

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Instituto de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia)**



**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS  
8 (FGF8) NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS  
CUMULUS-OÓCITO BOVINOS**

**Lorena Sanches**

**Botucatu – SP**

**Fevereiro de 2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Instituto de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia)**



**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8  
(FGF8) NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS  
CUMULUS-OÓCITO BOVINOS**

**Lorena Sanches**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP, para obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior**

**Botucatu – SP**

**Fevereiro de 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

Sanches, Lorena.

Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 (fgf8) na maturação in vitro de complexos cumulus-oócito bovinos / Lorena Sanches. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Buratini Júnior  
Capes: 21001006

1. Bovino - Reprodução. 2. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 3. Fibroblasto. 4. Meiose.

Palavras-chave: Bovino; Complexo cumulus-oócito; FGF8.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Instituto de Biociências**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia)**

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8  
(FGF8) NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS  
CUMULUS-OÓCITO BOVINOS**

**Lorena Sanches**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP, para obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.**

**Botucatu – SP**

**Fevereiro de 2016**

Lorena Sanches  
Botucatu, 25 de fevereiro de 2016

### **Composição da Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. José Buratini Jr

---

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

---

Prof. (a) Dr. (a) Fernanda da Cruz Landim

*“Confia no Senhor e faze o bem;  
hábita na terra e alimenta-te da verdade.  
Agrada-te do Senhor, e Ele satisfará os desejos do teu coração.  
Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e o mais Ele fará”.*

*SALMOS 37:3-5*

## *Dedicatória*

*Este trabalho é dedicado à Deus, pois até aqui o Senhor tem me guiado e sustentado. Grandes coisas Ele fez.*  
*Aos meus pais Wagner Tomas Sanches e Élide Drudi Sant'Anna Sanches*  
*Ao meu irmão, Lucas Henrique Sanches*  
*Pelo apoio, confiança e amor de sempre.*  
*Vocês são minha base, minha vida!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por tudo que Ele tem feito, por sempre guiar meus caminhos, por me abençoar e me manter firme nos momentos mais difíceis.*

*À minha família, que me apoiou em todos os momentos sempre com muito carinho e alegria. Sem vocês eu jamais teria conseguido! Amo vocês incondicionalmente!*

*Ao Professor Dr. José Buratini Júnior, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, pelas correções e pela paciência. Obrigada pela amizade e confiança!*

*Aos amigos do laboratório, Paula, Rodrigo e Carol, vocês foram essenciais nessa etapa! Não sei como agradecer tudo que fizeram por mim. Agradeço a Paula pelos ensinamentos desde o primeiro dia no laboratório, pela ajuda, pela confecção deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer! Ao Rodrigo, pela paciência, pelo companheirismo, pelo auxílio em todas as coisas, obrigada por tudo! Sempre que precisei você estava lá! A Carol, pelo apoio, pela ajuda nos momentos difíceis, pela compreensão! Vocês moram no meu coração! Obrigada pela amizade!*

*Aos amigos da pós-graduação, aos funcionários e professores do departamento. Obrigada pelo riso fácil, das conversas de distração e pelo apoio! Vocês foram essenciais nesta jornada!*

*Ao meu namorado Marcel, por todo apoio, disposição por continuarmos juntos mesmo a quilômetros de distância, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo amor, cuidado e compreensão! Obrigada por tudo meu amor!*

*Ao Diego Marcondes Guerra, por me direcionar e por ter me mostrado essa oportunidade! Obrigada pelos ensinamentos dos anos de convivência, das conversas, das rotinas de laboratório e, sobretudo, pela amizade!*



*À Carol e a Fernanda, por dividirem o mesmo teto e estarem comigo quando mais precisei. Vocês são lindas e especiais! Amo vocês.*

## LISTA DE FIGURA

**Fig 1: A)** Efeitos do FSH e da AREG sobre as porcentagens de oócitos em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (VGBD) e meiose I (MI) após 6 horas de MIV (n= 5 réplicas; 15-20 oócitos por grupo). **B)** Imagens representativas de oócito em VG corado com Hoechst 33342 e sob luz branca, visualizados com microscópio de fluorescência (400x). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fig 2.** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (VGBD) e meiose I (MI) após 6 e 9 horas de MIV na presença de FSH ou AREG (FSH 6 horas: n= 4; FSH 9 horas: n= 5; AREG 6 horas: n=5; AREG 9 horas: n=4; 15-20 oócitos por grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O asterisco indica a porcentagem de oócitos imaturos (0 hora) em estágio de VG e VGBD, este dado não foi adicionado a análise estatística, somente utilizado para controle interno.

**Fig 3. A)** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos em meiose I (MI) e meiose II (MII) após 22 horas de MIV na presença de FSH ou AREG (AREG 22 horas: n=5 réplicas; FSH 22 horas: n= 3 réplicas; 15-20 oócitos por grupo).

**B)** Imagens representativas de oócitos em MI e MII corados com Hoechst 33342 e visualizados com microscópio de fluorescência (400x).

**Fig 4.** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos com diferentes graus de expansão do cumulus após 22 horas de MIV induzida com AREG ou FSH. (AREG 22 horas: n=5 réplicas; FSH 22 horas: n=3 réplicas; 15-20 oócitos por grupo).

**Fig 5.** Efeitos do FGF8 sobre o consumo de glicose e produção de lactato, após 6, 9 e 22 horas de MIV com AREG. (AREG 6 horas: n=5 réplicas; AREG 9 horas: n=4 réplicas; AREG 22 horas: n=5 réplicas; 15-20 oócitos por grupo).

**Fig 6.** Efeitos do FGF8 sobre o consumo de glicose e produção de lactato, após 6, 9 e 22 horas de MIV com FSH. (FSH 6 horas: n=4 réplicas; FSH 9 horas: n=5

réplicas; FSH 22 horas: n=3 réplicas; 15-20 oócitos por grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

**Fig 7.** Efeitos do FGF8 sobre a abundância de RNAm dos genes ADAM10, PTGS2, AREG, EREG, EGFR, NPPC e NPR2 nas células do cumulus de COCs cultivados por 6 horas com AREG. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1:** Informação de *primers* específicos utilizados para a amplificação por PCR em tempo real.

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>4</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.MATURAÇÃO DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO.....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Maturação Oocitária.....	6
2.1.2. Maturação Nuclear.....	9
2.1.3. Expansão das Células do Cumulus .....	11
<b>2.2. METABOLISMO GLICOLÍTICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. COMUNICAÇÃO ENTRE O CUMULUS E OÓCITO .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. FATORES SECRETADOS PELO OÓCITO (FSO).....</b>	<b>15</b>
2.4.1. Fatores de Crescimento dos Fibroblastos (FGFs) .....	16
2.4.2. Subfamília FGF8 .....	17
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>31</b>
<b>O FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8 (FGF8) RETARDA A MATURAÇÃO NUCLEAR DURANTE A MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO BOVINOS.....</b>	<b>31</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>32</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURAS .....</b>	<b>41</b>
<b>TABELA.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>

## RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa fundamental da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). A conclusão prematura da maturação nuclear durante a MIV é considerada como uma das principais causas da eficiência limitada da PIV. Em camundongos, o fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) regula a atividade do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) aumentando a expressão de seu receptor (NPR2) e contribuindo assim para o bloqueio meiótico. O principal objetivo deste trabalho foi testar os efeitos do FGF8 sobre a dinâmica da quebra da vesícula germinativa e progresso da meiose durante a MIV induzida com FSH ou ampirregulina (AREG) em bovinos. Paralelamente, os efeitos do FGF8 sobre a expansão do cumulus e metabolismo da glicose também foram testados. Na MIV induzida com AREG, mas não com FSH, o FGF8 diminuiu a porcentagem de oócitos com quebra da vesícula germinativa às 6 e 9 horas do cultivo, enquanto aumentou a expressão do RNAm do NPPC, mas não do NPR2, nas células do cumulus. Distintamente, na MIV com FSH, o FGF8 diminuiu a porcentagem de oócitos em Meiose I às 9 horas de cultivo. O FGF8 não afetou a porcentagem de oócitos em Meiose II às 22 horas da MIV, nem a expansão do cumulus, embora tenha aumentado a expressão do RNAm de genes da cascata ovulatória [prostaglandina endoperoxidase sintase 2 (PTGS2) e desintegrina e metaloproteinase de domínio contendo proteína 10 (ADAM 10)]. Além disso, o FGF8 diminuiu o consumo de glicose e a produção de lactato na MIV com FSH, mas não com AREG. Em conclusão, o FGF8 desacelera a dinâmica da maturação nuclear enquanto aumenta a expressão do NPPC nas células do cumulus durante MIV induzida com AREG e, portanto, apresenta-se como fator potencialmente útil para melhorar a eficiência da MIV.

**PALAVRAS-CHAVE:** Complexo cumulus-oócito, FGF8, bovino.

## ABSTRACT

*In vitro* maturation (IVM) is a fundamental step for *in vitro* production of bovine embryos (IVP). Premature nuclear maturation during IVM is considered a major cause of limited efficiency in IVP. In mice, fibroblast growth factor 8 (FGF8) regulates natriuretic peptide type C (NPPC) activity by increasing the expression of its receptor (NPR2) and thus contributing for meiosis block. The aim of this study was to test the effects of FGF8 on the dynamics of germinal vesicle breakdown and meiosis progress during IVM induced with FSH or amphirregulin (AREG) in cattle. In parallel, the effects of FGF8 on cumulus expansion and glucose metabolism were also tested. In IVM induced with AREG, but not with FSH, FGF8 decreased the percentage of oocytes with germinal vesicle breakdown at 6 and 9 hours of culture, while increased mRNA levels of NPPC, but not of NPR2 in cumulus cells. Differently, during IVM with FSH, FGF8 decreased the percentage of oocytes in meiosis I (MI) at 9 hours of culture. Treatment with FGF8 did not affect cumulus expansion, nor the percentage of oocytes in meiosis II at 22 hours of IVM, although it increased mRNA abundance of genes in the ovulatory cascade [prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM 10)]. In addition, FGF8 decreased glucose consumption and lactate production in IVM with FSH, but not with AREG. In conclusion, FGF8 slows nuclear maturation dynamics while increasing the expression of NPPC in cumulus cells during IVM with AREG, and thus may be a useful additive to improve the efficiency of IVM.

**KEY WORDS:** oocyte cumulus complex, FGF8, bovine.

## **CAPÍTULO 1**



## 1.INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande potencial de produção e exportação de carne bovina. Por muitos anos deteve o título de maior exportador do mundo, atualmente com 16,13% da produção de carne bovina mundial ocupando terceira posição no ranking, precedido dos Estados Unidos e Índia. Em relação a produção leiteira, o Brasil situa-se na quinta posição com 33,3 bilhões de litros, sendo que a maior parte de produção de embrião designa para esta última atividade. (FAS/USDA, 2016).

Biotécnicas são utilizadas para auxiliar na melhoria dos índices zootécnicos, como por exemplo, a produção *in vitro* de embriões (PIV), que possui duas etapas importantes: a maturação *in vitro* (MIV) e a fecundação *in vitro* (FIV). Esse sistema é utilizado para aumentar a eficiência reprodutiva de rebanhos, selecionando animais com material genético superior e reduzindo a perda de células germinativas das fêmeas bovinas (YANG *et al.*, 1998; FARSI, 2013).

Estudos utilizando o bovino como modelo experimental, além dos benefícios supracitados para a melhoria dos rebanhos, também beneficiam o progresso das biotécnicas aplicadas em clínicas de reprodução assistida humana, visto que a fêmea bovina tem fisiologia ovariana semelhante à da mulher, além da dificuldade em utilizar células germinativas provenientes de humanos para fins experimentais.

A maturação do complexo cumulus-oócito (COC) é um processo importante para que o oócito se torne competente com a finalidade de suportar processos subsequentes, como ovulação, fecundação e desenvolvimento do embrião (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Para que a maturação ocorra de forma completa, as células do cumulus são fundamentais, pois estabelecem uma interação bidirecional com o oócito de grande importância (TANGHE *et al.*, 2002; FAIR, 2003).

