

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - IBB

Campus de Botucatu

Trabalho de Conclusão de Curso

**Efeitos do FGF2, FGF10 e da BMP15 sobre a maturação nuclear de
oócitos bovinos durante a maturação *in vitro***

Botucatu

2013

Efeitos do FGF2, FGF10 e da BMP15 sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*

Fernanda Fagali Franchi^A, Debora Jardina Sartor^B, Paula Fernanda de Lima^B, Jose Buratini Jr^A.

^A Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brasil.

^B Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-970, Brasil.

Endereço para correspondência: Email: buratini@ibb.unesp.br

Resumo

O ambiente folicular é responsável por manter o oócito em parada meiótica e pela retomada da mesma posteriormente. A retomada da meiose em momento adequado é de extrema importância para o desenvolvimento de oócitos de alta competência. Portanto, o estudo dos mecanismos reguladores da retomada da meiose é de grande utilidade. Nesse estudo, os efeitos do FGF2, FGF10 e BMP15 sobre a progressão da meiose durante a maturação oocitária *in vitro* foram testados. Para tanto, complexos cumulus-oócitos (COCs) foram cultivados em meio definido seguindo o delineamento: Interação FGF10 e BMP15: sendo os tratamentos: controle; FGF10 (10ng/mL); BMP15 (100ng/mL); FGF10 (10ng/mL) + BMP15 (100ng/mL); e Dose-Resposta FGF2: sendo os tratamentos: controle e FGF2 nas doses 1, 10 ou 100ng/mL. A fase da meiose foi avaliada após 22h de cultivo por meio de coloração HOESCHT 33342, sendo os oócitos classificados em meiose I ou meiose II. O FGF10 (68%), a BMP15 (62,57%) ou a interação, FGF10+BMP15, (73%) não alteraram a porcentagem de oócitos em MII após a MIV em relação ao controle (69,63%). Assim como, a adição de FGF2 nas doses de 1ng/mL (81,33%), 10ng/mL (84,83%) ou 100ng/mL (83%) também não alteraram a porcentagem de oócitos em MII em relação ao controle (79,83%).

Palavras chaves: Fator de crescimento dos fibroblastos, proteína morfogenética óssea.

Introdução

A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é bidirecional e essencial para a maturação nuclear e citoplasmática e, conseqüentemente, para aquisição da competência do oócito para a fecundação e geração de um embrião com alto potencial de desenvolvimento (Tanghe *et al.*, 2002; Fair, 2003). O oócito participa ativamente dos mecanismos reguladores da maturação do COC via secreção de fatores

parácrinos (FSOs). Por meio desses fatores, o oócito parece estimular as células do cumulus a realizarem funções que o oócito não consegue cumprir por si mesmo (Sutton-Mcdowall et al., 2010). Os FSOs levam ainda à diferenciação das células do cumulus em relação às células da granulosa murais e a manutenção dessa distinção fenotípica dentro do folículo (Eppig et al., 1997; Li et al., 2000).

Um dos FSOs mais explorado na literatura é a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) pertencente à família dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β), que regulam tanto a função das células do cumulus quanto a qualidade do oócito (Li et al., 2000; Eppig, 2001; McNatty et al., 2004; Gilchrist et al., 2006; Gilchrist et al., 2008). A alta expressão da BMP-15 em oócitos bovinos sugere sua importância nessa espécie (Crawford & McNatty, 2012).

Relatos recentes (Sugiura *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2005; Buratini *et al.* 2007; Machado *et al.*, 2009; Caixeta *et al.* 2013a) indicam a inclusão dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) dentre os FSOs, particularmente do FGF-10, expresso em níveis aparentemente altos pelo oócito bovino e com receptores expressos nas células do cumulus de COCs imaturos e ao longo da maturação *in vitro* MIV (Caixeta *et al.*, 2013a). Dados de expressão gênica e funcionais indicam o envolvimento dos FGFs no controle da maturação do COC. Enquanto o FGF10 é expresso pelo oócito, o FGF2 é expresso pelas células do cumulus em bovinos (Buratini *et al.*, 2007; Assidi *et al.*, 2010). Resultados recentes demonstraram que a adição de FGF10 durante a MIV estimula a expansão das células do cumulus e eleva as taxas de produção embrionária em bovinos (Zhang *et al.*, 2010a; Caixeta *et al.*, 2013b). Também há o relato de que o pico de LH estimula a expressão do FGF2 nas células do cumulus sugerindo sua participação na diferenciação do COC (Assidi *et al.*, 2010).

