

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS
FIBROBLASTOS 2 (FGF2) SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO
COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO BOVINO**

RODRIGO GARCIA BARROS

BOTUCATU – SP
SETEMBRO - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INFLUÊNCIA DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS
FIBROBLASTOS 2 (FGF2) SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DO
COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO BOVINO**

RODRIGO GARCIA BARROS

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 Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior.

BOTUCATU-SP
SETEMBRO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barros, Rodrigo Garcia.

Influência do fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) sobre a maturação in vitro do complexo cumulus-oócito bovino / Rodrigo Garcia Barros. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Buratini Júnior

Capes: 20804008

1. Bovino. 2. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 3. Oócitos. 4. Apoptose. 5. Meiose. 6. Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos.

Palavras-chave: Apoptose; Células do cumulus; FGF; Meiose; Oócito.

Rodrigo Garcia Barros

Botucatu, 28 de Setembro de 2016

Composição Banca Examinadora

Prof. Dr. José Buratini Junior

Prof. Dra. Fernanda da cruz Landim e Alvarenga

Prof. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

Dedicatória

Este trabalho é dedicado a toda minha família, especialmente meus pais que tanto me apoiam. Aos meus avós pelos ensinamentos e pela paciência. E aos meus irmãos e minha namorada pelo companheirismo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Buratini**, agradeço pela confiança e pela oportunidade de realizar esse trabalho e pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Christopher A. Price**, do do centro de pesquisa em reprodução animal, da faculdade de medicina veterinária da universidade de Montreal, Canadá, pelos ensinamentos e momentos de luz quando os resultados não faziam sentido.

Aos amigos do Laboratório **Carol, Lorena, Paula** e recentemente **Jhessica**, por estarem sempre junto comigo e me ajudando com o que fosse preciso e não deixando faltar nada. Pelas boas risadas e momentos de cafezinhos. E por sempre poder contar com vocês.

Aminha namorada **Lais** por todo apoio. Por estar ao meu lado, apesar da distância, pelo amor, cuidado e compreensão.

A **Camila de Paula Freitas dell'Aqua**, por sempre darum jeito de me encaixar nos horários e me ajudar com todas as análises.

Toda minha família, especialmente meus pais por sempre me apoiarem psicologica e financeiramente.

Aos **Servidores e Professores do Depto de Fisiologia – IB** pela amizade e disposição de emprestarem o laboratório sempre que preciso.

Ao **Lab. de produtos naturais**, em especial, **Garboso, Lari e Rie** pela amizade e por estarem sempre presentes. Principalmente para fazer qualquer coisa que não tivesse nada a ver com o que era necessário ser feito.

A **Capes** pela bolsa e suporte financeiro desse estudo.

Lista de Figuras

Figure 1. Effects of time in culture (A) and FSH dose (B) on *FGF2* mRNA abundance in bovine CC undergoing IVM. To assess the effects of FSH dose, COC were cultured for 12 hours (n=3-4 replicates per time or FSH dose). Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample calculated by the DDCT method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).p. 50

Figure 2. Effects of oocyte removal and oocyte secreted factors on *FGF2* mRNA expression. Intact (COC; A), oocyctectomized (OOX; B) and OOX plus denuded oocytes (OOX + OD; 1 oocyte/ μ L; C) were cultured for 4 9(n= 4 replicates) and 22 hours (n= 5 replicates) with FSH (1 μ g/mL) or AREG (100 ng/mL). Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample calculated by the DDCT method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).p. 51

Figure 3. Effects of *FGF2* on oocyte meiosis progression. COC were cultured for 6 hours to assess germinal vesicle status (A; GVBD=germinal vesicle breakdown; n= 5 replicates) and for 22 hours to assess meiosis (B; MII=meiosis II/includes oocytes from telophase I to metaphase II; n= 5 replicates). Oocyte stained with Hoechst 33342 and analysed under UV light (C) and bright field (D). Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).p.52

Figure 4. Effects of grading doses of *FGF2* on the percentage of COCs exhibiting different degrees of expansion (A; n= 5 replicates) and on ECM cohesiveness estimated by the number of pippeting movements to completely denude the oocytes (B; n= 5 replicates). COC were cultured for 22 hours in the presence of FSH (100 μ g/mL). Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).p.53

