p.339-345, 1998.
- JOHNSON, D.E. & WILLIAMS, L.T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Adv. Cancer Res.**, v.60, p.1-41, 1993.
- JUENGEL J.L. & MCNATTY K.P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Hum. Reprod. Update**, v.11, p.143–160, 2005.

- KAPADIA R. M., GUNTUR A. R. REINHOLD M. I., NASKI M. C., Glycogen synthase kinase 3 controls endochondral bone development: Contribution of fibroblast growth factor 18. Developmental Biology, 2005.
- KATOH, Y. & KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification of FGF-25. Int. J. Mol. Med. v. 16(4), p. 767-770, 2005.
- KIM J.M., YOON Y.D. AND TSANG B.K., Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. **Endocrinology** v.140, 2307–2317, 1999.
- KIM, I., MOON, S., YU, K., KIM, U., KOH, G.Y. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. Biochim. Biophys. Acta, v.1518, p.152-6, 2001.
- KNIGHT P.G. & GLISTER C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.165– 183, 2003.
- KNIGHT P.G. & GLISTER C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, p.191–206, 2006.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **J. Anim. Sci.**, v.82 p.14-23, 2004.
- LATHAM, K.E., BAUTISTA, D.M., HIRAO, Y., O'BRIEN, M.J., EPPIG, J.J. Comparison of protein synthesis patterns in mouse *cumulus* cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and insulin of granulosa cell differentiation *in vitro*. **Biol. Reprod**, v. 61, p. 482–492, 1999.
- LI Y.Z., LI C.J., PINTO A.V., PARDEE A.B., Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. **Mol. Med.**, v.5, p.232–239, 1999.
- LIU, Z., XU, J., COLVIN, J. S., ORNITZ, D. M. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. Genes Dev., v.16, p. 859– 869, 2002.
- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol* **Reproduction**, v. 54(6), p.1420-1429, 1996.

- MACARTHUR CA, LAWSHÉ A, XU J, SANTOS-OCAMPO S, HEIKINHEIMO M, CHELLAIAH AT, ORNITZ DM. FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. Development, v.121(11), p.3603-3613, 1995.
- MARKSTROM E., SVENSSON E.C., SHAO R., SVANBERG B., BILLIG H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, 23–30, 2002.
- MARUOKA Y, OHBAYASHI N, HOSHIKAWA M, ITOH N, HOGAN BL, FURUTA Y. Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. **Mech. Dev.**, 74(1–2): p.175– 177, 1998.
- MATZUK, M.M., BURNS, K.H., VIVEIROS, M.M., EPPIG, J.J. Intercellular communications in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Science, v. 296, p. 2178-80, 2002.
- MAZERBOURG, S., OVERGAARD, M.T., OXVIG, C., CHRISTIANSEN, M., CONOVER, C.A., LAURENDEAU, I., VIDAUD, M., TOSSER-KLOPP, G., ZAPF, J., MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, v.142, p.5243-53, 2001.
- MCNATTY, K.P., HEATH, D.A., LINDY, F., FIDLER, A.E., QUIRKE L., O'CONNELL A., SMITH, P., GROOME, N., TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. J. Reprod. Fertil., Suppl.54, p.3-16, 1999.
- MCNATTY, K.P., MOORE, L.G., HUDSON, N.L., QUIRKE, L.D., LAWRENCE, S.B., READER, K., HANRAHAN, J.P., SMITH, P., GROOME, N.P., LAITINEN, M., RITVOS, O., JUENGEL, J.L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128(4) p. 379-86. 2004.
- MCNATTY, K.P., READER K., SMITH P., HEATH D. A., JUENGEL J. L. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. In: Proceedings of the Seventh Internacional Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, v. 64, p. 55-68, 2006.

- MIHM, M., AUSTIN E. J., GOOD T. E. M., IRELAND J. L. H., KNIGHT P. G., ROCHE J. F., IRELAND J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 811–819, 2000.
- MIHM, M., CROWE, M.A., KNIGHT, P.G., AUSTIN, E.J. Follicle Wave Growth in Cattle. **Reprod. Domestic Anim.**, v.37, p.191–200, 2002.
- MIHM, M. & BLEACH, E.C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.,** v.78(3-4), p.217-37, 2003.
- MONGET, P., BESNARD N., HUET C., PISSELET C., MONNIAUX D. Insulinlike growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. Horm. Res. v. 45, p. 211–217, 1996.
- MONNIAUX, D., HUET, C., BESNARD, N., CLÉMENT, F., BOSC, M., PISSELET, C., MONGET, P., MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. J. Reprod. Fertil., Suppl.51, p.3-23, 1997a.
- MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v.47, p.3-12, 1997b.
- NASKI M.C. & ORNITZ D.M. FGF signaling in skeletal development. Front Biosci. v. 3, p. 781-794, 1998.
- NEZU M., TOMONAGA T., SAKAI C., ISHII A., ITOGA S.,NISHIMURA M., MATSUO Y., TAGAWA M., NOMURA F., Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor-8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors, Biochem Biophys Res Commun v.335 p.843–849 2005.
- NILSSON E., PARROTT J.A., SKINNER M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol. v.175, p. 123–130, 2001.
- NOGUEIRA M.F.G., BURATINI J.JR., PRICE C.A., CASTILHO A.C., PINTO M.L.G., BARROS C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.74, p.680-686, 2006.
- OHBAYASHI, N., HOSHIKAWA, M., KIMURA, S., YAMASAKI, M., FUKUI, S., ITOH, N. Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. J. Biol. Chem., v.273, 18161–18164, 1998.