Estudos em camundongos indicam que FGFs e BMPs interagem para regular a diferenciação do COC. O FGF8 em sinergismo com a BMP15 estimulou a expressão e a atividade de enzimas glicolíticas nas células do cumulus (Sugiura *et al.*, 2007). Além disso, o FGF8 e a BMP15 parecem estar envolvidos no controle da maturação nuclear. Em cooperação, esses FSOs aumentaram a expressão do receptor natriurético tipo 2 (NPR2), cuja ativação estimula a síntese de GMPc, que inibe a PDE3, mantendo elevados os níveis de AMPc e, portanto, suprimindo o fator promotor da maturação, o que mantém o oócito em parada meiótica (Zhang *et al.*, 2010b).

O ambiente folicular é responsável por manter o oócito em parada meiótica e, posteriormente, pela retomada da mesma (Gilchrist, 2011). Esse controle é fundamental para a MIV já que a progressão da meiose deve ocorrer em sintonia com a maturação citoplasmática e molecular do oócito para maximizar a competência para

o desenvolvimento (Mehlmann, 2005; Ledent *et al.*, 2005). O presente estudo investigou os efeitos dos FGFs 2 e 10, da BMP-15 e da interação entre as duas últimas proteínas sobre o progresso da meiose durante a maturação *in vitro* de COCs bovinos.

Material e métodos

Local dos experimentos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana, localizado no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu.

Obtenção dos Complexos Cumulus-Oócitos (COCs)

Os ovários, predominantemente de fêmeas *Bos indicus*, foram obtidos em abatedouros próximos da cidade de Botucatu (abatedouro Frigol, localizado em Lençóis Paulista, e Mondelli, localizado na cidade de Bauru, respectivamente a 50 e 100km de distância do laboratório). Os ovários foram transportados do abatedouro até o laboratório em recipiente térmico contendo solução salina estéril aquecida a 30°C. No laboratório, foram lavados em solução salina, esterilizados com álcool 70%, e os folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm aspirados. O fluido folicular recuperado foi depositado em tubo cônico e então colocado em repouso no banho seco a 35°C para a formação do pellet de células. O pellet recuperado foi colocado juntamente com líquido folicular centrifugado em placa de Petri (90mm) para rastreamento e seleção dos COCs de grau 1 e 2 de acordo com Stojkovic *et al.*, (2001). Portanto, apenas oócitos com citoplasma homogêneo e granulações finas, ou com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, e múltiplas camadas compactas de células do cumulus foram utilizados nos experimentos.

Maturação in vitro (MIV)

Os COCs foram maturados em placa multipoços de cultura de células de fundo chato (Sarstedt) contendo meio de cultivo TCM 199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ (Sigma) suplementado com piruvato (22µg/mL) e amicacina (75µg/mL) na presença de FSH (1µg/ml), LH (10UI/mL) e BSA (4mg/mL). O meio de cultivo recebeu a adição de fatores de crescimento de acordo com o delineamento do experimento descrito abaixo. Cada grupo continha 20 COCs que foram cultivados em 450 µL de meio (22,5 µL/oócito). Os grupos controle e dose 0 não receberam adição de fatores de crescimento. A incubação foi feita durante 22h sob temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa de 5.5% CO₂ em ar e máxima umidade.

