

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Dalila do Nascimento Reis

**FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) REGULA O
EFEITO DA PROGESTERONA E DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE
NO PERÍODO PRÓXIMO À OVULAÇÃO EM BOVINOS**

Santa Maria, RS

2022

Dalila do Nascimento Reis

**FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) REGULA O EFEITO
DA PROGESTERONA E DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE NO PERÍODO
PRÓXIMO À OVULAÇÃO EM BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Reis, Dalila do Nascimento

Fator de crescimento fibroblástico 18 (PGF18) regula o efeito da progesterona e do hormônio luteinizante no período próximo à ovulação em bovinos / Dalila do Nascimento Reis.- 2022.

77 p.; 30 cm

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Coorientador: Valério Valdetar Marques Portela Júnior
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Cultivo de células da granulosa. 2. Pré-ovulação.
3. Fator de crescimento fibroblástico 18. I. Bayard Dias Gonçalves, Paulo II. Valdetar Marques Portela Júnior, Valério III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt watta cma 10/1720.

Declaro, DALILA DO NASCIMENTO REIS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Dalila do Nascimento Reis

**FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) REGULA O EFEITO
DA PROGESTERONA E DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE NO PERÍODO
PRÓXIMO À OVULAÇÃO EM BOVINOS**

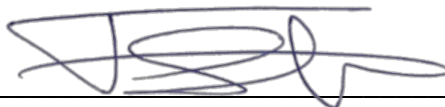
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência Animal**.

Aprovada em 15 de março de 2022:



Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD. (UFSM-UNIPAMPA)

(Presidente/Orientador)



Fernando Silveira Mesquita, PhD. (UNIPAMPA)



Juliana Germano Ferst, Dra. (USP)

Santa Maria, RS

2022

RESUMO

FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) REGULA O EFEITO DA PROGESTERONA E DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE NO PERÍODO PRÓXIMO À OVULAÇÃO EM BOVINOS

AUTORA: Dalila do Nascimento Reis

ORIENTADOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

O pico ovulatório do hormônio luteinizante (LH) inicia uma cascata de eventos nos folículos pré-ovulatórios que culminam com a ruptura da parede folicular e com a liberação de um complexo cúmulus-oócito apto a ser fertilizado. Ao longo dos últimos anos, mais detalhes têm sido descritos sobre a indução da cascata de eventos intrafoliculares pelo pico de LH, caracterizado por estimular a enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) demonstrando o envolvimento de fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like factors*), tais como ampirregulina (AREG) e epirregulina (EREG). Esses fatores foram identificados como genes rapidamente induzidos pelo LH nas células da granulosa e pelo EGF nas células do cumulus. A liberação dos *EGF-like factors* da membrana plasmática depende da síntese da família de proteínas ADAM, entre as quais estão o ativador do plasminogênio uroquinase (PLAU), ativador do plasminogênio tecidual (PLAT) e as metaloproteases e desintegrinas. O aumento da expressão das metaloproteases e desintegrinas depende de uma diminuição da expressão dos inibidores de protease do tipo serina (SERPINS 1 e 2) ao longo do processo da ovulação em diferentes espécies. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa revelou que existe uma ligação entre os efeitos de LH e a expressão do fator de crescimento fibroblástico 18 (FGF18) nas células da teca e que o FGF18 diminui a expressão do inibidor da protease do tipo serina E2 (SERPINE2) em cultivos de células da granulosa oriundas de folículos pequenos (2-5 mm de diâmetro). Esse mecanismo sugere um envolvimento do FGF18 no controle dos eventos intrafoliculares durante o processo ovulatório, porém, esta hipótese nunca foi testada. Portanto, o objetivo foi investigar a participação do FGF18 no controle da cascata de eventos intrafoliculares que coordenam o processo ovulatório em bovinos. Para isso utilizou-se um modelo experimental com cultivo de células da granulosa oriundas de folículos grandes (≥ 10 mm de diâmetro) as quais, expressam os genes chave para o controle da ovulação em resposta ao LH. Dessa forma, as células foram tratadas com LH e também com FGF18 na mesma concentração (10 ng/mL) e, após o tratamento, permaneceram em cultivo por 6, 12 e 24h. Em seguida, realizou-se a coleta do meio para a dosagem de progesterona (P4) e das células para a avaliação da expressão dos genes AREG, EREG, EGR1, EGR3, ANKRD1, CTGF, YAP1, BIRC5, CYR61 e da COX-2. Os níveis de P4 aumentaram na presença de FGF18 no primeiro intervalo de cultivo (6 h) e houve um decréscimo na abundância de RNAm de *BIRC5* e *CYR61*, enquanto a expressão de EREG, EGR1 e EGR3 apenas aumentou com a adição de LH e FGF18 ao meio de cultivo. Apesar disso, os tratamentos não influenciaram de modo significativo na resposta de COX-2 e do restante dos genes. Conclui-se que o fator de crescimento utilizado é importante na modulação dos mecanismos de LH e P4 em células da granulosa, os quais são críticos ao bom funcionamento do trato reprodutivo feminino.

Palavras-chave: FGF18. Granulosa. Ovulação. Cultivo.

ABSTRACT

FIBROBLASTIC GROWTH FACTOR 18 (FGF18) REGULATES THE EFFECT OF PROGESTERONE AND LUTEINIZING HORMONE IN BOVINES NEAR THE OVULATION PERIOD

