

MARIANA FERNANDES MACHADO

**EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE MEMBROS DAS
SUBFAMÍLIAS FGF-8 E FGF-9 EM FOLÍCULOS
ANTRAIS BOVINOS**

Orientador José Buratini Junior

BOTUCATU – SP

2012

MARIANA FERNANDES MACHADO

**EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE MEMBROS DAS
SUBFAMÍLIAS FGF-8 E FGF-9 EM FOLÍCULOS
ANTRAIS BOVINOS**

Tese apresentada ao programa de
Pós graduação do Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para
obtenção do título de doutor(a) em
Ciências Biológicas – Farmacologia.

Orientador José Buratini Junior

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Machado, Mariana Fernandes.

Expressão e função de membros das subfamílias FGF8 e FGF9 em folículos antrais bovinos / Mariana Fernandes Machado. - Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: José Buratini Junior

Capes: 21005001

1. Bovino – Reprodução. 2. Ovários. 3. Células – Cultura e meios de cultura.

Palavras-chave: Bovino; Células do cumulus; Expansão do cumulus; Expressão gênica; FGF; Folículo ovariano; Maturação oocitária.

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus pais Eleotério e Maria Aparecida, os mais profundos agradecimentos por infundir-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

A meus queridos irmãos Fabiana e Rafael e cunhados Kátia e Gelson que presentearam-me com lindos sobrinhos Pedrinho, Matheus e Renan e ao Riccardo pelo carinho e por sempre me ajudar a levantar a cabeça e seguir adiante nos momentos difíceis

Ao Orientador Prof. José Buratini Júnior e Dr. Christopher A. Price, exemplos de pesquisadores, pelo auxílio na realização deste trabalho e por compartilhar seu vasto conhecimento, o que me fez crescer pessoal e intelectualmente.

Aos Pesquisadores Dr. Robert Gilchrist e Jeremy Thompson e toda equipe, à Universidade de Adelaide pela grandiosa experiência da realização do estágio no Research Centre for Reproductive Health – Austrália.

Aos professores, alunos e funcionários dos Departamentos de Reprodução Animal, Fisiologia e Farmacologia da UNESP de Botucatu, pela amizade e ensinamentos transmitidos durante o doutorado e à Pós-graduação pela paciência e apoio.

Aos amigos do laboratório Anthony, Paula, Ester e Rubia pelo companherismo e amizade durante todos esses anos.

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

*“O que conhecemos é finito,
o desconhecido é infinito;
intelectualmente estamos parados numa ilha
no meio de um oceano ilimitado da inexplicabilidade.
Nosso objetivo a cada geração é conquistar
um pouco mais terra”
Thomas Huxley*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativo no domínio extracelular D3 gerando as isoformas b e c dos receptores FGFR1, 2 e 3. (domínio PTK = domínio intracelular tirosina quinase; TM = porção transmembrana; Adaptado de Eswarakumar *et al.*, 2005).23

Figura 2. Via de sinalização dos receptores de FGF. A Cascata intracelular de ativação dos receptores de FGF induz a fosforilação (círculos pretos) de tirosina do receptor estimulando a proteína ligadora do receptor (Grb2) que por sua vez induz o recrutamento outros fatores como o fator de troca de nucleotídeo (SOS) e a fosfatase homóloga a Src 2 (SHP2). Esses eventos iniciais promovem a ativação da cascata Ras e ERK que levam a mudanças na transcrição gênica (Adaptado de Goldfarb, 2001).24

Figura 3. Modelo de transativação do EGFR. Após a estimulação de receptores acoplados a proteína G (GPCR), (a) sinais intracelulares indefinidos ativam metaloproteínas específicas ligadas a membrana, levando a (b) clivagem proteolítica do ectodomínio dos ligantes EGF-like na superfície da célula. Os fatores de crescimento liberados ativam o EGFR e posteriormente, (c) a cascata da ERK/MAPK. Este mecanismo é conhecido como "triple-membrane passing signaling", pois o sinal atravessa a membrana três vezes (revisado por Hsieh & Conti, 2005).....30

CAPÍTULO II

Figura 1. A expressão do RNAm da CYP19A1 varia em células da granulosa classificadas como saudáveis, transicionais ou atresicas, baseado nas razões E2:P4 do fluido folicular. Dados são apresentados na forma de média ($\pm$ EPM). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....38

Figura 2. Abundância relativa de mRNA de FGF16 e FGF20 medida por RT-qPCR em células da teca e da granulosa de folículos classificados como

saudáveis (n=15), transicionais (n=14) ou atresicos (n = 15). Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM), letras diferentes representam diferença significativa ($p<0,05$).46

Figura 3. Imunodeteção do FGF16 em ovários bovinos. O FGF16 foi localizado em (A) oócitos e células da teca de folículos antrais, (C) folículo atresico e saudável no mesmo corte histológico, (D) folículo atresico, (D; seta) vaso sanguíneo (E; seta) citoplasma de folículos pré-antrais, (B) e (F) controles negativos. Abreviaturas: OO - oócito, CC - células do *cumulus*, CG – células da granulosa, CT – células da teca, EO – estroma ovariano, FS – folículo saudável e FA – folículo atresico.....47

Figura 4. Imunodeteção de FGF20 em ovários bovinos. O FGF20 foi localizado em (A) oócitos e células do *cumulus* de folículos antrais, (C; setas) citoplasma de oócitos pré-antrais (E) folículo atresico, (E; seta) vaso sanguíneo, (B), (D) e (F) controles negativos. Abreviaturas: OO - oócito, CC - células do *cumulus*, CG – células da granulosa, CT – células da teca, CN – controle negativo.....48

Figura 5. Efeitos do FSH (A e B) e IGF1 (C e D) na abundância do mRNA do FGF16 e do FGF20 em células da granulosa cultivadas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).....49

Figura 6. Abundância relativa de mRNA para FGF16 e FGF20 (média $\pm$ EPM) em oócitos durante a maturação de COCs *in vitro*. “Pools” de 20 oócitos foram recuperados imaturos (0 horas) ou após 4, 8, 12, 16 e 22 horas de maturação na presença de FSH (n = 4 repetições por tratamento).....50

Figura 7. Abundância relativa de mRNA para FGFR2c e FGFR3c (média $\pm$ EPM) em células do *cumulus* durante a maturação de COCs *in vitro*. Células do *cumulus* proveniente de 20 COCs foram cultivadas e recuperadas imaturas (0 horas) ou após 4, 8, 12, 16 e 22 horas de maturação, na presença de FSH ou ausência de FSH (n = 4 repetições por tratamento). Letras diferentes

indicam diferença significativa em relação ao tempo de maturação e asteriscos representam o efeito de FSH em cada momento.....51

CAPÍTULO III

Figura 1. Efeito do FGF17 sobre a expansão do *cumulus*. COCs foram cultivadas com doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10 e 100 ng/mL). Após 22 horas de cultivo o grau de expansão foi avaliado e classificado em G1 (expansão fraca), G2 (expansão moderada) e G3 (expansão completa; Zhang et al., 2010). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.....65

Figura 2. Efeito de doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10, 100 ng/mL) sobre a abundância relativa de RNAm dos EGF-like (AREG, EREG e BTC) em células do *cumulus* cultivadas por 22 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM) calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e em relação a uma amostra calibradora. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.....66

Figura 3. Efeito de doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10, 100 ng/mL) sobre a abundância relativa de RNAm de genes indutores da expansão (COX2, HAS2, TSG6 e PTX3) em células do *cumulus* cultivadas por 22 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM) calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e em relação a uma amostra calibradora. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.....67

Figura 4. Efeito do FGF17 e do tempo ao longo da maturação sobre a abundância de mRNA de AREG, EREG e BTC. Os COCs foram cultivados por 4, 8, 12 e 22 horas. Grupos de COCs imaturos foram utilizados para representar 0 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Letras

diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de três repetições para cada tratamento.....69

Figura 5. Efeito do FGF17 e do tempo ao longo da maturação sobre a abundância de mRNA de COX2, HAS2, TSG6 e PTX3. Os COCs foram cultivados por 4, 8, 12 e 22 horas. Grupos de COCs imaturos foram utilizados para representar 0 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de três repetições para cada tratamento.....70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Média ($\pm$ EPM) da concentração de esteróides no fluido folicular e diâmetro de folículos classificados como saudáveis, transicionais e atresicos baseado nas razões de E2:P4.....37

Tabela 2. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento e concentrações para cada oligonucleotídeo utilizado na RT-qPCR.....42

Tabela 3. Média dos valores de Ct para genes de referência e alvo nos diferentes tipos celulares do folículo ovariano.....45

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento e concentrações para cada oligonucleotídeo utilizado na RT-qPCR.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

AREG – ampiegulina

BMP15 – proteína morfogênica óssea 15

BSA – albumina sérica bovina

BTC – betacelulina

COC – complexo *cumulus*-oócito

COX2 – cicloxigenase 2

DAB - diamino benzeno

EGF – fator de crescimento epidermal

EGF-like – fatores de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal

EPM – erro padrão da média

EREG – epiregulina

ERK – quinase reguladora do sinal extracelular

FGF – fator de crescimento fibroblástico

FGFR – receptor de fator de crescimento fibroblástico

FRS2 – substrato 2 do receptor de FGF

FSH – hormônio folículo estimulante

FSO – fatores secretados pelo oócito

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDF9 – fator de crescimento e diferenciação 9

Grb2 - Proteína ligadora do receptor de fator de crescimento

H2AFZ – histona H2A

HAS2 – hialurona sintase 2

IGF1 – fator de crescimento semelhante a insulina 1

LH – hormônio luteinizante

MAPK – proteína quinase ativadora de mitógeno

MIV – maturação *in vitro* de COC

Pb – pares de base

PCR – reação da polimerase em cadeia

PIV – produção *in vitro* de embriões

PPIA – ciclofilina A

PTX3 – pentraxina 3

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

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

SCF - fator de células tronco ou kit-ligante

SHP2 – fosfatase homóloga a Src 2

SOS - fator de troca de nucleotídeo “son of sevenless”

Spry 2 – gene homólogo à sprouty 2

TGFβ - fator de crescimento transformante β

TSG6 ou TNFAIP6– proteína indutora do fator de necrose tumoral 6

TZP - processos transzonais

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

Capítulo I. Revisão de literatura.

Capítulo II. Padrões de expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 16 e 20 (FGF16 e FGF20) durante o desenvolvimento folicular e maturação de COCs em bovinos.

Capítulo III. Efeitos do fator de crescimento fibroblástico 17 (FGF17) sobre a expansão e expressão gênica em células do *cumulus* bovinas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1. Desenvolvimento Folicular.....	20
2. Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs).....	22
2.1. Subfamília FGF-8.....	24
2.2. Subfamília FGF-9.....	26
3. Maturação oocitária.....	27
3.1. Família dos fatores de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like).....	29
CAPÍTULO II - PADRÕES DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 16 E 20 (FGF16 E FGF20) DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A MATURAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO EM BOVINOS.....	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Obtenção das amostras.....	36
1.1. Células da teca e células da granulosa.....	36
1.2. Cultivo de células da granulosa com FSH e IGF-1.....	38
1.3. Maturação <i>in vitro</i> (MIV) de complexos cumulus-oócito (COC).....	39
2. Extração de RNA e reação de transcrição reversa (RT).....	40
3. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	41
3.1. Análise dos dados de PCR em tempo real.....	41
4. Imunohistoquímica.....	43
5. Radioimunoensaio.....	43
6. Análise Estatística.....	44
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	52
CAPÍTULO III - EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 17 (FGF17) SOBRE A EXPANSÃO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DO CUMULUS BOVINAS.....	56

RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1. <i>Maturação in vitro (MIV) de complexos cumulus-oócito (COC).....</i>	<i>61</i>
2. <i>Análise de expressão gênica.....</i>	<i>62</i>
3. <i>Análise Estatística.....</i>	<i>64</i>
RESULTADOS.....	64
<i>Experimento 1.....</i>	<i>64</i>
<i>Efeito do FGF17 no grau de expansão das células do cumulus.....</i>	<i>64</i>
<i>Efeito do FGF17 na expressão dos fatores EGF-like e genes indutores da expansão do cumulus.....</i>	<i>65</i>
<i>Experimento 2.....</i>	<i>67</i>
<i>Efeito do FGF17 sobre a expressão de genes indutores da expansão do cumulus e EGF-like ao longo da maturação de COCs.....</i>	<i>67</i>
DISCUSSÃO.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) regulam o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária através de ligação aos seus receptores (FGFRs). Os RNAm que codificam o FGFR2c e o FGFR3c foram detectados em folículos antrais bovinos. Com o objetivo de identificar FGFs que poderiam regular a foliculogênese por meios desses, investigou-se os padrões de expressão do FGF16 e FGF20 em folículos antrais bovinos, bem como os níveis de RNAm desses FGFs e seus receptores (FGFR2c e FGFR3c) durante a maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (COCs). Além disso, dados preliminares do nosso laboratório indicativos de que a expressão do FGF17 em oócitos é regulada ao longo da maturação oocitária motivaram a investigação da função dessa proteína na maturação de COCs *in vitro*. Sendo assim, avaliou-se o efeito do FGF17 na expansão do *cumulus* e no controle da transcrição de fatores EGF-like [ampiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e betacelulina (BTC)] e outros genes reguladores da expansão [cicloxigenase 2 (COX2), hialurona sintase 2 (HAS 2), pentraxina 3 (PTX3), proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6)]. Os RNAm dos FGF16 e FGF20 e as respectivas proteínas foram detectados no ovário bovino. A abundância de RNAm de FGF16 e FGF20 foi maior em células da granulosa e da teca de folículos atrésicos comparados a folículos saudáveis ou transicionais. O tratamento com FSH diminuiu a abundância de RNAm para FGF16 e FGF20 e o IGF1 inibiu FGF16 em células da granulosa cultivadas *in vitro*. Ao longo da maturação a expressão do FGF16 e do FGF20 foi estável no oócito, enquanto que a expressão dos receptores FGFR2c e FGFR3c foi estimulada nas células do *cumulus* pelo FSH. A proteína FGF16 foi localizada no oócito, células do *cumulus* e da teca e o FGF20 em oócitos, células do *cumulus*, da granulosa e da teca. O FGF17 aumentou a proporção de COCs totalmente expandidos, mas não alterou a abundância relativa de COX2, HAS2, PTX3, TSG6, AREG, EREG e BTC ao longo da MIV. Em conclusão, o FGF17 potencializou a expansão do *cumulus* de bovinos *in vitro* e os mecanismos não incluem o controle transcricional de fatores EGF-like ou genes indutores de expansão. Adicionalmente, o padrão de expressão do FGF16 e FGF20 em folículos

antrais bovinos sugerem seu envolvimento no controle da atresia e na interação oócito-*cumulus*.

PALAVRAS CHAVE: FGF, folículo ovariano, maturação oocitária, células do *cumulus*, expansão do *cumulus*, bovino.

ABSTRACT

Fibroblast growth factors (FGFs) regulate follicular development and oocyte maturation. Messenger RNA encoding receptors FGFR3c and FGFR2c have been detected in bovine antral follicles. Aiming to identify FGFs that can potentially regulate folliculogenesis through these receptors, the expression patterns of FGF16 and FGF20 were assessed in bovine antral follicles. Messenger RNA expression of these FGFs and their receptors (FGFR2c and FGFR3c) was also assessed in oocytes and cumulus cells, respectively, during *in vitro* maturation. In addition, previous data suggesting that FGF17 mRNA expression is regulated in the oocyte led us to investigate the effects of FGF17 on *cumulus* expansion and on the expression of EGF-like factors [amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) and betacelullin (BTC)] and other genes that regulate expansion [cyclooxygenase 2 (COX2), hyaluronan synthase 2 (HAS 2), pentraxin 3 (PTX3), protein-inducing tumor necrosis factor 6 (TSG6)]. FGF16 and FGF20 mRNA and proteins were detected in the bovine ovary. Messenger RNA abundance of FGF16 and FGF20 was higher in granulosa and theca cells from atretic follicles compared with healthy or transitional follicles. Treatment with FSH decreased mRNA expression of FGF16 and FGF20 and IGF1 inhibited FGF16 mRNA abundance in cultured granulosa cells. During maturation, mRNA expression of FGF16 and FGF20 was stable in the oocyte, while FGFR2c and FGFR3c were stimulated in *cumulus* cells by FSH. FGF16 protein was localized to the oocyte, *cumulus* and theca cells, and FGF20 was detected in the oocyte, cumulus, granulosa and theca cells. Supplementation of maturation medium with FGF17 increased the proportion of fully expanded COCs, but did not alter mRNA expression of COX2, HAS2, PTX3, TSG6, AREG, EREG and BTC in cumulus cells during *in vitro* maturation. In conclusion, FGF17 enhances bovine *cumulus* expansion *in vitro* and the

mechanisms involved do not appear to include transcriptional regulation of EGF-like factors or downstream expansion-inducing genes. Additionally, FGF16 and FGF20 expression patterns in bovine antral follicles suggest their involvement in the control of follicle atresia and in the interaction oocyte-cumulus cells.

KEY WORDS: FGF, ovarian follicle, gene expression, oocyte maturation, *cumulus* cells, *cumulus* expansion, bovine.

INTRODUÇÃO

O conhecimento dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi completamente atingido e tem sido foco de investigações devido à sua importância para a melhoria de técnicas que visam o aproveitamento do potencial reprodutivo de fêmeas com genótipos de destaque ou de espécies ameaçadas de extinção.

Sabe-se que fatores de crescimento produzidos localmente participam do controle do desenvolvimento folicular, mas há necessidade de uma melhor caracterização das funções que desempenham. Nesse sentido, a expressão do FGF-8 e seus respectivos receptores FGFR3c, FGFR4 e FGFR2c foi detectada em folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005; Berisha *et al.*, 2004). Evidências de regulação da expressão gênica do FGFR3c e FGFR4 ao longo do desenvolvimento folicular em células da granulosa e da teca, respectivamente, indicam fortemente a participação destes receptores no controle deste processo. Contudo, pouco se conhece sobre a expressão ovariana de outros FGFs capazes de ativar os receptores supracitados.

Membros da subfamília do FGF9 compartilham a capacidade de ativar os receptores FGFR3c e FGFR2c (Zhang *et al.*, 2006; Itoh & Ornitz 2004). O FGF9, presente no ovário de ratos, estimula a esteroidogênese em células da granulosa cultivadas na presença de FSH (Beverdam & Koopman, 2006; Drummond *et al.*, 2007) e parece desempenhar um papel importante na determinação do sexo e no desenvolvimento das gônadas (Bowles *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2006).

A natureza seletiva do desenvolvimento folicular acarreta em grande desperdício de células germinativas femininas que podem ser melhor aproveitadas pelo emprego de biotécnicas como a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos obtidos por aspiração folicular. Apesar do grande avanço na produção *in vitro* de embriões bovinos, os resultados de maturação oocitária em condições de cultivo são insatisfatórios quando comparados à maturação *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002; Farin *et al.*, 2007). Portanto, além da foliculogênese, outro mecanismo que necessita elucidação é a maturação oocitária. Esta, constitui etapa fundamental para a produção *in vitro* de embriões (PIV) e é importante tanto para o aperfeiçoamento da PIV quanto para biotécnicas modernas que emergiram na última década como clonagem e transgenia.

A comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito é bidirecional e essencial para a maturação nuclear e citoplasmática e, conseqüentemente, para aquisição da competência do oócito para a fertilização e geração de um embrião com alto potencial de desenvolvimento (Tanghe *et al.*, 2002; Fair, 2003). Sendo assim, o aprofundamento dos conhecimentos sobre as interações entre as células somáticas e germinativas que formam o complexo *cumulus*-oócito (COC) e suas exigências é necessário para a melhoria da eficiência da maturação oocitária *in vitro* (MIV). Compreendendo-se melhor essas interações, os meios de cultivo poderiam ser aprimorados de forma a minimizar o impacto da perda da unidade folicular durante o cultivo.

Dentre os fatores produzidos pelas células da granulosa murais e do *cumulus* que regulam a maturação oocitária, destacam-se os membros da família dos fatores semelhantes aos fatores de crescimento epidermal (EGF-like), incluindo a ampiegulina (AREG), a epiregulina (EREG) e a betacelulina (BTC). Essas moléculas são importantes mediadores intraovarianos que estimulam a expressão de genes críticos para a remodelagem da matriz extracelular tais como a ciclooxigenase 2 (COX2), fator estimulador de necrose tumoral 6 (TSG6), hialurona sintase 2 (HAS2) e pentraxina 3 (PTX3), melhorando assim a expansão das células do *cumulus* (Park *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2002). Além disso, os fatores EGF-like mimetizam os efeitos do LH promovendo a maturação oocitária nuclear e citoplasmática *in vitro* (Downs, 1989; Downs *et al.*, 1988; Dekel & Sherizly, 1985; Smitz *et al.*, 1998; De La

Fuente *et al.*, 1999).