- OHBAYASHI N., SHIBAYAMA M., KUROTAKI Y., IMANISHI M., FUJIMORI T., ITOH N., TAKADA S. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. Genes Dev., v. 16, p. 870–879, 2002.
- OHUCHI, H., HORI, Y., YAMASAKI, M., HARADA, H., SEKINE, K., KATO, S., ITOH, N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. Bioch. Bioph. Res. Comm., v. 277, p. 643-649, 2000.
- ORNITZ D.M & ITOH N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, REVIEWS3005, v. 2(3), p. 1-12, 2001.
- PARROTT, J.A., VIGNE, J.L., CHU, B.Z., SKINNER, M.K. Mesenchymalepithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. **Endocrinology**, v.135, p.569-575, 1994.
- PARROTT JA & SKINNER MK. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. Endocrinology. v.139, p.228–235, 1998a.
- PARROTT JA & SKINNER MK. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. **Endocrinology.** v.139, p. 2240–2245, 1998b.
- PENG, X.R., HSEUH, A.J., LAPOLT, P.S., BJERSING, L., NY, T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell lysates during follicular development and ovulation. Endocrinology v. 129, p. 3200-3207, 1991.
- PETER A.T. & DHANASEKARAN N. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. **Reprod Domest Anim.**, v.38, 209– 213, 2003.
- PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v. 29(9), 45, 2001.
- PORETSKY, L., CATALDO, N. A., ROSENWAKS, Z., GIUDICE, L. C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr. Rev. v. 20, p. 535–582, 1999.

- QUIRK, S.M., HARMAN, R.M., COWAN R.G. Regulation of Fas Antigen (Fas, CD95)-Mediated Apoptosis of Bovine Granulosa Cells by Serum and Growth Factors. Biol. Reprod. v. 63, p. 1278–1284, 2000.
- QUIRK S. M., COWAN R. G., HARMAN R. M., HU C. L., PORTER D. A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. **J Anim Sci**., v. 82, p. 40-52, 2004.
- RAMAKERS C., RUIJTERA J. M., DEPREZA R. H. L., MOORMAN A. F. M., Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters. v. 339, p. 62–66, 2003.
- RIVERA, G.M., CHANDRASEKHER, Y.A., EVANS, A.C., GIUDICE, L.C., FORTUNE, J.E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.102-11, 2001.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. Analysis of Diferencial Menssager RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. Biol. Reprod., Champaign v.66, 589-595, 2002.
- ROBLES R., TAO X.J., TRBOVICH A.M., MARAVEL D.V., NAHUM R., PEREZ G.I., TILLY K.I., TILLY J.L. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, 2641–2644. 1999.
- SAKAGUCHI M, DOMINKO T, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, NAGAI T, FIRST NL. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology**, v.54(8), p.1327-1342, 2000.
- SARTORELLI E., CARVALHO L., BERGFELT D., GINTHER O. J., BARROS C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SHIMASAKI, S., MOORE, R.K., ERICKSON, G.F., OTSUKA, F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. **Reproduction**, v. 61, p. 323-337, 2003.

- SHIMOKAWA T., FURUKAWA Y., SAKAI M., LI M., MIWA N., LIN Y. M., NAKAMURA Y. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. Cancer Res. v.63, p.6116–6120, 2003.
- SLEEMAN, M., FRASER, J., McDONALD, M., YUAN, S., WHITE, D., GRANDISON, P., KUMBLE, K., WATSON, J.D., MURISON, J.G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. Gene, v.271, p.171-82, 2001.
- SILVA, J.M. & PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. J. Endocrinol., v.174, p.499-507, 2002.
- SIRARD MA, PARRISH JJ, WARE CB, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biol Reprod.**, v.39(3), p.546-552, 1988.
- SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v. 65 (1), p. 126-136, 2006.
- SPICER, L.J. & ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.12, p.223-45, 1995.
- STEWART, R. E., SPICER L. J., HAMILTON T. D., KEEFER B. E., DAWSON L. J., MORGAN G. L., ECHTERNKAMP S. E. Levels of insulinlike growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology** v. 137, p. 2842–2850, 1996.
- SU, Y.Q., DENEGRE, J.M., WIGGLESWORTH, K., PENDOLA, F.L., O'BRIEN, M.J., EPPIG, J.J. 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Dev Biol**. v. 263(1), p. 126-138, 2003.
- SUGIURA K., SU Y., DIAZ F.J., PANGAS S.A., SHARMA S., WIGGLESWORTH K., O'BRIEN M.J., MATZUK M.M., SHIMASAKI S., EPPIG J.J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v.134, p.2593-2603, 2007.