AUTHOR: Dalila do Nascimento Reis

ADVISOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

The ovulatory peak of luteinizing hormone (LH) initiates a cascade of events in pre-ovulatory follicles culminating in the rupture of the follicular wall and release of a cumulus-oocyte complex ready to fertilization. Over the last few years, more details have been described the induction of the intrafollicular cascade of events by LH peak, characterized by stimulating cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme expression demonstrating the involvement of epidermal growth factor-like factors (EGF-like factors), such as amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG). It has been identified these factors as genes rapidly induced by LH in granulosa cells and by EGF in cumulus cells. The release of EGF-like factors from plasmatic membrane depends on the synthesis of the ADAM family of proteins, among which are plasminogen activator urokinase (PLAU), tissue plasminogen activator (PLAT), and the disintegrins and metalloproteases. The increased expression of metalloproteases and disintegrins depends on a decreased expression of serine-type protease inhibitors (SERPINS 1 and 2) throughout the ovulation process in different species. Previously, our research group revealed that there is a link between the effects of LH and fibroblast growth factor 18 (FGF18) expression in theca cells and that FGF18 decreases expression of serine E2-like protease inhibitor (SERPINE2) in cultured granulosa cells from small (2-5 mm diameter) follicles. This mechanism suggests an involvement of FGF18 in the control of intrafollicular events during the ovulatory process; however, we never tested this hypothesis before. Therefore, the aim was to investigate the participation of FGF18 in controlling the cascade of intrafollicular events that coordinate the ovulatory process in bovines. For this, we used an experimental model with a culture of granulosa cells from large follicles (≥ 10 mm in diameter) which express key genes for the control of ovulation in response to LH. Thus, we treated cells with LH and FGF18 at the same concentration (10 ng/mL) and they remained in culture for 6, 12, and 24h after treatment. Then, the medium was collected for progesterone (P4) dosage and the cells for evaluation of AREG, EREG, EGR1, EGR3, ANKRD1, CTGF, YAP1, BIRC5, CYR61 genes expression and COX-2. P4 levels increased in the presence of FGF18 at the first culture interval (6 h) and there was a decrease in the mRNA abundance of *BIRC5* and *CYR61*, whereas the expression of EREG, EGR1, and EGR3 only increased with addition of LH and FGF18 to the culture medium. In spite of that, treatments did not significantly influence in response of COX-2 and in the rest of the genes. We conclude that the growth factor used is important in modulating the LH and P4 mechanisms on granulosa cells, which are critical to the proper functioning of a female's reproductive tract.

Keywords: FGF18. Granulosa. Ovulation. Culture.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1: Effect of FGF18 and LH on secretion of progesterone (P4) from bovine granulosa cells. Cells were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Data are means \pm SEM of three independent replicates. Asterisk denotes differences between control and treatment groups ($P < 0.05$).

Figure 2: Effect of FGF18 and LH on expression of key genes for the ovulatory process and COX-2 enzyme. Cells from large follicles (≥ 10 mm) were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Abundance of mRNA was measured by real-time PCR. Data are means \pm SEM of three independent replicates. For mRNA, means without common letters are significantly different ($P < 0.05$); no letters indicates no significant effect of treatment. Asterisk denotes differences between control and treatment groups ($P < 0.05$).

Figure 3: Effect of FGF18 and LH on expression Hippo pathway's target genes during preovulatory process. Cells from large follicles (≥ 10 mm) were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Abundance of mRNA was measured by real-time PCR. Data are means \pm SEM of three independent replicates. For mRNA, means without common letters are significantly different ($P < 0.05$); no letters indicates no significant effect of treatment.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Primers designed for quantitative real-time PCR analysis

LISTA DE SIGLAS

ADAMs	A Disintegrin And Metalloproteinases
AMH	Anti-Müllerian Hormone
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain-containing protein 1
AREG	Amphiregulin
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYR61	Cysteine-Rich angiogenic inducer 61
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGR1	Early Growth Response 1
EGR3	Early Growth Response 3
EREG	Epiregulin
FGFs	Fibroblast Growth Factors
FGF18	Fibroblast Growth Factor 18
LH	Luteinizing Hormone
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
P4	Progesterone
PKA	Protein Kinase A
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TEAD	Transcriptional Enhanced Associate Domain
YAP	Yes-Associated Protein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS FOLICULARES.....	14
2.2	ATUAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NO OVÁRIO.....	16
2.3	A VIA HIPPO NA REPRODUÇÃO	18
2.4	O PAPEL DAS PROTEÍNAS DE RESPOSTA AO CRESCIMENTO PRECOCE E DOS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS NO CONTEXTO REPRODUTIVO	19
2.5	FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18.....	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	ARTIGO	29
5	CONCLUSÃO	54

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de métodos estratégicos para resolver distúrbios de fertilidade em diversas espécies, seja no campo científico da medicina como na produção animal, está vinculada ao gradativo esclarecimento sobre a complexidade biológica do sistema reprodutor. Em se tratando do ciclo reprodutivo feminino, o estudo de elementos relacionados com o mecanismo da ovulação é uma importante ferramenta para o alcance da solução desses distúrbios e também para o alcance do aumento dos índices de fertilidade em numerosos rebanhos.

Os efeitos regulatórios dos fatores de crescimento fibroblástico em muitos processos reprodutivos têm levado ao maior interesse na pesquisa sobre os membros da superfamília FGF, sendo que desses, são conhecidos 23 tipos e classificados dentro de 7 subfamílias (ITOH; ORNITZ, 2004). Alguns FGFs têm sido utilizados em experimentos para o estudo da fisiologia ovariana, um exemplo é o FGF10 que se apresenta mais expresso em folículos que deixam de produzir estrógenos em relação aos que estão produzindo e que em bovinos inibe a secreção de estradiol pelas células da granulosa (BURATINI et al., 2007).

As vias de sinalização celular são complexas e o ovário é responsável pela produção de vários fatores de crescimento que fazem parte do desenvolvimento folicular (HAVELOCK; RAINEY; CARR, 2004). As camadas de células da granulosa presentes em todo folículo convertem andrógeno em estrógeno e, junto com as células da teca no período pré-ovulatório, secretam a progesterona. Esta, além de atuar na manutenção gestacional, também pode possuir o papel de mediadora da ovulação, pois ao se ligar ao seu receptor nuclear nas células da granulosa, pesquisadores sugerem que sua ação provoca um aumento na abundância de RNAm para a isoforma *COX-2* da enzima COX (FORTUNE et al., 2009).

O pico de LH, induzido por elevadas concentrações de estradiol secretadas pelo folículo dominante, o qual secreta mais que 80% desse estrógeno, gera grandes mudanças fisiológicas, muitas delas ainda desconhecidas quando leva-se em consideração as condições no microambiente folicular. Os fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like factors*) estão envolvidos na cascata de eventos intrafoliculares e os genes ampirregulina (AREG) e epirregulina (EREG) são rapidamente induzidos pelo LH nas células da granulosa.

A via de sinalização EGF é crucial para a execução de uma série de eventos ovulatórios, uma vez que ela transmite o sinal do efeito do LH ao oócito, estando diretamente ligada à qualidade e maturação oocitária (RICHANI; GILCHRIST, 2018). Diferentemente dos hormônios FSH e LH, ambos comprovadamente atuantes no amadurecimento da granulosa para a luteinização, um cultivo *in vitro* dessas células demonstrou que tanto EGF como FGF são

potentes reguladores da proliferação celular. Mesmo em baixas concentrações, esses fatores de crescimento foram capazes de estimular a síntese de DNA das células da granulosa enquanto a aplicação do LH no modelo *in vitro* inibiu a proliferação de células luteais com uma melhora na diferenciação celular (GOSPODAROWICZ; ILL; BIRDWELL, 1977).