Por outro lado, o oócito também participa ativamente dos mecanismos reguladores da maturação do COC via secreção de fatores parácrinos que controlam a diferenciação das células somáticas adjacentes e, indiretamente, dele próprio (Eppig, 2001; McNatty *et al.*, 2004, Gilchrist *et al.*, 2008). Os FGFs estão envolvidos nesse controle, já que foi demonstrado que o FGF-8 oocitário atua em sinergismo com a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) para estimular a expressão e atividade de enzimas glicolíticas nas células do *cumulus* de camundongos (Sugiura *et al.*, 2007). Além disso, o FGF10 melhora a maturação oocitária e a expansão do *cumulus* em bovinos (Zhang *et al.*, 2010; Caixeta *et al.*, 2011)

Dados publicados recentemente indicam a participação de outro membro da subfamília do FGF8 no controle da foliculogênese bovina. O FGF17 foi detectado predominantemente em células da granulosa e em oócitos (Machado *et al.*, 2009). Curiosamente, a expressão do FGF17 mostrou-se maior em oócitos imaturos em comparação com maturados *in vivo*, além de ter sido ausente em oócitos maturados *in vitro* (Machado *et al.*, 2008). A regulação da expressão oocitária do FGF17 e a similaridade entre o FGF8 e o FGF17 quanto à estrutura e afinidade pelos mesmos receptores reforçam a hipótese de que ele esteja envolvido no controle da diferenciação das células do *cumulus* e motivam sua investigação.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Desenvolvimento folicular

Durante o desenvolvimento folicular antral, ondas de crescimento folicular emergem sob o controle das gonadotrofinas (FSH e LH), hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona) e fatores ovarianos de ação endócrina e parácrina (Fortune, 1994; Gong *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 2003). O aumento das concentrações de FSH induz o recrutamento folicular (Adams *et al.*, 1992; Fortune, 1994) que em bovinos, envolve a seleção de apenas um folículo e este, passa a exercer dominância sobre os demais que compõem a onda folicular (Ginther *et al.*, 1996). Através da secreção de estradiol e inibina, o folículo dominante causa redução dos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (Ginther *et al.*, 1996). A maioria dos folículos recrutados interrompe o seu crescimento durante o declínio das concentrações plasmáticas de FSH (Mihm *et al.*, 2003). Esta fase é definida como desvio folicular, a partir da qual o folículo dominante continua a crescer, enquanto que os folículos subordinados iniciam o processo de atresia (Fortune *et al.*, 1991; Ginther *et al.*, 2001).

Evidências demonstram que os fatores ovarianos parácrinos participam da mediação e modulação da ação das gonadotrofinas (Campbell *et al.*, 1999). Contudo, os mecanismos na seleção e regressão folicular ainda não estão completamente esclarecidos. Trabalhos recentes têm sugerido a participação dos FGFs como agentes antiesteroideogênicos e pró regressão folicular (Buratini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009; Portela *et al.*, 2010).

O crescimento e a diferenciação do oócito e das células somáticas nos folículos ovarianos dependem de uma comunicação bidirecional essencial para o desenvolvimento dos dois tipos celulares e são orquestrados de forma coordenada e mutuamente dependente (Eppig, 2001). As células da granulosa de folículos pré-antrais são diferenciadas em duas distintas populações durante a transição para a fase antral: as células do *cumulus*, que estão diretamente associadas ao oócito e as células da granulosa murais, que circundam a parede folicular. Apesar da similaridade desses dois tipos celulares, existem

diferenças na produção de transcritos e proteínas (Latham *et al.*, 1999). As células do *cumulus* parecem ser especializadas em oferecer suporte nutricional para o desenvolvimento do oócito e têm papel fundamental no seu crescimento e metabolismo (Haghighat & Van Winkle, 1990). Já o oócito, secreta fatores que agem nas células do *cumulus* e células da granulosa murais, essenciais para a regulação da função ovariana (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004). A competência adquirida durante a foliculogênese através dessa comunicação, torna o oócito capaz de completar a meiose, ser fecundado, passar pela transição materno-zigótica e prosseguir seu desenvolvimento (Coticchio *et al.*, 2004).

A comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo *gap* permitem transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (Albertini *et al.*, 2001). Interessantemente, este tipo de comunicação, em murinos, parece ser regulado durante o desenvolvimento, uma vez que as TZPs retraem quando o folículo atinge o estágio antral, o que se acredita ser, pelo menos em parte, um efeito da ação do FSH (Albertini *et al.*, 2001). Já em bovinos, o FSH e o LH estimulam a expressão das junções do tipo *gap* em células da granulosa de folículos antrais pequenos e em células da teca de folículos antrais grandes, respectivamente, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção dos folículos ovarianos (Jonhson *et al.*, 2002).

A comunicação intercelular também ocorre por sinalização parácrina. Dentre os vários fatores de crescimento produzidos pelo oócito e células da granulosa, o fator de células tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante) e membros da família dos fatores de crescimento transformantes- (TGF-), têm recebido a maior parte da atenção (Webb *et al.*, 2003). Sabe-se que os membros da família TGF- , tais como o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogênica óssea 15 (BMP-15), secretados pelo oócito, são importantes reguladores de funções celulares como proliferação e diferenciação celular, esteroidogênese, apoptose e expansão das células do *cumulus* e melhoram a competência de desenvolvimento do oócito (Eppig, 2001; Matzuk *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2005). A

expressão alterada ou nula desses fatores pode causar danos severos sobre a função ovariana e à fertilidade (McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2004). Outras moléculas, como os FGFs, também agem sob sinalização parácrina e são secretadas pelo oócito (Buratini *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2007).

2. Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

Os FGF compõem uma família de 23 membros descritos em mamíferos (Itoh & Ornitz, 2004). Tais fatores apresentam padrões de expressão temporais e espaciais específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e processos fisiológicos como angiogênese, cicatrização e oncogênese (Basílico *et al.*, 1992). Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam potentes atividades neurotróficas e angiogênicas. Essas moléculas estão expressas em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento e também em tecidos adultos, o que indica que elas desempenham papel importante como fatores de crescimento e diferenciação durante toda a vida (Igarashi *et al.*, 1998).

Os eventos celulares mediados pelos FGFs acontecem via ativação dos principais receptores, FGFR1 a FGFR4, que localizam-se na membrana plasmática e têm atividade intracelular tirosina quinase. Estruturalmente esses receptores são caracterizados por uma porção extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs. A porção extracelular é dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (domínios *Ig-like*); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. É no domínio D3, que “splicing” alternativo dos genes FGFR1, 2 e 3 gera as isoformas funcionais dos tipos b e c (Figura 1; revisado por Eswarakumar *et al.*, 2005).

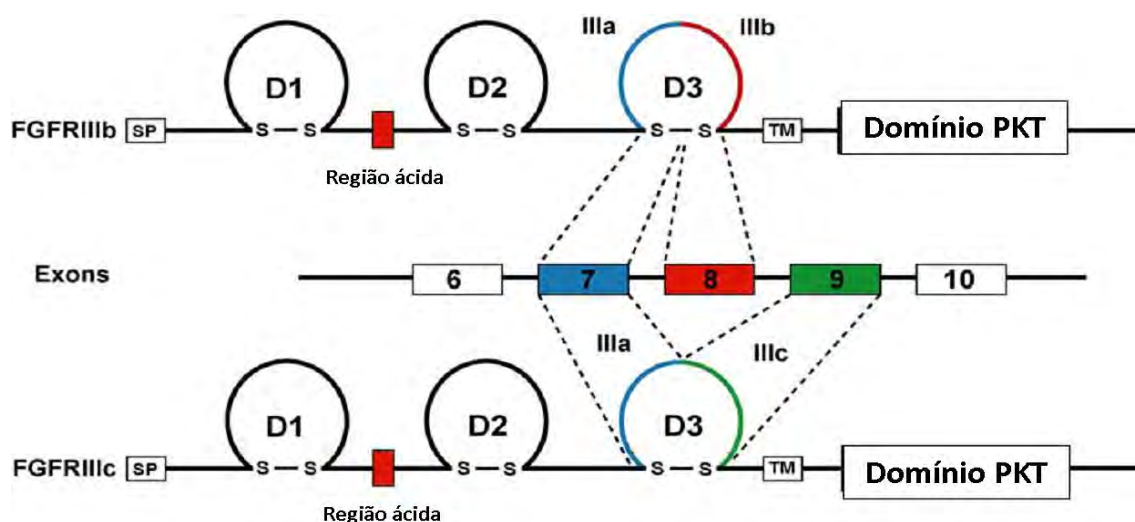


Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativo no domínio extracelular D3 gerando as isoformas b e c dos receptores FGFR1, 2 e 3. (domínio PTK = domínio intracelular tirosina quinase; TM = porção transmembrana; Adaptado de Eswarakumar *et al.*, 2005).

Os FGFs ligam-se a ectodomínios dos receptores promovendo dimerização e ativação do receptor tirosina quinase que por sua vez induz a ativação preferencial da via de sinalização SHP2/Ras/ERK (Figura 2). Os mecanismos de ação incluem internalização dos complexos ligante-receptor levando ao acúmulo de receptor ou ligante no compartimento intracelular. Como consequência, ocorre a liberação de FGFs em sítios internos onde podem interagir com moléculas alvo para desencadear respostas biológicas que incluem crescimento celular, diferenciação e morfogênese (revisado por Goldfarb, 2001). Também é sugerido que os receptores podem translocar para o núcleo para promover respostas biológicas (Maher, 1996).

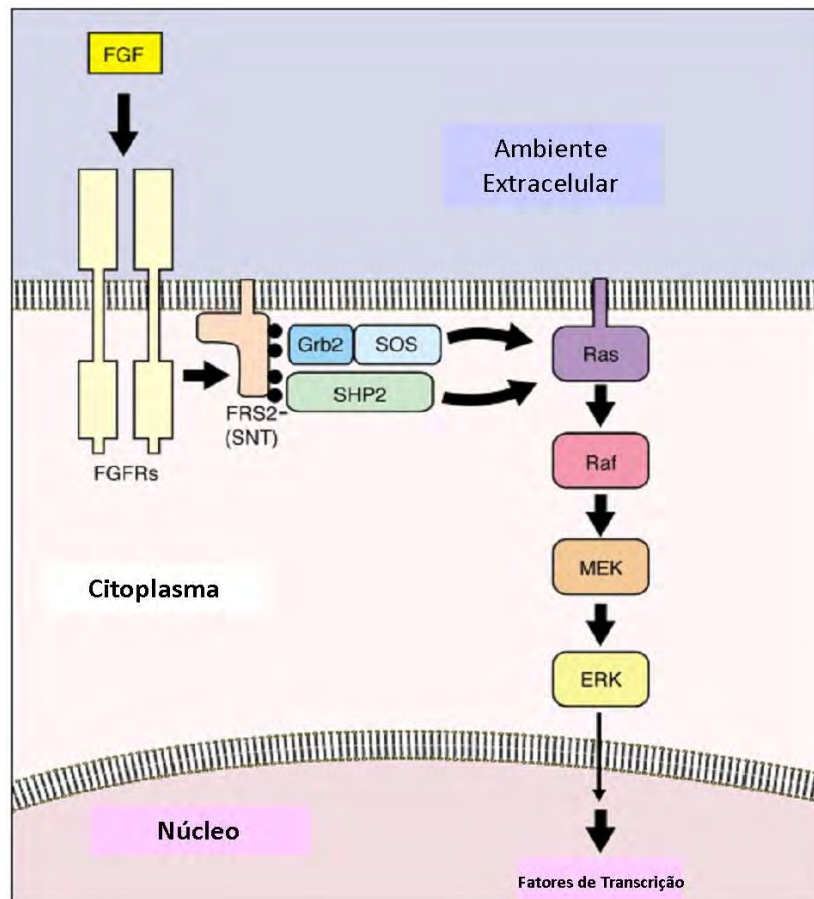


Figura 2. Via de sinalização dos receptores de FGF. A Cascata intracelular de ativação dos receptores de FGF induz a fosforilação (círculos pretos) de tirosina do receptor estimulando a proteína ligadora do receptor (Grb2) que por sua vez induz o recrutamento outros fatores como o fator de troca de nucleotídeo (SOS) e a fosfatase homóloga a Src 2 (SHP2). Esses eventos iniciais promovem a ativação da cascata Ras e ERK que levam a mudanças na transcrição gênica (Adaptado de Goldfarb, 2001).

2.1. Subfamília FGF8

O FGF17 e o FGF18 pertencem à subfamília do FGF8, conhecida como família oncogênica fetal (Nezu, 2005). Membros dessa subfamília apresentam semelhantes seqüências de aminoácidos (Hoshikawa *et al.*, 1998; Maruoka *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999), características bioquímicas incluindo afinidade pelos mesmos FGFRs (Itoh & Ornitz, 2004) e padrões espaciais de expressão (Xu *et al.*, 2000; Maruoka *et al.*, 1998). Assim como o FGF8, o FGF17 e o FGF18

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).

O FGF8 foi primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (Tanaka *et al.*, 1992; Crossley & Martin, 1995) e ativa preferencialmente o FGFR4 e o subtipo 'c' do FGFR3 (Ornitz *et al.*, 1996). A expressão gênica do FGF8 foi detectada em oócitos, células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005b). Em relação aos seus receptores, destaca-se a expressão do FGFR3c em células da teca e da granulosa, e do FGFR4 exclusivamente em células da teca de folículos antrais bovinos. A expressão do FGFR3c mostrou-se aumentada em células da granulosa de folículos grandes e estrogênicos, enquanto que a expressão do FGFR4 mostrou-se maior em folículos antrais pequenos, o que sugere que esses receptores mediam ações específicas em tipos celulares distintos no controle de fases avançadas ou iniciais do desenvolvimento folicular antral (Buratini *et al.*, 2005).

O FGF17 foi clonado e identificado em humanos a partir do seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA construída a partir de ovários com câncer (Greene *et al.*, 1998) e, posteriormente, detectado por PCR em embriões de ratos (Hoshikawa *et al.*, 1998) e camundongos (Xu *et al.*, 1999). Tanto a expressão do RNAm quanto da proteína FGF17 foi detectada em oócitos, células da granulosa e células da teca de folículos antrais bovinos (Machado *et al.*, 2009). Além disso, a expressão do RNAm do FGF17 mostrou-se aumentada em células da granulosa e da teca de folículos atrésicos em relação a folículos saudáveis e transitórios e foi inibida pelo FSH e IGF1 em células da granulosa cultivadas (Machado *et al.*, 2009). Curiosamente, a expressão do FGF17 mostrou-se maior em oócitos imaturos em comparação com maturados *in vivo*, além de ter se mostrado ausente em oócitos maturados *in vitro* (Machado *et al.*, 2008). A regulação da expressão oocitária do FGF17 na maturação e sua supressão durante a maturação *in vitro*, motivam a investigação de suas funções na interação oócito-cumulus.

3.2. Subfamília FGF9

Os FGFs 9, 16 e 20 foram agrupados na mesma subfamília de FGFs a partir de análise filogenética e apresentam cerca de 70% de similaridade em suas seqüências de nucleotídeos (Kirikoshi *et al.*, 2000). Esses genes apresentam seqüência sinalizadora não clivável, sendo a proteína produzida a partir de um peptídeo sinalizador na região n-terminal (Miyamoto *et al.*, 1993; Jeffers *et al.*, 2001). Análise por hibridização *in situ* revelou padrões de expressão distintos para os membros dessa subfamília durante o desenvolvimento embrionário de ratos (Ohmachi *et al.*, 2000).

O cDNA do FGF16 foi primeiramente clonado a partir do coração de ratos através de PCR baseado na homologia entre outros FGFs (Myiake *et al.*, 1998). Este gene codifica uma proteína de 207 aminoácidos, com uma região de 120 aminoácidos conservada entre os membros da mesma subfamília de FGFs (Danilenko *et al.*, 1999). A seqüência de aminoácidos apresenta 73% de identidade em relação à seqüência do FGF9 (Miyamoto *et al.*, 1993) e é altamente conservada entre humanos, ratos e camundongos (Sontag & Cattini, 2003).

O FGF16 é predominantemente expresso no tecido adiposo marrom em embriões de ratos, onde desempenha importante ação proliferativa (Myiake *et al.*, 1998). Sua atividade mitogênica é mediada pela ligação ao receptor FGFR4 na membrana plasmática em adipócitos primários (Konishi, 2000). Além disso, o FGF16 participa do controle do desenvolvimento do ouvido interno em embriões murinos (Wright, 2003).

Dentre os tecidos adultos estudados em ratos, o RNAm do FGF16 mostrou-se mais intensamente expresso no coração, embora também tenha sido detectado no estômago, intestino delgado, baço, tecido adiposo marrom e testículo (Myiake *et al.*, 1998). Em camundongos, o FGF16 induziu proliferação hepatocelular e de oligodendrócitos *in vitro*. Os efeitos sobre a atividade proliferativa de oligodendrócitos foram similares mas não idênticos aos do seu homólogo, o FGF9, o que foi interpretado como decorrência de ativação preferencial do FGFR3c pelo FGF16 nesse tipo celular (Danilenko *et al.*, 1999).

Já o FGF20 foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro de rato por PCR de homologia de bases (Ohmachi *et al.*, 2000) e codifica um

polipeptídeo com 211 aminoácidos (Kirikoshi, 2000). Mais tarde, o FGF20 foi clonado a partir de uma linhagem de células de câncer de cólon e caracterizado como um novo oncogene em humanos (Jeffers *et al.*, 2001). O RNAm do FGF20 foi expresso exclusivamente no cérebro de rato e aumenta a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, sendo considerado um novo fator neurotrófico (Ohmachi *et al.*, 2000). Esse fator induz atividade proliferativa em fibroblastos e células epiteliais (Jeffers *et al.*, 2001) e parece ter função importante no reparo do epitélio intestinal (Jeffers *et al.*, 2002). Sobre sua interação com os receptores, o FGF20 parece ser capaz de ativar diversos subtipos de FGFRs, mas tem maior afinidade pelo FGFR2c e FGFR3c (Jeffers *et al.*, 2001).

Resultados não publicados de nosso laboratório indicam que o FGF9 não é transcrito em oócitos, células da teca ou da granulosa de folículos antrais bovinos. Contudo, até o presente momento, a literatura não dispõe de dados sobre a expressão dos FGF16 e FGF20 no ovário ou em qualquer outro tecido reprodutivo.

3. Maturação oocitária

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

Durante o processo de ovulação as células do *cumulus* secretam hialurona (HA), que se acumula entre as células formando uma matriz

gelatinosa, o que constitui o processo conhecido como expansão do *cumulus* (Eppig, 1979; Hess *et al.*, 1999). O sucesso da fertilização está diretamente relacionado à composição e capacidade funcional da matriz do *cumulus*, como demonstrado por estudos em animais knockout para os genes COX2, TSG6 e PTX3 e também outras abordagens que inibiram a expansão, organização e funcionalidade das proteínas da matriz do *cumulus* (Lim *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1999; Fulop *et al.*, 2003; Varani *et al.*, 2002). Dentre as proteínas críticas para o processo de expansão da matriz estão a COX2, enzima fundamental para a formação de prostaglandinas, bem como genes que codificam os componentes da matriz, incluindo a HAS2 (enzima que sintetiza o esqueleto de hialurona da matriz) e proteínas de ligação à hialurona, como a TSG6 e a PTX3.

A expansão das células do *cumulus* e a maturação do oócito são induzidas pelo pico pré-ovulatório de LH *in vivo* (Diaz *et al.*, 2006) e pelo FSH em COCs isolados *in vitro* (Su *et al.*, 2002). Contudo, as ações do LH na maturação oocitária parecem ser indiretas, uma vez que o seu receptor (LHR) tem expressão restrita no folículo ovariano. Em bovinos, o RNAm do LHR não foi detectado em células do *cumulus* e oócitos, mas mostrou-se presente em células da granulosa murais de folículos pré-ovulatórios (van Tol *et al.*, 1996), indicando que fatores parácrinos mediadores devem ser liberados por este tipo celular em resposta ao LH para promover a expansão das células do *cumulus* e a maturação do oócito (Peng *et al.*, 1991; revisado por Conti, 2006). Dentre os fatores parácrinos, destaca-se o fator de crescimento epidermal (EGF), uma vez que o mesmo mostrou-se capaz de induzir a expansão das células do *cumulus*, acelerar a retomada da meiose *in vitro* e melhorar a maturação citoplasmática oocitária (Dekel & Sherizly, 1985; Downs *et al.*, 1988; Prochazka *et al.*, 2000). Posteriormente, outros estudos demonstraram efeito positivo do EGF na maturação *in vitro* de COCs em ratos (Downs, 1989; Harper & Bracket, 1993; Lonergan *et al.*, 1996; Lorenzo *et al.*, 1996), camundongos (Das *et al.*, 1992) e bovinos (Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Rieger *et al.*, 1998). Sakaguchi *et al.* (2000) observaram aceleração da retomada da meiose em COCs bovinos cultivados na presença de EGF, o que não ocorreu em oócitos desnudos, sugerindo que o EGF também participa do

controle da maturação nuclear de forma indireta via células do *cumulus* (Lonergan *et al.*, 1996).

A maturação de oócitos *in vitro* ocorre na presença de FSH, mas não de LH, devido à presença de receptores para FSH (FSHR), mas não para LH (LHR), em células do *cumulus* e da granulosa de folículos de pequeno a médio tamanho, os quais são utilizados na produção *in vitro* de embriões (van Tol *et al.*, 1996). Além disso, o FSH promove a competência oocitária e é amplamente utilizado em protocolos de maturação *in vitro* a fim de melhorar a expansão das células do *cumulus*, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (Calder *et al.*, 2003). Curiosamente, o FSH estimula a expansão do *cumulus* bovinos e suínos na ausência de oócitos, em contraste com dados observados em murinos, demonstrando que mecanismos de sinalização distintos são requeridos para a expansão das células do *cumulus* entre as diferentes espécies de mamíferos (Ralph *et al.*, 1995).

Contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos que controlam a maturação oocitária de bovinos. Sabe-se que a comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* é fundamental para esse processo e que fatores liberados pelos oócitos melhoram a expansão das células do *cumulus*, a maturação e a competência de desenvolvimento do oócito (revisado por Gilchrist *et al.*, 2008). Portanto, conhecer os fatores secretados pelo oócito que influenciam nos processos acima descritos é fundamental para melhorar os resultados das técnicas de produção *in vitro* de embriões.

3.1. Família dos fatores de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like)

O fator de crescimento epidermal (EGF) é membro de um grupo de proteínas que inclui o fator de crescimento transformante α (TGF- α), a ampiregulina (AREG), a epiregulina (EREG) e a betacelulina (BTC; Prigent & Lemoine, 1992). Membros dessa família possuem um *motif* caracterizado por seis resíduos de cisteína que formam três alças intramoleculares ligadas a bissulfeto e conferem afinidade de ligação ao receptor (EGFR). Os peptídeos EGF-like são sintetizados como precursores transmembrana que podem ser liberados como peptídeos maduros solúveis por clivagem proteolítica de

ectodomínios na superfície da membrana (Massague & Pandiella, 1993). Em particular, membros da família de proteases ADAM são os principais reguladores da liberação dos fatores EGF-like da superfície celular (Sahin *et al.*, 2004; Sunnaborg *et al.*, 2002). A sinalização do EGFR (receptor do tipo tirosina quinase) pode ocorrer indiretamente por transativação de receptores acoplados à proteína G (GPCR), que estimulam sinais intracelulares indefinidos. Esses sinais ativam metaloproteinases (MMPs) específicas que levam a clivagem proteolítica e liberação de peptídeos EGF-like na superfície da célula. Os fatores de crescimento liberados ativam o EGFR resultando na ativação da cascata ERK/MAPK. (Figura 3; revisado por Hsieh & Conti, 2005).

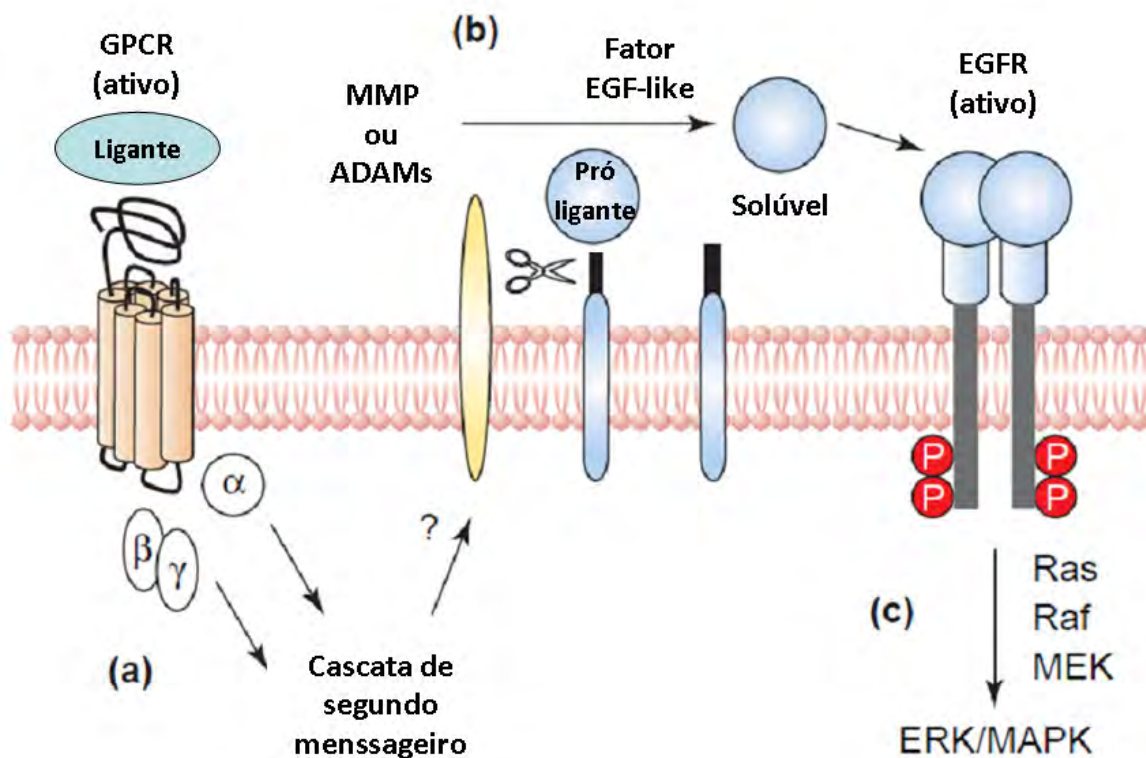


Figura 3. Modelo de transativação do EGFR. Após a estimulação de receptores acoplados a proteína G (GPCR), (a) sinais intracelulares indefinidos ativam metaloproteinases específicas ligadas a membrana, levando a (b) clivagem proteolítica do ectodomínio dos ligantes EGF-like na superfície da célula. Os fatores de crescimento liberados ativam o EGFR e posteriormente, (c) a cascata da ERK/MAPK. Este mecanismo é conhecido como "triple-

membrane passing signaling", pois o sinal atravessa a membrana três vezes (revisado por Hsieh & Conti, 2005).

Recentemente, membros da família dos EGF-*like* têm sido incluídos na cascata de eventos desencadeada pelo LH *in vivo*. No modelo demonstrado em roedores, o LH ativa seus receptores (LHR) em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, levando à estimulação da cascata de sinalização dependente de cAMP e à expressão de mRNAs que codificam os fatores EGF-*like* AREG, EREG E BTC. O LH também induz o processamento das pró-proteínas desses fatores de crescimento pela ação das desintegrinas e metaloproteinases (ADAMs), que em seguida liberam os peptídeos maduros da superfície celular. Os fatores de crescimento solúveis exercem efeitos autócrinos/parácrinos através da ativação do EGFR, seguida da ativação de ERK/MAPK em células da granulosa e do *cumulus*. Como consequência ocorre a retomada da meiose nos oócitos e expansão das células do *cumulus*, eventos cruciais para o processo ovulatório. A capacidade dos EGF-*like* em induzir a expansão do *cumulus* decorre da ativação da transcrição de genes essenciais a esse processo como a ciclooxigenase 2 (COX-2), a hialurona sintase 2 (HAS2), a pentraxina 3 (PTX3) e a proteína indutora do fator de necrose tumoral alfa (TSG6; Diaz *et al.*, 2006).

Em cultivo, esses fatores de crescimento mimetizam os eventos morfológicos e bioquímicos desencadeados pelo LH, incluindo a expansão do *cumulus* e a maturação do oócito, o que demonstra sua participação como mediadores parácrinos que propagam o sinal do LH pelo folículo ovariano (Park *et al.*, 2004). Porém, pouco se conhece sobre as moléculas reguladoras dos fatores EGF-*like* e é provável que tal conhecimento direcione uma reavaliação da formulação de meios utilizados na MIV tendo em vista os efeitos benéficos bem estabelecidos de EGF na aquisição de competência do oócito e de desenvolvimento do embrião (Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Rieger *et al.*, 1998).

A interação entre os sistemas EGF e FGF nos mecanismos reguladores da expansão das células do *cumulus* ainda não foi investigada e constitui alvo de hipóteses propostas neste trabalho.

CAPÍTULO II

PADRÕES DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 16 E 20 (FGF16 E FGF20) DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A MATURAÇÃO DE COMPLEXOS *CUMULUS*- OÓCITO EM BOVINOS

RESUMO

Os RNAm que codificam os receptores dos fatores de crescimento fibroblástico 2c e 3c (FGFR2c e FGFR3c) foram detectados em folículos antrais bovinos. Com o objetivo de identificar FGFs que poderiam regular a foliculogênese por meio desses receptores, investigou-se os padrões de expressão do FGF16 e FGF20 em folículos antrais bovinos e sua regulação pelo FSH e IGF1. Além disso, os padrões de expressão dos RNAm do FGF16, FGF20, FGFR2c e FGFR3c foram avaliados em oócitos e células do *cumulus* durante a *maturação in vitro*. A abundância de RNAm de FGF16 e FGF20 foi significativamente maior em células da granulosa e da teca de folículos atresícos comparados a folículos saudáveis ou transicionais. O tratamento com FSH diminuiu a abundância de RNAm para FGF16 e FGF20 e o IGF1 inibiu o FGF16 em células da granulosa cultivadas *in vitro*. Ao longo da maturação a expressão do FGF16 e do FGF20 foi estável no oócito, enquanto que a expressão dos receptores FGFR2c e FGFR3c foi estimulada nas células do *cumulus* pelo FSH. A proteína FGF16 foi localizada no oócito, células do *cumulus* e da teca e o FGF20 em oócitos, células do *cumulus*, da granulosa e da teca. Em conclusão, os padrões de expressão de FGF16 e FGF20 sugerem um papel fisiológico na diferenciação das células do *cumulus* e no controle da atresia folicular.

PLAVRAS-CHAVE: FGF16, FGF20, folículo ovariano, *cumulus*, oócito, bovino.

ABSTRACT

Messenger RNA encoding fibroblast growth factors receptors 2c and 3c (FGFR2c and FGFR3c) have been detected in bovine antral follicles. In order to identify FGFs that could regulate folliculogenesis through these receptors, we investigated the expression patterns of FGF16 and FGF20 in bovine antral follicles and their regulation by FSH and IGF1 in cultured granulosa cells. In addition, FGF16, FGF20, FGFR2c and FGFR3c mRNA expression was assessed in oocytes and *cumulus* cells during *in vitro* maturation. Messenger RNA abundance of FGF16 and FGF20 was higher in granulosa and theca cells

from atretic follicles compared with healthy or transitional follicles. Treatment with FSH decreased mRNA abundance for FGF16 and FGF20 and IGF1 inhibited FGF16 in cultured granulosa cells. During *in vitro* maturation, mRNA expression of FGF16 and FGF20 was stable in the oocyte, while FGFR2c and FGFR3c were stimulated in *cumulus* cells by FSH. FGF16 protein was localized to the oocyte, *cumulus* and theca cells, and FGF20 was detected in the oocyte, *cumulus*, granulosa and theca cells. In conclusion, the expression patterns suggest a role for FGF16 and FGF20 in the regulation of *cumulus* cells differentiation and follicle atresia.

KEYWORDS: FGF16, FGF20, ovarian follicle, *cumulus*-oocyte maturation, bovine.

INTRODUÇÃO

Fatores de crescimento fibroblástico (FGF) produzidos localmente no ovário têm sido relatados como reguladores do desenvolvimento folicular e da maturação de complexos *cumulus*-oócitos (Berisha et al., 2004; Buratini et al., 2005; Buratini et al., 2007; Machado et al., 2009; Portela et al., 2010; Sugiura et al., 2008; Zhang et al., 2010; Caixeta et al., 2011). Em mamíferos, os FGFs constituem uma família composta por 22 membros agrupados em sete subfamílias com diferentes afinidades pelos cinco receptores (FGFR) identificados (Zhang et al., 2006; Sleeman et al., 2001). Os genes FGFR1, FGFR2 e FGFR3 geram por *splicing* alternativo gerando as isoformas funcionais "b" e "c", que ligam-se a diferentes FGFs com afinidade variável e exibem padrões específicos de expressão nos tecidos (Cheon et al., 1994; Mason, 1994; Powers et al., 2000). Os FGFR1, 2 e 3 são expressos em ovários de roedores, humanos, suínos e bovinos (Asakai et al., 1994; Drummond et al., 2007; Valve et al., 2000; Ben-Haroush et al., 2005; Schams et al., 2009; Berisha et al., 2004; Parrot & Skinner, 1998 e Buratini et al., 2005). No ovário bovino, a expressão gênica de FGFR2c e FGFR3c foi observada em células da granulosa e da teca (Berisha et al., 2004; Buratini et al., 2005). A abundância de RNAm para o FGFR3c aumentou significativamente em células da granulosa com a concentração de estradiol no fluído folicular e com o

tratamento com FSH em cultivo (Buratini *et al.*, 2005). Em contraste, a expressão do FGFR2c não foi alterada durante o crescimento folicular final (Berisha *et al.*, 2004).

A subfamília do FGF8 (FGF8, FGF17 e FGF18) é capaz de ativar eficientemente as isoformas 'c' de FGFR2 e 3 (Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006). No ovário de ratos adultos, a expressão de FGF8 foi restrita ao oócito (Valve *et al.*, 1997). Já em bovinos, o RNAm do FGF8 foi detectado não só em oócitos mas também em células somáticas foliculares (Buratini *et al.*, 2005). Além disso, o FGF8 em cooperação com a BMP15, estimulou a glicólise nas células do *cumulus* (Sugiura *et al.*, 2007). Em camundongos, o FGF18 mostrou-se mais expresso que o FGF17 no oócito (Zhong *et al.*, 2006), sugerindo o envolvimento do FGF18 derivado do oócito, na regulação de funções das células da granulosa e do *cumulus*. No ovário bovino, o FGF17 foi detectado principalmente no oócito (Machado *et al.*, 2009), enquanto que o mRNA do FGF18 mostrou-se predominantemente expresso em células da teca e ausente em oócitos (Portela *et al.*, 2010). Ambos FGF17 e FGF18 inibiram a esteroidogênese nas células da granulosa e foram sugeridos como fatores reguladores da atresia folicular (Machado *et al.*, 2009; Portela *et al.*, 2010).

Os membros da família do FGF9 compartilham com membros da família do FGF8 a capacidade de ativar os receptores FGFR3c e 2c (Zhang *et al.*, 2006; Itoh & Ornitz 2004). O FGF9 é altamente expresso no ovário de ratos e estimula a produção de progesterona em células da granulosa cultivadas na presença de FSH (Drummond *et al.*, 2007). O RNA mensageiro para FGF9 também foi detectado no oócito de ratos em um estudo de microarranjo (Beverdam & Koopman, 2006) e parece desempenhar papel importante na determinação do sexo masculino e no desenvolvimento das gônadas (Bowles *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2006). Contudo, até o momento, nenhum outro membro da subfamília do FGF9 foi identificado no ovário. Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os padrões de expressão do FGF16 e do FGF20 durante o desenvolvimento folicular e maturação de COCs bovinos. Especificamente, objetivou-se localizar os RNAm e as proteínas nos diferentes tipos de células foliculares, avaliar se a expressão é regulada durante o desenvolvimento folicular antral em diferentes classes foliculares, determinar se a expressão está sob o controle de FSH e IGF1, e, finalmente, avaliar a

expressão desses FGFs e seus receptores (FGFR2c e 3c) nos COCs durante a maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras

1.1. Células da teca e células da granulosa

Ovários bovinos foram colhidos em matadouro e transportados em solução fisiológica gelada (cerca de 5° C) até o laboratório, onde folículos antrais com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm foram dissecados. O fluido folicular foi recuperado e mantido a -80°C até a determinação das concentrações de estradiol e progesterona por radioimunoensaio. Amostras de RNA total de células da granulosa e da teca foram recuperadas separadamente de folículos antrais individualizados. As células da granulosa foram isoladas por lavagem da cavidade folicular mediante aspirações e ejeções sucessivas de solução fisiológica estéril utilizando uma seringa de 1 mL. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada a fim de formar um “pellet” de células da granulosa. A camada de células da teca foi destacada da face interna da parede folicular com o auxílio de pinças oftálmicas e lavada em solução fisiológica estéril a fim de eliminar possíveis células da granulosa remanescentes. O “pellet” resultante de células da granulosa e a camada de células da teca foram imersos separadamente em 1 ml de solução Trizol, triturados em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e o RNA total foi extraído utilizando-se o protocolo Trizol® (Invitrogen). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (NanoDrop®; Thermo Scientific).

Para avaliar a regulação da expressão gênica ao longo do desenvolvimento, os folículos foram classificados de acordo com a razão entre as concentrações de estradiol e progesterona (E2:P4) no fluido folicular como saudáveis (E2:P4>1; n=15), transicionais (E2:P4>0,01<1; n=14) e altamente atresícos (E2:P4<0,01; n=14; Grimes & Ireland, 1986). As médias das

concentrações de esteróides no fluido folicular e o diâmetro dos folículos para cada classe estão representados na Tabela 1.

Adicionalmente, a expressão de mRNA da aromatase P450 (CYP19A1) foi analisada nas células da granulosa para uma melhor caracterização da classe folicular (Figura 4). Contaminação cruzada entre as células da teca e da granulosa foi testada pela detecção do RNAm da CYP19A1 e da 17 β -hidroxilase (CYP17A1) por PCR como descrito anteriormente (Buratini *et al.* 2005). A detecção de CYP19A1 em amostras de células da teca ou de CYP17A1 em amostras de células da granulosa indicava contaminação cruzada e que tais amostras foram descartadas.

Tabela 1. Média ($\pm$ EPM) da concentração de esteróides no fluido folicular e diâmetro de folículos classificados como saudáveis, transicionais e atresícos baseado nas razões de E2:P4.

	Saudável (n=15)	Transicional (n=14)	Atrésico (n=14)
Estradiol (ng/ml)	185 $\pm$ 76 ^a	15 $\pm$ 3 ^b	0 $\pm$ 10 ^c
Progesterona (ng/ml)	41 $\pm$ 7 ^a	54 $\pm$ 17 ^a	109 $\pm$ 28 ^b
Diâmetro (mm)	9 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,6
Variação do diâmetro (mm)	8-11	7,5-15	5-14

Médias com diferentes superescritos indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

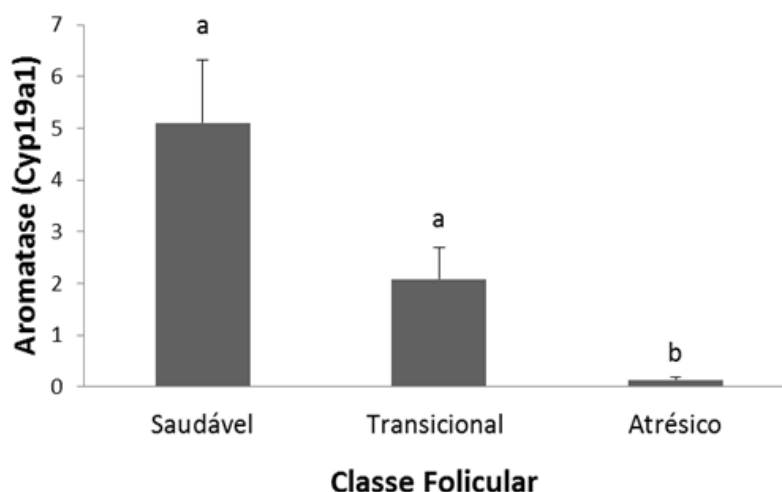


Figura 1. A expressão do RNAm da CYP19A1 varia em células da granulosa classificadas como saudáveis, transicionais ou atrésicas, baseado nas razões E2:P4 do fluido folicular. Dados são apresentados na forma de média ($\pm$ EPM). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

1.2. Cultivo de células da granulosa

A regulação da expressão gênica do FGF16 e do FGF20 pelo FSH e IGF-1 foi investigada em amostras de células da granulosa produzidas no laboratório do colaborador Prof. Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal. Quando não especificado, os reagentes foram obtidos da Invitrogen. Os cultivos foram realizados conforme descrito anteriormente (Gutiérrez *et al.* 1997), com modificações (Manuel Silva & Price, 2000). Folículos saudáveis ≤ 5 mm de diâmetro foram dissecados a partir de ovários de vacas adultas obtidos em um matadouro local e transportados para o laboratório em PBS a 35 °C contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As células da granulosa foram recuperadas por “*flushing*”, lavadas duas vezes por centrifugação durante 20 minutos cada, e suspensas em meio DMEN/F12 (Gibco) com Hepes (20nM), bicarbonato de sódio (10nM), selenito de sódio (4 ng/ml), BSA (0.1%; Sigma-Aldrich), penicillina (100 IU/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), transferrina (2,5 μ g/ml), aminoácidos não-essenciais (1.1 mM), androstenediona (10^{-7} M –no início da cultura e 10^{-6} M a cada passagem) e

insulina (10 ng/ml). Para avaliar a regulação da expressão do genes alvo, as células foram estimuladas com doses crescentes de FSH (AFP-5332B, NIDDK, Bethesda, EUA; 0, 0,1 e 1 ng / ml) ou análogo de IGF1 (LR3; Sigma-Aldrich; Oakville, Canadá; 0, 10 e 100 ng / ml) a partir do segundo dia de cultivo. O cultivo foi realizado a 37°C em 5% CO₂ por 6 dias, com troca de 70% do meio a cada 2 dias. Ao final do período de cultivo, as células foram centrifugadas e ao *pellet* obtido foi adicionado 1ml de Trizol® (Invitrogen). Posteriormente, as células foram trituradas em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e armazenadas em freezer -80°C até a extração de RNA. Os dados foram obtidos a partir de três cultivos independentes realizados em momentos diferentes.