- VALVE E., PENTTILA T.L., PARANKO J. & HARKONEN P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 232, 173–177, 1997.
- 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 TOL HT, VAN EIJK MJ, MUMMERY CL, VAN DEN HURK R, BEVERS MM. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. Mol Reprod Dev., v.45(2), p. 218-224, 1996.
- 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, p.133-40, 1995.
- VISSER J.A. & THEMMEN A.P. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. **Mol. Cel. Endocrin.**, v.234, p.81–86, 2005.
- WANDJI, S.A., PELLETIER, G., SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v.47, p.807-13, 1992.
- WANG Y., ASSELIN E. AND TSANG B.K. Involvement of transforming growth factor alpha in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by follicle-stimulating hormone. **Biol Reprod.**, v.66, 1672–1680, 2002.
- WEBB, R., NICHOLAS, B., GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., GUTIERREZ, C.G., GARVERICK, H.A., ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction**, Suppl.61, p.71-90, 2003.
- WEBB, R., CAMPBELL B. K. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. In: Proceedings of the Seventh Internacional Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, v. 64, p. 141-163, 2006.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. Theriogenology, doi:10.1016/j.theriogenology, 04.028, 2007.

- XU Z, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, HAMILTON SA, YOUNGQUIST RS. 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, 1995.
- XU, J., LAWSHE, A., MACARTHUR, C.A., ORNITZ, D.M., Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17, Mech. Dev .v. 83, 165–178, 1999.
- XU, J., LIU, Z., ORNITZ, D.M., Temporal and spatial gradients of fgf8 and fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures, **Development** v.27, 1833–1843, 2000.
- YAMASHITA, T., ITOH, N., Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain. Biochem Biophys Res Commun, v.277, 494–498, 2000.
- 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(23), 15694-700, 2006.
- ZHONG W., WANG Q.T., SUN T., WANG F., LIU J., LEACH R., JOHNSON A., PUSCHECK E.E., RAPPOLEE D.A. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells **Mol. Reprod. Develop**. v. 73, p. 540– 550, 2006.
- ZUELKE, K. A. & BRACKETT, B. G. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. Endocrinology, v. 131, p.2690-2696, 1992.

"Trabalho enviado para a revista Reproduction"

Regulation of fibroblast growth factor 17 expression in bovine antral follicles

MF Machado¹, VM Portela², CA Price², IB Costa¹, P Ripamonte³, RL Amorim⁴, J Buratini Jr³*

¹Departamento de Reprodução Animal and ⁴Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada

³Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil

*Correspondence: J. Buratini Jr., Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual Paulista, Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000 Brasil; FAX: 55-14-38116251; e-mail: buratini@ibb.unesp.br

SHORT TITLE: FGF17 expression in bovine follicles.

ABSTRACT

Fibroblast growth factor-8 (FGF8) is an oocyte-derived protein that signals to cumulus cells. FGF8 has structural and receptor-binding similarities with FGF17, whose expression in the ovary has not been reported. In this study, we demonstrate protein localization to the oocyte of preantral follicles, and to the oocyte and granulosa cells of antral follicles. Real-time PCR demonstrated the presence of mRNA in immature oocytes and, to a lesser extent, in granulosa and theca cells, but not in matured oocytes. *FGF17* mRNA abundance was low in granulosa cells from healthy follicles and increased significantly in attetic follicles. Addition of FSH or IGF1 to granulosa cells in vitro inhibited *FGF17* mRNA abundance. We conclude that FGF17 is a potential oocyte-derived paracrine mediator of granulosa cell differentiation in the immature oocyte-cumulus cell complex.

INTRODUCTION

Follicle development is under the control of gonadotrophins, steroids and a variety of locally produced peptides including fibroblast growth factors (FGFs) (Webb *et al.* 2003). Several FGFs and their receptors (FGFR) have been detected in ovarian follicles, suggesting roles in the regulation of folliculogenesis (van Wezel *et al.* 1995; Berisha *et al.* 2004; Buratini *et al.* 2005a; Buratini *et al.* 2005b; Buratini *et al.* 2007). The twenty-two known FGFs have been grouped into 7 subfamilies with distinct receptor-binding properties. The FGFR proteins are encoded by five different genes of which FGFR1, 2 and 3 undergo alternative splicing to produce two functional variants (B and C; Ornitz et al. 1996; Itoh & Ornitz 2004). Paracrine roles within the follicle have been explored for FGF2 and for the FGF7 subfamily, containing also FGF10. FGF2, which is predominantly expressed by theca cells (Berisha *et al.* 2000), stimulates

proliferation and inhibits steroidogenesis in both theca and granulosa cells (Lavranos *et al.* 1994; Vernon & Spicer 1994; Spicer & Stewart 1996; Nilsson *et al.* 2001). *FGF7* and *FGF10* are expressed in the theca cells but not granulosa cells, and the receptor, *FGFR2B*, is expressed in granulosa cells (Parrot & Skinner 1998; Berisha *et al.* 2004; Buratini *et al.* 2007). Both FGFs inhibit estradiol secretion from cultured granulosa cells (Parrot & Skinner 1998, Buratini *et al.* 2007).