A comunicação celular é mediada por junções do tipo gap, que transportam íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras ao oócito, e também por fatores parácrinos, tanto oocitários (GILCHRIST *et al.*, 2008) quanto do cumulus, que regulam o metabolismo celular (ALBERTINI *et al.*, 2001). Alguns fatores importantes são secretados pelo oócito (FSO; GILCHRIST,

2004), como os fatores pertencentes à família dos fatores de crescimento transformantes  $\beta$  (TGF $\beta$ ; LI *et al.*, 2000; MCNATTY *et al.*, 2004; GILCHRIST *et al.*, 2008), dentre eles a BMP15 e o GDF9, que regulam a diferenciação e expressão gênica das células do cumulus (JUENGEL *et al.*, 2004, GILCHRIST *et al.*, 2008). Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) também pertencem ao grupo dos FSO. O FGF8, FGF10 e FGF17 são expressos pelo oócito bovino e assim como a BMP15 e GDF9 regulam a função do cumulus (BURATINI *et al.*, 2005; CAIXETA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2015). O FGF8, em sinergismo com BMP15, aumenta a atividade glicolítica das células do cumulus (SUGIURA *et al.*, 2007) e a expressão do receptor de peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) nas células do *cumulus*, contribuindo para o bloqueio meiótico (ZHANG *et al.*, 2010).

Na MIV, no momento em que o oócito é retirado do folículo, há perda da influência dos fatores inibidores da meiose presentes no fluido folicular, precipitando o processo de maturação nuclear (SIRARD e COENEN, 1993) e afetando a competência para o desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2001). Sendo assim, existe a necessidade de ajustar as condições de cultivo para que se aproximem da situação fisiológica, proporcionando melhores resultados na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos.

Este estudo teve como objetivo testar os efeitos do FGF8 no meio de maturação *in vitro* sobre a progressão da meiose, expansão das células do cumulus e metabolismo glicolítico de complexo cumulus-oócito, além de expressão gênica de células do cumulus.

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1.MATURAÇÃO DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO**

#### **2.1.1. Maturação Oocitária**

O processo de maturação oocitária se inicia antes do nascimento e continua durante foliculogênese, sendo um evento prolongado e complexo no qual oócitos alcançam competência para o desenvolvimento (FARSI, 2013).

A maturação oocitária compreende a maturação nuclear e a citoplasmática, sendo que estas devem acontecer em sincronia para não haver prejuízo celular. Se esta etapa for incompleta ou assincrônica entre núcleo e citoplasma, a fecundação e o desenvolvimento embrionário podem ser comprometidos (XU e GREVE, 1988).

A maturação nuclear é caracterizada pela progressão da meiose no oócito, que inclui remodelagem da cromatina, quebra da vesícula germinativa (VGBD) em decorrência da ação do LH nas células da granulosa mural, levando à segregação cromossômica, desaparecimento do nucléolo, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico e após a fertilização a extrusão do segundo corpúsculo polar finalizando a meiose (MEINECKE *et al.*, 2001). Já a maturação citoplasmática inclui eventos que proporcionam condições adequadas ao oócito para completar a maturação nuclear, como a reorganização de organelas, acúmulo de RNA, proteínas e fatores transcricionais (WATSON, 2007).

O acúmulo de RNAm e proteínas que ocorre durante a primeira parada meiótica é fundamental para suportar o desenvolvimento embrionário até o início da transcrição embrionária, que se inicia após a fase conhecida como bloqueio embrionário (FEUERSTEIN *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2006).

A parada meiótica depende das concentrações de 3'5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) dentro do oócito, que são reguladas pela atividade das fosfodiesterases (PDE), enzimas que degradam o AMPc (TSAFRIRI *et al.*, 1996). A principal PDE no oócito é a PDE3A, cuja atividade é regulada pelo monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que atua como um inibidor competitivo da hidrólise de AMPc. Portanto, quando o GMPc chega em grandes quantidades ao oócito através de junções do tipo gap (NORRIS *et al.*, 2009), uma maior parcela da PDE3A disponível degrada GMPc, aumentando as concentrações de AMPc no oócito (revisado por ZACCOLO e MOVSESIAN, 2007), proporcionando a manutenção da parada meiótica.

A produção de GMPc pelas células do cumulus é estimulada quando o precursor do peptídeo natriurético C (NPPC) se liga ao seu receptor peptídeo natriurético tipo-2 (NPR2), ambos presentes nas células da granulosa mural (VACCARI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; 2011). O principal papel do NPPC é inibir a retomada da meiose e sustentar as junções do tipo gap abertas

permitindo a passagem do GMPc e, este por sua vez, regula a atividade da PDE3A (FRANCIOSI *et al.*, 2014).

Para ocorrer a retomada da meiose é necessário que haja o estímulo gonadotrópico pré-ovulatório do LH, com rompimento da vesícula germinativa, progressão da meiose e expansão das células do *cumulus* via sinalização dos mediadores parácrinos secretados pelas células da granulosa murais, os fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-Like; SCHATTEN e SUN, 2011; ASHKENAZI *et al.*, 2005; PENG *et al.*, 1991; revisado por CONTI *et al.*, 2006).

O LH induz a expressão dos fatores EGF-like como ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) nas células da granulosa por aumento dos níveis de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA; PARK *et al.*, 2004; FREIMANN *et al.*, 2004). Esses fatores são sintetizados pelas células da granulosa murais como precursores transmembrânicos e devem ser clivados pelos membros da família desintegrina e metaloproteinases (ADAMs) para serem liberados da superfície celular em sua forma ativa (BEM-AMI *et al.*, 2006). Assim que são liberados, os fatores EGF-like ativam seus receptores (EGFR) nas células da granulosa e do cumulus e estimulam a maturação do complexo cumulus-oócito (ASHKENAZI *et al.*, 2005; CONTI, 2006; DIAZ *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2003).

Após a ativação do EGFR, há fosforilação das ERK1/2 (SAKAGUCHI *et al.*, 2000) e ativação de vias que induzem a fosforilação da conexina 43 (Cx43), que causa o fechamento de junções gap com consequente perda dos efeitos inibitórios do AMPc e GMPc vindos das células do cumulus sobre a meiose. Na presença de AMPc e de GMPc o bloqueio meiótico é mantido pela inibição do fator promotor da maturação (MPF) e da regulação da PDE3A, respectivamente (revisado por GILCHRIST *et al.*, 2011).

O declínio do AMPc leva à desfosforilação e consequente ativação do MPF (MILLER e RUSSELL, 1992). A proteína MPF é responsável pelo início da maturação oocitária e é ativada concomitantemente à quebra da vesícula germinativa (GVBD). Essa proteína é um complexo formado pela ciclina B (subunidade regulatória) e quinase p34<sup>cdc2</sup> (subunidade catalítica). Quando ativo, o MPF fosforila proteínas que formam o envelope nuclear alterando a condensação da cromatina e levando à reorganização do citoesqueleto (VAN

DER HURK e ZHAO, 2005). Concluindo a etapa de maturação, o oócito atinge a metáfase II, enquanto este é circundado pelo cumulus expandido, torna-se competente para a fecundação (VAN DER HURK e ZHAO, 2003).

### 2.1.2. Maturação Nuclear

A maturação nuclear é o processo que se inicia quando o oócito retoma a meiose, caracterizado pela quebra da vesícula germinativa (VGBD) que é seguida pela conclusão da metáfase II. A quebra de vesícula germinativa compreende uma série de acontecimentos, que incluem condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear, que é a quebra propriamente dita (MERMILLOD e LANNOU, 1999). Estas mudanças na configuração da cromatina em estágio de vesícula germinativa (VG) foram descritas em bovinos e ocorrem até o momento anterior ao reinício da meiose. A cromatina contida na VG atinge um alto grau de condensação e compactação passando por configurações intermediárias (GRUZOVA e PARFENOV, 1993; FUHRER *et al.*, 1989; CHOCHAN e HUNTER, 2003; LODDE *et al.*, 2007). A vesícula germinativa apresenta padrões diferentes de configuração da cromatina, classificados como GV0, GV1, GV2 e GV3, com aumento progressivo da condensação, silenciamento transcricional, metilação global do DNA e acetilação de histonas (H4; LODDE *et al.*, 2007, 2008, 2009; LUCIANO *et al.*, 2011). A acetilação das histonas está associada com modificações da estrutura da cromatina. Quando a cromatina está aberta no nucleossomo existe um aumento da atividade transcricional (CHEUNG *et al.*, 2000; GRUNSTEIN, 1997; TURNER, 2000; WOLFFE e PRUSS, 1996).

A relação direta entre configuração da cromatina e competência oocitária foi avaliada em vacas, relacionando as taxas de VG com a configuração da cromatina e a competência meiótica. Apenas uma porcentagem limitada de oócitos VG0 foi capaz de completar a primeira divisão meiótica, enquanto os oócitos em VG1, VG2 e VG3 conseguiram alcançar o estágio de MII (LODDE *et al.*, 2007; LUCIANO *et al.*, 2011). Além disso, no mesmo estudo quando comparados os estágios de VG em relação a competência oocitária, os oócitos em VG2 e VG3 conseguiram completar o desenvolvimento pré-implantação em uma proporção maior do que oócitos que estavam em VG1 (LODDE *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstraram que mudanças na estrutura e remodelação da cromatina são características que podem ser consideradas como marcadores de diferenciação e competência para o desenvolvimento do oócito (DE LA FUENTE, 2006).

Os hormônios gonadotróficos estimulam o recomeço do ciclo celular a partir do diplóteno da prófase I, fase onde as cromátides-irmãs tornam-se visíveis com um centrômero aparentemente não dividido. Na metáfase I, a membrana nuclear e os nucléolos desaparecem, cada cromossomo homólogo toma uma posição nas extremidades do plano equatorial e os centrômeros ligam-se às fibras do fuso dos polos opostos (MEINECKE *et al.*, 2001). Em seguida, na anáfase I, cada um dos dois pares de cromátides irmãs é levado para um polo diferente, e na telófase I, forma-se um núcleo para cada polo (GRIFFITHS *et al.*, 2006). Na prófase II, se formam novos centríolos, na metáfase II, as cromátides-irmãs movem-se para o plano equatorial, há formação do segundo fuso meiótico e alinhamento dos cromossomos e, finalmente, na anáfase II, cada uma das cromátides-irmãs é levada para um núcleo diferente à medida que a célula se divide pela segunda vez (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

Quando a primeira divisão meiótica ocorre, o citoplasma é dividido de forma assimétrica para que não ocorra grande perda do material citoplasmático, a célula menor é chamada de corpúsculo polar e a outra é o oócito secundário que é o oócito propriamente dito (CAN *et al.*, 2003). O corpúsculo polar, além de possuir metade dos cromossomos, também possui uma variedade de organelas, como mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. Este corpúsculo polar é estruído para o espaço perivitelino (SIRARD, 1992).

Com a conclusão da metáfase II, o oócito permanece nesse estágio até a fecundação (MAYES e SIRARD, 2001). Após a fecundação, a segunda divisão meiótica será concluída com a continuidade da metáfase II, telófase II e extrusão do segundo corpúsculo polar. A partir da formação do zigoto, as células embrionárias se multiplicarão por divisões mitóticas (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Durante a maturação nuclear, mudanças epigenéticas podem afetar a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA (BARTON *et al.*, 1984; OBATA *et al.*, 1998; SURANI, 1998). O genoma do oócito é passível de modificações, particularmente por diferenciação funcional da estrutura da

cromatina, o que altera a expressão gênica (EPPIG *et al.*, 2004; PATTERTON e WOLFFE, 1996). A organização da cromatina é um aspecto importante da diferenciação dos oócitos em mamíferos (LODDE *et al.*, 2013). Para o desenvolvimento do oócito, é necessário que haja mudanças na estrutura e função da cromatina no interior do núcleo, que são essenciais para a competência meiótica. Essas alterações acontecem ao longo da foliculogênese e são reguladas pela comunicação entre o gameta e as células somáticas (ALBERTINI *et al.*, 2003).