1.3. *Maturação in vitro (MIV) de complexos cumulus-oócito (COC)*

Ovários da vaca adultas foram obtidos em um matadouro local e transportadas para o laboratório em solução salina a 37 °C. COCs (grau 1 e 2) foram aspirados de folículos com 2-8 mm de diâmetro e selecionados no estereomicroscópio. Grupos de 20-25 COCs foram lavados e agrupados em gotas de 100 µL de meio bicarbonato TCM199 com sais de Earle e glutamina (Gibco), suplementado com piruvato (22 µg/mL), amicacina; 75 µg/mL, na presença ou ausência de FSH (10 ng/ml; pFSH, Folltropin-V®; Bioniche). As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas em ambiente umidificado a 38,5 °C e 5% de CO₂. Oócitos e células *cumulus* de COCs imaturos ou após 4, 8, 12, 16 e 22 horas de cultivo, foram isolados mecanicamente por repetidas pipetagens em gotas de 100 µL de PBS. Os oócitos foram recuperados quando não eram mais observadas células do *cumulus* ao estereomicroscópio. As células do *cumulus* foram centrifugadas por 2 minutos para formar um "*pellet*". O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 350 µL do tampão de lise do *kit* de extração de RNA. As amostras foram estocadas a -80 °C até a extração do RNA. O RNA total de oócitos provenientes dos cultivos com FSH e das células *cumulus* provenientes dos cultivos com e sem FSH foi extraído utilizando o *kit* RNeasy® (Qiagen). Foram realizadas quatro repetições por tratamento.

2. Extração de RNA e reação de transcrição reversa (RT)

A extração de RNA de células da teca e células da granulosa foi realizada segundo o protocolo Trizol® (Invitrogen). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 10 µl de água destilada e autoclavada. O RNAm de oócitos e células do *cumulus* foi extraído utilizando o *kit* RNeasy® (Qiagen). As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria NanoDrop® (Thermo Scientific). A fim de evitar que uma eventual contaminação com DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade® (Invitrogen), o volume da solução foi calculado a fim de conter 1µg e 100ng de RNA total para células da teca/granulosa e células do *cumulus*, respectivamente. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa (RT).

As amostras de células da teca/granulosa e células do *cumulus* foram reversamente transcritas pelas enzimas SuperScript III® (1µL; Invitrogen) ou Omniscript® (0,2 µL; Qiagen), utilizando oligo -d(T). O protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 µl de água estéril. Essa solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl). Na seqüência, foi acrescido 1µl (200 U) de transcriptase reversa e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras de cDNA produzidas ao final da RT foram mantidas em gelo para utilização imediata na PCR ou armazenadas (-20° C).

O RNA total proveniente de “pools” de vinte oócitos foi incubado com DNase I (0,2U/amostra; Invitrogen®). Como a quantidade de RNA obtida dos oócitos foi muito baixa para ser precisamente quantificada por espectrofotometria, utilizou-se o volume máximo de RNA no protocolo de transcrição reversa (SensiScript®; Qiagen).

3. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes alvo foi investigada por ensaio de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção Power SybrGreen® (Applied Biosystems) no equipamento ABI Prism 7500 Sequence Detection System® (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados foram delineados a partir de seqüências bovinas disponíveis no banco de dados GenBank. As seqüências dos *primers*, tamanhos dos fragmentos amplificados, temperatura de anelamento e concentrações para cada par de *primers* utilizado nos experimentos são apresentados na Tabela 2. A PCR foi otimizada a fim de obter máxima eficiência de amplificação para cada gene. A expressão dos genes alvo foi realizada a partir de 0.5-1.0 µl de cDNA em reações com volume final de 25 µl, corridas em duplicata. A especificidade de cada produto da PCR foi determinada pela análise da curva de dissociação e confirmada pelo tamanho do fragmento na eletroforese em gel de agarose 1.5%. Controles negativos (água em substituição ao cDNA) foram corridos em cada placa.

3.1. Análise dos dados de PCR em tempo real

A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (Pfaffl, 2001). Os genes *GAPDH*, Ciclofilina (*PPIA*) e Histona (*H2AFZ*) foram testados pelo programa geNorm® (Microsoft; Ramakers *et al.*, 2003) para seleção do gene de referência mais estável para cada tipo celular analisado. A CYC-A foi escolhida como gene de referência para células da granulosa, células da teca e oócitos e o gene de referência mais estável para células da granulosa cultivadas foi a H2A. Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de

amostras individualmente pelo programa LinRegPCR. Para cada primer, a linha de “*threshold*” foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, determinada pelos valores mínimos e máximos de fluorescência.

Tabela 2. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento e concentrações para cada oligonucleotídeo utilizado na RT-qPCR.

Genes	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração (nM)
GAPDH	S 5' ggc gtg aac cac gag aag tat aa 3'	119	62	150
	A 5' ccc tcc acg atg cca aag t 3'			
PPIA	S 5' gcc atg gag cgc ttt gg 3'	65	60	300
	A 5' cca cag tca gca atg gtg atc t 3'			
H2AFZ	S 5' gag gag ctg aac aag ctg ttg 3'	74	60	300
	A 5' ttg tgg tgg ctc tca gtc ttc 3'			
CYP19A1	S 5' tga cca gat cca aac cag aca cca 3'	182	62	400
	A 5' atg agg ttg cta aga gtc ggc 3'			
FGF16	S 5' act ggt aca aca cct atg cct cca 3'	84	61	300
	A 5' agc cgt ctt tat tca ggg cca cat 3'			
FGF20	S 5' tag ttt cct tgg gta cac ggc tca 3'	84	60	400
	A 5' agg ctg aat tcc cag gat cac agt 3'			
FGFR2c	S 5' cac cac gga caa aga aat tg 3'	84	60	300
	A 5'atg cag agt gaa agg ata tcc 3'			
FGFR3c	S 5' act ggt aca aca cct atg cct cca 3'	84	59	300
	A 5' tct gga cat ggt ggg caa ctt aga 3'			

S = primer sense; A = primer antisense; pb = pares de base

4. *Imunohistoquímica*

Para a localização das proteínas FGF-16 e FGF20 em folículos antrais, ovários bovinos foram obtidos em abatedouro, seccionados e fixados em paraformaldeído. O tecido fixado foi mergulhado em parafina e cortes de 4 µm foram colocados em lâminas com poli-L-lisina, desparafinizados em xilol duas vezes por 20 minutos e hidratados em banhos sucessivos de 3 min em etanol. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em solução 0.5 M Tris-EDTA pH 9.0 na panela Pascal® (Dako Cytomation) por 20 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação em solução 95% metanol e 5% peróxido de hidrogênio por 20 min, seguida de lavagens em água destilada e solução Tris 0.5 M pH 7.4. O anticorpo policlonal anti-FGF16 (SC-22917; Santa Cruz Biotechnology) foi biotinilado com o *kit* EZ-Link biotinylation® (Pierce Biotechnology) e incubado no tecido a 8 µg/mL por 18 horas a 4°C, seguido de lavagem e incubação com avidina-peroxidase do *kit* Vecstain ABC® (Vector Laboratories) por 30 minutos. Para o FGF20, cortes de ovários foram incubados com o anticorpo policlonal anti-FGF20 (SC-16834; Santa Cruz Biotechnology) a 2 µg/mL por 18 horas a 4 °C. As lâminas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anticabra por 30 minutos, seguido de estreptoavidina-peroxidase do *kit* LSAB system-HRP® (Dako Cytomation). Controles negativos foram realizados através de incubação do anticorpo com quatro vezes o volume do peptídeo bloqueador específico para FGF-16 (SC-22917P, Santa Cruz) e FGF20 (SC-16834P; Santa Cruz). A imunomarcação foi detectada com DAB líquido (diamino benzeno; Dako Cytomation®) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

5. *Radioimunoensaio*

As concentrações de esteróides foram mensuradas no fluido folicular utilizando kits para estradiol (DSL-39100) e progesterona (DSL-3400; Diagnostics Systems Laboratories). As curvas padrão foram preparadas a partir de estradiol e progesterona liofilizados (Sigma-Aldrich) em PBSgelatina (0,02M de fosfato de sódio; 0,15M de cloreto de sódio; 0,1% de gelatina; 0,01% de azida sódica; pH=7,5). O intervalo das concentrações de estradiol utilizadas na

curva padrão foi de 0,031-250 µg/100ul. Na dosagem de estradiol, os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 5,17% e 11,3%, respectivamente. O limite de detecção para o E2 foi 0,1 ng/ml, e a diluição utilizada foi 1:500 de fluido folicular em PBS. O intervalo das concentrações de progesterona utilizados na curva padrão foi 3,9-100 pg/25ul. A dosagem de progesterona apresentou coeficiente de variação intra e inter-ensaio de 2,5% e 8,7%, respectivamente. O limite de detecção foi de 1,56 ng/ml e a diluição utilizada foi 1:10 de fluido folicular em PBS.

6. *Análise Estatística*

Foi realizado o teste de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias entre grupos, com transformação para logarítimos se necessário para realização de análise paramétrica. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar os efeitos

(1) da classe folicular sobre a expressão do FGF16 e FGF20 em células da granulosa e da teca,

(2) do tratamento com ou FSH e IGF1 sobre a expressão de FGF16 e FGF20, no cultivo de células da granulosa;

(3) do tempo de cultivo sobre a expressão dos FGF16, FGF20, FGFR2c e FGFR3c nas células do *cumulus* durante a MIV.

Havendo efeito, as médias foram comparadas pelos testes de Tukey. As análises foram realizadas no programa JMP® (SAS Institute), os dados são apresentados como média ±EPM e foram consideradas significativas diferenças de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Utilizando-se como base para uma análise descritiva os valores de Ct, que equivale ao ciclo de PCR em que a amostra atinge o nível de quantificação na fase exponencial da amplificação (Bustin *et al.*, 2009), constatou-se que os mRNA de FGF16 e FGF20 são predominantemente expressos em “pools” oócitos imaturos e em níveis menores nas células da granulosa e da teca (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos valores de Ct para genes de referência e alvo nos diferentes tipos celulares do folículo ovariano.

Tipo celular	Média de valores de Ct		
	<i>FGF16</i>	<i>FGF20</i>	<i>PPIA</i>
Oócito imaturo	31,39	36,15	23,06
Células da granulosa	36,21	38,61	20,14
Células da teca	37,36	38,94	20,65

Uma análise mais detalhada em células da granulosa e da teca provenientes de folículos saudáveis, transicionais e atresicos demonstrou que a abundância relativa de mRNA foi significativamente maior em folículos atresicos comparado com folículos saudáveis ou transicionais, para ambos tipos celulares (Figura 2).

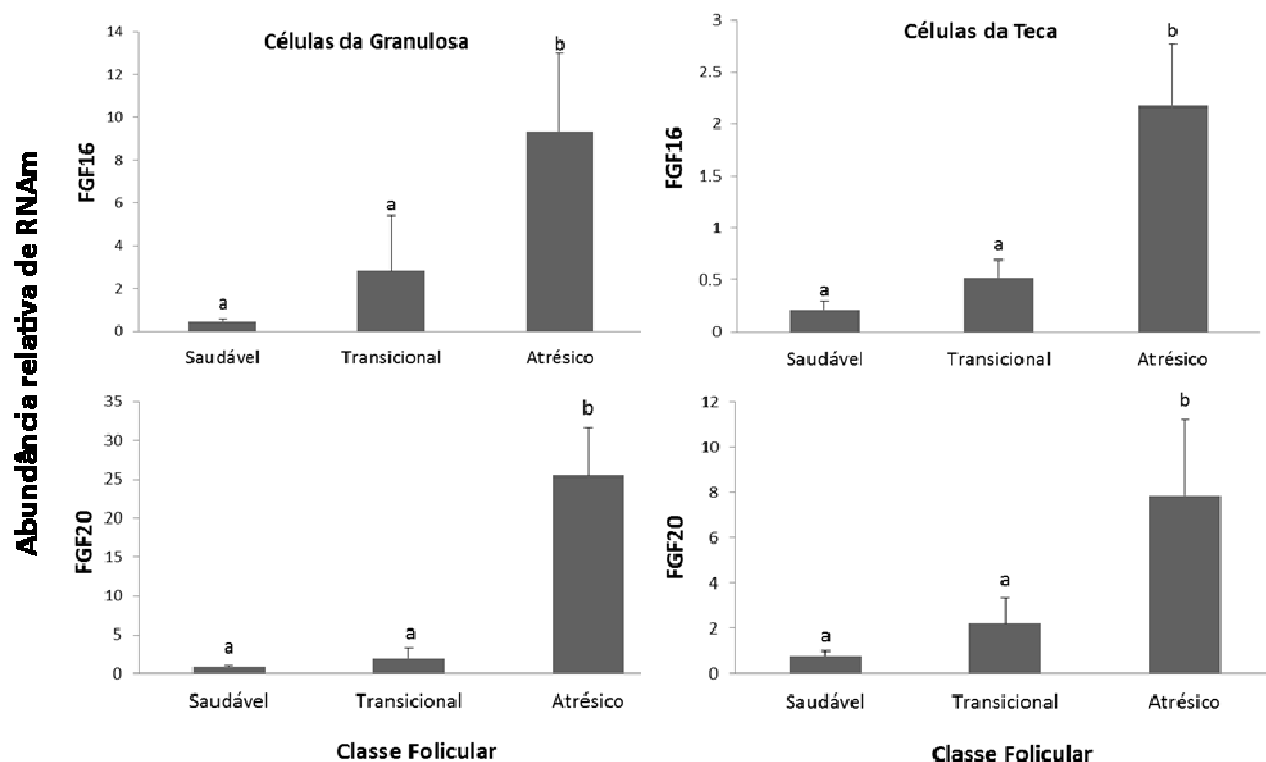


Figura 2. Abundância relativa de mRNA de FGF16 e FGF20 medida por RT-qPCR em células da teca e da granulosa de folículos classificados como saudáveis (n=15), transicionais (n=14) ou atrésicos (n = 15). Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM), letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A imunohistoquímica confirmou a presença das proteínas FGF16 e FGF20 em folículos ovarianos bovinos (Figura 3 e 4). O FGF16 foi observado em oócitos e células da teca de folículos antrais (Fig 3A). Observou-se marcação mais evidente para folículos atrésicos em relação a folículos saudáveis no mesmo corte histológico (Fig 3C). A proteína não foi detectada em vasos sanguíneos (Fig 3D; seta) e fraca marcação foi observada no citoplasma de oócitos de folículos pré-antrais (3E; setas).

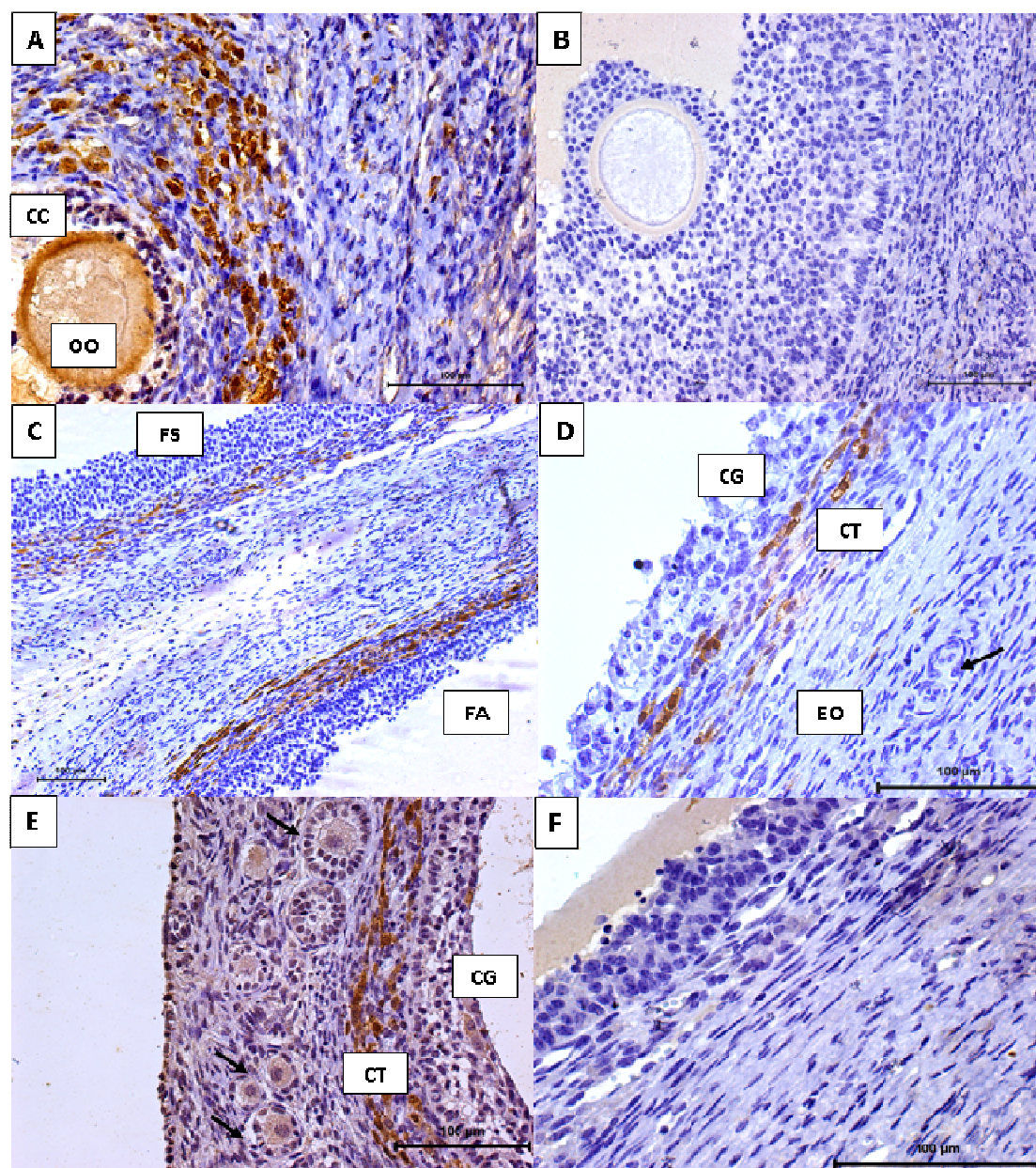


Figura 3. Imunodeteção do FGF16 em ovários bovinos. O FGF16 foi localizado em (A) oócitos e células da teca de folículos antrais, (C) folículo atrésico e saudável no mesmo corte histológico, (D) folículo atrésico, (D; seta) vaso sanguíneo (E; seta) citoplasma de folículos pré-antrais, (B) e (F) controles negativos. Abreviaturas: OO - oócito, CC - células do *cumulus*, CG – células da granulosa, CT – células da teca, EO – estroma ovariano, FS – folículo saudável e FA – folículo atrésico.

O FGF20 foi detectado no citoplasma de oócitos pré-antrais (Fig 4C; setas) e em oócitos e células *cumulus* de folículos antrais (Fig 4A). Folículos atrésicos, com apenas algumas camadas de células da granulosa e núcleos

picnóticos foram positivos para FGF20 (Figura 4E). A marcação também foi detectada em níveis de fundo em células da teca e vasos sanguíneos (Figura 4E; setas). Não foi observada marcação quando o anticorpo para FGF20 foi incubado com o peptídeo bloqueador (Figura 4B, 4D, 4F).

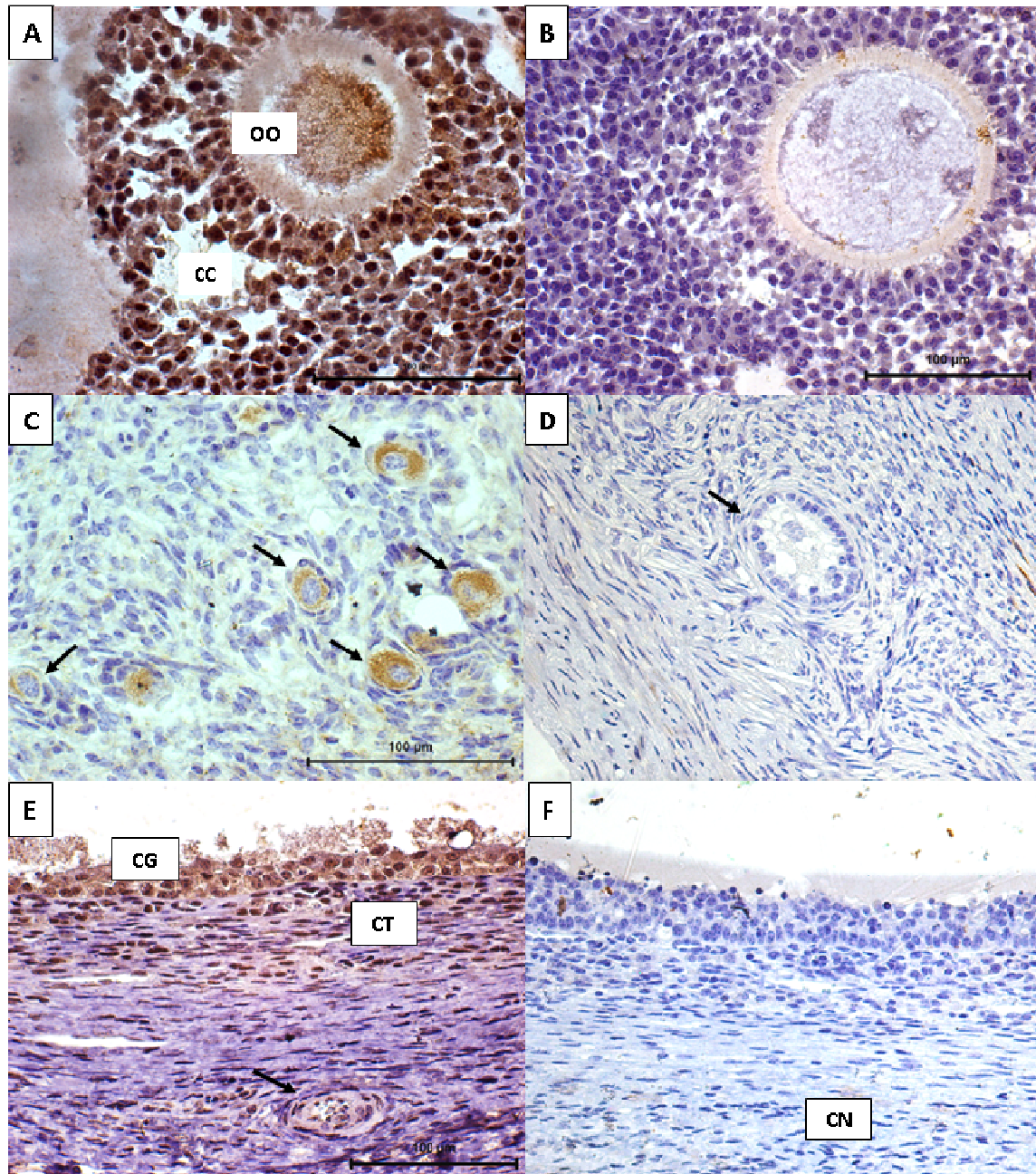


Figura 4. Imunodeteção de FGF20 em ovários bovinos. O FGF20 foi localizado em (A) oócitos e células do *cumulus* de folículos antrais, (C; setas) citoplasma de oócitos pré-antrais (E) folículo atrésico, (E; seta) vaso sanguíneo, (B), (D) e (F) controles negativos. Abreviaturas: OO - oócito, CC - células do

cumulus, CG – células da granulosa, CT – células da teca, CN – controle negativo.