Another subfamily that may be of interest for potential paracrine signalling is the FGF8 subfamily. In adult rodents, *Fgf8* expression is largely confined to the oocyte (Valve *et al.* 1997), and was reported in oocytes as well as somatic follicle cells in cattle (Buratini *et al.* 2005b). FGF8 activates FGFR3C, which was found in theca and granuloa cells in cattle, and *FGFR4* which was localized only to theca cells (Ornitz *et al.* 1996; Buratini *et al.* 2005). Although the roles of the FGF8 subfamily in the control of the ovarian activity are still poorly understood, it was recently shown that oocyte-derived FGF8 cooperates with bone morphogenetic protein 15 (BMP15) to promote glycolytic activity in cumulus cells in mice (Sugiura *et al.* 2007).

The FGF8 subfamily also contains FGF17 (Itoh & Ornitz 2004), which also preferentially activates FGFR3C and FGFR4 (Ford-Periss *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2006). *FGF17* expression was first detected in the embryonic brain, and is most associated with neurogenesis (O'Leary *et al.* 2007) and skeletal development (Krejci *et al.* 2007). Very little is known about the pattern of expression of *FGF17* in the reproductive system. Messenger RNA encoding *FGF17* was detected in human prostatic epithelial cells (Polnaszek *et al.* 2004) and in human placenta and in mouse oocytes and embryos (Zhong *et al.* 2006).

The objective of the present work was to test the hypothesis that FGF17 is a candidate for paracrine signalling within the follicle. Specifically, we sought to

determine in which follicular cell types *FGF17* is expressed, and gain insight into the potential regulation of *FGF17* expression.

RESULTS

Immunohistochemistry revealed the presence of FGF17 protein predominantly in oocytes and granulosa cells of preantral and antral follicles (Fig 1). Staining was localized to the nucleus of oocytes in primordial follicles (Fig 1B) and present in the nucleus and cytoplasm of oocytes in primary, secondary and antral follicles. Staining was weaker in the theca cell layer and at background levels in deep ovarian stroma. Staining was also observed in the surface epithelium and tunica albuginea underlying the epithelium. No staining was observed in the presence of excess blocking peptide.

A survey of *FGF17* expression in follicle cells by real-time PCR showed the presence of mRNA in pooled immature oocytes and at comparatively low levels in both granulosa and theca cells. Whereas Ct values were in the 30-35 range for *FGF17* in all tissues, the Ct values for the housekeeping genes Cyclophilin A (*PPIA*) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) were approximately 25 and 30 respectively in oocyte samples, and 18 and 20 respectively in granulosa and theca samples. A detailed assay of *FGF17* in granulosa and theca cells collected from healthy, transitional and atretic follicles showed that mRNA abundance was significantly higher in granulosa and theca cells from atretic follicles than from healthy or transitional follicles (Fig 2). No *FGF17* mRNA was detected in matured oocyte pools.

As FGF17 protein and mRNA was detected in granulosa cells, we determined whether expression is regulated. Cells were cultured in serum-free medium and treated for 6 days with graded doses of FSH or IGF1. Both gonadotrophic hormones significantly inhibited *FGF17* mRNA abundance (Fig3).

DISCUSSION

These data demonstrate for the first time the expression of FGF17 protein and mRNA in the ovary. The significant findings are the localization of protein to the oocyte and granulosa cells, greater abundance of mRNA in the oocyte, and upregulation of mRNA levels in granulosa and theca cells of atretic follicles.

In the female reproductive system, *FGF17* mRNA has been described only in isolated mouse oocytes/embryos (Zhong *et al.* 2006). In agreement with those data, we detected FGF17 protein in oocytes of preantral and antral follicles. Protein was detected in primordial follicles, but the staining was localized to the nucleus, whereas in follicles at the primary stage and beyond, FGF17 protein was also found in the cytoplasm. This suggests translocation of protein to the nucleus in oocytes, which is more apparent in primordial follicles. Nuclear translocation of endogenous FGF has been reported for FGF1, -2 and -3 (Sheng *et al.* 2004; Zhan *et al.* 1992, Kiefer & Dickson 1995). Nuclear FGF2 increased (Choi *et al.* 2000) whereas nuclear FGF3 decreased (Kiefer & Dickson 1995) cell proliferation in other cell types, but there are no reports on aspects of cellular activity other than proliferation.