### 2.1.3. Expansão das Células do Cumulus

O processo de expansão dessas células é fundamental para ovulação. Se a expansão das células do cumulus for comprometida, há queda na taxa de ovulação (CHEN *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 1999). A expansão também é necessária para a passagem eficiente do oócito pelo oviduto e para fecundação *in vivo* e *in vitro* (BUCCIONE *et al.*, 1990; TANGHE *et al.*, 2002; FURNUS *et al.*, 1998). Esse evento é caracterizado pela produção de uma matriz intercelular formada por deposição de ácido hialurônico (YOKOO e SATO, 2004).

Durante o período pré-ovulatório, a expansão das células do cumulus é disparada pelo pico de LH, ativando a expressão dos EGF-*like* e da hialurona sintetase 2 (HAS2), prostaglandinas (PG) endoperoxide sintase 2 (PTGS2), da proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e da pentraxina 3 (PTX3; RUSSEL e ROBKER, 2007). A HAS2 é a principal enzima responsável pela síntese de ácido hialurônico, que é um produto do metabolismo da glicose pela via das hexosaminas nas células do cumulus (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003; CHEN *et al.*, 1990). A TSG6 tem função de estabilizar a hialurona extracelular do cumulus expandido (RICHARDS, 2005). A interação da TSG6 com a PTX3 é necessária para a estruturação da matriz do cumulus (RICHARDS, 2005). A expressão da HAS2, COX2, TSG6 e PTX3 tem sido usada como marcador da competência do COC para a fecundação (TESFAYE *et al.*, 2009; ASSIDI *et al.*, 2008).

## 2.2. METABOLISMO GLICOLÍTICO

Durante a maturação do complexo cumulus-oócito há uma demanda metabólica muito intensa e uma grande quantidade de moléculas e fatores são mobilizados. COCs maduros consomem o dobro de glicose, oxigênio e piruvato, quando comparados a COCs imaturos (SUTTON *et al.*, 2003). Segundo PREIS *et al.*, 2005, a atividade metabólica dos oócitos aumenta na segunda metade do processo de maturação meiótica, coincidentemente com aumento na produção de lactato, que tem sido proposto como indicador na qualidade oocitária.

A glicose é um fator limitante para o metabolismo glicolítico do COC, uma vez que a baixa disponibilidade de glicose impede a síntese de ácido nucleico e produção de energia, podendo comprometer a homeostase e sinalização celular (SUTTON *et al.*, 2003b; DOWNS *et al.*, 1998), resultando em prejuízo para maturação nuclear e todo desenvolvimento embrionário (EPPIG *et al.*, 2000; SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2005).

As vias metabólicas da glicose são: biossíntese da hexosamina, glicólise, pentose fosfato e via poliol (GUTNISKY *et al.*, 2007; SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2010). Na via da biossíntese da hexosamina há conversão de frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, que é convertido pela enzima reguladora L-glicosamina: D-frutose-6-fosfato (GFPT) e o produto final da via é UDP-N-acetil glicosamina. Nas células do cumulus, este produto final é convertido através da HAS2 em ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular das células do cumulus (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2006).

A enzima fosfofrutoquinase é responsável por regular a via glicolítica. Essa enzima catalisa a reação de transferência de um grupo ATP para frutose-6-fosfato, formando frutose 1,6-bifosfato. Desta forma, permitindo a produção de lactato ou piruvato, para que haja a conversão de um para o outro é necessário que a enzima lactato desidrogenase esteja presente (LDHA) (MOON *et al.*, 2011; SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2010). O lactato tem como função permitir o estado antioxidante citosólico, conhecido também como estado redox, na qual promove a integridade citoplasmática (DUMOLLARD *et al.*, 2007; DUMOLLARD *et al.*, 2009). Enquanto o piruvato serve de substrato para a enzima oxidativa mitocondrial denominada piruvato desidrogenase 1 (PDHA1), presente nas células do cumulus e oócito de camundongos e tem como função catalisar a



formação da adenosina trifosfato (ATP) com consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono (JOHNSON *et al.*, 2007).

A via pentose fosfato é importante no processo de maturação, porém, apenas uma parte da glicose é metabolizada por ela, sendo a maior quantidade processada pela via glicolítica (DOWNS e UTECHT, 1999). Ela é dividida em estágio oxidativo e não oxidativo. A oxidação de glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona pela enzima G6PDH resulta na produção de NADPH, que tem como função, combater efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio e radicais livres, participar da síntese de ácidos graxos e compostos esteroides. Além de promover a integridade citoplasmática e ser responsável por manter o estado redox através da redução da glutatona (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2010). Um produto também originado desta via é o fosforibosilpirofosfato, que é importante para síntese de purinas, fundamentais na síntese de nucleotídeos, tendo como objetivo formar novos RNAs mensageiros. Também tem envolvimento na progressão de todo os estágios da meiose, incluindo retomada da meiose e transição de meiose I para meiose II, desta forma, controlando a maturação nuclear (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2010; SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2005, HERRICK *et al.*, 2006).

A via poliol produz, através de enzimas aldo-redutase (AR) e sorbitol desidrogenase (SDH), substratos denominados sorbitol e frutose que são considerados fonte alternativa de energia para o oócito. Existem algumas evidências de que as células da granulosa fazem a conversão de glicose para sorbitol, desta forma, tentando uma alternativa de suprir a demanda de energia celular (WONGSRIKEAO *et al.*, 2006). Porém, na ausência de glicose, estes substratos são ineficientes em manter o processo de maturação adequado (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2010). Em condições normais de taxas glicêmicas, esta via é responsável apenas por uma pequena parte do metabolismo da glicose em células somáticas, talvez pela baixa afinidade das enzimas AR pela glicose (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2010). Sob condições normais de glicemia, SDH e AR são expressos em tecidos reprodutivos. Os mais elevados níveis de proteína e atividade enzimática são encontrados no ovário (KANEKO *et al.*, 2003), sugerindo que a via do poliol está envolvida na diferenciação dos tecidos do ovário e remodelação durante o ciclo estral.

A via de metabolismo da glicose utilizada pelo COC que permite a produção de energia sob forma de ATP e produção de piruvato e lactato é a via glicolítica (DOWNS e UTECHT 1999, HARRIS *et al.*, 2009). O oócito tem pouca capacidade de utilizar glicose, sendo seu substrato eleito o piruvato.

O piruvato e o lactato são metabolizados pelos oócitos via ciclo de Krebs (ciclo de ácido tricarboxílico), seguido pela fosforilação oxidativa (STEEVES e GARDNER 1999). Os oócitos possuem baixa atividade glicolítica e as células do cumulus fazem o papel de metabolizar grande quantidade de glicose consumida pelo COC (BIGGERS *et al.*, 1967). Essa glicose é convertida em piruvato/lactato para utilização imediata pelo oócito (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2010). As células do cumulus possuem elevada atividade de enzimas glicolíticas como 6-fosfogluconato e PFKP e alta expressão de genes como o *solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1* (SLC2A 1) ou transportador de glicose 1 (GLUT1) e *solute carrier family 2 (Facilitated Glucose Transporter), member 4* (SLC2A4) ou transportador de glicose 4 (GLUT4), que codificam proteínas que funcionam como facilitadores do transporte de glicose (DOWNS *et al.*, 1996; ROBERTS *et al.*, 2004).

### 2.3. COMUNICAÇÃO ENTRE O CUMULUS E OÓCITO

O oócito regula a diferenciação das células somáticas adjacentes desde o início da foliculogênese até a fecundação (EPPIG, 2001). Há evidências de que o metabolismo do COC é essencial para o desenvolvimento do oócito, pois as células do cumulus fornecem a energia necessária para o processo de maturação nuclear e citoplasmática através do piruvato, além de fornecer lipídios e aminoácidos (SUGIURA *et al.*, 2005).

A comunicação entre oócito e células do cumulus é viabilizada por junções tipo gap. Por meio dessas junções metabólitos e outras moléculas transitam entre as células (LUCIANO *et al.*, 2011). Além de comunicar os oócitos com as células do cumulus, estas junções potencialmente possibilitam também comunicação entre as células da granulosa e o oócito (ANDERSON e ALBERTINI, 1976).

Cada junção do tipo *gap* é composta por seis subunidades de conexinas (Cx), formando hexâmeros dispostos como um hemi-canal. Um canal funcional

é formado quando hemi-canais dispostos em duas membranas celulares interagem (WHITE *et al.*, 1995). Embora a proteína Cx-43 tenha sido detectada no ooplasma (GRANOT *et al.*, 2002), estudos realizados em ratas, demonstram que a principal conexina envolvida na comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* adjacentes é a Cx-37 (SIMON *et al.*, 1997).

Outra estrutura importante para a comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito são as projeções trans-zonais (TZPs), que são extensões das células da granulosa que atravessam a zona pelúcida e atingem a membrana do oócito. Através delas, há transporte de RNAm das células do *cumulus* para o oócito, o que parece ser importante para a competência oocitária (MACAULAY *et al.*, 2014).

#### **2.4. FATORES SECRETADOS PELO OÓCITO (FSO)**

Os fatores secretados pelo oócitos mais conhecidos são o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), pertencentes à família dos fatores de crescimento transformantes  $\beta$  (TGF $\beta$ ), 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.*, 2008).

Os TGF $\beta$  (GDF-9 e BMP15) participam da regulação parácrina da maturação oocitária e da diferenciação das células do *cumulus* e das células da granulosa, além de serem fundamentais para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais (LI *et al.*, 2000; JUENGEL e MCNATTY, 2005). Eles regulam vários processos como proliferação, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do *cumulus*, além de favorecerem a competência do oócito para a fecundação e desenvolvimento embrionário (EPPIG, 2001; GILCHRIST *et al.*, 2004; JUENGEL *et al.*, 2004).

Os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) também estão incluídos no grupo dos FSO.

#### 2.4.1. Fatores de Crescimento dos Fibroblastos (FGFs)

Os FGFs e seus receptores (FGFR) estão envolvidos em diversos sistemas biológicos e são relevantes em alguns processos como desenvolvimento embrionário e fetal, reparação de tecidos, diferenciação celular, angiogênese, além de agirem como mediadores autócrinos e parácrinos em vários processos fisiológicos e patológicos como, por exemplo, em desenvolvimento ou progressão de tumores (NEZU *et al.*, 2005, TURNER; GROSE, 2010). Segundo ZHANG e EALY, 2012, os FGFs também estão envolvidos no controle da oogênese, foliculogênese e maturação do complexo *cumulus*-oócito. Sabe-se que o bloqueio de receptores de FGFs prejudica as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário em vacas.

Em mamíferos, os FGFs compõem uma família de 23 membros, que apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos (revisado por BEENKEN e MOHAMMAD, 2009). Estes polipeptídios são ligantes extracelulares que possuem em comum um núcleo de 140 aminoácidos e são agrupados em sete subfamílias de acordo com sua homologia sequencial e função (ORNITZ, 2000). Estudos filogenéticos levaram ao agrupamento dos FGFs em sete subfamílias, cujos membros ativam os mesmos receptores: subfamílias do FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9, iFGF e hFGF (ITOH & ORNITZ, 2004).

A sinalização dos FGFs ocorre por meio de quatro receptores (FGFR1 a 4) do tipo tirosina-quinase localizados na membrana plasmática. Arranjos transcricionais alternativos (“alternative splicing”) do FGFR1, FGFR2 e FGFR3 levam à formação das isoformas “B” e “C” dos receptores, que apresentam diferentes graus de afinidade por FGFs distintos (ORNITZ *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2006). A dimerização dos FGFRs resulta na transforilação de resíduos específicos de tirosina quinase, levando à ativação de mecanismos intracitoplasmáticos envolvidos na migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (revisado por DOREY e AMAYA, 2010). A foliculogênese está incluída dentre os processos fisiológicos dos quais participam os FGFs.