O tratamento com FSH inibiu a expressão de FGF16 e FGF20 na dose de 1 ng/mL (Figura 5A; 5B). Enquanto que o IGF1 reduziu a abundância de mRNA de FGF16 a partir da dose de 10 ng/mL (Figura 5C), sem contudo alterar os níveis de RNAm do FGF20.

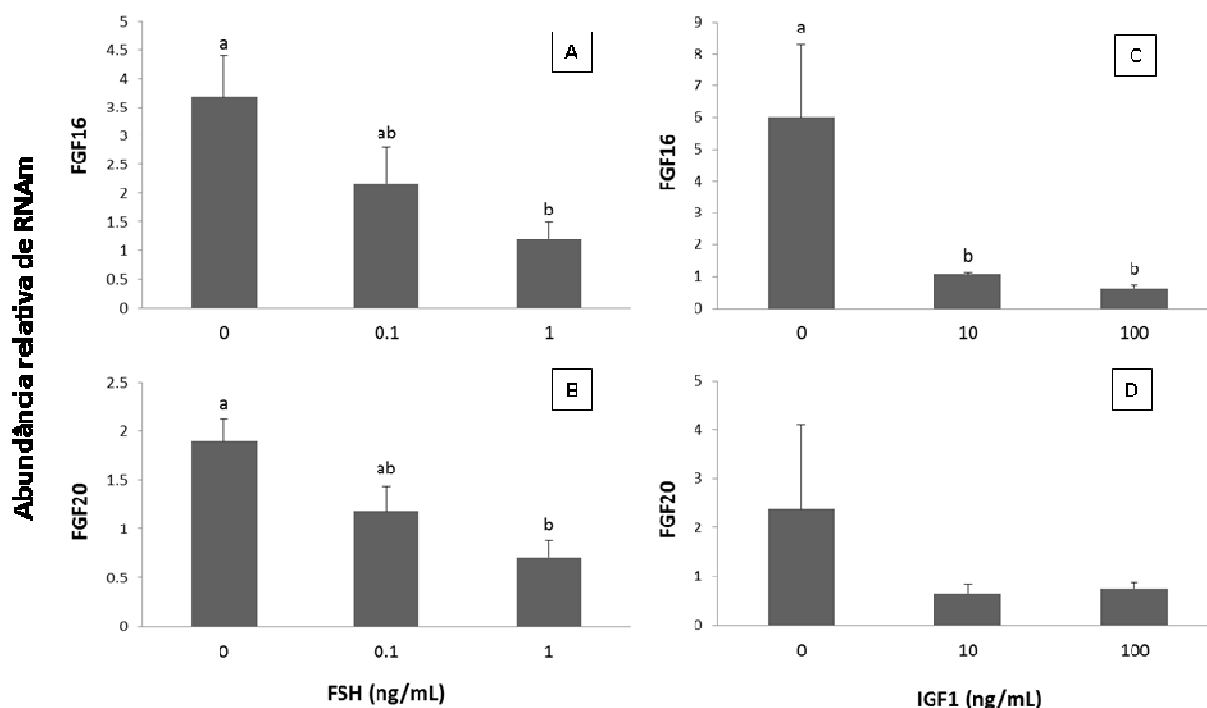


Figura 5. Efeitos do FSH (A e B) e IGF1 (C e D) na abundância do mRNA do FGF16 e do FGF20 em células da granulosa cultivadas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A expressão dos RNAm do FGF16 e do FGF20 em oócitos não varia durante a MIV (Figura 6).

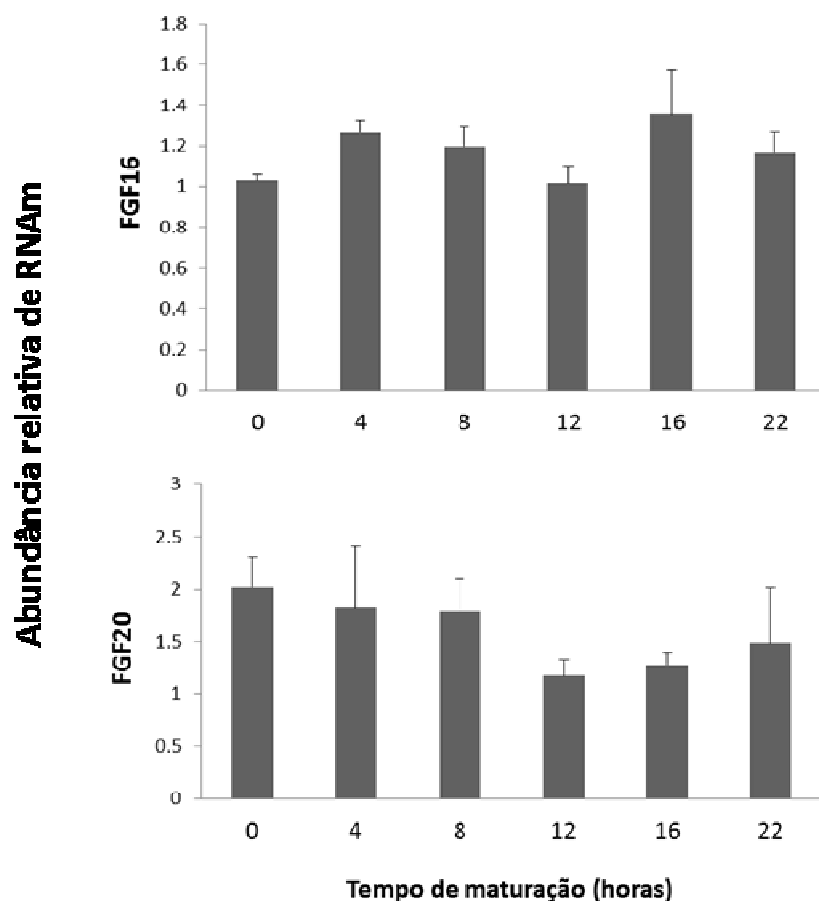


Figura 6. Abundância relativa de mRNA para FGF16 e FGF20 (média $\pm$ EPM) em oócitos durante a maturação de COCs *in vitro*. “Pools” de 20 oócitos foram recuperados imaturos (0 horas) ou após 4, 8, 12, 16 e 22 horas de maturação na presença de FSH (n = 4 repetições por tratamento).

A expressão do RNAm dos receptores FGFR2c e FGFR3c foi estimulada pelo FSH durante a MIV (Figura 7).

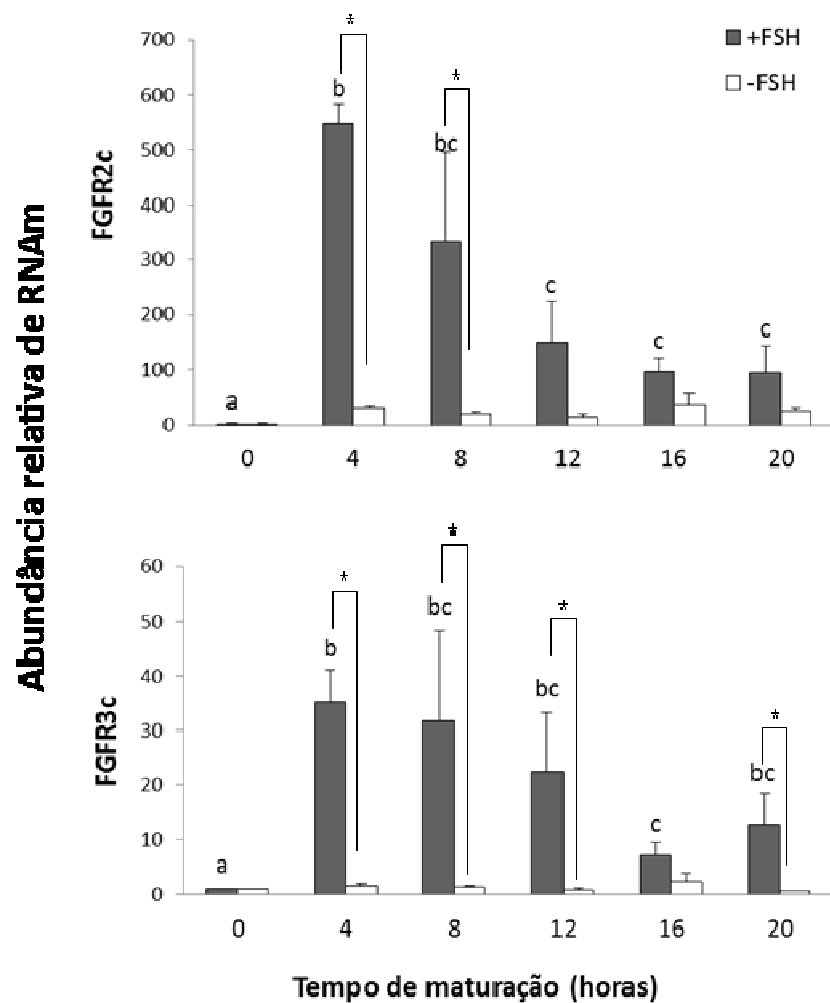


Figura 7. Abundância relativa de mRNA para FGFR2c e FGFR3c (média $\pm$ EPM) em células do *cumulus* durante a maturação de COCs *in vitro*. Células do *cumulus* proveniente de 20 COCs foram cultivadas e recuperadas imaturas (0 horas) ou após 4, 8, 12, 16 e 22 horas de maturação, na presença de FSH ou ausência de FSH (n = 4 repetições por tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao tempo de maturação e asteriscos representam o efeito de FSH em cada momento.

DISCUSSÃO

Diversos FGFs e seus receptores têm sido identificados no folículo ovariano sugerindo um papel importante para essas moléculas na regulação da função ovariana de diferentes espécies (Parrott & Skinner 1998, Nilsson *et al.* 2001, Buratini *et al.* 2005, Buratini *et al.*, 2007, Machado *et al.*, 2009; Portela *et al.*, 2010). No presente estudo, descrevemos os padrões de expressão do FGF16 e do FGF20 no folículo ovariano bovino. Os principais resultados obtidos foram a regulação dos receptores FGFR2c e FGFR3c em células do cumulus ao longo da MIV e a regulação da expressão de FGF16 e FGF20 em folículos atrésicos e por fatores pró sobrevivência do folículo (FSH e IGF1).

A mensuração da expressão do FGF16 e do FGF20 por RT-PCR indica que a abundância dos RNAm é maior nos oócitos em comparação com células da granulosa e da teca. Os valores médios de Ct correspondem ao ciclo em que a amostra atinge o nível de quantificação na fase exponencial da amplificação (Bustin *et al.*, 2009). Em geral, uma diferença de 1 Ct entre duas amostras diferentes indica que uma amostra é aproximadamente duas vezes mais expressa que a outra em uma mesma corrida. Portanto, menores valores de Ct no oócito indicam maior quantidade de mRNA expresso. Além disso, o mRNA de apenas 20 oócitos (aproximadamente 80ng de RNA), foi usado na RT-PCR enquanto que 1µg de RNA total de células da granulosa e da teca foi utilizado. Este fato explica a maior média de Ct encontrada para o gene referência no oócito em comparação com células da granulosa e da teca. Os valores mais altos de Ct para o gene de referência e os valores mais baixos de Ct para FGF16 e FGF20 no oócito corroboram nossa sugestão de que o oócito expressa mais FGF16/FGF20 do que células da granulosa e da teca. Estes resultados são consistentes com a detecção prévia de FGF9, membro da mesma subfamília, no oócito de ratos (Drummond *et al.*, 2007). Da mesma forma, a abundância de mRNA de FGF8 e FGF17 foi predominante no oócito (Buratini *et al.* 2005; Valve *et al.* 1997; Machado *et al.*, 2009).

Em células somáticas ovarianas, a expressão relativa do mRNA de FGF16/FGF20 foi maior nas células da granulosa e da teca de folículos atrésicos em comparação com folículos saudáveis ou transicionais. Padrões similares de expressão foram observados para FGF17 e FGF18 no ovário

bovino. Ambos FGFs foram mais expressos em folículos atrésicos e suprimiram a secreção de esteróides em células da granulosa cultivadas (Machado *et al.*, 2009; Portela *et al.*, 2010). O membro protótipo desta subfamília, o FGF8, também suprimiu a produção de estradiol induzida por FSH em células da granulosa em ratos (Miyoshi *et al.*, 2010). Como o desenvolvimento folicular requer aumento da secreção de estradiol para diferenciação das células da granulosa (Bao *et al.*, 1997), os FGFs parecem ter um papel inibitório durante o crescimento de folículos antrais. É possível que os FGF16/FGF20 possam ativar os mesmos receptores que os FGF17 e FGF18 e desempenhar funções semelhantes ou até cumulativas durante o crescimento folicular. Por outro lado, os padrões de expressão do FGF16 e do FGF20 diferiram daqueles observados para o FGF1, cuja expressão não foi alterada pelas concentrações intrafoliculares de estradiol, e para o FGF2, cuja expressão aumentou com a concentração de estradiol (Berisha *et al.*, 2006; Vernon & Spicer, 1994). Essas diferenças quanto à regulação da expressão dos FGFs pelas concentrações de estradiol podem decorrer do padrão de expressão em cada tecido e/ou da propriedade de ligação aos diferentes receptores.

Em células da granulosa cultivadas, a abundância dos mRNA do FGF16 e FGF20 foi significativamente diminuída pelo FSH. Além disso, o IGF1 também inibiu a expressão do FGF16. Da mesma forma, a abundância de RNAm do FGF17 foi reduzida pelo FSH e o IGF1 no mesmo sistema de cultivo de células da granulosa. A apoptose das células da granulosa é um dos principais mecanismos responsáveis pela atresia folicular e dentre os fatores que influenciam este processo estão os hormônios sexuais (FSH e LH) e fatores de crescimento (revisado por Grotowski *et al.*, 1997). As gonadotrofinas e o IGF1 são os principais fatores de sobrevivência que suprimem o início da apoptose folicular (Chun *et al.*, 1994; revisado por Quirk *et al.*, 2004). No ovário, o IGF1 age de forma sinérgica ao FSH para regular a esteroidogênese folicular (Spicer *et al.*, 2002). Portanto, os resultados sugerem que o FSH e IGF1 inibem a expressão de FGF16 e FGF20, favorecendo a produção de estradiol e a continuidade do crescimento.

A detecção do FGF16 no ovário parece ser específica, pois a pré-incubação do anticorpo com o peptídeo bloqueador específico aboliu completamente a marcação. Essa discrepância pode ser explicada pela

internalização de FGF16 após ligação ao seu receptor, que é sustentada pela evidência de internalização de receptores mediada pelos FGF1 e FGF2 exógenos em diversas linhagens (Olsnes *et al*, 2003; Wesche *et al*, 2006). De acordo com estudos de atividade mitogênica, o FGF16 liga-se preferencialmente ao FGFR3c e FGFR2c, ambos detectados em células da teca de folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2005; Berisha *et al.*, 2004; Drummond *et al.*, 2009; Berisha *et al.*, 2006). Os níveis de mRNA do FGFR3c tecal não foram significativamente alterados pelas concentrações intrafoliculares de estradiol ou pelo diâmetro, mas foram estimulados pelo FSH em células da granulosa cultivadas (Buratini *et al.*, 2005), sugerindo que o FGF16 liga-se preferencialmente ao FGFR3c em células da teca atresicas.

Já a detecção da proteína do FGF20 foi consistente com dados de expressão do mRNA. A marcação foi observada no oócito, células do *cumulus* e da granulosa e camada de células da teca. Fraca marcação foi observada no estroma ovariano e a presença de peptídeo bloqueador em excesso anulou a marcação no tecido ovariano. A forte marcação de FGF20 em células do *cumulus* pode ser explicada pela internalização do FGF20 após ligação ao seu receptor, como já descrito para outros FGFs em diversas linhagens celulares (Olsnes *et al*, 2003; Wesche *et al*., 2006).

A detecção do mRNA e da proteína para FGF16/FGF20 em oócitos estimulou a investigação da expressão dos FGF16/FGF20 e seus receptores (FGFR2c e FGFR3c) durante a maturação *in vitro* de COCs. Embora a expressão de FGF16/FGF20 tenha sido constante no oócito durante a maturação, resultados interessantes foram observados para o FGFR2c e FGFR3c nas células do *cumulus*. A expressão de ambos os receptores foi estimulada pelo FSH durante a MIV. Dados anteriores demonstraram que o FSH pode modular a expressão de FGFRs (Buratini *et al*, 2005; Buratini *et al*, 2007) e estimular receptores funcionais nas células da granulosa (Shikone *et al*, 1992). Em conjunto, a presença dos RNAm e das proteínas FGF16 e FGF20 no oócito, somada à regulação da expressão dos receptores em células do *cumulus*, sugerem ação parácrina do FGF16 e do FGF20 nos mecanismos de controle da diferenciação das células do *cumulus*. De fato, ações parácrinas de FGFs oocitários já foram descritas na literatura. O FGF8, parece controlar a diferenciação das células *cumulus* de camundongo atuando em sinergismo com

a BMP15 para promover a glicólise (Sugiura *et al.* 2007). Além disso, outro FGF, o FGF10, estimulou a expansão das células do *cumulus* durante a maturação *in vitro* (Zhang *et al.*, 2010).

Em conjunto os dados de expressão gênica e protéica sugerem o envolvimento do FGF16 e do FGF20 no controle do desenvolvimento folicular. Sugere-se que no início da onda folicular, o FSH estimularia o crescimento de folículos antrais e também a expressão de um dos principais receptores para o FGF16 e o FGF20, o FGFR3c nas células da granulosa, tornando-as sensíveis ao sistema FGF nos folículos cujo crescimento é sustentado, o FSH e IGF1 diminuiriam a expressão do FGF16 e do FGF20 na parede folicular favorecendo a esteroidogênese.

Em conclusão, estes resultados fornecem evidências da presença de FGF16/FGF20 no ovário bovino. Os padrões de expressão do mRNA de FGF16/FGF20 e dos receptores FGFR2c/FGFR3c em COCs sugerem um papel fisiológico no controle da diferenciação das células do *cumulus*. E os padrões de expressão na parede do folículo antral sugerem um possível papel para FGF16/FGF20 durante a atresia folicular.

CAPÍTULO III

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 17 (FGF17) SOBRE A EXPANSÃO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DO *CUMULUS* BOVINAS.

RESUMO

O oócito participa ativamente dos mecanismos reguladores da maturação do complexo *cumulus*-oócito (COC) via secreção de fatores parácrinos, tais como membros da família TGF-beta e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Estes fatores melhoram a competência de desenvolvimento do oócito por mecanismos desconhecidos. Estudos recentes sugerem a participação de membros da subfamília do FGF8 nos mecanismos reguladores da diferenciação das células do *cumulus*. O FGF17, membro desta subfamília, foi detectado principalmente no oócito imaturo no folículo ovariano bovino. Além disso, seus receptores foram detectados nas células do *cumulus* ao longo da maturação *in vitro*. Contudo, a expressão do FGF17 parece ser suprimida após o pico de LH e durante a maturação de COCs *in vitro*. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do FGF17 na expansão do *cumulus* e expressão de fatores EGF-like [ampiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e betacelulina (BTC)] e genes reguladores da expansão [cicloxigenase 2 (COX2), hialurona sintase 2 (HAS 2), pentraxina 3 (PTX3), proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6)]. O tratamento com FGF17 aumentou a proporção de COCs totalmente expandidos, mas não alterou a abundância relativa de COX2, HAS2, PTX3, TSG6, EREG e BTC ao longo da MIV. A expressão do RNAm da AREG foi estimulada às 22 horas de maturação na mesma dose que melhorou a expansão. Entretanto, os níveis de mRNA da AREG foram reduzidos no final da maturação (22 horas), esse efeito não foi mais observado quando o FGF17 foi avaliado em diferentes momentos da maturação. Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que o FGF17 potencializa a expansão *in vitro* de COCs bovinos e os mecanismos não incluem o controle transcricional de fatores EGF-like ou outros genes indutores da expansão.

PALAVRAS-CHAVE: FGF17, expansão do *cumulus*, expressão gênica, bovino.