FGF17 mRNA was also detected in immature oocytes, but not in matured oocytes. Oocyte secreted factors govern several aspects of *cumulus cells* differentiation; they prevent apoptosis and luteinization, and promote glycolytic activity and *cumulus* mucification and expansion (Gilchrist *et al.* 2008). The present data suggest FGF17 as a possible mediator of such mechanisms. In fact FGF8, the prototype member of this FGF subfamily, was shown to synergize with BMP15 to promote glycolysis in *cumulus cells* (Sugiura *et al.* 2007). The absence of *FGF17* mRNA in matured oocytes indicates that expression is developmentally regulated, and that transcription is suppressed once LH

triggers maturation. Based on Ct values (with respect to housekeeping Ct values), oocytes contained a greater abundance of *FGF17* mRNA than granulosa or theca cells. This is consistent with the oocyte localization of the prototype member of this FGF subfamily, FGF8 (Valve *et al.* 1997, Buratini *et al.* 2005b, Sugiura *et al.* 2007). Relative amounts of *FGF17* mRNA were not obviously different between granulosa and theca cells, although protein staining was considerably stronger in granulosa than in theca cells. Combined, these data suggest that most FGF17 is oocyte-derived, and the stronger staining in granulosa may be due to the diffusion of FGF17 through the avascular granulosa layer, binding to granulosa cell receptors or capture and internalization in granulosa cells. This is supported by evidence for receptor-mediated internalization of exogenous FGFs in several cell lines (Belleudi *et al.* 2002; Olsnes *et al.* 2003; Weshe *et al.* 2006).

Granulosa and theca cell abundance of *FGF17* mRNA was significantly increased in atretic follicles compared with healthy follicles. It is not known whether this is part of an apoptotic pathway or disregulation of gene expression during cell death. Nevertheless, expression of *FGFR3c*, a receptor efficiently activated by FGF17, was detected in theca cells of atretic follicles in cattle (Buratini *et al.* 2005b), which is compatible with a role for FGF17 in the control of thecal atresia. FGFR4 is the other receptor efficiently activated by FGF17, and is unlikely to mediate FGF17 effects on thecal differentiation as expression patterns of ligand and receptor do not match; *FGFR4* mRNA expression was higher in small non-atretic and absent in atretic follicles in cattle (Buratini *et al.* 2005b).

As *FGF17* mRNA and protein were both detected in granulosa cells, we determined if the major gonadotrophic hormones FSH and IGF1 regulate mRNA levels. Both hormones decreased *FGF17* mRNA abundance, which is consistent with the low

mRNA levels observed in healthy follicles. In contrast, expression of FGFR3c was stimulated by FSH in cultured granulosa cells (Buratini *et al.* 2005b). If FGF17, like FGF2, FGF7 and FGF10 (Vernon & Spicer 1994; Parrot & Skinner 1998; Buratini *et al.* 2007), is indeed an inhibitor of estradiol secretion in granulosa cells, it would be critical to keep FGF17 levels low to allow continued follicle growth. Therefore, it is possible to speculate that FSH and IGF1 may stimulate estradiol production in part through the inhibition of FGF expression.

Collectively, these data suggest that somatic cells are not a major source of FGF17 in the healthy follicle, and that FGF17 may be upregulated during follicle atresia. Consistent with the data for FGF8, the present work suggest that FGF17 is principally an oocyte-derived factor. Oocyte *FGF17* expression is developmentally regulated, being drastically inhibited after LH induced maturation. This suggests FGF17 as a paracrine regulator of cumulus cell differentiation in immature cumulus cell-oocyte complexes.

MATERIALS AND METHODS

Tissues

Follicles of diameter ≥ 5 mm were dissected from the ovaries of adult cows (predominantly Nellore, *Bos taurus indicus*) obtained in an abattoir local to the Sao Paulo State University campus in Botucatu and transported to the laboratory in saline on ice. Follicular fluid was aspirated, centrifuged, and frozen for progesterone and estradiol assays. The antral cavity was flushed repeatedly with cold saline, and granulosa cells were recovered by centrifugation at 1200 X g for 1 min and pooled with the follicular fluid pellet. The remaining granulosa cells adhering to the follicle wall were removed by gently scraping with a blunt Pasteur pipette, and the theca layer was removed with a

forceps and washed in saline by repeated passages through a 1 ml syringe. Samples were collected in Trizol (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil), homogenized with a Polytron and submitted immediately to total RNA extraction according to the manufacturer's protocol. Cumulus-oocyte-complexes were aspirated from antral follicles (2 to 8 mm), and cumulus cells were removed from the oocyte by vortexing. Pools of 20 immature oocytes were collected, and RNA was extracted with the RNeasy kit (Qiagen, Sao Paulo, Brazil).

Follicles were classed according to estradiol:progesterone (E:P) ratios of > 1, 1– 0.01, and < 0.01 (Ireland *et al.* 1994), which we defined as healthy, transitional, and highly atretic, respectively (Grimes & Ireland, 1986). Cross-contamination of theca and granulosa cells was tested by detection of mRNA encoding cytochromes P450 aromatase (*CYP19A1*) and 17 α -hydroxylase (*CYP17A1*) mRNA in each sample by PCR as described (Buratini *et al.* 2005b). The detection of *CYP19A1* amplicons in theca samples or of *CYP17A1* amplicons in granulosa samples indicated cross-contamination, and such samples were discarded.