#### 2.4.2. Subfamília FGF8

A subfamília do FGF8 é também conhecida como família oncogênica fetal (NEZU *et al.*, 2005). Membros dessa subfamília (FGF8, FGF17 e FGF18) apresentam semelhantes sequências de aminoácidos (HOSHIKAWA *et al.*, 1998; MARUOKA *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1999), características bioquímicas incluindo afinidade pelos mesmos FGFRs (ITOH, ORNITZ, 2004). Esses FGFs ativam preferencialmente os receptores FGFR3c e FGFR4, apresentando ainda afinidade moderada pelo FGFR2c (XU *et al.*, 2000; FORD-PERRISS *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2006). A expressão de receptores FGFR2c e FGFR3 foi relatada em células do cumulus antes e durante a maturação (ZHANG e EALY, 2012). Mudanças drásticas no perfil de RNAm de FGFR foram observadas em células do cumulus, porém não em oócitos durante a MIV. Sugere-se que o FGF age através de células do cumulus para melhorar a competência oocitária, também foi observado um aumento na expressão relativa de RNAm de SPRY2 (Sprouty homolog 2) que é um regulador de *feedback* dos receptores do tipo tirosina quinase, que está relacionada com aumento na atividade dos receptores de FGF já existentes nas células do cumulus durante a maturação *in vitro* (ZHANG e EALY, 2012).

O FGF8 foi primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (TANAKA *et al.*, 1992; CROSSLEY e MARTIN, 1995). Transcritos de FGF8 são expressos nas células da granulosa e em oócitos bovinos (BURATINI *et al.*, 2007), sendo que nos oócitos e nas células do cumulus (CAIXETA *et al.*, 2015) a expressão parece diminuir ao longo da maturação do COC (MACHADO *et al.*, 2015). Seus receptores estão expressos em células da teca, da granulosa mural e do *cumulus*, onde os níveis de RNAm foram drasticamente aumentados pelo FSH (BURATINI *et al.*, 2005). Níveis de RNAm que codificam variantes do tipo “C” de FGFR2 e FGFR3 também foram aumentados em células do cumulus pelo FSH (CAIXETA *et al.*, 2013).

O FGF8, em sinergismo com a BMP15, estimula a expressão e atividade de enzimas glicolíticas nas células do *cumulus* (SUGIURA *et al.*, 2007). Além disso, o FGF8, também em cooperação com a BMP15, aumenta a expressão do

receptor natriurético tipo 2 (NPR2) nas células do *cumulus*, o que aumenta a síntese de GMPc e inibe a retomada da meiose (ZHANG *et al.*, 2010).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.647-653. 2001.

ALBERTINI; D. F., SANFINS, A.; COMBELLES, C. M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. **Reprod Biomed Online**, 6:410-415. 2003.

ANDERSON, E., ALBERTINI, D.F. Gap junctions between the oocytes and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The journal of cell biology**. v.71, p.680-686. 1976.

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

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

BARTON, S.C., SURANI, M.A., Norris, M.L., 1984. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. **Nature**. v.311, p.374–376. 1984.

BEENKEN., A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. v.8(3):p. 235–253. 2009.

BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. 2006. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. **Mol Hum Reprod**, v.12, p.413–419. 2006.

BIGGERS, J. D., WHITTINGHAM, D. G., DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. **Zoology**, v. 58, p. 560–567. 1967.

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

BURATINI, J. JR., PINTO, M.G., CASTILHO, A.C. 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. 2007.

BURATINI, J. Jr.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B.; GLAPINSKI, V.F.; PINTO, M.G.L.; GIOMETTI, I.C.; BARROS, C.M.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors,

fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reprod**, v. 130, p.343-350. 2005.

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

CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.9, p.749-756. 2003.

CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Mol Reprod Dev**. v.34, p.87-93. 1993.

CHEN, L.; WERT, S.E.; HENDRIX, E.M.; RUSSELL, P.T; CANNON, M.; LARSEN, W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. **Mol Reprod Dev**, v.26, p.236-47. 1990.

CHEUNG, P., ALLIS, C.D., SASSONE-CORSI, P. Signaling to chromatin through histone modifications. **Cell**, v.103, p.263-271. 2000.

CHOHAN, K. R; HUNTER, A. G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. **Anim Reprod Sci**, v.76, p.43-51. 2003.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**; v.20, p.715-23. 2006.

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

DE LA FUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. **Dev Biol**, v.292, p.1-12. 2006.

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**. 1;299 (1): p.91-104. 2006.

DOREY, K., AMAYA, E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. **Development**. v.137(22), p.3731-3742. 2010.

DOWNS, S. M., HUMPHERSON, P. G., LEESE, H. J. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p.121-131. 1996.



DOWNS, S. M., HUMPHERSON, P. G., LEESE, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. **Biology of Reproduction**. v.58, p.1084–1094. 1998.

DOWNS, S. M., UTECHT, A. M. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte–cumulus cell complexes. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1446–1452. 1999.

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

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

EPPIG, J. J., HOSOE, M., O'BRIEN, M. J., PENDOLA, F. M., REQUENA, A., WATANABE, S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Molecular and Cellular Endocrinology** v.163, p.109–116. 2000.

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

EPPIG, J.J.; VIVEIROS, M.M.; MARIN-BIVENS, C.; DE LA FUENTE, R.. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung, P.C.K., Adashi, E.Y. (Eds.), *The Ovary*. **Elsevier**, Amsterdam, pp. 113–129. 2004.

FAS/USDA 2016 - United States Department of agriculture/ Foreign Agricultural Service. Acessado dia 8 de fevereiro de 2016. Disponível em: < <http://www.fas.usda.gov> >.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.203-216. 2003.

FARSI, M.M.; KAMALI, N.; POURGHASEM, M. Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. **Int J Mol Cell Med**; v.2. p.99-109. 2013.

FEUERSTEIN, P.; CADORETA, V. DALBIES-TRANA, R.; GUERIFA, F.; ROYEREA, D. Le dialogue ovocyte–cumulus. **Gynecol Obstet Fertil**, v.34, p.793-800. 2006.

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

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S.C.; FADINI, R.; CANTO, M.D.; RENZINI, M.M.; ALBERTINI, D.F.; LUCIANO, A.M. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap

Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biology reproduction**. 91(3):v.61, p.1-9. 2014.

FREIMANN, S.; BEN-AMI, I.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. 2004. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.324, p.829–834. 2004.

FUHRER, F., MAYR, B., SCHELLANDER, K., KALAT, M., SCHLEGER, W. 1989. Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes. **Zentralbl Veterinarmed A**, 36:285-291. 1989.

FURNUS, C. C., DE MATOS, D.G., MOSES, D.F. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p.76–83. 1998.

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

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocytes-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction Science**. v.82-83, p.431-446. 2004.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p. 23–31. 2011.

GOTTARDI, F.P., MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influencia na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Ver Bras Reprod Anim**, v.33, n.2, p.82-94. 2009.

GRANOT, I., DEKEL, N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.13, p. 310–313. 2002.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T.; MILLER, J.H. Introdução à genética. 8. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**. v.389, p.349–352. 1997.

GRUZOVA, M. N.; PARFENOV, V. N. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. **Int Rev Cytol**, v.144, p.1-52. 1993.

GUTNISKY, C., DALVIT, G. C., PINTOS, L. N., THOMPSON, J. G., BECONI, M. T., CETICA, P. D. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo

development. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.19, p. 488–497. 2007.

HARRIS, S. E., LEESE, H. J., GOSDEN, R. G., PICTON, H.M. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 231–238. 2009.

HERRICK, J. R., BRAD, A. M., KRISHER, R. L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. **Reproduction**, v.131, p. 289–298. 2006.

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.

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

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

JUENGEL, J.L.; BODENSTEINER, K.J.; HEATH, D.A.; HUDSON, N.L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; SAWYER, H.R.; MCNATTY, K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Anim Reprod Sci**, v.82–83, p.447–460. 2004.

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.143-60. 2005.

KANEKO, T., IUCHI, Y, TAKAHASHI, M. FUJII, J. Colocalization of polyolmetabolizing enzymes and immunological detection of fructated proteins in the female reproductive system of the rat. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 119, p.309–315. 2003.

LI, R.; NORMAN, R.J.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and *cumulus* cells. **Biol Reprod**, v.63, p.839-845. 2000.

LODDE, V.; MODINA, S. C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I. Luciano A, M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. **Eur J Histochem**, v.53, p.199-207. 2009.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A.M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.740-749. 2007.

LODDE, V.; MODINA, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; FRANCIOSI, F.; LAURIA, A.; LUCIANO, A. M. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Mol Reprod Dev**, v.75, p.915-924. 2008.

LUCIANO, M.A.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S.C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of reproduction**, v.85, p.1252–1259. 2011.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; LUCIANO, A. M. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **J Assist Reprod Genet**, v.30, p.1219-1226. 2013.

MACAULAY, A. D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.; BARRETO, R.; FOURNIER, E.; TOSSOU, P.; SIRAD, M.; CLARKE, H. J.; KHANDJIAN, E. W.; RICHARD, F. J.; HYTTEL, P.; ROBERT, C. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocytes. **Biology Reproduction**. 91:90. 2014.

MACHADO, M. F., CAIXETA, E. S., SUDIMAN, J., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G., LIMA, P. F., PRICE, C. A., BURATINI, J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v.84, p.390–398. 2015.

MARUOKA, Y., OHBAYASHI, N., HOSHIKAWA, M., ITOH, N., HOGAN, B. L., 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.

MAYES, M.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.911-922. 2001.

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

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

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

MILLER, J.B.; RUSSELL, P. The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Cell**, v.68, p.407-410. 1992.

MERMILLOD, P.; LANNOU, L. D. Maturation ovocytaire in vivo et in vitro chez les mammifères. In: Hamamah S, Menezo Y. Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie. **Paris Ellipses Edition**, p.95-122.1999.

MOON, J.S.;KIM, H.E.; KOH, E.; PARK, S.H.;JIN, W.J.; PARK, B.W.; KIM, K.S. Kru" ppeI-like Factor 4 (KLF4) Activates the Transcription of the Gene for the Platelet Isoform of Phosphofructokinase (PFKP) in Breast Cancer. **Jol Biol Chemis**. v.286: p.23808-16. 2011.

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.

NOGUEIRA, D., RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A., Cortvrindt R, Smitz J. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. **Biol Reprod**, v.74, p.177-184. 2006.

NORRIS, R.P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H., KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**. 136: 1869–1878. 2009.

OBATA, Y.; K.-I.T.; KOIDE, T.; TAKAI, Y.; UEDA, T.; DOMEKI, I.; SHIROISHI, T.; ISHINO, F.; KONO, T. Disruption of primary imprinting during oocytes growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. **Development** 125, 1553–1560. 1998.

ORNITZ, D. M. 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **BioEssays**, v.22, p.108-112. 2000.

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

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.30;303, p.682-4. 2004.

PATTERTON, D., WOLFFE, A.P. Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. **Dev. Biol**. 173, 2–13. 1996.

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.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37. 1998.

PREIS, K. A., SEIDEL, J. G., GARDNER, D. K. Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes. **Reproduction**. v. 130, p. 475–483. 2005.

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

ROBERTS, R., STARK, J., IATROPOULOU, A., BECKER, D. L., FRANKS, S., HARDY, K. Energy substrate metabolism of mouse cumulus–oocytes complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.199–209. 2004.

RUSSELL, D. L. e ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Hum Reprod Update**.v.13, p.289-312. 2007.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. 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, p.1327-1342. 2000.

SCHATTEN, H.; SUN, Q-Y. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus a meiotic spindle formation. **Mol Reprod Dev**. v,78, p. 757-768. 2011.

SCHONENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocytes maturation in cattle. **Biol of Repro**, v. 69, p. 269-27. 2003.

SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D.A.; LI, E.; PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v.385, p.525-529. 1997.

SIRARD, M. A.; Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254. 2001.

SIRARD, M. A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.39-57. 1992.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotics resumption. **Theriogenology**, v.40, p.933-942. 1993.

STEEVES, T. E., GARDNER, D. K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.92–101. 1999.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v.64, p.904-909. 2001.

SU, Y.Q.; DENEGRE, J.M.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. 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, p.126-138. 2003.

SUGIURA, K.; NAITO, K.; ENDO, T.; TOJO, H. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/M-phase-promoting factor activity during porcine oocytes maturation. **Biol Reprod**. v.73, p.593-600. 2005.

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

SUGIURA, K., SU, Y. Q., LI, Q., WIGGLESWORTH, K., MATZUK, M. M. EPPIG, J.J. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. **Molecular Endocrinology**. v.24, p. 2303–2314. 2010.

SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell**. v.93, p.309–312. 1998.