Quando a atividade ovariana é estimulada, COX-2 apresenta-se como marcadora do período de maturação final do oócito e também como mediadora da biossíntese de prostaglandinas (SIROIS et al., 2004). O fator de transcrição EGR tipo 1 (EGR1) aparentemente influencia com a mesma relevância na biossíntese de prostaglandinas, posto que em células bovinas após o tratamento com LH, a alta expressão de EGR1 resultou no aumento dos níveis de RNAm para *Prostaglandina E sintase*, *Prostaglandina Endoperóxido sintase-2* e para *Prostaglandina E2*, inclusive nas transcrições do receptor de LH. O gene EGR1 estimula do mesmo modo a abundância de RNAm de EGR tipo 3 (*EGR3*), até mesmo de *AREG* e *EREG* e de genes chaves da família FGF, ao passo que a adição no cultivo celular da maioria dos FGFs testados no estudo de Han et al. (2017) influenciaram na expressão dos dois fatores, com exceção da inclusão de FGF18 que influenciou apenas a expressão de EGR1.

A via de sinalização Hippo foi há pouco tempo identificada como participante da foliculogênese e do mecanismo ovulatório. Assim que o seu efetor principal é ativado, a proteína YAP1, genes considerados alvos dessa via de sinalização celular são expressos; entre eles estão ANKRD1, BIRC5, CTGF e CYR61. Em camundongos e humanos, a ativação de YAP1 promove a transição de folículos primordiais para o estágio primário, incluindo a proliferação de células da granulosa e a proteção delas contra a apoptose. Além disso, a inibição do complexo YAP-TEAD por verteporfina no cultivo desse tipo celular, desencadeou não somente a redução no número de células como também a elevação da secreção de progesterona (GERSHON; DEKEL, 2020; SUN; DIAZ, 2019). Em folículos pré-ovulatórios, a ação de LH promove a inativação de YAP1 através da via ERK1/2 (JI et al., 2017).

A via clássica de sinalização ERK1/2 é desencadeada pela ativação dos *EGF-like factors* durante a ligação do LH ao seu receptor nas células da granulosa, resultando na fosforilação da via após a clivagem desses fatores pelos membros da família ADAM. No decorrer do processo ovulatório, a ação de desintegrinas e metaloproteases estimula a liberação de *EGF-like factors* da membrana plasmática e, para que isso aconteça, é preciso que haja uma diminuição da expressão dos inibidores de protease do tipo serina (SERPINS 1 e 2). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a utilização do FGF18 em cultivo de células da granulosa de pequenos folículos (2-5 mm de diâmetro) ocasiona a redução nos níveis de RNAm de *SERPINE2*, além da diminuição da esteroidogênese (PORTELA et al., 2010). E ficou demonstrado nesse mesmo

estudo que existe uma relação entre o efeito do LH e do FGF18. Dessa maneira, levanta-se a hipótese de que esse fator estaria envolvido na regulação do processo de ruptura folicular ao influenciar nas ações de LH e P4 e na expressão de alguns componentes relacionados com a ovulação e sobrevivência celular, como a enzima COX-2 e os genes selecionados. Por isso, o objetivo foi verificar, durante o processo de maturação final do folículo, a ação desse fator de crescimento sobre os níveis de progesterona, bem como sua presença na resposta das células ao LH e na expressão de COX-2; e também investigar se existe uma relação do seu efeito com a via Hippo nesse processo, adotando como ferramenta de estudo o cultivo *in vitro* de células da granulosa originárias da espécie bovina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS FOLICULARES

A formação folicular é precedida pela oogênese, na qual as células germinativas primordiais se proliferam por mitose para gerar oócitos primários. No momento em que os folículos ovarianos se encontram no estágio inicial de crescimento, as células da granulosa passam a ter formato cubóide e o oócito começa a ampliar seu tamanho. À medida que este se desenvolve, as células aumentam rapidamente em número e ficam concentradas ao redor da célula germinativa. Com isso, origina-se a estruturação de várias camadas da granulosa, as quais são responsáveis pela maior atividade mitótica ao longo da foliculogênese e, conseqüentemente, sintetizam componentes *gap-junction*, tais como citocinas (KITLG), EGF, FGF e hormônio Mulleriano (AMH) (MONNIAUX; ELIS; MAILLARD, 2018).

Na fase primordial, um *pool* de folículos começa a crescer pelo estímulo de fatores intraovarianos e/ou por outros desconhecidos, fazendo com que ocorra a quiescência do restante dos folículos do ovário e o início desse recrutamento é caracterizado como um processo contínuo. Baseado nisso, supõe-se que uma parte do conjunto folicular migra para o grupo destinado ao progressivo amadurecimento e, dessa forma, no interior do ovário acontece a redução do número de folículos primordiais e/ou primários (MCGEE; HSUEH, 2000). Nesse período, as concentrações séricas do hormônio folículo estimulante (FSH) são altas e precedem as ondas foliculares que propiciam o crescimento folicular em novilhas pré-púberes. As gonadotrofinas estimulam, aparentemente, o crescimento de vários folículos em vacas jovens, porém o aumento precoce dos níveis gonadotróficos é suprimido até que elas estejam aptas à reprodução. Assim que as células foliculares se preparam para a diferenciação, as células da teca expressam os fatores de crescimento e os fatores-chave para progéstágeno (CYP11A1, STAR, HSD3B2), os receptores de LH e a síntese de andrógeno (CYP17A1).

Conforme os estágios primários e secundários da foliculogênese avançam, os folículos adquirem novas estruturas devido às transformações das células da granulosa, como formação da teca externa e interna, corona radiata e *cumulus oophorus*, acompanhados pelo desenvolvimento completo do oócito seguido da cavidade antral, onde se acumula o líquido folicular (KHAN et al., 2016). Por outro lado, no término da foliculogênese, as células foliculares perdem a capacidade de se proliferar e de produzir AMH, tornando-se secretoras de esteroides e responsivas ao FSH. No estágio mais avançado, os níveis de estradiol e inibina

umentam drasticamente (MONNIAUX; ELIS; MAILLARD, 2018). Esse aumento é característico da constituição do folículo dominante, o qual produz os hormônios estradiol e inibina para exercer o *feedback* negativo sobre a liberação de gonadotrofinas e, dessa maneira, impedir que folículos subordinados se tornem dominantes (MCGEE; HSUEH, 2000).