Pools of 20 immature oocytes were collected from abattoir ovaries, and RNA was extracted with the RNeasy kit (Qiagen). *In vivo* matured oocytes were obtained from ten Nellore (*Bos taurus indicus*) cows submitted to the following hormonal protocol to optimize oocyte recovery per cow, which was started on random days of the estrous cycle. On Day 0 cows were injected i.m. with 2mg of estradiol benzoate (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Canada) and an intravaginal device containing 1.9g of progesterone (CIDR-B; Pfizer, Sao Paulo, Brazil) was inserted and maintained for eight days. From Day 5 to Day 8, eight decreasing doses of FSH (total of 200 mg; Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) were administered i.m. Seventy two hours after the beginning of the FSH treatment, a PGF_{2a} analog (25 mg, d-cloprostenol,

Prolise, Arsa S.R.L., Buenos Aires, Argentina) was administered i.m., and 48 hours later (on Day 9) the progesterone device was removed and 25 mg LH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) was injected to induce oocyte maturation. Fifteen to eighteen hours after the LH treatment, oocytes were recovered by transvaginal ultrasound-guided aspiration. The oocytes were denuded by vortexing in PBS and stored at -80°C until RNA extraction with the RNeasy kit (Qiagen). To confirm in vivo maturation, representative oocytes were denuded, fixed for 24 h in ethanol with acetic acid (3:1), stained with 0.004% lacmoid and observed under a phase-contrast microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The metaphase plate and first polar body were observed in the representative oocytes that were classified as matured metaphase II oocytes.

Cell Culture

Granulosa cell culturing was performed as described (Gutiérrez *et al.* 1997), with modifications (Silva & Price, 2000). All materials were obtained from Invitrogen Life Technologies, except where otherwise stated. Follicles ≤ 5 mm diameter were dissected from slaughterhouse ovaries, and those with obvious signs of atresia (avascular theca, debris in antrum) were discarded. Cells were collected by repeatedly passing the follicle wall through a pipette, washed twice by centrifugation at 980 × g for 20 min each, and suspended in DMEM/F12 containing Hepes (20 mM), sodium selenite (4 ng/ml), BSA (0.1%; Sigma-Aldrich), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), transferrin (2.5 µg/ml), non-essential amino acid mix (1.1 mM), androstenedione (10⁻⁷ M at start of culture, and 10⁻⁶ M at each medium change) and insulin (10 ng/ml). Cell viability was estimated with 0.4% Trypan Blue Stain. Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Corning) at a density of 10⁶/well in 1 ml medium. Cultures were maintained at 37° C in 5% CO₂ in air for 6 days, with 700 µl medium being replaced every 2 days.

To determine the regulation of FGF17 expression, cells were stimulated with graded doses of FSH (AFP-5332B, NIDDK, Bethesda, USA; 0, 0.1, 1, 10 and 100 ng/ml) or IGF1 analog (LR3; Sigma-Aldrich - 0, 5, 10, 50 and 100 ng/ml) starting on day 2 of culture. At the end of the culture period, cells were collected in Trizol and stored at 70°C until RNA extraction. Data were derived from three independent cultures.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Theca and granulosa cell RNA (1 μ g) samples were incubated with DNAse I (1U/ μ g RNA; Invitrogen) then reverse transcribed with SuperScript III (200U/ μ L; Invitrogen) and oligo-d(T) primer. The RNA yield from pools of twenty oocytes was too low to be accurately quantified by spectrometry, so 8 μ l aliquots of RNA were reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen).

Primers for *FGF17* were designed based on the predicted bovine sequences and amplicons were sequenced to confirm identity. Relative real-time RT-PCR analysis was performed with an ABI 7500 using TaqMan Assay by Design (Applied Biosystems, Sao Paulo, Brazil) for the target gene (*FGF17*) and Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for housekeeping genes. The primer sequences, fragment size and annealing temperature for each gene are shown in table 1. Reactions were optimized to provide maximum amplification efficiency for each gene. PCR was performed on 0.5μ l cDNA in 25 μ L reaction volumes in duplicate, and the specificity of each PCR product was determined by melting curve analysis (for housekeeping genes) and confirmation of the amplicon size using electrophoresis with 2% agarose gels (for *FGF17* and housekeeping genes). Negative controls (water replacing cDNA) were run on every plate. The relative expression of each target gene was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction (Pfaffl, 2001); the control was a cDNA sample from each cell type analyzed. To select the most stable housekeeping gene for each cell type analyzed, *PPIA*, *GAPDH* and histone H2AFZ (*H2AFZ*) amplification profiles were compared using the geNorm software (Microsoft, Redmond, USA; Ramakers *et al.* 2003); *PPIA* was chosen for theca cells and oocytes, *GAPDH* for granulosa, and *H2AFZ* for cultured granulosa cells.