SUTTON, M. L., CETICA, P. D., BECONI, M. T., KIND, K. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v.126, p.27–34. 2003.

SUTTON, M. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocytes complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**. v. 9, p. 35–48. 2003b.

SUTTON-McDOWALL, M. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G. Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear

maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. **Reproduction, Fertility, and Development**. v.17, p. 407–415. 2005.

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

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

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

TANGHE, S.; SOON, A.V.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation e fertilization. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.414-424. 2002.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N., MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.805–810.2000.

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

TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol**. 178: 393–402. 1996.

TURNER, B.M. Histone acetylation and an epigenetic code. **BioEssays**. v. 22,p.836–845. 2000.

TURNER, N. GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nature reviews cancer**. v.10, p. 116-129. 2010.

VACCARI, S.; WEEKS, J. L II, HSIEH, M.; MENNITI, F. S.; CONTI, M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod**. 81: 595–604. 2009.

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, p.173–177. 1997.



VAN SOOM, A. S., TANGHE, I. D. P., MAES, D. KRUIF, A. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. **Reprod Dom Anim.** v.37, p.144–151. 2002.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **J. Anim. Sci.**, 85, pp. E1–E3, 2007.

WHITE, T. W., PAUL, D. L., GOODENOUGH, A. D., BRUZZONE, R. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Molecular Biology of the Cell.* v. 6, p.459-470. 1995.

WOLFFE, A.P., PRUSS, D. Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. **Cell.**v.84, p.817–819. 1996.

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

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.

XU, K.P.; GREVE, T. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **J Reprod Fertil**, v.82, p.127-134, 1988.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. **Theriogenology.** v. 49, p. 471-482. 1998.

YOKOO, M. SATO, E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. **Int Ver Cytol.** v. 235, p. 251-291, 2004.

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

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Sci Vet**, v.31, p.188-205. 2003.

ZACCOLO, M.; MOVSESIAN, M.A. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. **Circ Res**, v.100: p.1569–1578. 2007.

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. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 42, p.230-238. 2012.

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

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**. 152: 4377–4385. 2011.

ZHANG, X., IBRAHIMI, O. A., OLSEN, S. K., UMEMORI, H., MOHAMMADI, M., ORNITZ, M. D. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian fgf Family. **Biol Chem**. v. 281(23): p.15694–15700. 2006.

## **CAPÍTULO 2**

### **O FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS 8 (FGF8) RETARDA A MATURAÇÃO NUCLEAR DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO BOVINOS**

## RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa fundamental da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). A conclusão prematura da maturação nuclear durante a MIV é considerada como uma das principais causas da eficiência limitada da PIV. Em camundongos, o fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) regula a atividade do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) aumentando a expressão de seu receptor (NPR2) e contribuindo assim para o bloqueio meiótico. O principal objetivo deste trabalho foi testar os efeitos do FGF8 sobre a dinâmica da quebra da vesícula germinativa e progresso da meiose durante a MIV induzida com FSH ou ampirregulina (AREG) em bovinos. Paralelamente, os efeitos do FGF8 sobre a expansão do cumulus e metabolismo da glicose também foram testados. Na MIV induzida com AREG, mas não com FSH, o FGF8 diminuiu a porcentagem de oócitos com quebra da vesícula germinativa às 6 e 9 horas do cultivo, enquanto aumentou a expressão do RNAm do NPPC, mas não do NPR2, nas células do cumulus. Distintamente, na MIV com FSH, o FGF8 diminuiu a porcentagem de oócitos em Meiose I às 9 horas de cultivo. O FGF8 não afetou a porcentagem de oócitos em Meiose II às 22 horas da MIV, nem a expansão do cumulus, embora tenha aumentado a expressão do RNAm de genes da cascata ovulatória [prostaglandina endoperoxido sintase 2 (PTGS2) e desintegrina e metaloproteinase de domínio contendo proteína 10 (ADAM 10)]. Além disso, o FGF8 diminuiu o consumo de glicose e a produção de lactato na MIV com FSH, mas não com AREG. Em conclusão, o FGF8 desacelera a dinâmica da maturação nuclear enquanto aumenta a expressão do NPPC nas células do cumulus durante MIV induzida com AREG e, portanto, apresenta-se como fator potencialmente útil para melhorar a eficiência da MIV.

## INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) tem como objetivo proporcionar a aquisição de competência para a fecundação em oócitos retirados da fêmea doadora antes da maturação fisiológica induzida pelo pico de LH (CHILD *et al.*, 2002). A MIV deve proporcionar maturação nuclear com condensação da cromatina e segregação cromossômica após retomada da meiose, e citoplasmática, com reorganização das organelas e armazenamento de RNAm, proteínas e fatores de transcrição (WATSON, 2007). *In vivo*, o LH estimula a secreção dos fatores EGF-*like* [ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC)] nas células da granulosa murais, que estimulam sua própria produção nas células do cumulus, enquanto que na maturação *in vitro* utiliza-se o FSH ou o EGF, que agem diretamente nas células do cumulus levando à produção dos fatores EGF-*like* (GILCHRIST, 2011). Os fatores EGF-*like* induzem a maturação do complexo cumulus-oócito via ativação do EGFR e da via de sinalização ERK1/2, principalmente (SAKAGUCHI *et al.*, 2000). A cascata ovulatória leva à fosforilação da conexina 43 (Cx43), que causa o fechamento de junções gap com consequente perda dos efeitos inibitórios do AMPc e GMPc vindos das células do cumulus sobre a meiose (revisado por GILCHRIST, 2011), resultando na retomada da meiose.

Na MIV, assim que os oócitos são retirados do folículo, há retomada espontânea da meiose (PINCUS e ENZMANN, 1935), gerando assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; SANCHEZ e SMITZ, 2012), pois o COC perde o contato com fatores inibidores da meiose contidos no ambiente folicular (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Dessa forma, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena competência citoplasmática (ADONA e LEAL, 2006; GILCHRIST E THOMPSON, 2007). A maturação oocitária é mais eficiente quando realizada *in vivo*, proporcionando ao oócito maior competência para o desenvolvimento (CHIAN *et al.*, 2004), em comparação a maturação *in vitro* (VAN DE LEEMPUT *et al.*, 1999; RIZOS *et al.*, 2002; FARIN *et al.*, 2007). Portanto, novas estratégias de cultivo tem sido propostas para tornar a maturação nuclear mais gradual beneficiando a fertilidade do oócito. Por exemplo, sistemas de cultivo em duas fases com utilização de inibidores de fosfodiesterase ou NPPC no cultivo pré-maturação

tem disso investigados (ALBUZ *et al.*, 2010; FRANCIOSI *et al.*, 2014). Por outro lado, a substituição do FSH pela AREG, que é o indutor fisiológico principal da maturação do cumulus, também têm sido estudada. Recentemente, a combinação de AREG com BMP15 proporcionou aumento da produção e qualidade embrionária (SUGIMURA *et al.*, 2015).

Fatores secretados pelo oócito como a BMP15, o GDF9 e fatores de crescimento dos fibroblastos regulam a diferenciação do cumulus e, conseqüentemente, a fertilidade do próprio oócito (CAIXETA *et al.*, 2013; SUGIURA *et al.*, 2010). O FGF10 e o FGF17 estimularam a expansão do cumulus e melhoraram a produção embrionária *in vitro* em bovinos (ZHANG *et al.*, 2010, CAIXETA *et al.*, 2013, MACHADO *et al.*, 2015). O FGF8 ativa os mesmos receptores que o FGF17 e é expresso pelo oócito bovino (BURATINI *et al.*, 2005; ZHANG 2006, FORD-PERRISS *et al.*, 2001). Interessantemente, polimorfismos no gene FGF8 foram associados a maior recuperação de oócitos em vacas (SANTOS-BIASE *et al.*, 2012). Em camundongos, o FGF8 em cooperação com a BMP15 estimula o metabolismo glicolítico no cumulus e regula a maturação nuclear (ZHANG *et al.*, 2010; SUGIURA, 2010, SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2010). O efeito do FGF8 sobre a maturação nuclear parece ser mediado pelo aumento da expressão de NPR2 nas células do cumulus (ZHANG *et al.*, 2010). Contudo, nenhum estudo até o momento avaliou a participação do FGF8 no controle da maturação nuclear oocitária em outras espécies.

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do FGF8 sobre a quebra da vesícula germinativa e progressão da meiose, bem como sobre a expansão e atividade glicolítica do cumulus durante a maturação oocitária *in vitro* induzida com FSH ou AREG em bovinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana localizado na Universidade Estadual Paulista – *campus* Botucatu.

## **Obtenção e cultivo dos Complexos Cumulus-oócito (COCs)**

Ovários bovinos obtidos em abatedouro foram transportados em recipiente térmico contendo solução salina (0,9% NaCl) estéril e aquecida a 26°-28°C. No laboratório, foram lavados em solução salina aquecida a 26°C e álcool 70%. Os folículos com diâmetro entre 3 a 6 mm foram aspirados. O fluido recuperado foi depositado em tubo cônico, permanecendo em repouso, para posterior recuperação e seleção, sob estereomicroscópio, dos COCs de grau 1 e 2 (células com citoplasma homogêneo e pelo menos com 5 camadas de células do cumulus) em placa de Petri (90mm).

Os COCs foram lavados com solução TCM199 e 25Mm HEPES, suplementado com amicacina (75µg/mL) e 4mg/mL albumina sérica bovina (BSA) (M199D). Grupos de 20 COCs foram transferidos e cultivados em placas multipoços contendo 400µl em meio de cultivo básico TCM 199 com sais de Earle, glutamina e NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com amicacina (75µg/mL), piruvato (22µg/mL), 4mg/mL de BSA fração V livre de ácidos graxos e AREG (100 ng/mL) ou FSH (1 ug/mL; pFSH, Folltropin-V® Bioniche, ON, CA). Os cultivos foram realizados sob temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa de 5% CO<sub>2</sub> e máxima umidade.

## **Delineamento experimental**

Para testar os efeitos do FGF8 sobre a maturação nuclear e função do cumulus, COCs foram cultivados por 6, 9 e 22 horas com concentrações crescentes de FGF8 (0, 1, 10 e 100 ng/mL) na presença de FSH ou AREG (n=3-5 réplicas por grupo). A progressão da meiose foi avaliada às 6 e às 9 horas e oócitos foram classificados em VG, VGBD e MI, enquanto às 22 horas oócitos foram classificados em estágio de MI e MII, a expansão do cumulus foi avaliada às 22 horas e as concentrações de glicose e lactato do meio de cultivo foram avaliadas nos três momentos.

## **Avaliação da expansão**

A expansão foi avaliada visualmente no estereomicroscópio atribuindo-se graus de 1 a 3 (1- expansão inexistente ou muito fraca; 2- expansão parcial; 3- expansão completa ou quase completa (ZHANG *et al.*, 2010).

### **Avaliação da maturação nuclear**

A ocorrência de quebra da vesícula germinativa e o progresso da meiose foram avaliados pela visualização do envelope nuclear e configuração da cromatina. Para tanto, os oócitos foram desnudados mecanicamente, fixados com 500 µl solução 60% de metanol em Dulbecco PBS (DPBS) durante 30 minutos a 4°C e corados com 5µl da solução de 1 µg/mL do corante Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO, USA), para serem avaliados em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i) e classificados em vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (VGBD), metáfase I e metáfase II.

### **Metabolismo glicolítico**

Concentrações de glicose e lactato foram determinadas no meio de maturação pelo método de química seca, esta metodologia dispensa a utilização de água em qualquer uma de suas etapas, utiliza seis camadas de reagentes sólidos que filtram os interferentes de alto peso molecular (proteínas, lipídios e hemoglobinas) e possibilitam que o exame seja feito a partir de uma amostra com o mínimo de interferentes. Este método foi realizado com uso do equipamento VITROS®Fusion 5.1 FS (JOHNSON & JOHNSON, Ontario, Canada). Para determinar o consumo de glicose, a concentração de glicose medida ao fim do cultivo foi subtraída da concentração de glicose no meio pré-cultivo. O consumo de glicose e a síntese de lactato foram expressos em pmol/COC/h (SUTTON Mc-DOWALL *et al.*, 2012).