Após a seleção, o folículo que for dominante irá adquirir receptores de LH e continuará a desenvolver-se com a presença desse hormônio em um ambiente de baixos níveis de FSH, mas se não houver o efeito do LH sobre o folículo no estado de dominância, ou seja, sobre aquele folículo que tiver maior capacidade de produzir estradiol, o mesmo será destinado à regressão e provocará uma nova onda de crescimento folicular na espécie bovina. No intervalo que antecede o pico pré-ovulatório de LH, todos os componentes foliculares permanecem estáveis e organizados até serem intensamente remodelados a partir do momento em que o LH se conecta com os seus receptores presentes na camada da granulosa (GONÇALVES et al., 2012). Com isso, há a ativação da adenilato ciclase que, por consequência, estimula o aumento na concentração AMPc nas células da granulosa, a qual aciona a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (CONTI, 2002; MARSH, 1976; RICHARDS, 2001). A PKA, por sua vez, catalisa a fosforilação de proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB – AMPc *response element binding*), um fator de transcrição nuclear que aumenta a transcrição de genes envolvidos no processo de ovulação (RICHARDS, 2001).

Os *EGF-like factors* como AREG, EREG e β -celulina (BTC) são estimulados pelo pico de LH via AMPc (PARK et al., 2004). A transativação do receptor de EGF (EGFR) ocorre na camada da granulosa e do cumulus pela enzima proteolítica ADAM17 (ou TACE, enzima conversora do TNF) que libera o domínio desses fatores (AREG e EREG) e regula a fosforilação da MAPK (PANIGONE et al., 2008; YAMASHITA; HISHINUMA; SHIMADA, 2009; YAMASHITA; SHIMADA, 2012). A fosforilação de MAPK nas células da granulosa é igualmente essencial para que a ovulação ocorra em mamíferos, tendo em vista que camundongos *Knockout* condicional para ERK1/2 nesse tipo de célula apresentaram oócitos inclusos e sem a formação de corpo lúteo após superovulação (FAN HENG-YU, HEDRICK; RICHARDS, 2009). O pico de gonadotrofinas promove uma alteração de rotas esteroideogênicas e, além do mais, o LH parece estimular a síntese de progesterona em células da granulosa de suínos (VELDHUIS; KLASE, 1982).

2.2 ATUAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL NO OVÁRIO

A cascata de eventos da ovulação compreende uma série de fatores que atuam em conjunto na modulação de mecanismos moleculares essenciais ao completo processo de maturação oocitária e tecidual. A título de exemplo, pode-se afirmar que EGF possui um papel fundamental no desprendimento do oócito de dentro do folículo ovariano, dado que sua via de sinalização exerce efeitos positivos no controle de sinais ovulatórios (RICHANI; GILCHRIST, 2018). Entre as proteínas que compõem a família EGF, encontra-se o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF), fator de crescimento transformador alfa ($TGF\alpha$), epígeno (EPGN), neuregulinas 1-4 (NRG1-4), AREG, EREG e betacelulina (BTC) (RICHANI; GILCHRIST, 2018; SCHNEIDER; WOLF, 2009).

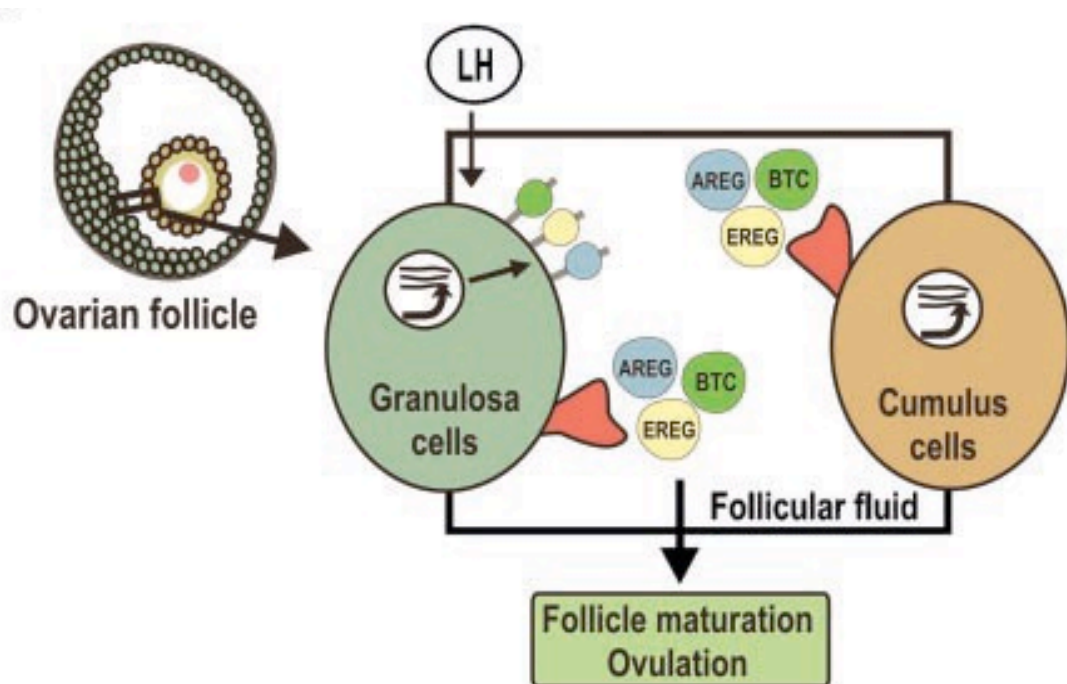
Os fatores de crescimento caracterizam-se como importantes constituintes intrafoliculares que induzem a expansão do cumulus e o desenvolvimento oocitário, um exemplo é a aplicação de EGF e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) no meio de cultivo *in vitro*, onde ambos foram capazes de promover alta taxa de maturação nuclear e de propagação de células do cumulus em complexos *cumulus oophorous* (COCs) bovinos (LORENZO et al., 1994). Entretanto, no transcorrer do evento ovulatório, tanto EGF como IGF-1 não alteram seus níveis de expressão e os seus receptores inseridos nas células da granulosa podem ser potencialmente ativados por outros ligantes (SHIMADA; UMEHARA; HOSHINO, 2016; SINGH; RUTLEDGE; ARMSTRONG, 1995; ZHOU; CHIN; BONDY, 1991).

Em espécies monovulatórias, exemplificando a espécie humana, os mediadores chaves para a ruptura folicular possuem ações colaborativas no sucesso desse mecanismo da reprodução, sendo que a progesterona e o seu receptor juntamente com as prostaglandinas e os *EGF-like factors* dependem da ativação dos sinais de EGF para a produção de COX-2, indicando que existe uma reciprocidade entre a complexa via EGF e as substâncias críticas para o aumento da expressão de genes considerados alvos da ovulação (CHOI et al., 2017). AREG e EREG são um dos membros *EGF-like factors* que desempenham um papel notório na condução do término da fase de crescimento dos folículos ovarianos (SHIMADA; UMEHARA; HOSHINO, 2016).