Immunohistochemistry

Bovine ovaries were collected from an abattoir, bisected, and fixed in paraformaldehyde. Fixed tissues were embedded in paraffin, and 3 µm sections were placed on poly-L-lysine-coated slides. Sections were deparaffinized in xylene twice for 20 min, and hydrated in successive 3-min washes in 95% and 85% ethanol. Antigen retrieval was achieved by incubating in 0.5 M mM Tris-EDTA pH 9.0 at 96°C for 30 min. Endogenous peroxidase was quenched by incubation in methanol with 5% hydrogen peroxide for 10 min, then rinsed ten times in distilled water and twice for 5 min in 0.5 M Tris pH 7.4. Slides were then incubated with polyclonal FGF17 antibody (1.25µg/mL; 500-P152; PeproTech, Rocky Hill, USA) for 2 hours at room temperature in a humidified chamber. Slides were washed in 0.5 M Tris pH 7.4, then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 40 min (EnVision Dual Link System, Dako, Carpinteria, USA). Immunostaining was revealed with liquid DAB (Dako) and sections were counterstained with Harris hematoxylin. Negative controls were performed by preincubating FGF17 antibody with twice the concentration of recombinant FGF17 protein for two hours at room temperature (2.5µg/mL; 100-27; PeproTech).

Steroid Assays

Estradiol and progesterone were assayed in follicular fluids using iodinated tracers and the antibodies furnished in the Third Generation Estradiol RIA and Progesterone RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, USA), respectively, with a revised protocol (Buratini *et al.* 2005b). The standard curves and samples were diluted in PBSgelatin. The intraassay and interassay coefficients of variation were 7.4% and 13.5%, respectively, for estradiol, and 6.8% and 7.0%, respectively, for progesterone. The sensitivities of the assays were 0.3 ng/ml for estradiol and 0.2 ng/ml for progesterone.

Statistics

The data were transformed to logarithms if not normally distributed. ANOVA was used to test the effect of follicle class on *FGF17* mRNA levels in granulosa cells, and the effects of FSH and of IGF1 on *FGF17* mRNA levels in cultured granulosa cells. Non parametric ANOVA was used to test the effect of follicle class on FGF17 mRNA abundance in theca cells as data were not normally distributed even after transformation to logarithms. Means comparisons were performed with the Tukey-Kramer HSD test after ANOVA. Data are presented as means \pm SEM. Analyses were performed with JMP software (SAS Institute, Cary, USA).

DECLARATION OF INTEREST

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

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Garcia JF (Universidade Estadual Paulista, Araçatuba) for sequencing the *FGF17* PCR products, and Drs Castilho ACS, Pinczowski P and Guerra DM for technical assistance.

REFERENCES

Belleudi F, Ceridono M, Capone A, Serafino A, Marchese C, Picardo M, Frati L & Torrisi MR 2002 The endocytic pathway followed by the keratinocyte growth factor receptor. *Histochemistry and Cell Biology* **118** (1) 1-10.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W & Einspanier R 2000 Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *The Journal of Endocrinology* **167** (3) 371-82.

Berisha B, Sinowatz F & Schams D 2004 Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* **67** 162-171.

Buratini Jr J, Glapinski VF, Giometti IC, Teixeira AB, Costa IB, Avellar MCW, Barros CM & Price CA 2005a Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and –4, in fetal bovine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development* **70** 255-261. **Buratini Jr J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES & Price CA** 2005b Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* **130** 343-350.

Buratini Jr J, Pinto MGL, Castilho AC, Amorim RL, Giometti IC, Cao M, Nicola ES & Price CA 2007 Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its

receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. *Biology of Reproduction* **77** 745-750.

Choi J, Ko MK & Kay EP 2000 Subcellular localization of the expressed 18 kDa FGF-2 isoform in corneal endothelial cells. *Molecular Vision* **6** 222-231.

Ford-Perriss M, Abud H & Murphy M 2001 Fibroblast growth factor in the developing central nervous system. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* **28** 493–503.

Gilchrist RB, Lane M & Thompson JG 2008 Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* **14** (2) 159–177.

Grimes RW & Ireland JJ 1986 Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biology of Reproduction* **35** 725–732.

Gutiérrez CG, Campbell BK & Webb R 1997 Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* **56** 608-616.

Ireland JLH, Good TEM, Knight PG & Ireland JJ 1994 Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biology of Reproduction* **50** 1265-1276.

Itoh N & Ornitz DM 2004 Evolution of the FGF and FGFR gene families. *Trends of Genetics* **20** (11) 563-569.

Kiefer P & Dickson C 1995 Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Molecular and Cellular Biology* **15** (8) 4364-4374.

Krejci P, Krakow D, Mekikian PB & Wilcox WR 2007 Fibroblast growth factors 1, 2, 17, and 19 are the predominant FGF ligands expressed in human fetal growth plate cartilage. *Pediatrics Research* **61** (3) 267-272.