Figure 5. Effects of graded doses of FGF2 on cumulus cells viability as assessed by PI staining, and percentage of cells positive for caspase 3/7 and annexin V. COCs were cultured with increasing doses of FGF2 for 22 h in the presence of FSH (100 µg/mL). Numbers of total and stained cells were determined by flow cytometry (n= 5 replicates). Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) and bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).....p.54

Figure 6. Effects of FGF2 on mRNA abundance of genes regulating cumulus expansion. COCs were cultured with increasing doses of FGF2 for 6 (n= 5 replicates) and 22h (n= 5 replicates). Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).....p.55

Figure 7. Effects of FGF2 on mRNA abundance of genes regulating apoptosis. COCs were cultured with increasing doses of FGF2 for 22h (n= 5 replicates). Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample by the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).....p.56

Figure 8. Effects of FGF2 on mRNA abundance of genes regulating oocyte maturation. COCs were cultured with increasing doses of FGF2 for 6 (n= 5 replicates). Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR. Data are presented as mean values ($\pm$ S.E.M.) relative to a calibrator sample by the DDCT method with efficiency correction. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$).p.57

Lista de abreviaturas

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
AREG – ampirregulina
ATP – Adenosina trifosfato
BAX – BCL2-associated X protein
BCL2 – B-cell CLL/Lymphoma 2
BMP15 – Proteína morfogênica óssea 15
BSA – Albumina bovina sérica
BTC – Betacelulina
CASPASE – do inglês, *cistenyl aspartate-specific protease*
CC – Células do cumulus
CIV – Cultivo *in vitro*
CMK – Clorometil cetona
COC – Complexo cumulus-oócito
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ECM – Matriz extra celular
EGF – Fator de crescimento epidermal
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal
EPM – Erro padrão da media
EREG – Epirregulina
FAS – TNF recptor superfamily member 6
FGF2 – Fator de crescimento dos fibroblastos 2
FGFb – Fator de crescimento dos fibroblastos básico
FGFR – Receptor do fator de crescimento dos fibroblastos
FIV – Fertilização *in vitro*
FLICA – do inglês, *fluorochrome-labeled inhibitors of caspase*
FMK - Fluorometil cetona
FSH – Hormônio folículo estimulante
FSO – Fatores secretados pelo oócito
GDF9 – Fator de crescimento e diferenciação 9
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
GVBD – Vesícula germinativa em quebra (do inglês, *germinal vesicle breaking down*)

HA – Ácido hialurônico
HAS2 – Hialurona sintase 2
HS – Heparan sulfato
KITL – Kit Ligant
LAV – Meio de lavagem
LH – Hormônio luteinizante
MAPK – do inglês, mitogen activated protein kinase
MIV – Maturação *in vitro*
MPF – Fator promotor da maturação
mRNA – RNA mensageiro
NPPC – do inglês, natriuretic peptide precursor C
nPR – Receptor de progesterone
NPR2 – do inglês, natriuretic peptide receptor 2
OPU – do inglês, *ovarium pick up*
PDE – Fosfodiesterase
PGE2 – Prostaglandina E2
PI – Iodeto de propídeo
PIV – Produção *in vitro*
PKCδ – Proteína quinase c delta
PS - Fosfatidilserina
PTGS2 – do inglês, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*
PTX3 - *pentraxin 3*
TSG6 (ou TNFAIP6) - *Tumor necrosis factor-induced protein 6*
TZP – Projeções trans-zonais

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1. Interação entre o oócito e as células do cumulus	4
2.2. Maturação do complexo cumulus-oócito.....	5
2.3. Apoptose.....	7
2.4. Marcadores para apoptose em citometria de fluxo	11
2.4.1. Ativação das caspases.....	11
2.4.2. Alterações na membrana plasmática	12
2.5. Fator de crescimento dos fibroblastos (FGFs).....	13
2.5.1. Fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2).....	14
3. Referências Bibliográficas	15
CAPITULO 2	27
Fibroblast growth factor 2 regulates <i>in vitro</i> maturation of bovine cumulus oocyte complexes: evidences for a role mediating the influence of the oocyte and FSH	27
Abstract.....	28
1. Introduction	29
2. Material and Methods	31
3. Results.....	36
4. Discussion.....	38
5. References.....	42

RESUMO

BARROS, RG. **Influência do fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito bovino.** Botucatu, 2016. Qualificação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - UNESP