O fortalecimento das atividades mitogênicas em diferentes tipos celulares se dá quando os receptores acoplados a proteína G (GPCRs), conhecidos por serem o maior grupo de

receptores de superfície celular, utilizam a via de sinalização EGFR. Algumas pesquisas descrevem que essa interação é dependente de metaloprotease, uma vez que a transativação de EGFR por GPCRs ocorre quando a estimulação destes impulsiona a atividade de alguma metaloprotease, resultando na ativação da cascata a jusante de EGFR (PRENZEL et al., 1999; SCHNEIDER; WOLF, 2009). No ovário, a expressão elevada dos *EGF-like factors* sobre as células murais da granulosa acarretam a ativação dos EGFRs dentro dessa mesma camada ou da camada do cumulus através do fluido folicular, por isso esse receptor é encarregado de gerar a expansão das células do cumulus junto com a completa maturação do oócito e, portanto, de favorecer o começo do processo ovulatório (Figura 1). Hsieh et al. (2007) observaram que em camundongos, a ausência das proteínas AREG e EREG causa distúrbios na maturação de foliculos e na ovulação.

Figura 1 – Papel dos ligantes EGFR na fisiologia ovariana.



O hormônio luteinizante (LH) promove a expressão de AREG, EREG e BTC nas células ovarianas da granulosa. Estes peptídeos, uma vez lançados no fluido folicular, ativam EGFR na granulosa e nas células do cumulus, regulando a maturação folicular e a ovulação. Fonte: (SCHNEIDER; WOLF, 2009).

Foi demonstrado por alguns estudos de que EGF e EGFR são cruciais para a comunicação entre o oócito e as células foliculares ao longo do desenvolvimento folicular e ovariano (VOLENTINE; YAO; BAHR, 1998; WANG; GE, 2004; YAO; BAHR, 2001). Em peixes zebra, por exemplo, Wang & Ge (2004) comprovaram que os padrões de expressão entre o fator e o seu receptor se distinguem, visto que no ovário desses vertebrados EGF manifesta sua expressão no oócito tal como nas células foliculares, porém com maiores níveis de expressão na célula reprodutiva durante as etapas iniciais de evolução ovariana, enquanto que a abundância de RNAm de *EGFR* é restrita às células foliculares, expressando-se com maior intensidade nos estágios finais. Isso diferencia o mecanismo de ação do fator no ovário de vertebrados pertencentes à classe Mammalia, pois em humanos, os níveis de expressão de EGF aumentam gradativamente na célula germinativa feminina à proporção que o folículo se desenvolve, atingindo seu auge na fase pré-ovulatória (MARUO et al., 1993; WANG; GE, 2004).

2.3 A VIA HIPPO NA REPRODUÇÃO

Na embriogênese de mamíferos, a via de sinalização Hippo é indispensável porque a atividade de YAP/TAZ regula a formação do blastocisto em roedores, além de ser necessária para a diferenciação do trofoblasto, sendo que a redução de sua atividade também beneficia a geração da massa celular interna na maioria das espécies (WU; GUAN, 2021). Inclusive, é importante ressaltar que essa via pode ser modulada pela via de sinalização GPCRs de maneira dependente aos tipos de proteínas G acopladas ao receptor (WU; GUAN, 2021). Além disto, quando há interferência nas ações do complexo YAP/TAZ-TEAD por algum dano provocado no ovário, a polimerização da actina acontece e surge um aumento no número de folículos pré-ovulatórios e de oócitos maduros, bem como aumento na expressão dos genes inibidores de apoptose CTGF, CYR61 e BIRC e indução de crescimento folicular em indivíduos com infertilidade (HSUEH; KAWAMURA, 2020).

A via tem sido descrita como uma rede de variados componentes envolvidos na regulação de distintos comportamentos celulares (HSUEH et al., 2015; JOHNSON; HALDER, 2014). Seus elementos alvos podem ser expressos em todos os folículos ovarianos em qualquer etapa de desenvolvimento, principalmente no que diz respeito às espécies mamíferas, tendo em vista que, por meio de pesquisas relacionadas a humanos e camundongos (KAWAMURA et al., 2013; ZHENG et al., 2014), a progressão de um folículo para a fase antral ou pré-antral ou até mesmo a sua seleção deriva da circunstância em que a sinalização se apresenta, ou seja, se

naquele intervalo de interação entre diversos folículos está havendo alguma inibição da via (HSUEH et al., 2015).

O complexo YAP/TAZ-TEAD serve como base para indicar se a ampla funcionalidade da sinalização Hippo está na sua forma ativa, identificada pela fosforilação de inúmeras proteínas. Esse processo desencadeia a interrupção do deslocamento da proteína YAP ao núcleo das células, tornando-a incapaz de ligar-se aos demais coativadores transcricionais e à família de fatores de transcrição, o que impossibilita a notável atuação de genes característicos dessa imensa fonte de regulação celular (LIN; PARK, 2017). A via Hippo detém essa definição por apresentar evidências de sua função em controlar o destino de uma variedade de unidades funcionais pertencentes a muitos tipos de tecidos do organismo vivo (DAVIS; TAPON, 2019; HEALLEN et al., 2013; LAVADO et al., 2018; LEE et al., 2008; LIN; YAO; CHUANG, 2015).

Detecta-se no corpo lúteo de vacas a expressão do gene *CYR61* que age como um mediador da neovascularização, por esse fato pesquisadores sugerem que essa proteína está envolvida na geração de novos folículos ovarianos (YANG; CHEN; CHEN, 2018; ZHANG et al., 2011). Ela é semelhantemente observada nas células endoteliais dos vasos que circundam a cloaca e co-expressa em conceptos e no endométrio condicionado à fase precoce de gestação (KLEIN, 2016; MALIK et al., 2013; YANG; CHEN; CHEN, 2018). *BIRC5* é um outro gene que está associado com a foliculogênese e com o desenvolvimento embrionário e fetal (JIANG et al., 2014). Foi demonstrado que em camundongos mutantes, a inativação do inibidor da apoptose no oócito não interfere na sobrevivência do mesmo e nem na ovulação, em contrapartida, sua inatividade nas células da granulosa compromete o crescimento dos folículos e o funcionamento do ovário, reduzindo a dinâmica do processo ovulatório (JIANG et al., 2014). Recentemente, em nosso estudo, revelamos que a ação do efector YAP parece regular a expressão basal de EGFR na superfície da granulosa, além de influenciar na cascata pré-ovulatória dos *EGF-like factors* induzidos por LH e, deste modo, servir como mais um fator crítico para a ovulação em espécies monovulares (DOS SANTOS et al., 2022).