### **Análise de expressão gênica**

Para investigar os mecanismos pelos quais o FGF8 altera a maturação nuclear, avaliou-se os efeitos do FGF8 sobre a expressão de genes da cascata ovulatória, NPPC e NPR2. As células do cumulus foram utilizadas para realizar a expressão gênica, após serem cultivadas, ainda com o oócito, por 6 horas de MIV.

As células do cumulus e oócitos (n= 20/grupo) foram mecanicamente separados por sucessivas pipetagens em gotas de PBS. Oócitos desnudos foram lavados três vezes em PBS. As células do cumulus foram transferidas para



um tubo de 1,5 mL, centrifugadas durante 5 minutos a 700 g, após o que o sobrenadante foi descartado e 350 µl de tampão de lise foram adicionados ao precipitado de células celulares, o que foi armazenado a -80°C para posterior extração de RNA. A extração do RNA total das células do cumulus de grupos de 20 COCs foi realizada utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen, Mississauga, ON, CA) conforme as instruções do protocolo do fabricante. Após a purificação, as amostras de RNA total foram suspensas em 30 µl de água ultrapura livre de RNase. A concentração do RNA total extraído das amostras foi mensurada no espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Alíquotas de 100ng de RNA total foram tratadas com DNase I (1 U/µg; Invitrogen, São Paulo, Brazil) e só então submetidas à transcrição reversa com primers Oligo-dT e a transcriptase reversa Omniscript (Qiagen, Mississauga, ON, CA) para células do cumulus.

A avaliação da expressão gênica foi realizada por RT-PCR em tempo real com termociclador ABI 7500 utilizando o sistema de detecção Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com volume final de 25µl para todos os genes alvos e endógenos. Os ciclos de PCR foram repetidos 40 vezes conforme a seguir: 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos seguido de anelamento por 1 minuto. As temperaturas de anelamento foram distintas para cada primer e aparecem especificadas na Tabela 1, bem como a sequência e tamanho dos *amplicons* (fragmentos amplificados). As reações foram otimizadas para obter máxima eficiência para cada gene.

Cada amostra foi corrida em duplicata e a especificidade do produto de PCR foi testada pela curva de dissociação e avaliação do tamanho do *amplicon* em eletroforese em gel de agarose 2,5%. Para seleção do controle endógeno, mais estável, os perfis de amplificação dos genes Ciclofilina-A (CYC-A), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Histona (H2A) foram testados utilizando o programa geNorm para Microsoft Excel ([medgen.ugent.be/genorm](http://medgen.ugent.be/genorm); VANDESOMPELE *et al.*, 2002) em estudo anterior (CAIXETA *et al.*, 2013). Para células do cumulus, o gene endógeno mais estável foi a CYC-A. Os valores de expressão relativa para cada gene foram calculados pelo método  $\Delta\Delta C_t$  com correção da eficiência e uma amostra como calibradora (PFAFFL, 2001). A média da eficiência para cada gene foi calculada a partir do perfil de amplificação de cada amostra com o software LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003).

## **Análise Estatística**

A fim de testar os efeitos dos tratamentos sobre a maturação nuclear e expansão das células do cumulus, os dados referentes a proporções de COCs ou oócitos foram transformados em arcoseno, enquanto que as concentrações de glicose e lactato e os valores de expressão gênica foram transformados em log quando não apresentaram distribuição normal. Os efeitos dos tratamentos foram testados por ANOVA e os grupos comparados com o teste de Tukey. Quando mesmo após transformação, a distribuição dos dados não era normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

A análise estatística foi feita utilizando-se o software JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

Inicialmente, comparamos a dinâmica da quebra da vesícula germinativa na MIV induzida com FSH ou AREG e constatamos que às 6 horas do cultivo a AREG antecipou a quebra da vesícula germinativa e a meiose I (Fig. 1).

Na presença de AREG, o FGF8 na dose de 100ng/mL diminuiu a taxa de oócitos em VGBD às 6 horas e aumentou a taxa de oócitos em VG às 6 e 9 horas. Já na presença de FSH, o FGF8 na dose de 100ng/mL diminuiu a taxa de oócitos em meiose I às 9 horas (Fig. 2). O FGF8 não afetou a progressão da meiose (Fig. 3), nem a expansão do cumulus em nenhum dos dois cenários às 22 horas (Fig. 4).

O FGF8 não influenciou o consumo de glicose e a produção de lactato na presença de AREG (Fig. 5), mas, na dose de 100ng/mL, reduziu o consumo de glicose na presença de FSH às 9 horas da MIV (Fig. 6).

A fim de avaliar os mecanismos pelos quais o FGF8 retardou a maturação nuclear na presença de AREG, testamos seus efeitos sobre a abundância do RNAm de genes da cascata ovulatória e do sistema NPPC/NPR2. O FGF8 aumentou a expressão de ADAM 10, PTGS2 e NPPC (Fig. 7).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, primeiramente, observou-se que a AREG precipita a maturação nuclear em relação ao FSH, o que possivelmente se deve à ativação direta dos receptores EGFR dando início à cascata ovulatória mais rapidamente em relação ao estímulo com FSH. Além disso, a AREG reduziu a expressão do RNAm do NPPC em células da granulosa de ratas (TSUJI *et al*, 2012), o que poderia contribuir para um efeito mais agudo sobre o bloqueio da meiose.

Na MIV com AREG, o FGF8 diminuiu as taxas de VGBD às 6 e 9 horas do cultivo, o que se mostrou associado a níveis aumentados do RNAm do NPPC nas células do cumulus. O efeito inibitório do FGF8 sobre a VGBD pode ter sido causado, ao menos em parte, pelo aumento da expressão de NPPC nas células do cumulus. Isso causaria aumento da produção de GMPc e conseqüentemente, aumento dos níveis de AMPc, contribuindo para a parada meiótica (ZHANG *et al.*, 2010). Já na MIV com FSH o efeito sobre a quebra da vesícula germinativa não se repetiu, embora o FGF8 tenha reduzido a porcentagem de oócitos em MI às 9 horas da MIV com FSH. As diferenças dos efeitos do FGF8 nesses cenários distintos é interessante, mas de difícil explicação. O FGF8, por ser capaz de estimular a expressão do NPPC, poderia atenuar a diminuição mais rápida da oferta de NPPC na MIV com AREG em relação ao FSH, contribuindo para manter a vesícula germinativa.

Nos cenários de AREG ou FSH, o FGF8 não alterou a expansão do cumulus na MIV, embora tenha aumentado a expressão de ADAM10 e PTGS2 na presença de AREG. Os resultados corroboram com os dados de SUGIURA *et al*, 2010, em que o FGF8 não alterou a expansão do COC em camundongos. Entretanto, MACHADO *et al*, (2015) demonstraram que o FGF17, que ativa os mesmos receptores que o FGF8, estimula a expansão das células do cumulus. Ações diferentes de FGFs que ativam os mesmos receptores podem ser decorrentes de diferentes padrões de ativação das vias intracelulares (SUGIURA, *et al* 2007).

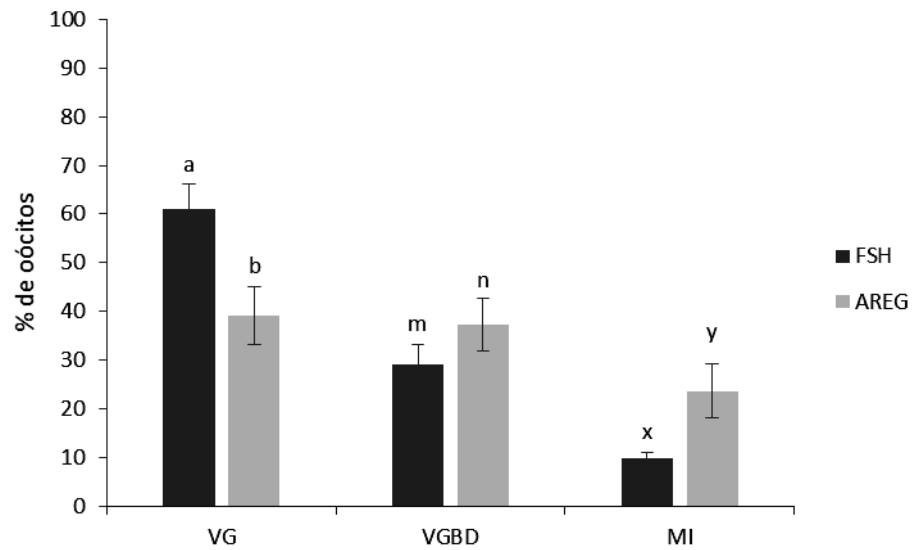
O FGF8 não afetou o metabolismo da glicose no cenário AREG, enquanto que no cenário FSH, o FGF8 diminuiu o consumo de glicose às 9 horas da MIV. Outros estudos são necessários para esclarecer as causas desse efeito e se há repercussão sobre a fertilidade do oócito. A ausência de efeito inibitório

sobre o metabolismo da glicose na presença de AREG pode ser decorrente da maior competência da AREG, comparada ao FSH, em estimular o metabolismo energético. A AREG reduz o fluxo de glicose através da via das hexosaminas, direcionando-o para o metabolismo glicolítico e, proporcionando, desta forma, maior produção de ATP a partir da glicólise dentro das células do cumulus em comparação com COCs tratados com FSH. Especula-se que essa seja a causa pela qual a AREG pode melhorar a competência para o desenvolvimento dos oócitos (SUGIMURA *et al*, 2014).

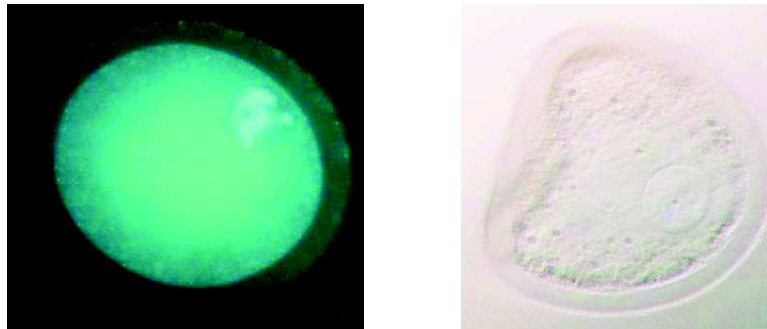
Em conclusão, o presente estudo indica que a AREG precipita a retomada da meiose (VGBD) em relação ao FSH na MIV em bovinos. Além disso, apresentamos pela primeira vez evidências de que o FGF8 é capaz de retardar a quebra da vesícula germinativa sem comprometer a capacidade de atingir a meiose II, por mecanismos que parecem incluir o aumento da expressão do NPPC nas células do cumulus. Esses dados sugerem que o FGF8 pode ser utilizado como um modulador da maturação nuclear na MIV induzida com AREG, embora seus efeitos sobre a produção embrionária ainda devam ser testados.