O conhecimento sobre as interações entre células somáticas e células germinativas é importante para a melhoria na eficácia da maturação oocitária *in vitro*. O oócito é um regulador da diferenciação das células foliculares e através dos fatores secretados pelo oócito (FSO) regula eventos importantes que ocorrem dentro do folículo. O fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) é expresso pelas células do cumulus (CC) e teca e estimula a expansão das CC em bovinos e em roedores, além de ter ação antiapoptótica em células da granulosa, mas suas funções no complexo cumulus-oócito bovino não são muito conhecidas. Uma vez que há receptores de FGF em CC e granulosa sugere que há regulação parácrina e autócrina pelo FGF2. O objetivo desse trabalho foi avaliar a adição de doses crescentes de FGF2 ao meio de maturação *in vitro* e avaliar a taxa de quebra da vesícula germinativa (GVBD), estágio da meiose, grau de expansão das CC, grau de coesividade da matriz extracelular, além de genes relacionados com a maturação. Também avaliar a apoptose das CC, através de marcadores para caspase 3 e análise de genes relacionados a apoptose. Foi observado que a taxa de GVBD é aumentada às 6 horas de maturação, no entanto não alterou os níveis de mRNA de *NPPC* ou *NPR2* às 6 horas; da mesma forma não alterou a porcentagem de oócitos em MII às 22 horas. Não houve diferenças significativas no grau de expansão das CC às 22 horas de cultivo, mas há um aumento na coesão da matriz extracelular dessas células. FGF2 diminuiu *COX2* mRNA às 6 horas de cultivo, além de diminuir a *HAS2* mRNA e elevou o *CD44* mRNA, sem interferir na expressão de *VERS* mRNA às 22 horas de cultivo. Ainda, houve uma diminuição nas CC marcadas para caspase 3 às 22 horas, mas sem alteração na marcação de anexina V. FGF2 não alterou a expressão de *FAS* mRNA, mas aumentou a quantidade de transcritos de *nPR* mRNA e a relação anti-apoptótica *BCL2/BAX*. O presente estudo sugere que FGF2 está envolvido na maturação do COC bovino e a

expressão do RNA nas CC é influenciada pelo oócito, o qual induz a retomada da meiose, alterações na matriz extra celular e atividade da caspase.

Palavras Chave: meiose, células do cumulus, apoptose, oócito.

ABSTRACT

BARROS, RG. **Influence of fibroblast growth factor 2 (FGF2) during *in vitro* maturation of bovine cumulus oocyte complexes** Botucatu, 2016. Qualificação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - UNESP

The knowledge about interactions between somatic cells and germ cells is important to improve the oocyte *in vitro* maturation. The oocyte is a regulator of the differentiation of follicle cells and through oocyte secreted factors (OSF) regulates important events that occurs inside follicle. The Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is expressed by cumulus cells (CC) and theca cells and stimulates the expansion of CC in bovine and rodents, also have anti-apoptotic action on granulosa cells, but its functions on cumulus-oocyte complexes remains unclear. Once there are receptors for FGF on CC and granulosa cells it suggests that there is a paracrine and autocrine regulation by FGF2. The aim of this study was evaluate the addition of grade doses of FGF2 on maturation medium and assess the germinal vesicle break down (GVBD) rate, meiosis stage, expansion grade of CC, grade of cohesiveness of extra cellular matrix, besides genes related with maturation. Also assess apoptosis on CC, through markers for caspase 3 and analysis of genes related to apoptosis. It was observed an increase in GVBD rate at 6 hours of maturation, but did not alter the rates of mRNA of *NPPC* or *NPR2* at 6 hours, in the same way, did not alter the percentage of oocytes in metaphase II (MII) at 22 hours. Did not have significance in expansion grade of CC at 22 hours of maturation, but there is an increase in cohesiveness of extra cellular matrix of these cells. FGF2 decreased *PTGS2* mRNA at 6 hours of culture, and *HAS2* mRNA and increased *CD44* mRNA, without alter expression of *VERSICAN* mRNA at 22 hours of culture. There is a decrease in CC marked for caspase 3 at 22 hours, but no alteration on annexin V was observed. FGF2 did not alter expression of *FAS* mRNA expression, but increased *nPR* mRNA and *BCL2/BAX* ratio. The present data suggest that FGF2 is involved in bovine COC maturation and its mRNA expression in CC is influenced by oocyte which induces meiosis resumption, alteration of ECM and decrease of caspase activity.