ABSTRACT

The oocyte actively participates in the regulatory mechanisms of *cumulus*-oocyte complex (COC) maturation via secretion of paracrine factors such as members of the TGF-beta family and fibroblast growth factors (FGFs). These factors enhance oocyte competence by unknown mechanisms. Recent studies suggest a role for the FGF8 subfamily in the regulatory mechanisms of *cumulus* cells differentiation. FGF17, a member of the FGF8 subfamily, was shown to be predominantly expressed in immature oocytes in the bovine ovary. In addition, its receptors (FGFR2c e FGFR3c) were detected in *cumulus* cells during *in vitro* maturation. Moreover, FGF17 mRNA expression in the oocyte appears to decrease after the LH surge and during COC *in vitro* maturation. The objective of this study was to investigate the effects of FGF17 on *cumulus* expansion and on the expression of EGF-like factors [amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) and betacellulin (BTC)] and other expansion-inducing genes [cyclooxygenase 2 (COX2), hyaluronan synthase 2 (HAS 2), pentraxin 3 (PTX3), protein-inducing tumor necrosis factor 6 (TSG6)]. FGF17 treatment increased the proportion of fully expanded COCs, but did not alter mRNA expression of COX2, HAS2, PTX3, TSG6, EREG and BTC during *in vitro* maturation. AREG mRNA expression was stimulated by FGF17 at 22 hours of maturation at the dose that stimulated expansion. However, as AREG mRNA levels were shown to be drastically reduced at the end of maturation (22 hours), this effect was no longer observed when FGF17 was tested at different times of maturation in the following experiment. In conclusion, present results indicate that FGF17 can enhance *cumulus* expansion during bovine *in vitro* maturation and that the underlying mechanisms do not include transcriptional regulation of EGF-like or other expansion-inducing genes.

KEY WORDS FGF17, *cumulus* expansion, gene expression, bovine.

INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, os resultados de maturação oocitária em condições de cultivo são insatisfatórios quando comparados à maturação *in vivo* (Sirard *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2002). Provavelmente, isso é decorrente da remoção dos COCs dos folículos, que perdem a influência de diversos fatores presentes no fluido folicular, importantes no processo de maturação nuclear e citoplasmática (Dode *et al.*, 2006). Além disso, a competência do oócito em originar blastocisto após fecundação *in vitro* varia com o grau de comunicação entre ele e as células somáticas adjacentes, comprometido quando da retirada do COC do folículo (Lonergan *et al.*, 1994, Krisher, 2004), o que reflete a importância dos agentes presentes no ambiente folicular.

As gonadotrofinas, em conjunto com os fatores parácrinos, regulam a maturação oocitária tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O pico pré-ovulatório de LH leva à ativação de uma cascata de eventos que resulta em extensiva proliferação e expansão das células do *cumulus* (Li *et al.*, 2009; Scherzer *et al.*, 2009). A competência para realizar a expansão é uma característica única de diferenciação das células do *cumulus* (Diaz *et al.*, 2006), fundamental para o desenvolvimento normal do oócito, ovulação e fertilização (Elvin *et al.*, 1999; Vanderhyden *et al.*, 2003 Tanghe *et al.*, 2002, Russell & Salustri, 2006). Os efeitos do LH *in vivo* são propagados no folículo ovariano através da secreção dos fatores EGF-like, AREG, EREG e BTC, que são estimulados nas células da granulosa mural em resposta ao LH e atuam nas células do *cumulus* estimulando sua própria síntese (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2006). Em COCs cultivados *in vitro*, o FSH regula a expressão gênica do *cumulus* e estimula a síntese de peptídeos EGF-like (Su *et al.*, 2002; Downs & Chen, 2008). Os EGF-like ativam receptores nas células do *cumulus* induzindo a expressão de genes essenciais para a expansão do *cumulus* como HAS2, COX2, PTX3 e TSG6 (Ashkenazi *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2010).

A comunicação entre oócito e células do *cumulus* é fundamental para garantir a sobrevivência e subsequente maturação do oócito, permitindo-lhe cumprir o seu propósito reprodutivo (Motlik *et al.* 1989, Sirard *et al.* 1989,

Kastrop *et al.* 1991, Tatemoto & Terada 1995). O oócito secreta fatores de crescimento solúveis (OSF) que regulam a diferenciação, proliferação, apoptose e luteinização das células do *cumulus* (Gilchrist *et al.*, 2008). A secreção destes fatores permite ao oócito regular as funções das células vizinhas para garantir condições ideais propícias para o seu desenvolvimento (Gilchrist *et al.*, 2008).

Evidências crescentes têm sugerido a participação de membros da família dos FGFs na regulação da diferenciação das células do *cumulus* e da maturação oocitária. Estudos recentes demonstraram que alguns FGFs favorecem a expansão do *cumulus*, a aquisição de competência do oócito e a qualidade embrionária (Fields *et al.* 2011; van Montfoort *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). A suplementação com FGF2 e FGF10 têm sido associada com o sucesso da fertilização *in vitro* e desenvolvimento do blastocisto (Wang *et al.*, 2009; Fields *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2010). O FGF10 aumentou a progressão meiótica de oócitos bovinos e melhorou a expansão do *cumulus* (Zhang *et al.*, 2010). Já o FGF8, produzido pelo oócito de camundongos, atua cooperativamente com a BMP15 para promover a glicólise nas células do *cumulus* (Sugiura *et al.* 2007).

O FGF17 é membro da subfamília do FGF8, com quem compartilha os mesmos receptores (Zhang *et al.*, 2006). Esse fator de crescimento é predominantemente expresso pelo oócito no folículo ovariano bovino e sua expressão diminui após o pico pré-ovulatório de LH (Machado *et al.*, 2008). Os RNAs dos receptores ativados pelo FGF17, FGFR2c e FGFR3c, foram detectados nas células do *cumulus* bovinas (Zhang *et al.*, 2010). Essas observações sugerem que a sinalização do FGF17 (via FGFR2c e FGFR3c), assim como previamente demonstrado para o FGF10 (via FGFR1b e FGFR2b; Zhang *et al.*, 2010; Caixeta *et al.*, 2011), também potencializaria a expansão do *cumulus*.

Sendo assim, este trabalho objetivou testar os efeitos do FGF17 sobre a expansão do *cumulus* e expressão de genes reguladores desse processo durante a MIV de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócito (COC)

A menos que seja especificado, todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma. Ovários de vacas adultas (predominantemente da raça Nelore, *Bos indicus*) foram obtidos em um abatedouro local e transportados ao laboratório em solução salina (0,9% NaCl) contendo antibióticos (penicilina G, 100 UI/mL e estreptomicina, 100 ug/mL) a 35-37 ° C. Os COCs foram aspirados de folículos (3-8 mm de diâmetro) com agulha calibre 18 e agrupados em tubos de 15 mL. Após a sedimentação, os COCs foram recuperados e selecionados em estereomicroscópio. Apenas COCs com citoplasma homogêneo e multicamada de células *cumulus* compacta foram utilizados (Grau 1 e 2). Em seguida grupos de 15 COCs foram lavados e transferidos para gotas de 300 µL de meio de maturação TCM199 contendo sais de Earle e suplementado com 1 ug/mL de FSH (pFSH, Folltropin-V ® Bioniche), 10 UI/mL de LH (PLH , Lutropin-V ®, Bioniche), 22 ug/mL de piruvato de sódio, 75 ug/mL de amicacina e 4 mg/mL de BSA. As gotas foram cobertas com óleo mineral e a incubação realizada a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar umidificado.

Experimento 1. Para avaliar os efeitos do FGF17 sobre a expansão do *cumulus* e a expressão gênica, os COCs foram cultivados por 22 horas em meio de maturação suplementado com doses crescentes de FGF17 (R&D Systems, 0, 1, 10 e 100 ng/mL; n=4). A expansão do *cumulus* foi estimada visualmente de acordo com um sistema de avaliação subjetivo. Foram atribuídos graus crescentes de expansão de 1 a 3 (1 - expansão fraca, caracterizada por poucas alterações morfológicas em comparação aos COCs antes da maturação, 2 - expansão parcial, caracterizada por moderada expansão mas com a presença de células ainda não completamente expandidas e 3 – expansão completa ou quase completa, Zhang *et al.*, 2010).

Experimento 2. A fim de avaliar os efeitos do FGF17 sobre a expressão dos EGF-*like* (AREG, EREG e BTC) e outros genes indutores da expansão do

cumulus (COX2, HAS2, PTX3 e TSG6), células do *cumulus* foram recuperadas de 15 COCs imaturos (0 hora) ou cultivados por 4, 8, 12 e 22 horas na ausência ou presença de 100 ng/mL de FGF17 (dose escolhida a partir dos resultados do experimento 1). Foram feitas três réplicas por momento, sempre iniciadas em dias diferentes.

2. **Análise de expressão gênica**

Células do *cumulus* foram mecanicamente separadas de 15 oócitos por sucessivas pipetagens em gotas de PBS. As células foram recuperadas e transferidas para um tubo de 1,5 mL, centrifugadas duas vezes durante 5 minutos a 700g. O sobrenadante foi descartado e 350 µL do tampão de lise do kit de extração de RNA foi adicionado ao pellet e estas células foram armazenadas a -80 °C até a extração de RNA.

O RNA total foi extraído de células *cumulus* provenientes de 15 COCs com o kit RNeasy® (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras de RNA foram eluídas em 30 mL de água livre de RNase. A concentração de RNA total foi mensurada por espectrofotometria (NanoDrop ND 1000®; Thermo Scientific). O RNA total (100 ng/reação) foi incubado com DNase I® (1 U/mg; Invitrogen) e em seguida transcrito reversamente de acordo com o protocolo da Omniscript® (Qiagen) utilizando primer Oligo-dT. As amostras foram incubadas com os reagentes a 37 ° C por 60 minutos e 93 °C por 3 minutos para inativação da enzima.

A análise por RT-PCR em tempo real foi realizada em um termociclador ABI 7500 utilizando o método de detecção Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O volume final da reação de PCR foi de 25 mL e as condições da PCR foram: 95 °C por 10 minutos (ciclo 1), 95°C por 10 segundos para desnaturação seguida de anelamento por 1 minuto (40 ciclos). As seqüências de *primers*, tamanhos dos fragmentos e temperatura de anelamento para cada gene são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos, temperatura de anelamento e concentrações para cada oligonucleotídeo utilizado na RT-qPCR.

Genes	Sequência do Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
PPIA	F 5'-gcc atg gag cgc ttt gg-3'	65	60
	R 5'-cca cag tca gca atg gtg atc t-3'		
GAPDH	F 5'-ggc gtg aac cac gag aag tat aa-3'	119	62
	R 5'-ccc tcc acg atg cca aag t-3'		
H2AFZ	F 5'-gag gag ctg aac aag ctg ttg-3'	74	60
	R 5'-ttg tgg tgg ctc tca gtc ttc-3'		
AREG	F 5'-ctt tcg tct ctg cca tga cct t-3'	100	60
	R 5'-cgt tct tca gcg aca cct tca-3'		
EREG	F 5'-act gca cag cat tag ttc aaa ctg a-3'	100	60
	R 5'-tgt cca tgc aaa cag tag cca tt-3'		
BTC	F 5'-gcc cca agc agt aca agc at-3'	100	59
	R 5'-gcc cca gca tag cct tca tc-3'		
COX2	F 5'-aag cct agc act ttc ggt gga gaa-3'	168	60
	R 5'-tcc aga gtg gga aga gct tgc att-3'		
HAS2	F 5'-aca cag aca ggc tga gga caa ctt-3'	133	60
	R 5'-aag cag ctg tga ttc caa gga gga-3'		
PTX3	F 5'-cct cag cta tcg gtc cat aa-3'	294	54
	R 5'-att gaa gcc tgt gag gtc tgc-3'		
TSG6	F 5'-gca aag gag tgt ggt ggt gtg ttt-3'	135	60
	R 5'-act gag gtg aat gcg ctg acc ata-3'		

F = primer sense; R = primer antisense; pb = pares de base

As reações foram otimizadas para proporcionar máxima eficiência de amplificação para cada gene. As amostras foram corridas em duplicata e a especificidade dos produtos de PCR foi confirmada por análise da curva de dissociação e pelo tamanho do fragmento determinado na eletroforese em gel de agarose a 2%. Para selecionar o gene de referência mais estável, os perfis de amplificação da ciclofilina-A (PPIA), Histona H2AFZ (H2AFZ) e do

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram comparados no programa geNorm applet para Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; Vandesompele *et al.*, 2002). O gene de referência mais estável para células do *cumulus* foi a PPIA. Os valores de expressão relativa para cada gene foram calculados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Valores médios de eficiência para cada gene foram calculados a partir do perfil de amplificação de amostras individuais pelo programa LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).

3. Análise Estatística

Os dados do experimento de expansão das células do *cumulus* foram transformados para arcoseno e os dados de expressão gênica foram transformados para logaritmo quando não proporcionaram distribuição normal. Os efeitos do tempo sobre a expressão gênica e do tratamento com FGF17 sobre a expansão do *cumulus* e expressão gênica foram testados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. A análise estatística foi realizada com o programa JMP (SAS Institute) e os resultados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Efeito do FGF17 sobre o grau de expansão das células do cumulus

O tratamento com FGF17 na dose de 100 ng/mL aumentou a proporção de COCs totalmente expandidos (grau 3) e diminuiu a proporção de COCs pouco expandidos (grau 1; Figura 1).

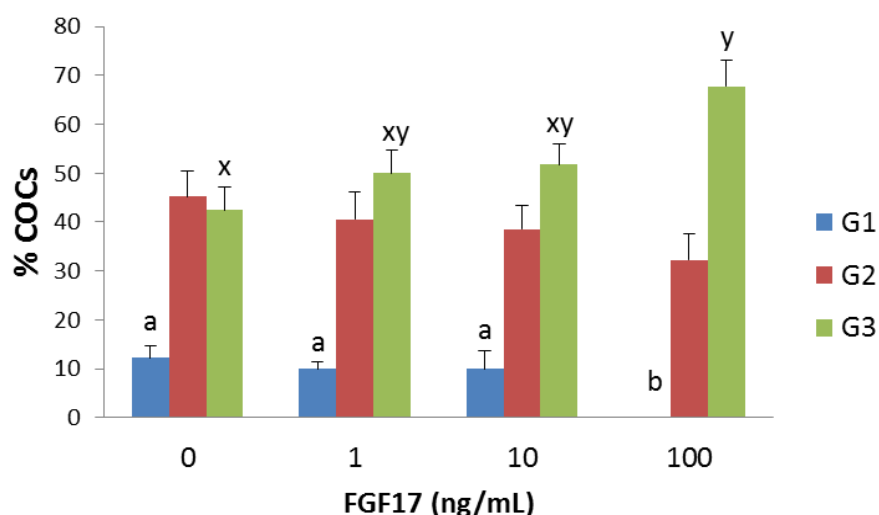


Figura 1. Efeito do FGF17 sobre a expansão do *cumulus*. COCs foram cultivadas com doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10 e 100 ng/mL). Após 22 horas de cultivo o grau de expansão foi avaliado e classificado em G1 (expansão fraca), G2 (expansão moderada) e G3 (expansão completa; Zhang et al., 2010). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.

Efeito do FGF17 sobre a expressão dos fatores EGF-like e genes indutores da expansão do cumulus

Para uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na melhora da expansão do *cumulus* pelo FGF17, avaliamos a regulação da expressão de genes indutores da expansão. Após 22 horas de maturação o FGF17 (100ng/mL) estimulou os níveis de RNAm para AREG, porém não houve efeito significativo sobre os níveis de EREG e BTC (Figura 2).

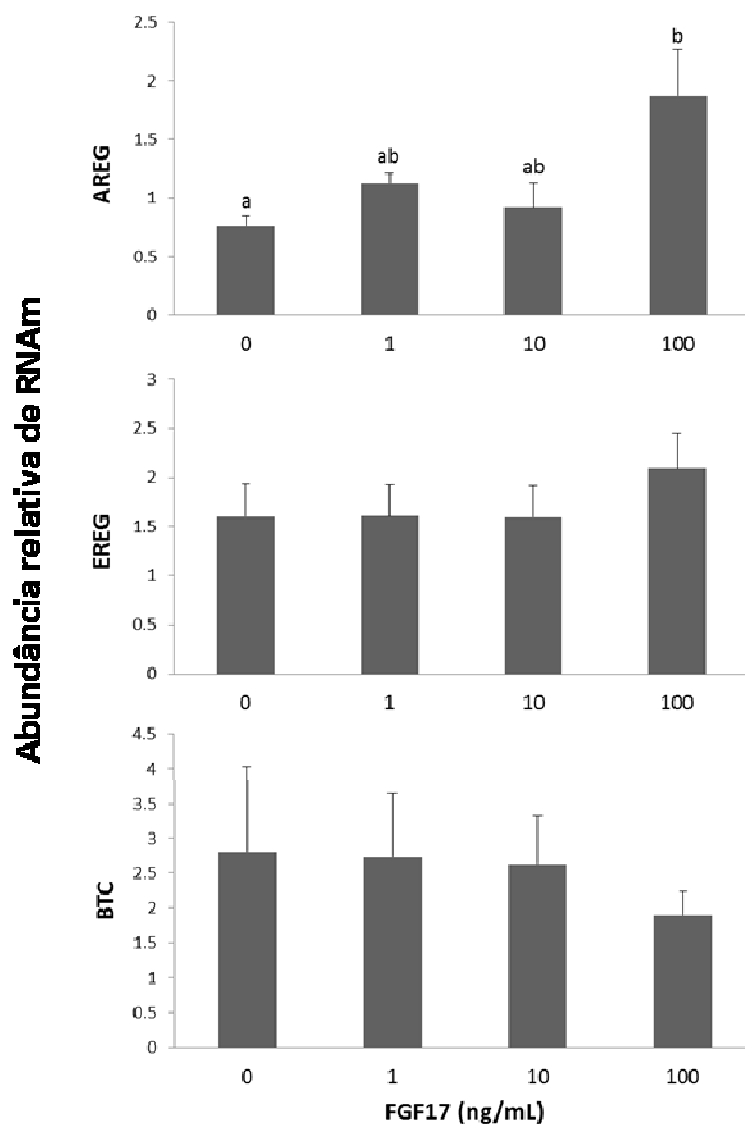


Figura 2. Efeito de doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10, 100 ng/mL) sobre a abundância relativa de RNAm dos EGF-like (AREG, EREG e BTC) em células do *cumulus* cultivadas por 22 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM) calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e em relação a uma amostra calibradora. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.

O FGF17 não alterou a abundância relativa de mRNA dos genes indutores da expansão do *cumulus* (COX2, HAS2, TSG6 e PTX3; Figura 3) às 22 horas de maturação.

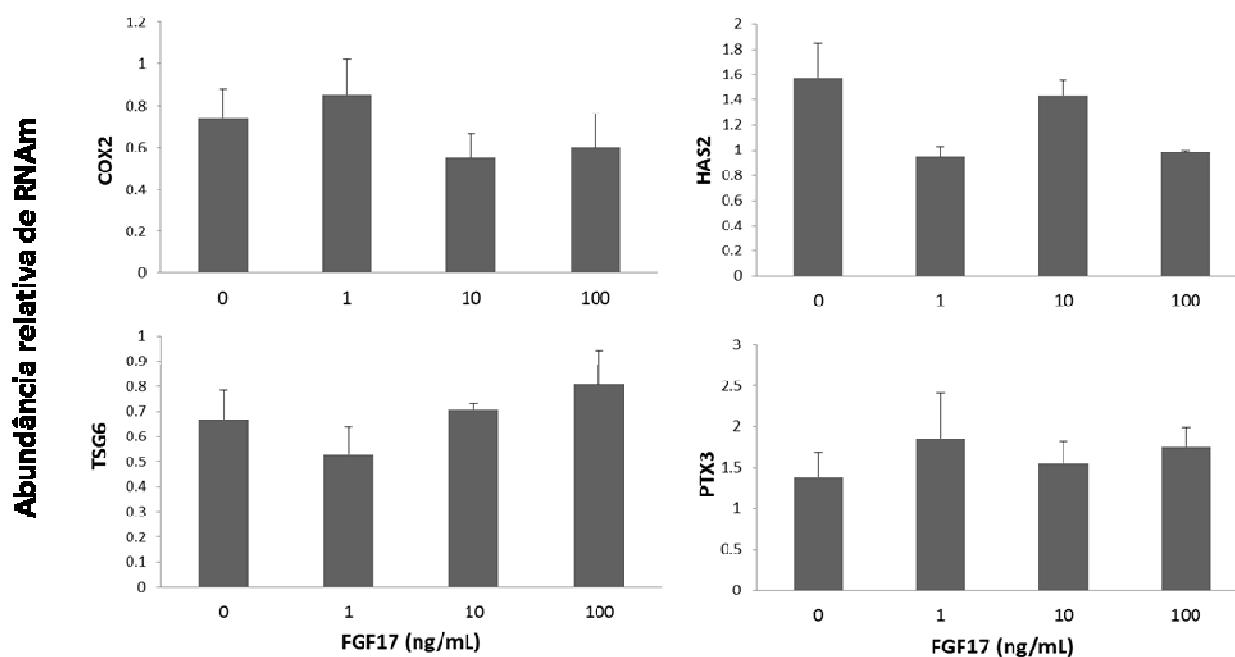


Figura 3. Efeito de doses crescentes de FGF17 (0, 1, 10, 100 ng/mL) sobre a abundância relativa de RNAm de genes indutores da expansão (COX2, HAS2, TSG6 e PTX3) em células do *cumulus* cultivadas por 22 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM) calculados pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e em relação a uma amostra calibradora. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de quatro repetições para cada tratamento.