## FIGURAS

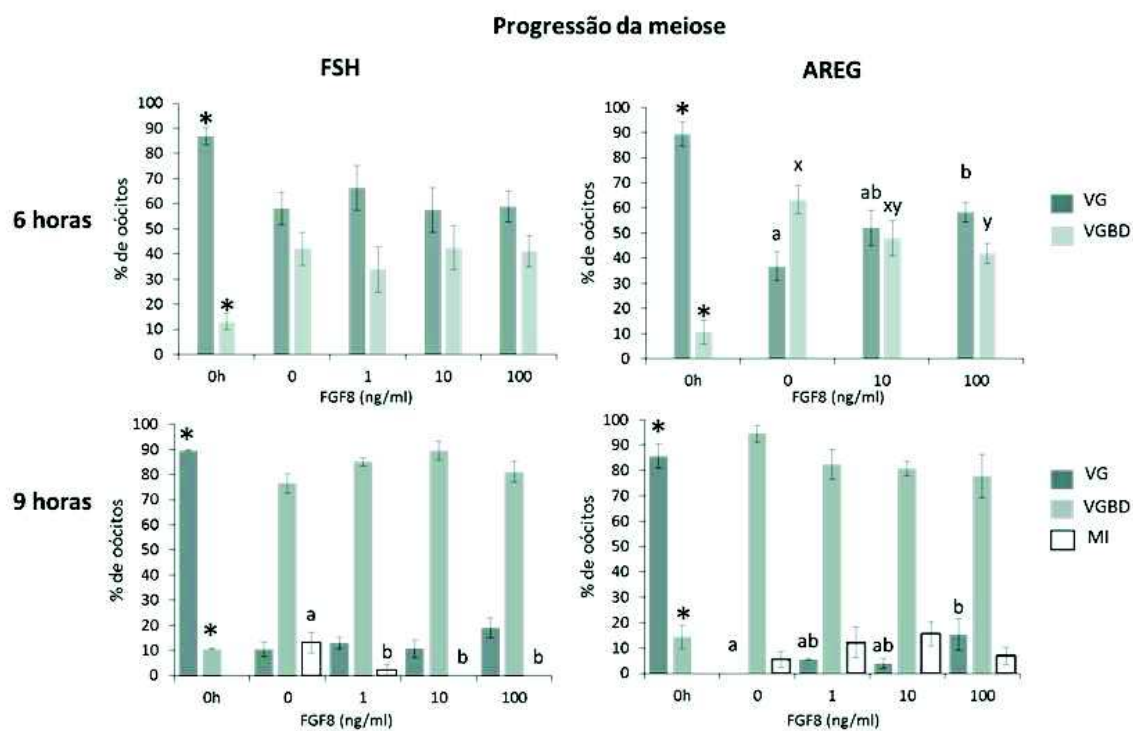
**A**



**B**

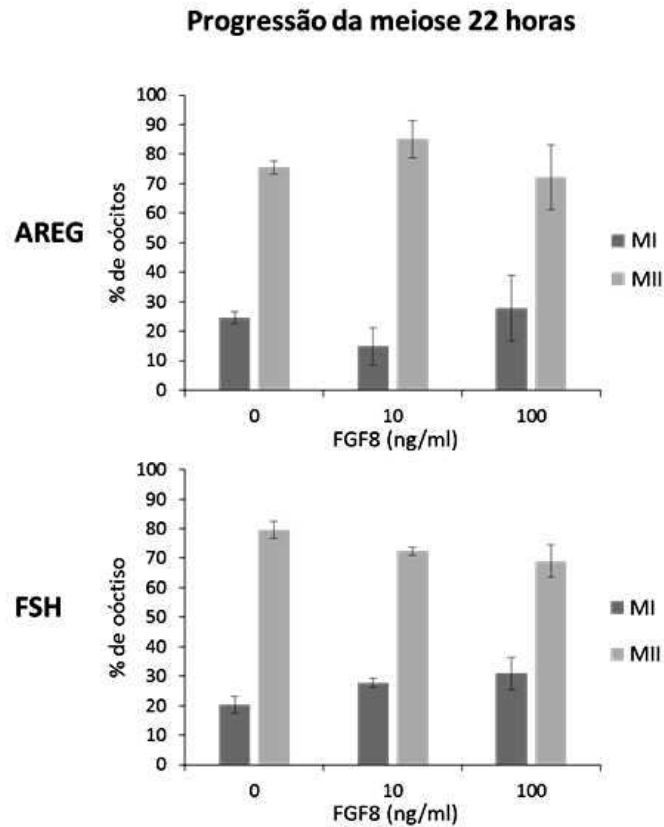


**Fig 1. A)** Efeitos do FSH e da AREG sobre as porcentagens de oócitos em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (VGBD) e meiose I (MI) após 6 horas de MIV (n= 5 réplicas; 15-20 oócitos por grupo). **B)** Imagens representativas de oócito em VG corado com Hoechst 33342 e sob luz branca, visualizados com microscópio de fluorescência (400x). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

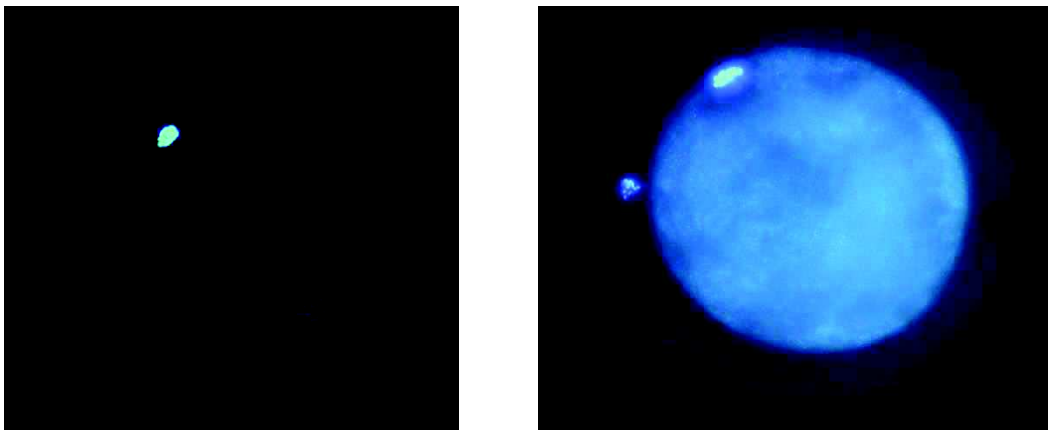


**Fig 2.** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (VGBD) e meiose I (MI) após 6 e 9 horas de MIV na presença de FSH ou AREG (FSH 6 horas: n= 4; FSH 9 horas: n= 5; AREG 6 horas: n=5; AREG 9 horas: n=4; 15-20 oócitos por grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O asterisco indica a porcentagem de oócitos imaturos (0 hora) em estágio de VG e VGBD, este dado não foi adicionado a análise estatística, somente utilizado para controle interno.

**A**

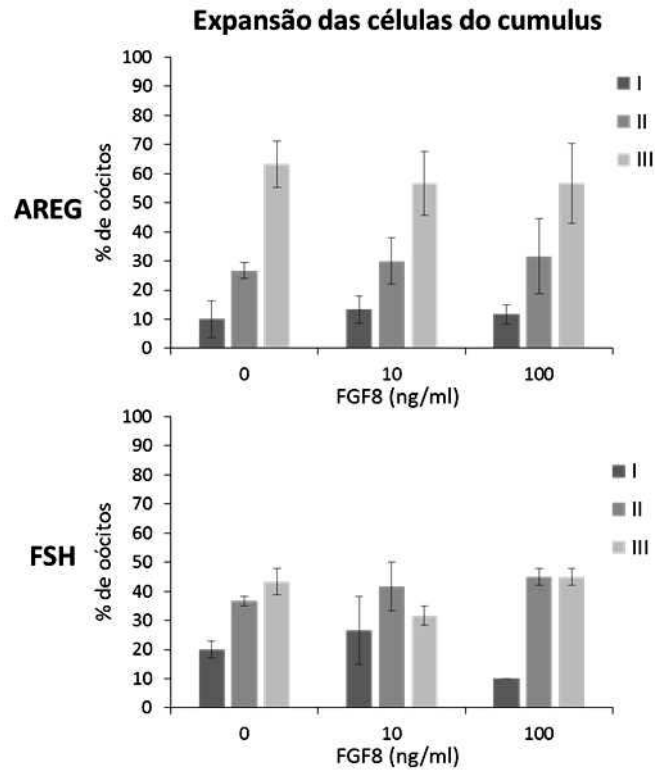


**B**



**Fig 3. A)** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos em meiose I (MI) e meiose II (MII) após 22 horas de MIV na presença de FSH ou AREG (AREG 22 horas: n=5 réplicas; FSH 22 horas: n= 3 réplicas; 15-20 oócitos por grupo).

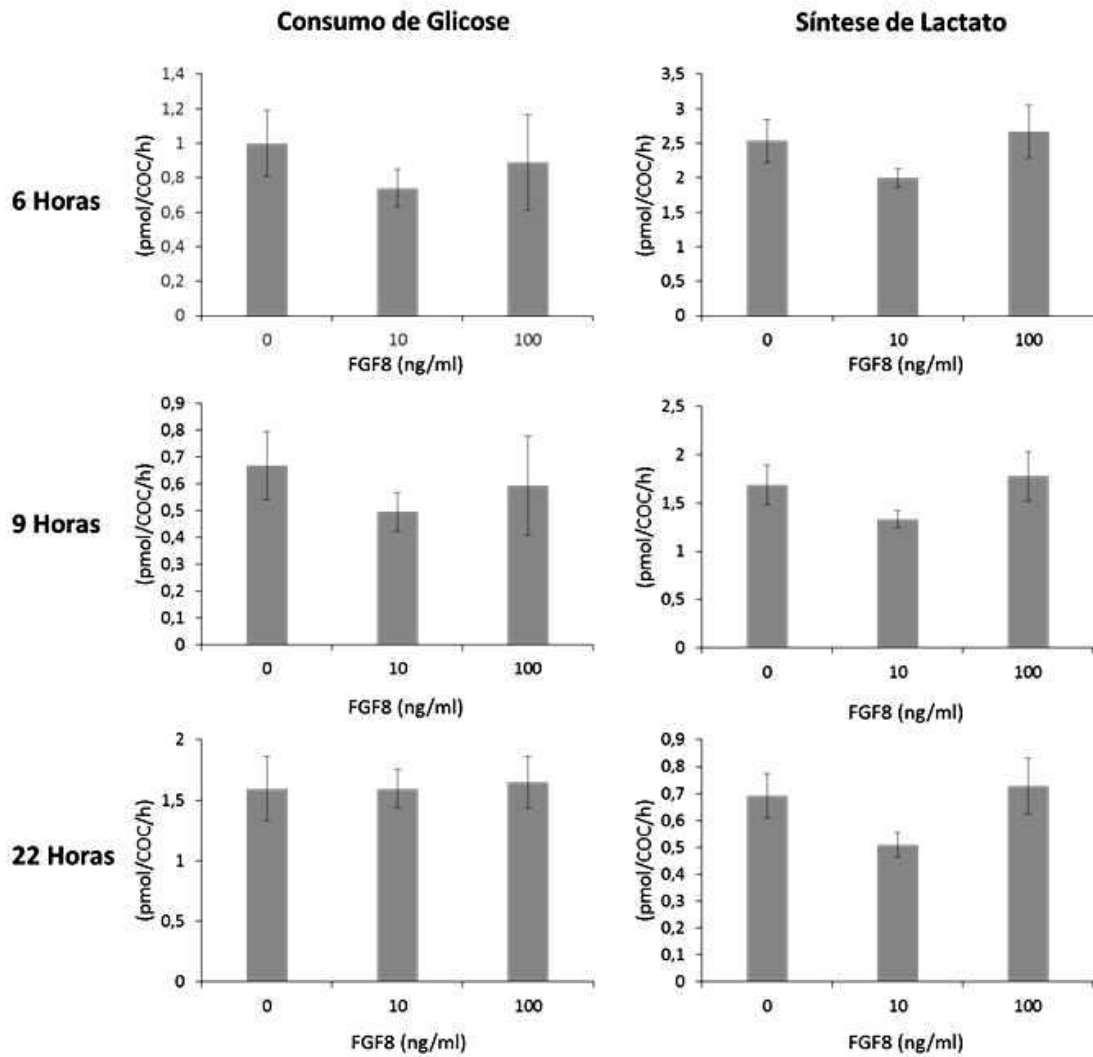
**B)** Imagens representativas de oócitos em MI e MII corados com Hoechst 33342 e visualizados com microscópio de fluorescência (400x).