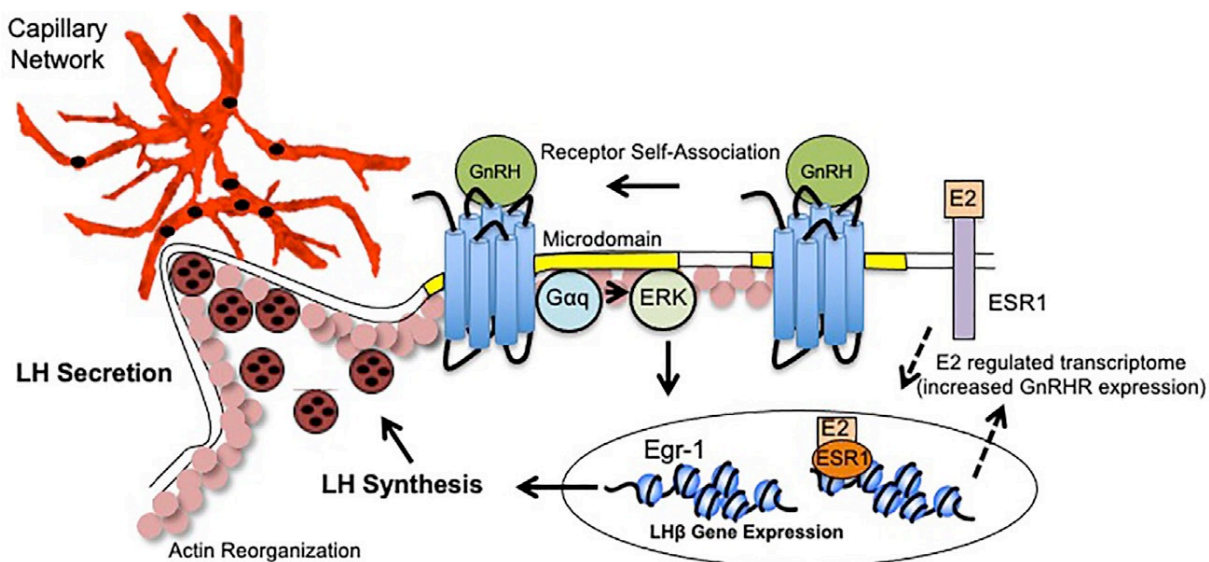
2.4 O PAPEL DAS PROTEÍNAS DE RESPOSTA AO CRESCIMENTO PRECOCE E DOS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS NO CONTEXTO REPRODUTIVO

A família das proteínas de resposta ao crescimento precoce (EGR) integram o grupo dos genes iniciais imediatos (IEGs) os quais, de maneira geral, são induzidos rapidamente no meio intracelular sob diversos estímulos, mesmo na presença de inibidores de síntese proteica. Há quatro membros de fatores transcricionais inseridos nessa família (EGR1-4) que é conhecida

por possuir domínio de ligação ao DNA altamente conservado, composto de clones de dedos de zinco. Diferentes clones de cDNA classificam cada membro, dos quatro, EGR4 é o único gene que não é considerado um fator de crescimento induzível, no entanto, todos têm sensibilidade e especificidade em sua expressão (O'DONOVAN et al., 1999).

No útero de roedores, comprova-se que EGR1 desempenha uma função muito importante nas células epiteliais e do estroma uterino, Kim et al. (2017) constatam que o seu efeito impacta no controle dos sinais provindos das ações estrogênicas e progesterônicas atribuídas ao preparo do embrião para a sua fixação no útero. O fator transcricional nuclear expressa-se igualmente de forma marcante no ovário, especialmente com o avançar da idade desses indivíduos, servindo como um regulador da apoptose em células da granulosa e, essa evidência, fortalece a hipótese de que ele possa ativar outros fatores relacionados com esse mecanismo. Em relação ao desenvolvimento dos folículos ovarianos, sua aplicação no modelo *in vitro* inibe a proliferação no estágio primário desse tipo celular, contudo, a alta abundância de RNAm de *EGRI* em folículos antrais indica seu provável papel em regular o rompimento folicular (YUAN et al., 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Modelo da dinâmica de gonadótropos submetidos ao pico de LH.



Durante o período pré-ovulatório, os níveis do estradiol-17 (E2) ovariano se elevam. A ativação de E2 associados à membrana plasmática e ESR1 nuclear induz a expressão de um programa genético único que inclui expressão aumentada do Receptor GnRH (GnRHR) e, portanto, sensibilidade aumentada ao GnRH hipotalâmico (setas tracejadas). Uma vez expresso, o GnRHR é constitutivamente localizado em microdomínios na membrana

plasmática (amarelo). Após a ligação do GnRH, seu receptor se auto-associa para formar dímeros/oligômeros. Os segundos mensageiros, incluindo Gαq e ERK, são ativados nos microdomínios. O aumento da atividade de ERK leva à ativação do gene inicial imediato *Egr-1*, que regula positivamente a expressão do gene *lhb*. O LH funcional é sintetizado e empacotado em vesículas secretoras que se incorporam ao citoesqueleto de actina cortical (círculos rosa). A ativação do GnRH também causa a reorganização do citoesqueleto de actina, o que permite que os gonadótropos se apossem do endotélio capilar (vermelho) para liberar LH na circulação (círculos pretos). Fonte: (CLAY; CHERRINGTON; NAVRATIL, 2021).

Ao visualizarem o RNAm de *EGR2* no epitélio luminal, glandular e nas células uterinas do estroma no período de pré-recepção do útero e durante o progresso da implantação embrionária, Yue et al. (2018) sugerem que o segundo tipo do fator de transcrição pode participar no processo de preparação do órgão para a receptividade do embrião, demonstrando sua importância de modulação uterina similar a *EGR1*. Nas células foliculares de humanos e roedores, observa-se que a expressão de *EGR2* tem a qualidade de proporcionar e de manter a sobrevivência delas através da estimulação de múltiplas gonadotrofinas e do controle de um mediador chave perante o aspecto funcional da granulosa no decorrer da foliculogênese (JIN et al., 2017).

O terceiro tipo do fator transcricional está localizado nas gônadas de camundongos em diferentes faixas etárias, nas células reprodutivas masculinas e femininas e em embriões na fase de pré-implantação (SHIN et al., 2017). Já no ovário bovino, sua ação é propensa a controlar, em parte, um dos ligantes pró-apoptóticos (FASLG) por causa do aumento de expressão gênica observada em células T associado a maior atividade transcricional de *EGR3* (YOO; LEE, 2004), além disso, quando são adicionadas em cultivo *in vitro* de granulosa as micotoxinas DON, verifica-se uma supressão sobre secreções de estradiol e progesterona ao mesmo tempo que gera uma intensa fosforilação das MAPKs, resultando na abundância de RNAm dos fatores transcicionais como *EGR1* e *EGR3* (GUERRERO-NETRO; CHORFI; PRICE, 2015).