Palavras Chave: meiose, células do cumulus, apoptose, oócito.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O Brasil é líder mundial na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos e o segundo colocado na produção *in vivo* convencional (Pontes *et al.*, 2011). Esse sucesso se deve à adequação da PIV às raças zebuínas, as principais componentes do rebanho nacional (Pontes *et al.*, 2009). Fêmeas zebuínas usualmente apresentam grande número de folículos antrais nos ovários e, conseqüentemente, grande disponibilidade de oócitos passíveis de recuperação por OPU (do inglês, *ovum pick up*) para PIV.

O aperfeiçoamento das biotecnologias na reprodução tem como objetivo melhorar e explorar o potencial reprodutivo das fêmeas, além do aumento na produtividade dos rebanhos de corte e leite. Com isso, o uso da PIV de embriões tende a ser intensamente pesquisado, assim aperfeiçoando protocolos e melhorando cada vez mais as taxas de produção.

A PIV compreende a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Apesar dessas biotecnologias serem bem estabelecidas, os índices de desenvolvimento ainda são insatisfatórios quando comparados com a produção *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2002). Esse desempenho inferior da PIV é associado a diversos fatores como a perda da sincronização entre maturação citoplasmática e nuclear durante a MIV e alterações epigenéticas nos embriões provocadas pelo sistema de cultivo (Blanco *et al.*, 2011). Dessa forma, acredita-se que as biotecnologias envolvidas na PIV podem ser otimizadas aproximando o sistema de cultivo às condições fisiológicas.

Os oócitos estão circundados por células somáticas especializadas, conhecida como células do cumulus (CC). Há uma comunicação bidirecional entre as CC e o oócito que é crítica para o desenvolvimento do oócito, uma vez que as CC provêm nutrientes, aminoácidos, segundos mensageiros, fatores necessários à maturação, promovendo um ambiente estável e favorável para a maturação do complexo cumulus oócito (COC) (Gilchrist *et al.*, 2008; Assidi *et al.*, 2010; Sutton-McDowall *et al.*, 2015).

A maturação nuclear é caracterizada por diversos eventos como remodelagem da cromatina e quebra da vesícula germinativa (VGBD), extrusão dos corpúsculos polares e, conseqüentemente, o fim da meiose (Meinecke *et al.*,

2001). Já na citoplasmática ocorre a reorganização das organelas e acúmulo de RNA, proteínas e fatores transcricionais (Watson, 2007).

É de extrema importância que as CC estejam viáveis e não iniciem a apoptose, que é um dos fatores que mais influenciam a competência oocitária (Zaraza *et al.*, 2010). A apoptose é um evento que ocorre em células individuais (Kerr *et al.*, 1972) e pode ser iniciada por fatores intrínsecos (estímulos internos) ou extrínsecos (estímulos externos) (Chang *et al.*, 2002). Esses estímulos desencadeiam respostas que levam a ativação da caspase-3, provocando os eventos finais da morte celular programada (Jin e El-Deiry, 2005).

Parte das CC iniciam o processo de apoptose durante a MIV, sendo que os níveis de apoptose são inversamente associados a competência do oócito (Hussein *et al.*, 2005). A apoptose das CC pode ser reduzida com a adição de fatores secretados pelo oócito (FSO) ao meio de cultivo.

O fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) ou fator de crescimento dos fibroblastos básico (FGFb), mostrou-se efetivo em reduzir a apoptose das células da granulosa em cultivo (Peluso *et al.*, 2001). Há evidências de que uma das ações é a inibição da apoptose pela manutenção da homeostase de íons cálcio livres dentro da célula, através da proteína quinase c δ (PKC δ) (Peluso *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2012).

Em folículos antrais a maior expressão FGF2 é apresentada nas células da teca (Berisha *et al.*, 2004) e após o pico de hormônio luteinizante (LH) há estímulo para expressão de FGF2 nas CC bovinas (Assidi *et al.*, 2010). Ainda, segundo (Caixeta *et al.*), a expressão dos principais receptores do FGF2 foi detectada nas CC, sendo fortemente estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) durante a MIV.