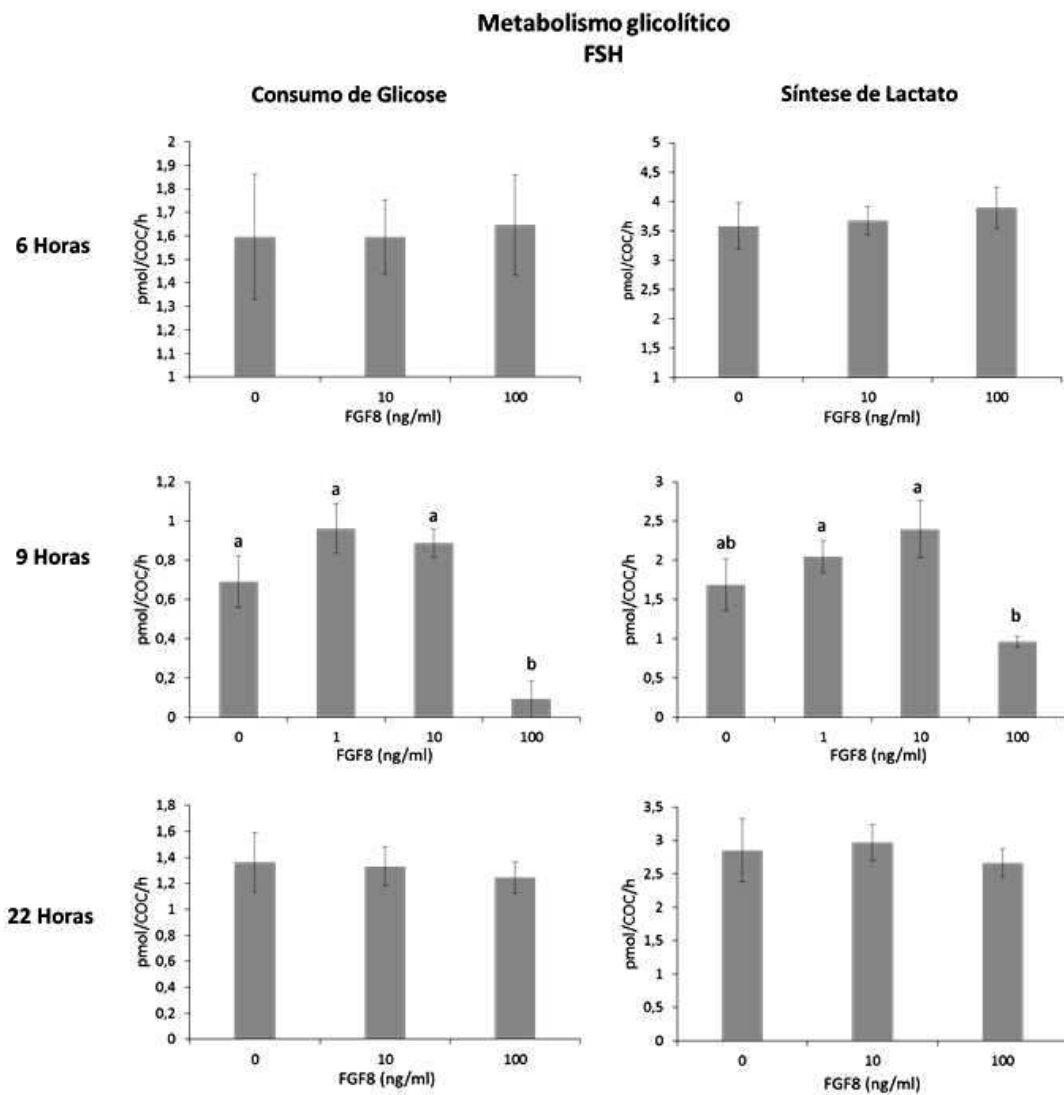
**Fig 4.** Efeitos do FGF8 sobre as porcentagens de oócitos com diferentes graus de expansão do cumulus após 22 horas de MIV induzida com AREG ou FSH. (AREG 22 horas: n=5 réplicas; FSH 22 horas: n=3 réplicas; 15-20 oócitos por grupo).



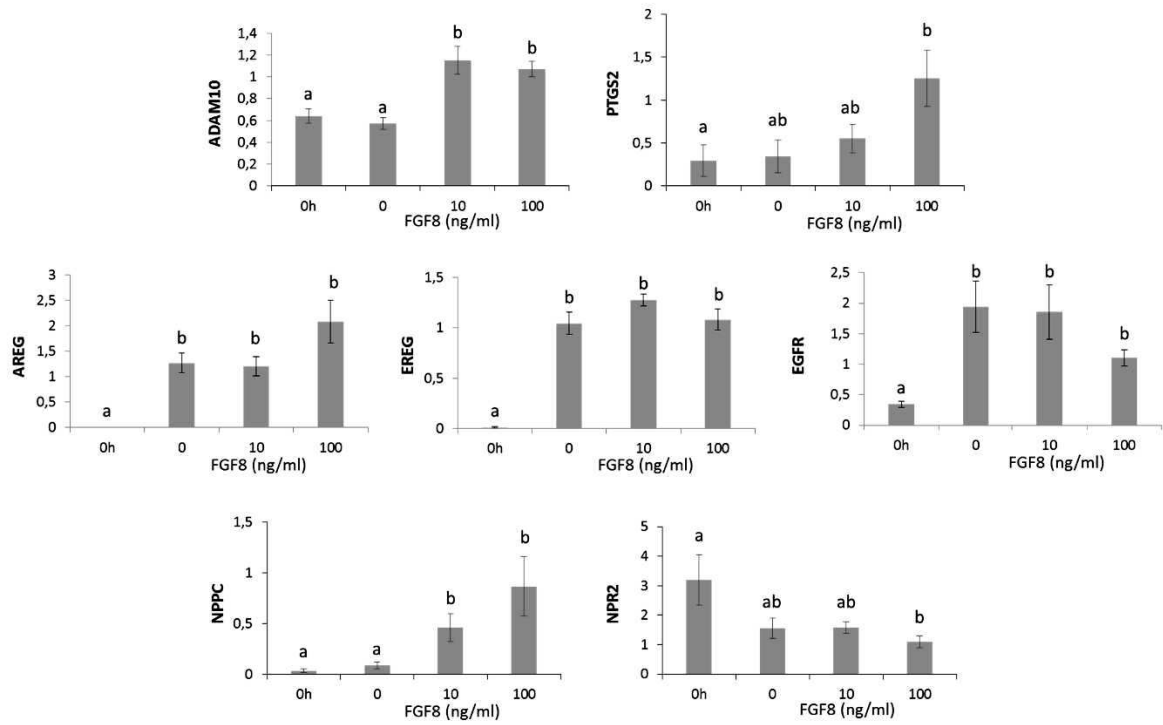
### Metabolismo glicolítico AREG



**Fig 5.** Efeitos do FGF8 sobre o consumo de glicose e produção de lactato, após 6, 9 e 22 horas de MIV com AREG. (AREG 6 horas: n=5 réplicas; AREG 9 horas: n=4 réplicas; AREG 22 horas: n=5 réplicas; 15-20 óocitos por grupo).



**Fig 6.** Efeitos do FGF8 sobre o consumo de glicose e produção de lactato, após 6, 9 e 22 horas de MIV com FSH. (FSH 6 horas: n=4 réplicas; FSH 9 horas: n=5 réplicas; FSH 22 horas: n=3 réplicas; 15-20 óocitos por grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )



**Fig 7.** Efeitos do FGF8 sobre a abundância de RNAm dos genes ADAM10, PTGS2, AREG, EREG, EGFR, NPPC e NPR2 nas células do cumulus de COCs cultivados por 6 horas com AREG. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

## TABELA

Tabela 1: Informação de *primers* específicos utilizados para a amplificação por PCR em tempo real.

GENES	Sequência	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (C°)
AREG	F 5'-CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT-3' R 5'-CGTTCTTCAGCGACACCTTCA-3'	100	60
EREG	F 5'-ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA-3' R 5'-TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT-3'	100	60
EGFR	F 5'-AAAGTTTGCCAAGGGACAAG-3' R 5'-AAAGCACATTCCTCGGATG-3'	253	53
PTGS2	F 5'-AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA-3' R 5'-TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT-3'	168	60
ADAM 10	F 5'-ACCCCCAAAGTCTCTCACA-3' R 5'-AATCATGCGGAGATCCAAAGTT-3'	210	60
NPPC	F- TCAGCCTCCTCGCATCT R- ACAGCTGGTGTGTATCC	101	60
NPR2	F-ATGACAGCATCAACCTGGACTGGA R-AGCACGAAACGACTATCCACCACA	145	60

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R., LEAL, C. L. V. Effect of concentration and exposure period to butirolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, p.354-359. 2006.

ALBUZ, F.K., SASSEVILLE, M., LANE, M., ARMSTRONG, D.T., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum Reprod**. v.25:p.2999–3011. 2010.

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

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

CHIAN, R. C., LIM, J. H., TAN, S. L. State of the art in *in vitro* oocyte maturation. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v.16, p.211-219. 2004.

CHILD, T. J., PHILLIPS, S. J., ABDUL-JALIL, A. K., GULEKLI, B., TAN, S. L. A comparison of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries. **Obstet Gynecol**, v. 100; p.665-670. 2002.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.97-112. 2007.

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

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G., LODDE, V., TESSARO, I., MODINA, S.C., FADINI, R., DAL CANTO, M., RENZINI, M.M., ALBERTINI, D.F., LUCIANO, A.M..Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biology of Reproduction**, 91(3):61, p1–9. 2014.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p. 23–31. 2011.

GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15. 2007.

GOTTARDI, F.P., MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influencia na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Ver Bras Reprod Anim**, v.33, n.2, p.82-94. 2009.

MACHADO, M. F., CAIXETA, E. S., SUDIMAN, J., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, J. G., LIMA, P. F., PRICE, C. A., BURATINI, J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v.84, p.390–398. 2015.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v.62: p.655–675.1935.

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

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.234-248. 2002.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. 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, p.1327-1342. 2000.

SÁNCHEZ, F. & SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**. 1822(12):p.1896–1912. 2012.

SANTOS-BIASE, W. K. F., BIASE, F. H., BURATINI Jr, J., BALIEIRO, J., WATANABE, Y. F., ACCORSI, M. F., FERREIRA, C. R., STRANJERI, P., CAETANO, A. R., MEIRELLES, F. V. Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. **Animal Reproduction Science**. v.134, p.141-149. 2012.

SUGIURA, K., SU, Y. Q., LI, Q., WIGGLESWORTH, K., MATZUK, M. M., EPPIG, J. J. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocytes-derived GDF9 e BMP15. **Mol Endocrinol**. v.24 (12):p. 2303–2314. 2010.

SUGIMURA, S., RITTER, L. J., SUTTON-McDOWALL, M. L., MOTTERSHEAD, D. G., THOMPSON, J. G, GILCHRIST, R. B. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Mol Hum Reprod**. v.20(6):p.499-513. 2014.

SUGIMURA, S., RITTER, L. J., ROSE, R. D., THOMPSON, J. G., SMITZ, J., MOTTERSHEAD, D. G., AND GILCHRIST, R. B. Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. **Dev. Biol.** v.403, p.139–149. 2015.

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

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

TSUJI, T., KIYOSU, C., AKIYAMA, K., KUNIEDA, T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by egfr-mediated signaling in preovulatory follicles. **Molecular Reproduction Development**, v. 79:p.795–802. 2012.

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

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMANA, S.J. Improvement of *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349. 1999.

WASSARMAN, P. M., ALBERTINI, D.F. Cytochalasin b-induced pseudocleavage of mouse oocytes *in vitro*: asymmetric localization of mitochondria and microvilli associated with a stage-specific response. **J Cell Sci**, v.21, p.523-535. 1994.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **J. Anim. Sci.**, v.85, pp. E1–E3. 2007.

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

ZHANG, X., IBRAHIMI, O. A., OLSEN, S. K., UMEMORI, H., MOHAMMADI, M., ORNITZ, M. D. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF Family. **Biol Chem**. v. 281(23): p.15694–15700. 2006.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostra pela primeira vez que o FGF8 tem participação no atraso da retomada da meiose durante o processo de maturação *in vitro*, possibilitando a sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática. Visto que, no momento em que o COC é retirado do folículo perde fatores inibidores da meiose fazendo com que este processo reinicie precocemente, mesmo que o oócito não esteja completamente capacitado. Dados obtidos através dos cultivos com associação de AREG e FGF8 mostraram uma maior porcentagem de oócitos que se mantiveram em estágio de VG. Desta forma, concluímos que o oócito tenha adquirido melhor competência neste cenário. Sendo assim, o FGF8 pode ser um aditivo útil para a MIV na presença de AREG, pois o oócito mais competente possui melhores chances de suportar etapas subsequentes a maturação e evoluindo para o desenvolvimento embrionário.