Experimento 2

Efeito do FGF17 sobre a expressão de genes indutores da expansão do cumulus e EGF-like ao longo da maturação de COCs

Uma vez determinada a dose de FGF17 capaz de estimular a expansão do *cumulus* no final da maturação, testou-se o efeito do FGF17 na regulação da expressão de genes da expansão ao longo da maturação. A expressão de todos os genes, com exceção da BTC, aumentou durante a maturação *in vitro*, independente da presença do FGF17. A BTC diminuiu significativamente com o tempo de cultivo (figura 4). Os níveis de RNAm para todos os genes foram significativamente maiores após 4 horas de cultivo quando comparados com células do *cumulus* imaturas (figuras 4 e 5). Maiores níveis de RNAm para

AREG e EREG foram observados às 8 horas de maturação. Já a abundância relativa de TSG6 e PTX3 aumentou às 12 horas e manteve-se estimulada até às 22 horas de cultivo (figura 5). O FGF17 não alterou a expressão de nenhum dos genes investigados em diferentes momentos da MIV.

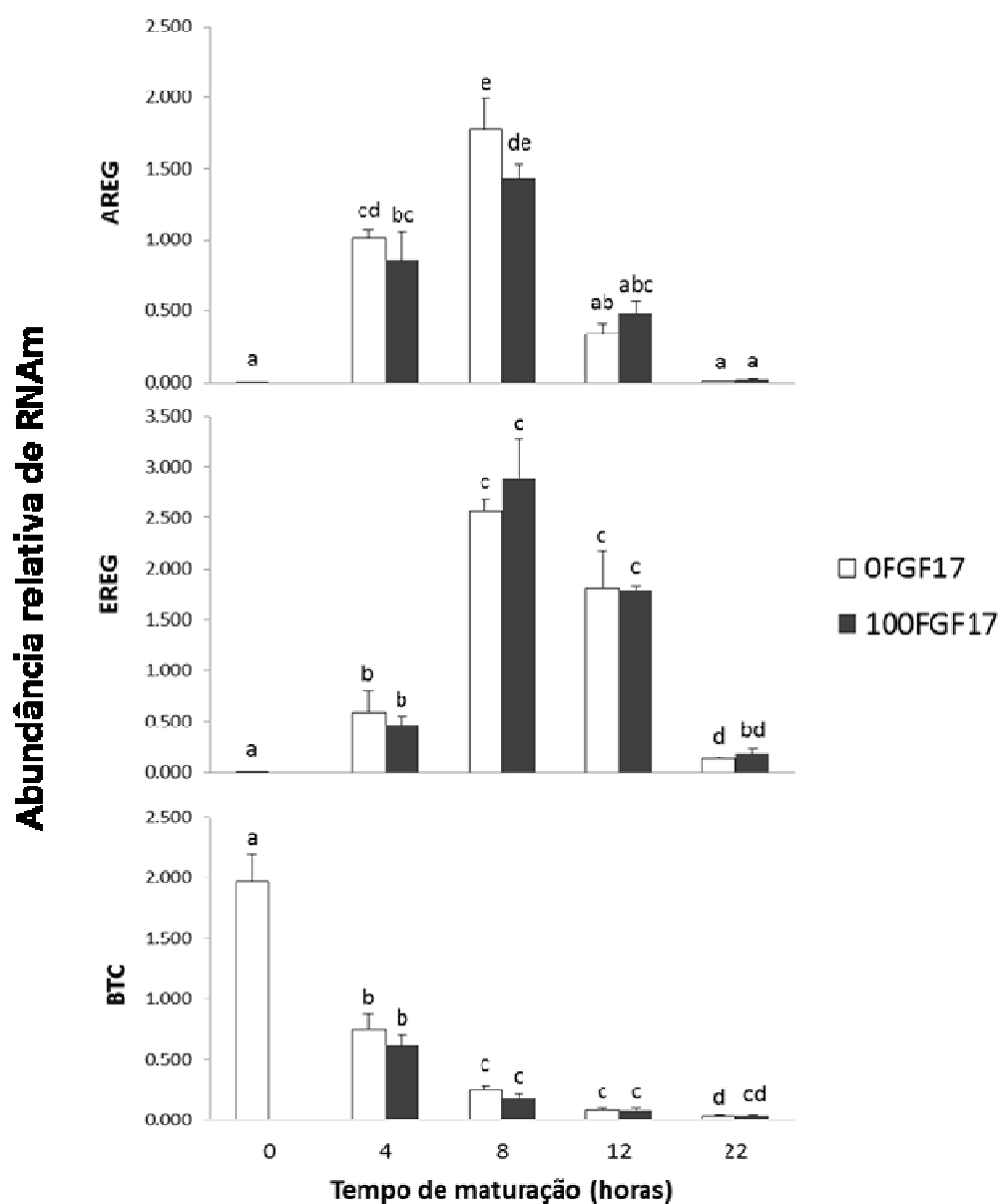


Figura 4. Efeito do FGF17 e do tempo ao longo da maturação sobre a abundância de mRNA de AREG, EREG e BTC. Os COCs foram cultivados por 4, 8, 12 e 22 horas. Grupos de COCs imaturos foram utilizados para representar 0 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de três repetições para cada tratamento.

Abundância relativa de RNAm

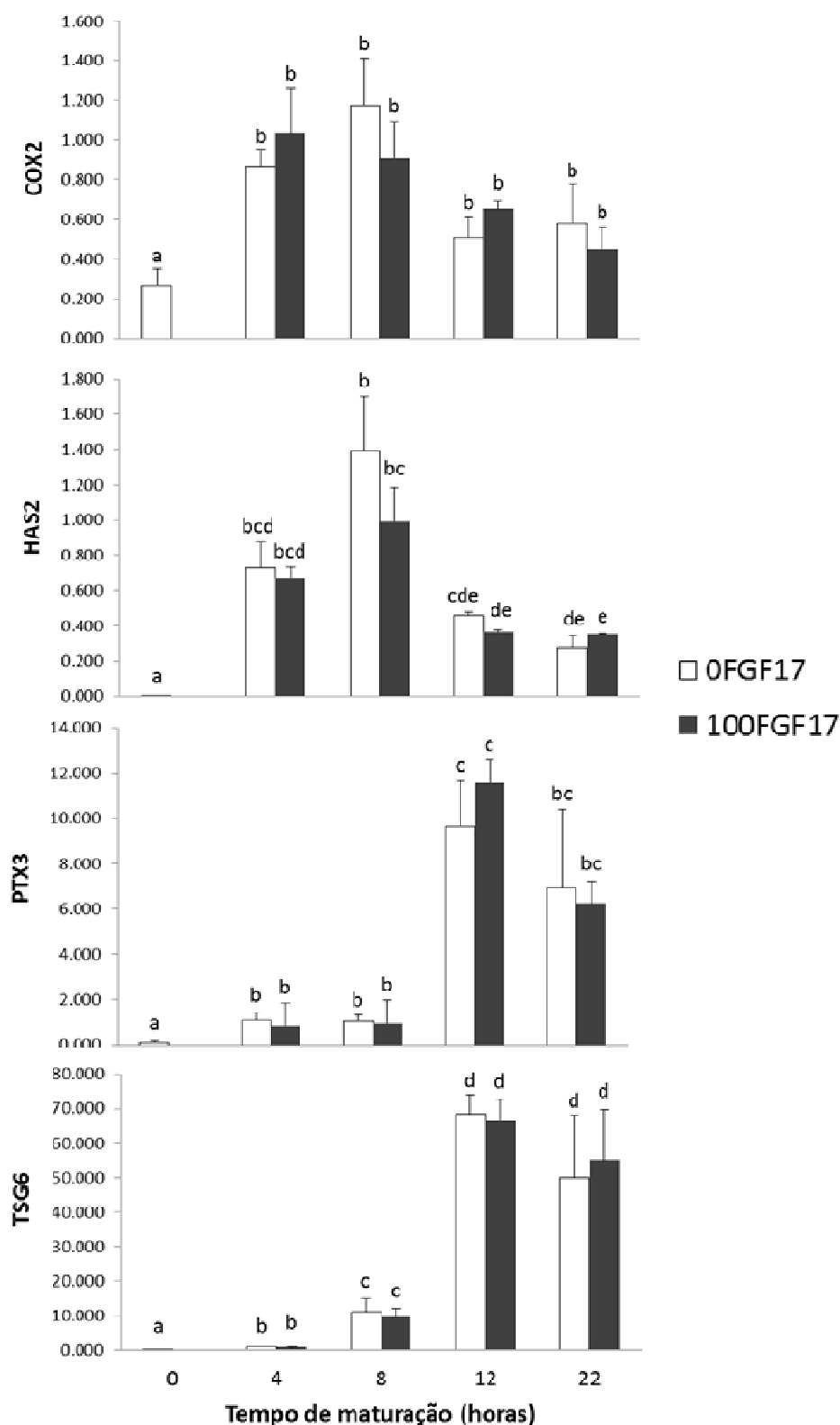


Figura 5. Efeito do FGF17 e do tempo ao longo da maturação sobre a abundância de mRNA de COX2, HAS2, TSG6 e PTX3. Os COCs foram cultivados por 4, 8, 12 e 22 horas. Grupos de COCs imaturos foram utilizados para representar 0 horas. Os dados são apresentados como média ($\pm$ EPM).

Barras com letras diferentes representam diferença significativa para efeito do tempo de maturação ($p < 0,05$). Os dados foram obtidos de três repetições para cada tratamento.

DISCUSSÃO

Estratégias para o desenvolvimento de um sistema de cultivo que aumente a eficiência da MIV podem ser alcançadas através da melhor compreensão dos eventos moleculares que levam a maturação dos oócitos, de modo que estes eventos possam ser reproduzidos *in vitro*. Nesse sentido, a adição de proteínas exógenas ao meio de maturação, principalmente fatores de crescimento, têm sido foco de diversos estudos devido a importância de fatores produzidos pelo oócito ou pelas células somáticas que são alterados quando da retirada do COC do folículo ovariano. Sendo assim, os FGFs têm sido incluídos dentre os fatores considerados importantes para a produção *in vitro* de embriões. O FGF2 por exemplo é considerado um biomarcador de oócito de alta qualidade em humanos (van Montfoort *et al.*, 2008). Enquanto que o FGF10 melhora tanto a maturação quanto a taxa de produção de blastocisto em bovinos (Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009).

No presente trabalho, demonstramos que a suplementação com FGF17 é capaz de potencializar a expansão das células do *cumulus* em bovinos. O processo de expansão é essencial tanto para a ovulação normal quanto para a subsequente fertilização (Sirard & Lambert, 1985; Vanderhyden & Armstrong, 1989). Diversos trabalhos têm associado o grau de expansão do *cumulus* com a taxa de desenvolvimento embrionário (Furnus *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1993). Em COCs retirados dos folículos e cultivados, a expansão ocorre na presença de FSH ou EGF no meio (Chen *et al.*, 1994; Downs 1989). Os genes que codificam os componentes da matriz extracelular são induzidos pelo FSH e EGF, incluindo a HAS2, enzima que sintetiza o esqueleto da matriz do *cumulus* (Tirone *et al.*, 1997; Elvin *et al.*, 1999; Dragovic *et al.*, 2005) e as proteínas ligadoras de hialurona como a TSG6 e a PTX3, essenciais para a formação e estabilidade do complexo (Fulop *et al.*, 1997; Varani *et al.*, 2002). Outra importante enzima durante o processo de expansão do *cumulus* é a COX2, que

leva a produção de prostaglandinas e induz mudanças na expressão de genes críticos para a expansão e ovulação. Todos esse fatores indutores da expansão têm sido associados à competência oocitária (McKenzie *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005) e são consequentemente importantes para a fertilidade.

De fato no presente estudo, o FSH estimulou a expressão dos genes indutores da expansão na maturação *in vitro*. Como previsto, os genes responsáveis pela formação da matriz, HAS2 e COX2, foram estimulados logo no início da maturação, de forma semelhante ao observado em estudo anterior focando a maturação *in vitro* de COCs bovinos (Schoenfelder & Einspanier, 2003). Em primatas, os níveis de RNAm da HAS2 aumentaram no folículo 12 horas após tratamento com hCG *in vivo* e voltaram aos níveis do controle 24 horas após o tratamento, embora não tenha sido avaliado nenhum momento anterior às 12 horas de maturação (Xu *et al.* 2011). Já a TSG6 e a PTX3, responsáveis pela estabilidade da matriz após a sua formação, tiveram o pico de abundância de RNAm às 12 horas de maturação, mantendo-se estimuladas até às 22 horas. Esse padrão de expressão do RNAm da TSG6 está de acordo com outros estudos realizados em células da granulosa murais de bovinos e primatas após estímulo pelo hCG (Sayasith *et al.*, 2008;. Xu *et al.* 2011). Em camundongos, as mudanças temporais da expressão de HAS2, PTX3 e TSG6 após estímulo gonadotrófico *in vivo* são muito mais rápidas e de menor duração do que observado em bovinos e primatas (Fulop *et al.*, 1997;. Ochsner *et al.*, 2003), consistente com a menor duração do período entre o pico de LH e a ovulação em roedores, em comparação com vacas e primatas (Sirois *et al.*, 2004).

Apesar de promover a expansão do *cumulus* em bovinos, o FGF17 não foi capaz de estimular a expressão dos genes indutores de expansão. Diferentemente das ações do FGF10, que também melhorou a expansão do *cumulus* (Caixeta *et al.*, 2011 Zhang *et al.*, 2010) porém estimulou a COX2, a PTX3 e a TSG6 ao longo da MIV (Caixeta *et al.*, 2011). Esses dados indicam que os FGF17 e FGF10 atuam em diferentes mecanismos para estimular a expansão e esse fato pode ser explicado pela ativação de receptores específicos para FGF17 e FGF10; o FGF17 ativa os FGFR3c, FGFR4 e FGFR2c enquanto que o FGF10 ativa os FGFR1b e FGFR2b (Zhang *et al.*,

2006). Os FGFR1b, 2b, 2c, 3c e 4 foram identificados em células do *cumulus* bovinas (Zhang *et al.*, 2010) e dados de nosso laboratório sugerem a regulação da expressão desses receptores ao longo da maturação *in vitro*, o que fortalece a hipótese de participação tanto de receptores para FGF17 quanto para FGF10 na regulação da diferenciação do *cumulus*. Contudo, ações distintas para os FGFs já foram descritas a partir da ligação de diferentes receptores no mesmo tipo celular (Zhang *et al.*, 2006).

Outra possível explicação seria que as ações do FGF17 poderiam ser mediadas por genes anteriores na cascata ovulatória. Recentemente diversos trabalhos têm demonstrado que os peptídeos EGF-like, AREG, EREG e BTC, são os principais propagadores dos sinais gonadotróficos nas células do *cumulus* (Edson *et al.*, 2009). Esses fatores de crescimento ativam via EGFRs a cascata RAS/MAPK, atuando como mediadores intrafoliculares para estimular a expansão do *cumulus*, maturação oocitária e ovulação (Park *et al.*, 2004; revisado por Sun *et al.*, 2009). Contudo, embora o FGF17 tenha aumentado a expressão da AREG às 22 horas da MIV, esse efeito não foi observado quando avaliou-se os efeitos da dose efetiva de FGF17 em potencializar a expansão sobre a expressão gênica em diferentes momentos da MIV. Esta aparente discrepância entre os resultados dos experimentos 1 e 2 do presente trabalho é decorrente da menor expressão da AREG às 22 horas em relação às 4, 8 e 12 horas e da análise conjunta dos dados obtidos em diferentes momentos. Os resultados do experimento 2 mostram que mesmo na presença de FGF17, a expressão da AREG é bem inferior a momentos anteriores e que é improvável que a AREG medie os efeitos do FGF17 sobre a expansão do *cumulus*. Além disso, resultados anteriores e do presente trabalho demonstram que a estimulação da expressão dos fatores EGF-like (AREG e EREG) ocorre em resposta ao FSH e é anterior aos genes indutores de expansão na cascata ovulatória. Em adição, a expansão do *cumulus* já pode ser visualizada a partir das 12 horas de maturação, portanto é improvável que o FGF17 tenha melhorado a expansão via ativação da transcrição da AREG que ocorreu somente ao final da maturação, momento que a expansão já está completa.

Os padrões temporais de expressão da BTC também foram avaliados e diferem do que foi observado em outras espécies. Diferentemente de camundongos, onde a BTC foi estimulada por gonadotrofinas em células da granulosa (Park *et al.*, 2004). No presente estudo, os níveis de RNAm da BTC diminuíram em células do *cumulus* com o tempo de cultivo e presença de FSH. Este achado condiz com o observado em folículos ovulatórios bovinos após injeção de GnRH (Li *et al.*, 2009), em células do *cumulus* de suínos (Procházka *et al.*, 2011) e células da granulosa de primata após estimulação gonadotrófica *in vivo* (Fru *et al.*, 2007). Esses dados indicam que mecanismos espécie específicos controlam os eventos iniciais da cascata ovulatória.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a adição do FGF17 exógeno é capaz de potencializar a expansão das células do *cumulus* durante a MIV em bovinos. Os mecanismos pelos quais o FGF17 regula a expansão aguardam para serem identificados, mas diferentemente do previamente observado para o FGF10, não parecem envolver o controle transcricional dos genes indutores de expansão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos últimos anos os FGFs têm sido incluídos dentre os fatores considerados importantes para o desenvolvimento folicular ovariano. Alguns membros das 7 subfamílias de FGFs foram identificados como potenciais reguladores da esteroidogênese, atresia folicular e maturação do complexo *cumulus*-oócito por meio da ativação de diferentes receptores. O presente trabalho descreve padrões de expressão inéditos que sugerem a participação de membros da subfamília do FGF9 (FGF16 e FGF20) no controle da regressão folicular e da interação *cumulus*-oócito. Por outro lado, dados também inéditos indicam que o FGF17 regula a expansão das células do *cumulus*, o que do ponto de vista aplicado pode ser uma importante ferramenta para a melhoria dos meios da MIV e consequentemente para a produção *in vitro* de embriões. Os mecanismos pelos quais atuam o FGF17 na expansão diferem do FGF10, o que demonstra que a sinalização por meio de diferentes receptores deva regular de forma específica a diferenciação das células do

cumulus bovinas e conhecer esses mecanismos é importante como conhecimento básico. A partir desse trabalho propõe-se a investigação dos mecanismos envolvidos nas ações do FGF17 na expansão e a avaliação de seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., Ginther, O.J 1992.. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fertil., v.94, p.177-88.
- Albertini; D.F.; Combelles, C.M.H.; Benecchi, E.; Carabatsos, M.J. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction, v.121, p.647-653.
- Albuz, F.K., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D.T., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B. 2010 Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): A novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. Hum Reprod.
- Anderson, E., and Albertini, D.F. 1976 Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. J Cell Biol 71(2), 680-6.
- Asakai, R., Song, S.Y., Itoh, N., Yamakuni, T., Tamura, K., Okamoto, R., 1995. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. Mol. Cell. Endocrinol. 114, 75-80.
- Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A (2005) Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. Endocrinology 146, 77-84.
- Assidi, M., Dieleman S.J. and Sirard M. 2010. *Cumulus* cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence Reproduction 140 835–852.
- Bao, B., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Salfen, B.E., Youngquist, R.S., 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. Biol. Reprod. 56, 1158–1168.
- Basílico, C. and Moscatelli, D. 1992 The FGF family of growth factors and oncogenes. Adv. Cancer Res. v.59, p. 115-65.
- 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 12, 413–419.
- Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Seger R, Ron-El R, Amsterdam A 2006. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. Mol Hum Reprod 12, 593–599.

- Ben-Haroush, A., Abir, R., Ao, A., Jin, S., Kessler-Icekson, G., Feldberg, D., Fisch, B., 2005. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertil. Steril.* 84, 1257–1268.
- Berisha, B., Sinowatz, F., Schams, D., 2004. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 162-171.
- Berisha, B., Steffl, M., Amselgruber, W., Schams, D., 2006. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction.* 131, 319-329.
- Beverdam, A., Koopman, P., 2006. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15, 417-431.
- Bowles, J., Feng, C.W., Spiller, C., Davidson, T.L., Jackson, A., Koopman, P., 2010. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev. Cell.* 19, 440-449.
- Buratini, J. Jr., Pinto, M.G., Castilho, A.C., Amorim, R.L., Giometti, I.C., Portela, V.M., Nicola, E.S., Price, C.A., 2007. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 77, 743-750.
- 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., 2005. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction.* 130, 343-350.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Caixeta, E.S. ; Fernandes, M.F. ; de Lima, P.F ; Bueno da Silva, R. ; Castilho, A. C. S. ; Price, C. ; Buratini, J. 2011 Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and fibroblast growth factor 10 (FGF10) stimulate *cumulus* expansion and differently regulate transcription of expansion inducing genes in bovine cumulus cells. In: 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2011, Portland - Oregon / USA. *Biology of Reproduction*, 2011. v. 85. p. 219-219.
- Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ (2001) Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine *cumulus in vitro*. *Biol Reprod* 65, 135–140.
- Campbell B. K 1999. The Modulation of Gonadotrophic Hormone Action on the Ovary by Paracrine and Autocrine Factors. *Anat. Histol. Embryol.* v. 28, p. 247-251.