Por fim, o gene *EGR4* é altamente expresso no ovário e menos expresso no útero e oviduto de fêmeas suínas, todavia, ele é também detectado no hipotálamo e na glândula pituitária, inclusive, o bloqueio de sua expressão desregula a esteroidogênese e o processo apoptótico. Portanto, revela-se como um agente potencial para o sistema reprodutor de mamíferos, posto que em experimentos envolvendo órgãos reprodutores de roedores e da espécie humana, a paralisação dos efeitos de *EGR4* desencadeou o fim da maturação de uma grande parte de células germinativas de indivíduos do sexo masculino e, na espécie suína, afetou a ação dos genes *Bax*, *P450arom*, *P450scc*, *EGR1*, *EGR2* e *EGR3* em células da granulosa (WANG et al., 2014).

Em meados do século XX, mais precisamente no final da década de 1930, cientistas descobriram a existência da família dos FGFs ao utilizarem como objeto de estudo tecidos cerebrais bovinos, o que possibilitou a comprovação de que estes fatores de crescimento exercem suas ações na glândula pituitária (GOSPODAROWICZ; JONES; SATO, 1974). A atividade dessas proteínas de sinalização celular depende da sincronização entre FGF-FGFR para que a via intracelular FGF ocorra de forma apropriada. Na biologia humana, os FGFs são fundamentais nos processos homeostáticos, regenerativos e embrionários por intermédio da comunicação parácrina que muitos deles exprimem (ZHANG et al., 2006).

Um alvo relevante para a identificação do dinamismo de células trofoblásticas em meio condicionado aos níveis de expressão do centro regulador da hipóxia em restrição seletiva de crescimento intra-uterino é o gene codificador FGF1 (LI et al., 2019). FGF1 foi investigado por Berisha et al. (2006) na finalidade de desvendar seus padrões de expressão no tempo definido de maturação folicular, tanto no momento anterior ao pico ovulatório de LH como após a ovulação. Eles observaram que a expressão de RNAm de *FGF1* aumentou significativamente nas fases iniciais de conversão folicular em corpo lúteo associado ao processo de angiogênese.

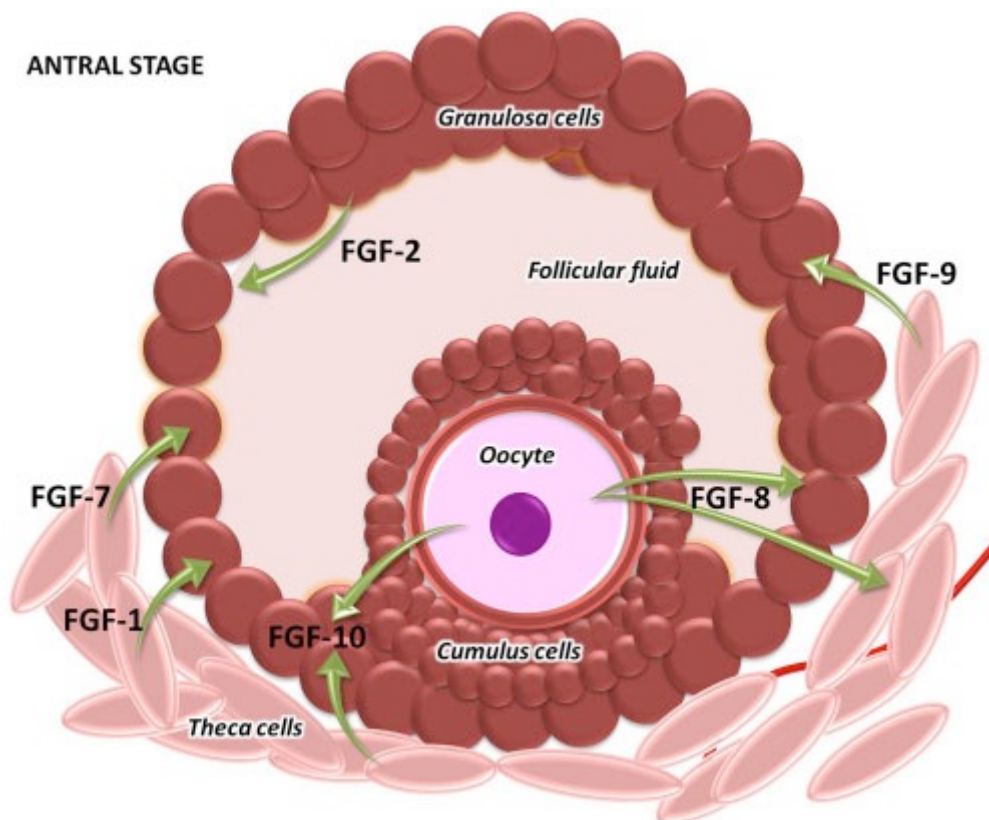
As células germinativas providas do feto suíno mantêm suas propriedades fisiológicas de manutenção e pluripotência pela via FGF2 (CHOI et al., 2018). No que diz respeito a anormalidades ocasionadas no trato reprodutivo masculino, FGF3 possui um efeito impactante quando o seu nível aumenta exacerbadamente na glândula prostática. Esse fator de crescimento também executa uma função parcial no desenvolvimento anatômico embrionário (CHUA et al., 2002). Vários trabalhos mostram os demais fatores FGFs como atuantes no complexo sistema de formação fetal (TANAKA; KUNATH; HADJANTONAKIS, 1998), (VILA-CEJUDO et al., 2020), (HAN; MARTIN, 1993), (YONEI-TAMURA et al., 1999), (BOULET; CAPECCHI, 2012), (ŠUĆUROVIĆ et al., 2017), (TEJEDOR et al., 2020), (HARTUNG et al., 1997), (VILSMAS et al., 2015), (GIMENO; BRÛLET; MARTÍNEZ, 2003), (CHAPMAN et al., 2006), (KUROSE et al., 2005), (HAJIHOSSEINI; HEATH, 2002), (YANG et al., 2021), (OHATA et al., 2014).