A sinalização FGF é feita através de quatro receptores de FGF (FGFR1 – 4) do tipo tirosina quinase e ocorre arranjos transcricionais alternativos formando as isoformas “b” e “c” apresentando diferentes graus de afinidades por distintos FGFs (Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006). E o FGF2 ativa o FGFR1 e as isoformas “c” dos FGFR2 e 3 (Ornitz *et al.*, 1996).

O presente estudo teve como objetivo verificar o padrão de expressão de mRNA de *FGF2* e sua regulação pelo FSH e FSO nas CC bovinas submetidas a MIV. Também verificar os efeitos da adição de FGF2 sobre maturação nuclear de oócitos, expansão e apoptose das CC de COC submetidos a MIV.

3. Referências Bibliográficas

ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-53, May 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427152> >.

ARNAUD, E. et al. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 505-14, Jan 1999. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858574> >.

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 835-52, Dec 2010. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724459> >.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 372-7, Sep 2001. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514191> >.

BEDNER, E. et al. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. **Exp Cell Res**, v. 259, n. 1, p. 308-13, Aug 2000. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942603> >.

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, n. 2, p. 162-71, Feb 2004. ISSN 1040-452X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14694431> >.

BOYCE, M.; DEGTEREV, A.; YUAN, J. Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 1, p. 29-37, Jan 2004. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647235> >.

CAIXETA, E. S. et al. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 6, p. 890-9, 2013. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021259> >.

CAO, M. et al. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Matrix Biol**, v. 25, n. 6, p. 342-54, Aug 2006. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806868> >.

CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 675-81, Nov 2002. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417006> >.

CHANG, S. H. et al. The effector phase of physiological cell death relies exclusively on the posttranslational activation of resident components. **Exp Cell Res**, v. 277, n. 1, p. 15-30, Jul 2002. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061814> >.

CHAVES, R. N. et al. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 7, p. 905-15, 2012. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22935151> >.

CONTI, M. et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 4, p. 715-23, Apr 2006. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051667> >.

COTICCHIO, G. et al. What criteria for the definition of oocyte quality? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1034, p. 132-44, Dec 2004. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731306> >.

DE MURCIA, G.; MÉNISSIER DE MURCIA, J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. **Trends Biochem Sci**, v. 19, n. 4, p. 172-6, Apr 1994. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8016868> >.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 383-424, 1999. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872455> >.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-38, Dec 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732978> >.

FADOK, V. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol**, v. 148, n. 7, p. 2207-16, Apr 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545126> >.

FREIMANN, S. et al. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, n. 2, p. 829-34, Nov 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474502> >.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2011. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366977> >.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 2, p. 159-77, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175787> >.

GOLDSTEIN, J. C. et al. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 156-62, Mar 2000. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707086> >.

GOSPODAROWICZ, D.; BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. **Endocrinology**, v. 104, n. 3, p. 757-64, Mar 1979. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/312195> >.

GREEN, D. R.; EVAN, G. I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v. 1, n. 1, p. 19-30, Feb 2002. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086884> >.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-9, Jul 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286356> >.

HAMMADEH, M. E. et al. Relationship between cytokine concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in serum, follicular fluid and ICSI outcome. **Am J Reprod Immunol**, v. 51, n. 1, p. 81-5, Jan 2004. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14725569> >.

HUSSEIN, T. S. et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 22, p. 5257-68, Nov 2005. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263764> >.

IKEDA, S.; IMAI, H.; YAMADA, M. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. **Reproduction**, v. 125, n. 3, p. 369-76, Mar 2003. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12611600> >.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet**, v. 20, n. 11, p. 563-9, Nov 2004. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475116> >.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther**, v. 4, n. 2, p. 139-63, Feb 2005. ISSN 1538-4047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725726> >.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.

LAVRANOS, T. C. et al. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. **Exp Cell Res**, v. 211, n. 2, p. 245-51, Apr 1994. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143770> >.

LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 8, p. 589-98, Aug 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483992> >.

LIU, C.; LI, C. Y.; YUAN, F. Mathematical modeling of the Phoenix Rising pathway. **PLoS Comput Biol**, v. 10, n. 2, p. e1003461, Feb 2014. ISSN 1553-7358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516373> >.

LODDE, V. et al. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence.

Mol Reprod Dev, v. 74, n. 6, p. 740-9, Jun 2007. ISSN 1040-452X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075796> >.

MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1545-56, Nov 1995. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595224> >.