Análise dos efeitos do FGF2, FGF10 e da BMP15 sobre a maturação nuclear

Grupos de 20 COCs por tratamento foram recuperados e submetidos à maturação *in vitro* como descrita acima. Para a análise dos efeitos do FGF10 e da BMP15 sobre a maturação nuclear, foram realizadas 8 réplicas utilizando os seguintes tratamentos: Controle; FGF10 (10ng/mL); BMP15 (100ng/mL); FGF10 (10ng/mL) + BMP15 (100ng/mL). Para a análise dos efeitos do FGF2 sobre a meiose, foram realizadas 6 réplicas de um experimento do tipo dose-resposta com adição do FGF2 ao cultivo nas doses de 0 (controle), 1, 10 e 100ng/mL. Após a maturação, os COCs foram desnudos mecanicamente por pipetagens sucessivas. Os oócitos desnudos foram corados em uma gota contendo 5µL de HOESCHT 33342 (corante fluorescente de DNA) sob uma lâmina histológica que, posteriormente, foi coberta por uma lamínula. Cada lâmina era formada por uma gota que continha um grupo tratado. Assim, em cada réplica, 4 lâminas foram analisadas. Em seguida, as lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) para serem classificadas conforme a fase da meiose em que se encontravam (MI: meiose I; MII: da telófase I até o bloqueio da meiose II). Os oócitos que apresentaram apenas um ponto de marcação fluorescente foram classificados em MI e, os oócitos que apresentaram dois pontos de marcação fluorescente foram classificados em MII (Figura 1).

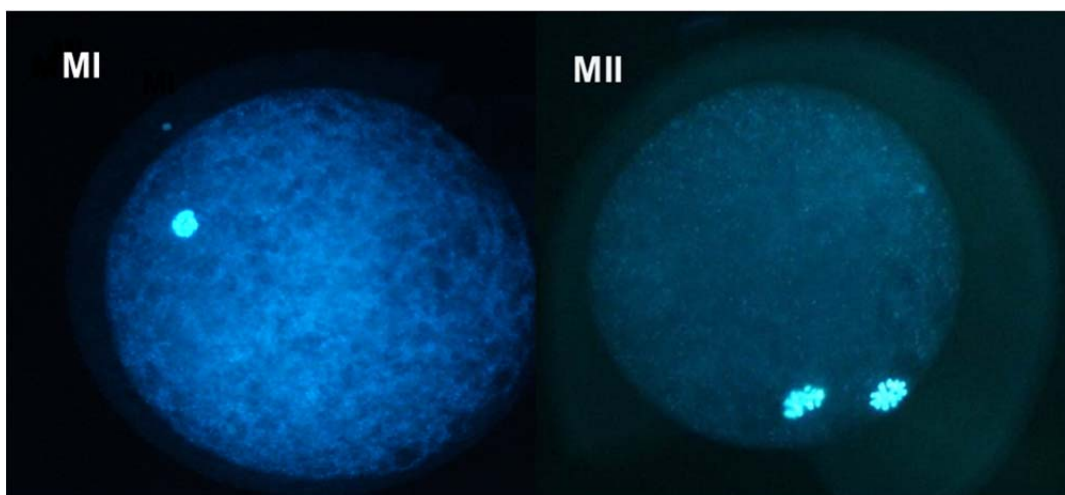


Figura 1. Fotomicrografia (microscopia de epifluorescência) ilustrativa da meiose I (MI) e II (MII) em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*.

Análise Estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre a maturação nuclear foram analisados através do teste ANOVA após transformação dos dados em logaritmos para obtenção de distribuição normal. As diferenças foram consideradas significativas quando $P > 0,05$.

Resultados

Efeitos do FGF2, FGF10 e da BMP15 sobre a maturação nuclear

O FGF10 (68%), a BMP15 (62,57%) ou a interação de ambas as proteínas, FGF10+BMP15, (73%) não alteraram a porcentagem de oócitos em MII após a MIV em relação ao controle (69,63%); (Figura 2). Assim como, a adição de FGF2 nas doses de 1ng/mL (81,33%), 10ng/mL (84,83%) ou 100ng/mL (83%) também não alteraram a porcentagem de oócitos que atingiram MII em relação a dose 0 (controle) (79,83%); (Figura 3).