- Chen L, Russell PT & Larsen WJ 1993 Functional significance of *cumulus* expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the *cumulus* mass. *Molecular Reproduction and Development* 34 87–93.
- Chen I, Russell PT, Larsen WJ 1994 Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse *cumulus* oocyte expansion *in vivo*. *Biol Reprod* 51:290–295
- Cheon, H.G., LaRochelle, W.J., Bottaro, D.P., Burgess, W.H., Aaronson, S.A., 1994. High affinity binding sites for related fibroblast growth factor ligands reside within different receptor immunoglobulin-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 989–993.
- Chi, L., Itäranta, P., Zhang, S., Vainio, S., 2006. Sprouty2 is involved in male sex organogenesis by controlling fibroblast growth factor 9-induced mesonephric cell migration to the developing testis. *Endocrinology*. 47, 3777–3788.
- Chun, S.Y., Billig, H., Tilly, J.L., Furuta, I., Tsafiriri, A., Hsueh, A.J.W., 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous IGF-I. *Endocrinology*. 135, 1845–1853.
- Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ (2006) Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715–723.
- Crossley, P.H. and Martin, G.R. 1995 The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, v.121, p.439–51.
- Danilenko D. M., Montestrucque S., Philo J. S., Li T., Hill D., Speakman J., Bahru M., Zhang M., Konishi M., Itoh N., Chirica M., Delaney J., Hernday N., Martin F., Hara S., Talvenheimo J., Narhi L. O., Arakawa T. 1999. Recombinant Rat Fibroblast Growth Factor-16: Structure and Biological Activity. *Archiv Bioch Bioph*, 361 (34–46).
- Das, K., Phipps, W.R., Henleigh, H.C., Tagatz, G.E. 1992. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. *Fertil Steril.*;57(4):895–901.
- Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. 1999 Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin- 1 β . *Endocrinology*; 140: 2685–2695.
- De La Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ 1999 Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* 14:3060–3068
- Dekel N, Sherizly I 1985 Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116:406–409
- Diaz, F.J., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. 2006. The preantral granulosa cell to *cumulus* cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol*. 1;299(1):91–104.
- Dode MA, Dufort I, Massicotte L & Sirard MA 2006 Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development* 73 288–297.
- Downs SM 1989 Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and *cumulus* oophorus *in vitro*. *Biol Reprod* 41:371–379

- Downs SM, Chen J (2008) EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of *cumulus*cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 75, 105–114.
- Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ 1988 Induction of maturation in *cumulus*cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool* 245:86–96
- Downs SM. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and *cumulus*oophorus *in vitro*. *Biol Reprod.* 41(2):371-9.
- Dragovic, R.A., Ritter, L.J., Schulz, S.J., Amato, F., Armstrong, D.T., and Gilchrist, R.B. 2005 Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse *cumulus*expansion. *Endocrinology* 146(6), 2798-806.
- Drummond, A.E., Tellbach, M., Dyson, M., Findlay, J.K., 2007. Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology.* 148, 3711-3721.
- Edson MA, Nagaraja AK & Matzuk MM 2009 The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews* 30 624–712.
- Egan JE, Hall AB, Yatsula BA & Bar-Sagi D 2002 The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human sprouty proteins. *PNAS* 99 6041–6046.
- Elvin, J.A. and Matzuk, M.M. 1998. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod.*, 3(3):183-95.
- Eppig, J.J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-*cumulus*cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*, 11;281(5731):483-4.
- Eppig, J.J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-*cumulus*cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*, 11;281(5731):483-4.
- Eppig, J.J. 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6), 829-838.
- Eswarakumar, V.P.; Lax, I.; Schlessinger, J. 2005 Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.16(2), p.139-149.
- Fair T. 2003 Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 15;78(3-4):203-16.
- Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR, Kennedy-Stoskopf S. 2007. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 2007 98(1-2):97-112.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., and Royere, D. 2007 Gene expression in human *cumulus*cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 22(12), 3069-77.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-tran, R., Guérif, F., Royère, D. 2006 Oocyte-*cumulus*dialog *Gynecol Obstet Fertil.*; 34(9):793-800.
- Fields SD, Hansen PJ, Ealy AD. 2011 Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology.* 75(8):1466-75.
- Ford-Perriss M, Abud H & Murphy M 2001 Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28 493-503.

- Ford-Perriss, M., Abud H. and Murphy M. 2001. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28, 493–503.
- Fortune, J.E. 1994 Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, v.50, p.225-32.
- Fortune, J. E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 135–163.
- Fru KN, Cherian-Shaw M, Puttabyatappa M, VandeVoort CA, Chaffin CL 2007 Regulation of granulosa cell proliferation and EGF-like ligands during the periovulatory interval in monkeys. *Hum Reprod* 22, 1247–1252.
- Fulop C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, Glant TT, Hascall VC 1997 Coding sequence, exon–intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding *cumulus* cell–oocyte complexes. *Gene* 202, 95–102.
- Fulop C, Szanto S, Mukhopadhyay D, Bardos T, Kamath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT et al. 2003 Impaired *cumulus* mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development* 130 2253–2261.
- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF 1998 *Cumulus* expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 51, 76–83.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14, 159–177.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., and Armstrong, D.T. 2004 Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83, 431-46.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K. 1996 Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-94.
- Ginther O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K. 2001 Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, v.65, p.638-47.
- Goldfarb M. 2001. Signaling by Fibroblast Growth Factors: The Inside Story *Sci. STKE* (106), pe37.
- Gong, J.G., Campbell, B.K., Bramley, T.A., Gutierrez, C.G., Peters, A.R.; Webb, R. 1996 Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, v.55, p.68-74.
- Greene, J.M., Li, Y.L., Yourey, P.A., Gruber, J., Carter, K.C., Shell, B.K., Dillon, P.A., Florence, C., Duan, D.R., Blunt, A., Ornitz, D.M., Ruben, S.M., Alderson, R.F. 1998. Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. *Eur. J. Neurosci.*, v.10, p.1911-25.
- Grimes, R.W., Ireland, J.J., 1986. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 35, 725-732.

- Grotowski, W., 1997. The role of apoptosis of granulosa cells in follicular atresia. *Ginekol Pol.* 68, 317-26.
- Gutiérrez, C.G., Campbell, B.K., Webb, R., 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 56, 608-616.
- Haghighat, N. and Van winkle, L.J. 1990. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *J. Exp. Zool.* 253, 71–82.
- Harper, K.M. and Brackett, B.G. 1993. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. *Zygote*;1(1):27-34.
- Hess KA, Chen L & Larsen WJ 1999 Inter- α -inhibitor binding to hyaluronan in the *cumulus* extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 61 436–443.
- Holbro T. and Hynes NE 2004 ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:195-217.
- Hoshikawa M., Ohbayashi N., Yonamine A., Konishi M., Ozaki K., Fukui S., Itoh N., 1998 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.
- Hsieh, M. and Conti M. 2005. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab.*; 16(7):320-6.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB (2005) Oocytes prevent *cumulus* cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 118, 5257–5268.
- Igarashi, M., Finch, P. W., Aaronson, S. A., 1998 Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 13230-13235.
- Igarashi, M., Finch, P. W., Aaronson, S. A., 1998 Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, v.273, p. 13230-13235.
- Ireland, J., Good, T., Knight, P., Ireland, J., 1994. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50, 1265-1276.
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* 20, 563-569.
- Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. 1998. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev.* Apr;49(4):444-53.
- Jeffers M., Shimkets R., Prayaga S., Boldog F., Yang M., Burgess C., Fernandes E., Rittman B., Shimkets J., Larochelle W. J., Lichenstein H. S. 2001. Identification of a novel human fibroblast growth factor and characterization of its role in oncogenesis. *Cancer Res*; 61:3131–3138.

- Johnson M.L., Redmer D.A., Reynolds L.P., Bilski J.J., Grazul-bilska A.T. 2002. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine*. 18(3):261-70
- Kastrop PM, Hulshof SC, Bevers MM, Destree OH & Kruip TA 1991 The effects of a-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 28 249–254.
- Kirikoshi H., Sagara N., Saitoh T., Tanaka K., Sekihara H., Shiokawa K., Katoh M. 2000. Molecular Cloning and Characterization of Human FGF-20 on Chromosome 8p21.3-p22. *Bioch Bioph Research Commun* 274, 337–343.
- Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on *in vitro* maturation of *cumulus*cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* v. 100(2) p. 439-46.
- Konishi M., Mikami T., Yamasaki M., Miyake A., Itoh N. 2000. Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 275:12119–12122.
- Krishner RL, Lane M, Bavister BD 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* v. 60(6) p. 1345-52.
- Latham, K.E., Bautista, D.M., Hirao, Y., O'Brien, M.J., Eppig, J.J. 1999. Comparison of protein synthesis patterns in mouse *cumulus*cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and insulin of granulosa cell differentiation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 61, 482– 492.
- Li Q., Jimenez-Krassel F., Ireland J.J. and Smith G.W. 2009 Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* 137 297–307.
- Li, Q., Rajanahally, S., Edson, M.A., and Matzuk, M.M. 2009 Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. *Mol Hum Reprod* 15(12), 779-88.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM & Dey SK 1997 Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91 197–208.
- Lin H., Kaplow J., Jaye M., Hayman M.J. 1997 Ligand-Binding specificity of human fibroblast growth factor receptor-3 IIIc *FEBS Letters* 411, 389-392.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendockt, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod.*; 54(6):1420-9.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I. 1994 Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. v.37, 48-53.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. 1994 Enhancement of *cumulus*expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of

- epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil.* 101(3):697-701.
- Lorenzo, P.L., Rebollar, P.G., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., Alvariño, J.M. 1996. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 1996 May;107(1):109-17.
- Machado M.F., Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 17 e 18 (FGF17 e FGF18) em folículos antrais bovinos. 2008. Dissertação de mestrado. UNESP – Botucatu.
- Machado, M.F., Portela, V., Price, C., da Costa, I., Ripamonte, P., Amorim, R., Buratini, J.J., 2009. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J. Endocrinol.* 202, 347-353.
- Maher P. A. Nuclear Translocation of Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptors in Response to FGF-2 1996. *The Journal of Cell Biology*, 134 (2) 529-536.
- Manuel Silva, J., Price, C.A., 2000. Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450 Aromatase and Cholesterol Side-Chain Cleavage in Bovine Granulosa Cells *In vitro*. *Biol. Reprod.* 62, 186-191.
- Maruoka Y, Ohbayashi N, Hoshikawa M, Itoh N, Hogan BL, Furuta Y. 1998 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.
- Mason, I.J., 1994. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell.* 78, 547–552.
- Massagué J, Pandiella A. 1993 Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 62:515-41.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM & Eppig JJ 2002 Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296 2178–2180.
- McKenzie L J, Pangas S A, Carson S A, Kovanci E, Cisneros P, Buster J E, Amato P, Matzuk M M (2004) Human *cumulus*granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19, 2869–2874.
- McNatty, K.P., Heath, D.A., Lindy, F., Fidler, A.E., Quirke L., O'Connell A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D.J. 1999 Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*54, p.3-16.
- 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. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*, v.128, p.379-386.
- Mehlmann, L.M., Jones, T.L., and Jaffe, L.A. 2002 Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297(5585), 1343-5.
- Mihm, M., Bleach, E.C. 2003 Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78(3-4), p.217-37.
- Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Arakawa, T., and Itoh, N. 1998 . Structure and expression of a novel member, FGF-16, on the fibroblast growth factor family *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 243, 148–152.

- Miyamoto, M., Naruo, K., Seko, C., Matsumoto, S., Kondo, T., Kurokawa, T. 1993. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4251–4259.
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Yamashita, M., Inagaki, K., Nakamura, E., Tsukamoto, N., Takeda, M., Suzuki, J., Makino, H., 2010. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 325, 84-92.
- Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clément, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P., Mariana, J.C. 1997 Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 51, p.3-23.
- Monniaux, D., Monget, P., Besnard, N., Huet, C., Pisselet, C. 1997 Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, v.47, p.3-12.
- Motlik J, Fulka J Jr, Prochazka R, Rimkeviciova Z, Kubelka M & Fulka J 1989 RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of *cumulus* cells. *Reproduction, Nutrition, Development* 29 601–609.
- Nagyova E, Nemcova L & Prochazka R 2009 Expression of tumor necrosis factor α -induced protein 6 messenger RNA in porcine preovulatory ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Development* 55 231–235.
- Nautiyal, J., Steel J.H., Rosell, M.M., Nikolopoulou, E., Lee, K., DeMayo, F.J., White, R., Richards J.S. and Parker M.G. 2010. The Nuclear Receptor Cofactor Receptor-Interacting Protein 140 Is a Positive Regulator of amphiregulin Expression and *Cumulus* Cell-Oocyte Complex Expansion in the Mouse Ovary *Endocrinology* 151:2923-2932.
- Nezu M., Tomonaga T., Sakai C., Ishii A., Itoga S., Nishimura M., Matsuo Y., Tagawa M., Nomura F. 2005 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.
- Nilsson, E., Parrott, J.A., Skinner, M.K., 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 175, 123-130.
- Ochsner SA, Russell DL, Day AJ, Breyer RM, Richards JS (2003) Decreased expression of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in *cumulus* cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology* 144, 1008–1019.
- Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Kimura, S., Yamasaki, M., Fukui, S., and Itoh, N. 1998 Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. *J. Biol. Chem.*, v.273, 18161–18164.
- Ohmachi S, Watanabe Y, Mikami T, Kusu N, Ibi T, Akaike A, Itoh N 2000 FGF-20, a novel neurotrophic factor, preferentially expressed in the substantia nigra pars compacta of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;277(2):355-60.
- Olsnes, S., Klingenberg, O., Wiedlocha, A., 2003. Transport of Exogenous Growth Factors and Cytokines to the Cytosol and to the Nucleus. *Physiological Reviews.* 83, 163-182.

- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M., 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292-15297.
- Parrott, J.A., Skinner, M.K., 1998. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology*. 139, 228-235.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 1991; 129:3200–3207.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Portela, V.M., Machado, M., Buratini, J. Jr., Zamberlam, G., Amorim, R.L., Goncalves, P., Price, C.A., 2010. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 83, 339-46.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W. and Wellstein A., 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer*. 7, 165-197.
- Prigent SA, Lemoine NR. 1992 The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res.* 4(1):1-24.
- Procházka R, Petlach M, Nagyová E, Nemcová L (2011) Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig *cumulus* cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. *Reproduction* 141, 425–435.
- Prochazka R, Srsen V, Nagyova E, Miyano T & Flechon JE 2000 Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte–*cumulus* cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Molecular Reproduction and Development* 56 63–73.
- Quirk S. M., Cowan R. G., Harman R. M., Hu C. L., Porter D. A. 2004 Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Science*, v. 82, p. 40-52.
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Harman, R.M., Hu, C.L., Porter, D.A., 2004. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82, 40-52.
- Ralph J.H., Telfer E.E. and Wilmot 1995 Bovine *Cumulus* Cell Expansion Does Not Depend on the Presence of an Oocyte Secreted Factor, *Molecular, reproduction and development* 42:248-253.
- Ralph JH, Telfer EE, Wilmot I. 1995. Bovine *cumulus* cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol Reprod Dev.* 1995, n.42, v.2, p.248-53.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 339, 62-66.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL (2002) Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 64, 69–92.

- Rieger, D., Luciano, A.M., Modina, S., Pocar, P., Lauria, A., Gandolfi, F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. J Reprod Fertil.; 112(1):123-30.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP & Lonergan P 2002 Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Molecular Reproduction and Development 61 234–248.
- Rizos, D.; Lonergan, P.; Boland, M. P.; Arroyo-Garcia, R.; Pintado, B.; de la Fuente, J.; Gutierrez-adan, A. 2002 Analysis of Diferencial Menssager RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. Biol. Reprod., Champaign v.66, 589-595.
- Robert C, Gagne D, Bousquet D, Barnes FL & Sirard MA 2001 Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. Biology of Reproduction 64 1812–1820.
- Russell DL and Salustri A. 2006 Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. Semin Reprod Med. 24(4):217-27.
- Sahin U., Weskamp G., Kelly K., Zhou H., Higashiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P. and Blobel C.P. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. The Journal of Cell Biology, 164 (5) 769–779.
- Sayasith K, Bouchard N, Doré M, Sirois J (2008) Regulation of bovine tumor necrosis factor- α -induced protein 6 in ovarian follicles during the ovulatory process and promoter activation in granulosa cells. Endocrinology 149, 6213–6225.
- Schams, D., Steinberg, V., Steffl, M., Meyer, H.H., Berisha, B., 2009. Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. Reproduction. 138, 141-9.
- Scherzer J, Ghuman SP, Pope M, Routly JE, Walter I, Smith RF, Dobson H. 2009 Follicle and oocyte morphology in ewes after treatment with insulin in the late follicular phase. Theriogenology. 15;71(5):817-28.
- Schoenfelder M, Einspanier R (2003) Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. Biol Reprod 69, 269–277.
- Shikone T, Yamoto M, Nakano R. 1992 Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. Endocrinology. 131(3):1063-8.
- Shikone, T., Yamoto, M., Nakano, R., 1992. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. Endocrinology. 131, 1063–1068.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS (2006) Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in *cumulus* oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. Mol Endocrinol 20, 1352–1365.

- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML & First NL 1989 Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 40 1257–1263.
- Sirard MA, Lambert RD. 1985 *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol Reprod.* 33(2):487-94.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1988 The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod.* 39(3):546-52.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006 Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 7;65(1):126-36.
- Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Dore M (2004) Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum Reprod Update* 10, 373–385.
- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D., Murison, J.G., 2001. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* 271, 171-82.
- Smits J, Cortvrindt R, Hu Y 1998 Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Hum Reprod* 13:664–669
- Sontag D.P. and Cattini P.A. 2003 Cloning and bacterial expression of postnatal mouse heart FGF-16. *Mol Cell Biochem.* 242(1-2):65-70.
- Spicer, L.J., Chamberlain, C.S., Maciel, S.M., 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22, 237–254.
- Su YQ, Sugiura K, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ (2010) Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Mol Endocrinol* 24, 1230–1239.
- Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ & Eppig JJ 2002 Mitogen activated protein kinase activity in *cumulus* cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and *cumulus* expansion in the mouse. *Endocrinology* 143 2221–2232.
- Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in *cumulus* cells. *Development.* 134, 2593-2603.
- Sunnarborg SW, Hinkle CL, Stevenson M, Russell WE, Raska CS, Peschon JJ, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Lee DC. 2002 Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem.* 277(15):12838-45.
- Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, M., Sato, B., Matsuo, H., and Matsumoto, K. 1992. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8928–8932.

- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M & de Kruif A 2002 Minireview: functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61 414–424.
- Tatemoto H & Terada T 1995 Time-dependent effects of cycloheximide and α -amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 43 1107–1113.
- Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A. 1997 Hyaluronan synthesis by mouse *cumulus* cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β 1). *J Biol Chem*. 21;272(8):4787-94.
- Törnell J, Billig H and Hillensjö T. 1991 Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum Reprod*. 6(3):411-22.
- Valve E, Penttilä TL, Paranko J, Härkönen P (1997) FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 173-177.
- Valve, E., Penttilä, T.L., Paranko, J., Harkonen, P., 1997. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 232, 173-177.
- van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL & Ayoubi TA 2008 Differential gene expression in *cumulus* cells as a prognostic indicator of embryo viability: amicroarray analysis. *Molecular Human Reproduction* 14 157–168.
- van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM. 1996 Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by *cumulus* cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev*; 45: 218-224.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. 1989 Role of *cumulus* cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*. 40(4):720-8.
- Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E, Dhawan A. 2003 Evaluation of members of the TGF β superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse *cumulus* expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl*. 61:55-70.
- Varani S, Elvin JA, Yan C, DeMayo J, DeMayo FJ, Horton HF, Byrne MC, Matzuk MM. 2002 Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol*. 16(6):1154-67.
- Vernon, R.K., Spicer, L.J., 1994. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J. Anim. Sci*. 72, 2696-2702.
- Wang X, Schutzkus V, Huang W, Rosa GJ, Khatib H. Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF2 with fertilization rate and early embryonic survival. *Anim Genet* 2009;40:722– 8.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA & Armstrong DG 2003 Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement* 61 71-90.

- Wesche, J., Malecki, J., Wiedlocha, A., Skjerpen, C.S., Claus, P., Olsnes, S., 2006. FGF- 1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 281, 11405–11412.
- Wright TJ, Hatch EP, Karabagli H, Karabagli P, Schoenwolf GC, Mansour SL. 2003 Expression of mouse fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor genes during early inner ear development. *Dev Dyn.* 228(2):267-72.
- Xu F, Stouffer RL, Muller J, Hennebold JD, Wright JW, Bahar A, Leder G, Peters M, Thorne M, Sims M, Wintermantel T, Lindenthal B (2011) Dynamics of the transcriptome in the primate ovulatory follicle. *Mol Hum Reprod* 17, 152–165.
- Xu, J., Lawshe, A., Macarthur, C.A., Ornitz, D.M., 1999 Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17, *Mech. Dev.* 83, 165–178.
- Xu, J., Liu, Z., Ornitz, D.M., 2000 Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures, *Development* v.27, 1833–1843.
- Zamah A.M. 1, Hsieh M., Chen J., Vigne J.L., Rosen M.P., Cedars M.I. and Conti M. 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin *Human Reproduction*, 25, 10 2569–2578.
- Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M & Ornitz DM 2006 Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *Journal of Biological Chemistry* 281 15694-15700.
- Zhang, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D., 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*. 140, 815-26.
- Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D.M., 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* 281, 15694-15700.
- Zhong, W., Wang, Q.T., Sun, T., Wang, F., Liu, J., Leach, R., Johnson, A., Puscheck, E.E., Rappolee, D.A., 2006. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 540-550.
- Zuelke, K.A. and Brackett, B.G. 1992. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. *Endocrinology* 131, 2690-2696.