MATOS, M. H. et al. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v. 19, n. 5, p. 677-84, 2007. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17601416> >.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v. 36, n. 3-4, p. 183-8, Aug 2001. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555366> >.

MILLAR, J. B.; RUSSELL, P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 407-10, Feb 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310893> >.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. 3, p. 215-66, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1759-7692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772309> >.

ORNITZ, D. M. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **J Biol Chem**, v. 271, n. 25, p. 15292-7, Jun 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663044> >.

PATTERSON, S. D. et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. **Cell Death Differ**, v. 7, n.

2, p. 137-44, Feb 2000. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713728> >.

PELUSO, J. J.; PAPPALARDO, A.; FERNANDEZ, G. Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC delta-dependent pathway. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4203-11, Oct 2001. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564676> >.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO : I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. **J Exp Med**, v. 62, n. 5, p. 665-75, Oct 1935. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870440> >.

PONTES, J. H. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-6, Jun 2011. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334055> >.

_____. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-7, Mar 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995895> >.

POZAROWSKI, P. et al. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. **Cytometry A**, v. 55, n. 1, p. 50-60, Sep 2003. ISSN 1552-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938188> >.

PRICE, C. A. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. **J Endocrinol**, v. 228, n. 2, p. R31-43, Feb 2016. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26542145> >.

QUIRK, S. M.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M. Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5033-43, Nov 2004. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271877> >.

SAKAGUCHI, M. et al. 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, n. 8, p. 1327-42, Nov 2000. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192191> >.

SALUSTRI, A. et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1577-86, Apr 2004. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998931> >.

SANTIQUET, N. W. et al. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. **Biol Reprod**, v. 87, n. 2, p. 46, Aug 2012. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649071> >.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-37, Feb 2000. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728374> >.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 784-8, Oct 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048729> >.

SCHÄFER, T. et al. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 8, p. 6244-51, Feb 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645213> >.

SMAILI, S. S. et al. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 183-90, Feb 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563519> >.

SMOLEWSKI, P. et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 73-82, May 2001. ISSN 0196-4763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309811> >.

STERINGER, J. P.; MÜLLER, H. M.; NICKEL, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2--a novel type of protein translocation across membranes? **J Mol Biol**, v. 427, n. 6 Pt A, p. 1202-10, Mar 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25051502> >.

SU, Y. Q. et al. 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, n. 1, p. 126-38, Nov 2003. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568551> >.

SUTTON, M. L. et al. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 27-34, Jul 2003. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814344> >.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 313-9, Sep 2004. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15333782> >.

SUTTON-MCDOWALL, M. L. et al. Redox and anti-oxidant state within cattle oocytes following in vitro maturation with bone morphogenetic protein 15 and follicle stimulating hormone. **Mol Reprod Dev**, v. 82, n. 4, p. 281-94, Apr 2015.

ISSN 1098-2795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721374> >.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-62, Mar 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878464> >.

TUNJUNG, W. A. et al. Effect of hyaluronan to inhibit caspase activation in porcine granulosa cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 382, n. 1, p. 160-4, Apr 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268653> >.

VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, Jan 1998. ISSN 0196-4763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450519> >.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **J Anim Sci**, v. 72, n. 10, p. 2696-702, Oct 1994. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883629> >.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **J Anim Sci**, v. 85, n. 13 Suppl, p. E1-3, Mar 2007. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322120> >.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods Cell Biol**, v. 103, p. 55-98, 2011. ISSN 0091-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722800> >.

WOAD, K. J. et al. FGF2 is crucial for the development of bovine luteal endothelial networks in vitro. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 581-8, Sep 2009.

ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542253> >.

XU, K. P.; GREVE, T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 1, p. 127-34, Jan 1988. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3339574> >.

YOKOO, M.; KIMURA, N.; SATO, E. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. **J Reprod Dev**, v. 56, n. 1, p. 15-9, Feb 2010. ISSN 0916-8818. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203431> >.

ZARAZA, J. et al. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 75-89, Jul 2010. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138354> >.

ZHANG, K.; EALY, A. D. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domest Anim Endocrinol**, v. 42, n. 4, p. 230-8, May 2012. ISSN 1879-0054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264662> >.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815-26, Dec 2010. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876224> >.

ZHANG, M. et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4377-85, Nov 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914782> >.

_____. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-9, Oct 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947764> >.

ZHANG, X. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 15694-700, Jun 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597617> >.