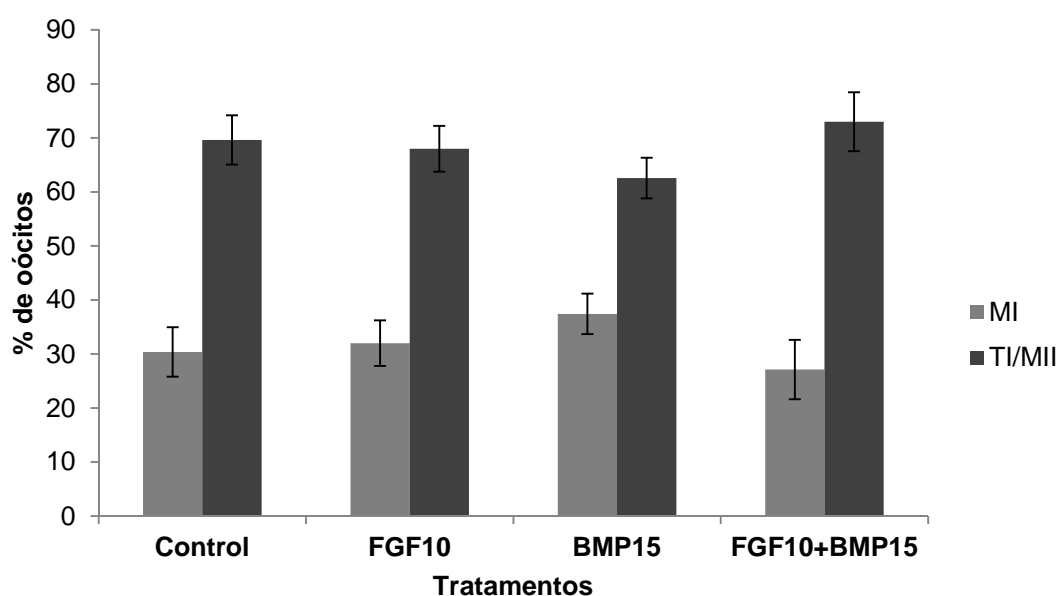


Figura 2. Efeitos do FGF10 (10 ng/ml), BMP15 (100 ng/ml) e combinação de ambos sobre o progresso da meiose (MI=meiose I, TI/MII=telófase I/meiose II). Os resultados são derivados de 8 réplicas para cada tratamento.

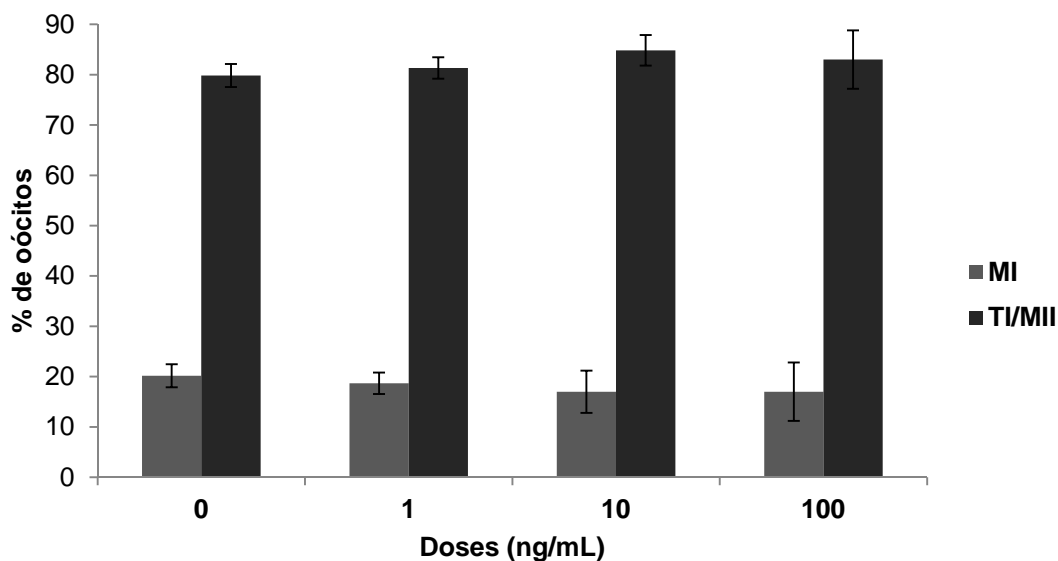


Figura 3. Efeitos de diferentes doses do FGF2 (0, 1, 10 e 100 ng/mL) sobre o progresso da meiose. MI (meiose I), TI/MII (telófase I/meiose II). (MI=meiose I, TI/MII=telófase I/meiose II). Os resultados são derivados de 6 réplicas para cada tratamento.