Lavranos TC, Rodgers HF, Bertoncello I & Rodgers RJ 1994 Anchorageindependent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fobroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Experimental Cell Research* 211 245-251.

Nilsson E, Parrott JA & Skinner MK 2001 Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **175** 123-130.

O'Leary DD, Chou SJ & Sahara S 2007 Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* **56** (2) 252-269.

Olsnes S, Klingenberg O & Wiedlocha A 2003 Transport of Exogenous Growth Factors and Cytokines to the Cytosol and to the Nucleus. *Physiology Reviews* **83** 163-182.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G & Goldfarb M 1996 Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (25) 15292–15297.

Ornitz DM & Itoh N 2001 Fibroblast growth factors. *Genome Biology Reviews* 2 (3) 1-12.

Parrott JA & Skinner MK 1998 Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology* 139 228–235.

Pfaffl MW 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** (9) 45.

Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Wang J & Ittmann M 2004 FGF17 is an autocrine prostatic epithelial growth factor and is upregulated in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **60** (1) 18-24.

Ramakers C, Ruijtera JM, Depreza RHL & Moorman AFM 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. **339** 62–66.

Sheng Z, Lewis JA & Chirico WJ 2004 Nuclear and Nucleolar Localization of 18kDa Fibroblast Growth Factor-2 Is Controlled by C-terminal Signals. *The Journal of Biological Chemistry* **279** (18) 40153–40160.

Silva J & Price CA 2002.Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Endocrinology* **174** 499-507.

Spicer LJ & Stewart RE 1996 Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biology of Reproduction* **54** (1) 255-63.

Sugiura K, Su Y, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ 2007 Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* **134** 2593-2603.

van Wezel IL, Umapathysivam K, Tilley WD & Rodgers RJ 1995 Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology* **115** 133-140.

Valve E, Penttila TL, Paranko J & Harkonen P 1997 FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232 173–177.

Vernon RK & Spicer LJ 1994 Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science* **72** 2696-2702.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA & Armstrong DG 2003 Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction* **61** 71-90.

Wesche J, Malecki J, Wiedlocha A, Skjerpen CS, Claus P & Olsnes S 2006 FGF-1 and FGF-2 Require the Cytosolic Chaperone Hsp90 for Translocation into the Cytosol and the Cell Nucleus. *The Journal of Biogical Chemistry* **281** 11405-11412.

Zhan X, Hu X, Friedman S & Maciag T 1992 Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **188** (3) 982-991.

Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M & Ornitz DM 2006 Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of Biological Chemistry* **281** (23) 15694-15700. **Zhong W, Wang QT, Sun T, Wang F, Liu J, Leach R, Johnson A, Puscheck EE & Rappolee DA** 2006 FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. *Molecular Reproduction and Development* **73** 540–550.

Figure legends

Fig 1. Immunohistological detection of FGF17 protein in bovine ovaries. Staining was observed in the surface epithelium (A) and in the oocyte of primordial (B, arrow), primary (C), secondary (A) and antral (D) follicles. The granulosa cell layer was well stained in antral follicles (D,E) whereas the theca layer was weakly stained. No staining was observed in the presence of excess FGF17 protein (F). Original magnification 250x (A,E,F), 640x (B), 500x (C) and 400x (D). g, granulosa; t, theca; s, stroma.

Fig 2. Follicular *FGF17* mRNA abundance varies with follicle health. Follicles were classified as healthy, transitional or atretic based on E2:P4 ratios in follicle fluid and RNA measured by real-time PCR in isolated granulosa and theca cells. Data are presented as mean (\pm SEM) values relative to a calibrator sample by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Data from theca cells were analysed by nonparametric tests. Bars with different letters are significantly different. Numbers in parentheses denote the number of samples analysed.

Fig 3. Regulation of *FGF17* mRNA abundance in granulosa cells by FSH and IGF1. Cells from follicles 2-5 mm diameter were placed in serum-free culture and the stated doses of FSH or IGF1 were added on day 2. Total RNA was collected on day 4, and *FGF17* mRNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean (\pm SEM) values relative to a calibrator sample by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different. Data were derived from three independent cultures.

Target	Sequence	Fragment size (bp)	Anneling temperature (°C)
GAPDH	F 5' ggc gtg aac cac gag aag tat aa 3' R 5' ccc tcc acg atg cca aag t 3'	119	62
PPIA	F 5' gcc atg gag cgc ttt gg 3' R 5' cca cag tca gca atg gtg atc t 3'	65	60
H2AFZ	F 5' gag gag ctg aac aag ctg ttg 3' R 5' ttg tgg tgg ctc tca gtc ttc 3'	74	60
FGF17	F 5' ccg ggt gcg cat caa g 3'R 5' gct tgc ccc tct tat tca tac aga t 3'Probe FAM 5' ctg aga gtg aga aat ac 3'	62	60

Table 1 Real time PCR primer data

F = forward primer; R = reverse primer







Fig 3