Discussão

No presente estudo, os efeitos da BMP15, de sua combinação com o FGF10 sobre a progressão da meiose durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos foram avaliados pela primeira vez. Apesar dos dados anteriores da literatura sugerindo a participação desses fatores de crescimento na regulação da maturação nuclear, nenhum deles alterou o progresso da meiose às 22 horas da maturação *in vitro* no presente estudo.

Em camundongos, a BMP15 e o FGF8 regulam a expressão do NPR2 nas células do cumulus. Esse receptor se liga ao NPPC, produzido pelas células da granulosa murais, estimulando a produção de GMPc (Zhang et al., 2010b). O GMPc inibe a atividade da fosfodiesterase 3 (PDE3), uma potente enzima presente no oócito, que degrada AMPc. Com isso, a alta concentração de AMPc suprime a ação do fator promotor da maturação (MPF) e o progresso da meiose continua interrompido (Gilchrist et al. 2011; Weeb et al., 2003; Conti et al., 2002; Zhang et al., 2010b). Como o FGF2 ativa os receptores ativados pelo FGF8 (Ornitz et al., 1996), testamos a hipótese de que ele inibiria o progresso da meiose na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Contudo, apesar dos indícios proporcionados pelo estudo acima, nem a BMP15, nem o FGF2, afetaram a maturação nuclear no presente estudo.

Em contraste aos resultados presentes, estudos anteriores relataram aumento na porcentagem de oócitos em MII após a maturação *in vitro* com FGF10 ou FGF2

(Zhang *et al.*, 2010a; Zhang & Ealy, 2012). Nos estudos com FGF10, enquanto nós utilizamos 10ng/mL no meio de cultivo baseados em estudo dose-resposta anterior que mediu os efeitos do FGF10 sobre a expansão do cumulus e metabolismo da glicose (Caixeta *et al.* 2013), Zhang *et al.* 2010a utilizaram 50ng/mL. Além disso, a fonte comercial e atividade biológica dos preparos de FGF10 quanto de FGF2 variam entre nossos estudos e os de Zhang *et al.* 2010a, o que pode ter contribuído para a discrepância entre os resultados.

Outra diferença entre os trabalhos é a dose de FSH utilizada no cultivo. Nos meios de cultivo de Zhang *et al.* 2010a e Zhang & Ealy 2012, foi empregada uma dose significativamente maior deste hormônio comparada à utilizada em nossos estudos (25 vs 1µg/mL). Além disso, a quantidade de meio fornecida por oócito em nossos estudos foi muito superior à quantidade utilizada nos experimentos de Zhang *et al.* 2010a e Zhang & Ealy, 2012 (22,5 µL/oócito vs 5µL/oócito, respectivamente). Por fim, enquanto utilizamos ovários de *Bos indicus*, Zhang e sua equipe em ambos os estudos trabalharam com *Bos taurus*, e já foram relatadas diferenças importantes quanto à fisiologia reprodutiva dessas subespécies (Sartori, *et al.* 2010).

Em conclusão, os dados presentes sugerem que a adição de FGF10, FGF2 ou BMP15 ao meio de cultivo não interfere na progressão da meiose durante as primeiras 22 horas da maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito bovinos.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Referências

- Assidi, M., S. J. Dieleman, and M. A. Sirard, 2010, Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence: *Reproduction*, v. 140, p. 835-52.
- Buratini, J., A. B. Teixeira, I. B. Costa, V. F. Glapinski, M. G. Pinto, I. C. Giometti, C. M. Barros, M. Cao, E. S. Nicola, and C. A. Price, 2005, Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles: *Reproduction*, v. 130, p. 343-50.
- Buratini, J., M. G. Pinto, A. C. Castilho, R. L. Amorim, I. C. Giometti, V. M. Portela, E. S. Nicola, and C. A. Price, 2007, Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles: *Biol Reprod*, v. 77, p. 743-50.

- Caixeta, E. S., M. F. Machado, P. Ripamonte, C. Price, and J. Buratini, 2013a, 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, p. 890-9.
- Caixeta, E. S., M. L. Sutton-McDowall, R. B. Gilchrist, J. G. Thompson, C. A. Price, M. F. Machado, P. F. Lima, and J. Buratini, 2013b, Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: *Reproduction*, v. 146, p. 27-35.
- Conti, M., C. B. Andersen, F. Richard, C. Mehats, S. Y. Chun, K. Horner, C. Jin, and A. Tsafiri, 2002, Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation: *Mol Cell Endocrinol*, v. 187, p. 153-9.
- Crawford, J. L., and K. P. McNatty, 2012, The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates: *Mol Cell Endocrinol*, v. 348, p. 339-43.
- Eppig, J. J., K. Wigglesworth, F. Pendola, and Y. Hirao, 1997, Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells: *Biol Reprod*, v. 56, p. 976-84.
- Eppig, J. J., 2001, Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals: *Reproduction*, v. 122, p. 829-38.
- Fair, T. 2003, Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78(3-4), 203-16
- Gilchrist, R. B., L. J. Ritter, S. Myllymaa, N. Kaivo-Oja, R. A. Dragovic, T. E. Hickey, O. Ritvos, and D. G. Mottershead, 2006, Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation: *J Cell Sci*, v. 119, p. 3811-21.
- Gilchrist, R. B., M. Lane, and J. G. Thompson, 2008, Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality: *Hum Reprod Update*, v. 14, p. 159-77.
- Gilchrist, R. B., 2011, Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation: *Reprod Fertil Dev*, v. 23, p. 23-31.
- Ledent, C., Demeestere, I., Blum, D., Petermans, J., Hämmäläinen, T., Smits, G., and Vassart, G. (2005) Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25), 8922-6
- Li, R., R. J. Norman, D. T. Armstrong, and R. B. Gilchrist, 2000, Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells: *Biol Reprod*, v. 63, p. 839-45.
- Machado, M. F., V. M. Portela, C. A. Price, I. B. Costa, P. Ripamonte, R. L. Amorim, and J. Buratini, 2009, Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles: *J Endocrinol*, v. 202, p. 347-53.
- McNatty, K. P., L. G. Moore, N. L. Hudson, L. D. Quirke, S. B. Lawrence, K. Reader, J. P. Hanrahan, P. Smith, N. P. Groome, M. Laitinen, O. Ritvos, and J. L. Juengel, 2004, The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology: *Reproduction*, v. 128, p. 379-86.

- Mehlmann, L.M. (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130(6), 791-9
- Ornitz, D. M., J. Xu, J. S. Colvin, D. G. McEwen, C. A. MacArthur, F. Coulier, G. Gao, and M. Goldfarb, 1996, Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: *J Biol Chem*, v. 271, p. 15292-7.
- Sartori, R., M. R. Bastos, P. S. Baruselli, L. U. Gimenes, R. L. Ereno, and C. M. Barros, 2010, Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment: *Soc Reprod Fertil Suppl*, v. 67, p. 357-75.
- Stojkovic, M., S. A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P. B. Gonçalves, and E. Wolf, 2001, Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture: *Biol Reprod*, v. 64, p. 904-9.
- Sugiura, K., F. L. Pendola, and J. J. Eppig, 2005, Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism: *Dev Biol*, v. 279, p. 20-30.
- Sugiura, K., Y. Q. Su, F. J. Diaz, S. A. Pangas, S. Sharma, K. Wigglesworth, M. J. O'Brien, M. M. Matzuk, S. Shimasaki, and J. J. Eppig, 2007, Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells: *Development*, v. 134, p. 2593-603.
- Sutton-McDowall, M. L., R. B. Gilchrist, and J. G. Thompson, 2010, The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence: *Reproduction*, v. 139, p. 685-95.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., and de Kruif, A. 2002, Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61(3), 414-24
- Webb, R., B. Nicholas, J. G. Gong, B. K. Campbell, C. G. Gutierrez, H. A. Garverick, and D. G. Armstrong, 2003, Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle: *Reprod Suppl*, v. 61, p. 71-90.
- Zhang, K., P. J. Hansen, and A. D. Ealy, 2010a, Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro: *Reproduction*, v. 140, p. 815-26.
- Zhang, M., Su, Y.Q., Sugiura, K., Xia, G., and Eppig, J.J. 2010b, Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 330(6002), 366-9
- Zhang, k., and Ealy, A.D. 2012, Supplementing fibroblast growth factor 2 during bovine oocyte in vitro maturation promotes subsequent embryonic development: *Open Journal of Animal Sciences*, v. 2, p. 119-126.