De modo inclusivo, os FGFs têm sido descritos como elementos envolvidos na modulação da funcionalidade ovariana em bovinos, ratos, camundongos e humanos (BURATINI et al., 2005, 2007; KOOS; OLSON, 1989; SUGIURA et al., 2008; YEHT et al., 2008). Os FGFs 2, 9, 13 e 18 estão dentre os mais estudados, e possuem funções bem descritas na organogênese e no desenvolvimento embrionário (THISSE; THISSE, 2005). Diversos estudos também têm demonstrado o envolvimento dos FGFs no controle local da atividade ovariana. O FGF2, o qual é predominantemente expresso pelas células da teca (BERISHA et

al., 2000), estimula a proliferação celular e inibe a esteroidogênese em células da teca e da granulosa, além de ter sido descrito como um potente indutor da apoptose em osteoblastos de camundongos (LAVRANOS et al., 1994; MANSUKHANI et al., 2000; SPICER; STEWART, 1996; VERNON; SPICER, 1994).

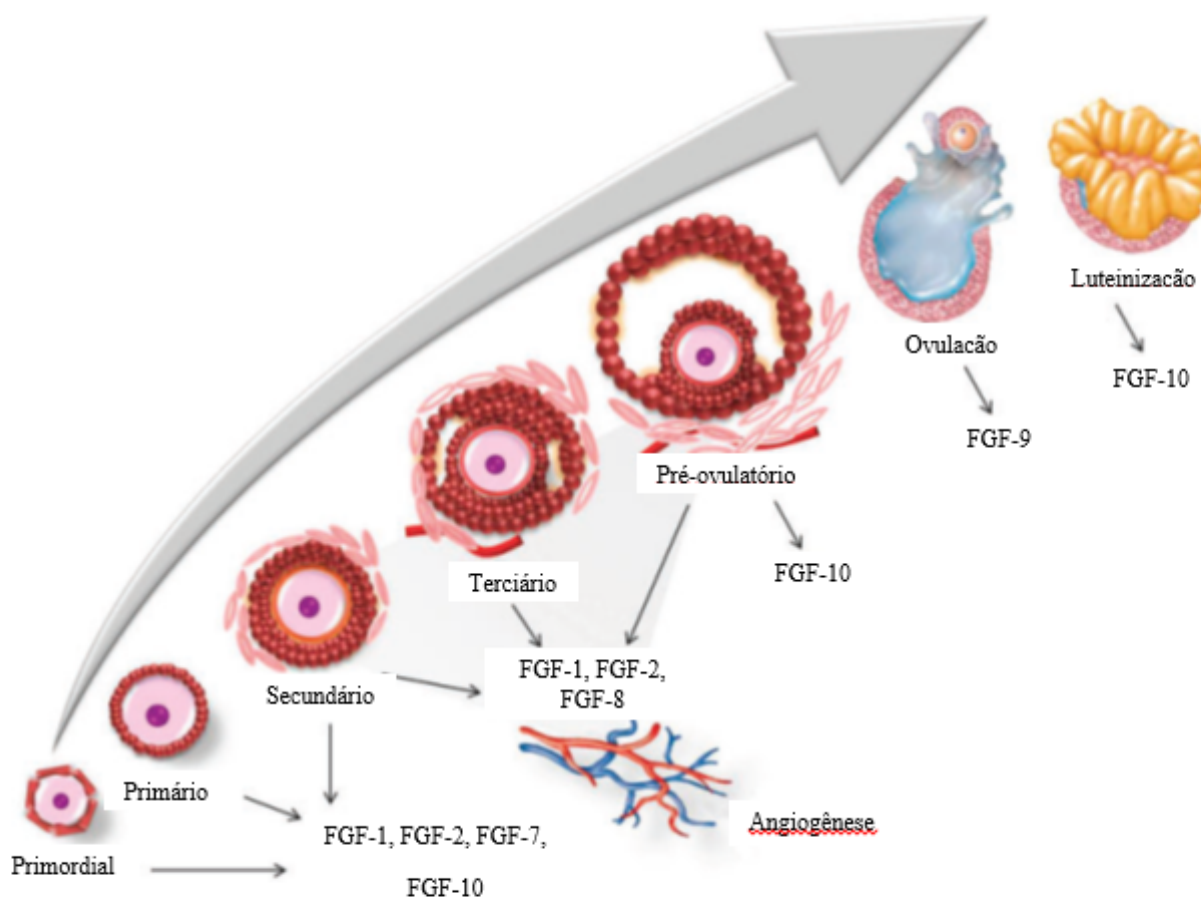
Outros dois FGFs estruturalmente similares, os tipos 7 e 10 (IGARASHI; FINCH; AARONSON, 1998), são expressos predominantemente nas células da teca e também atuam inibindo a secreção de estradiol nas células da granulosa de bovinos (BURATINI et al., 2007; PARROTT; SKINNER, 1998). Outro FGF de interesse para a fisiologia ovariana é o FGF8; em camundongos adultos, a expressão do FGF8 ocorre quase que exclusivamente em oócitos (VALVE et al., 1997). Entretanto, em bovinos, a expressão do RNAm para o *FGF8* não foi apenas detectada nos oócitos, mas também em células da teca e da granulosa (BURATINI et al., 2005) (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Localização de FGFs nos diferentes compartimentos (oócito, células da teca e granulosa) de folículos antrais.



Fonte: (CHAVES et al., 2012).

Figura 4 – Representação esquemática de efeitos celulares mediados por FGFs em diferentes categorias foliculares.



Fonte: (CHAVES et al., 2012).

Os FGFs 8, 17 e 18 compõem a subfamília FGF8. A expressão dos FGFs 17 e 18 já foi detectada através de ensaios de micro-arranjo e RT-PCR em oócitos de camundongos. No entanto, a expressão do FGF18 é considerada alta quando comparada com a expressão de FGF17 (ZHONG et al., 2006). Ambos os fatores apresentam alta afinidade pelos receptores FGFR3c e FGFR4 (ZHANG et al., 2006) e moderada afinidade pelo FGFR2C (FORD-PERRISS; ABUD; MURPHY, 2001). Esses três receptores são expressos tanto nas células do cúmulus e granulosa quanto no oócito de bovinos (ZHANG; HANSEN; EALY, 2010).

2.5 FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18

É visto como um componente da sinalização FGF de grande relevância, uma das razões está no campo da ciência farmacológica, posto que algumas pesquisas fornecem informações sobre o comportamento biomarcador do gene FGF18 e, esse fato, auxilia na investigação de novos tratamentos para a cura de doenças cancerígenas, uma vez que apresenta propriedades oncogênicas na angiogênese e no crescimento de células (ZHANG et al., 2019). Entre outras funções, sua presença durante o desenvolvimento pulmonar parece ser fundamental, principalmente em ratos (USUI et al., 2004), inclusive para a formação da cavidade oral e de múltiplos ossos craniofaciais (YUE et al., 2021).

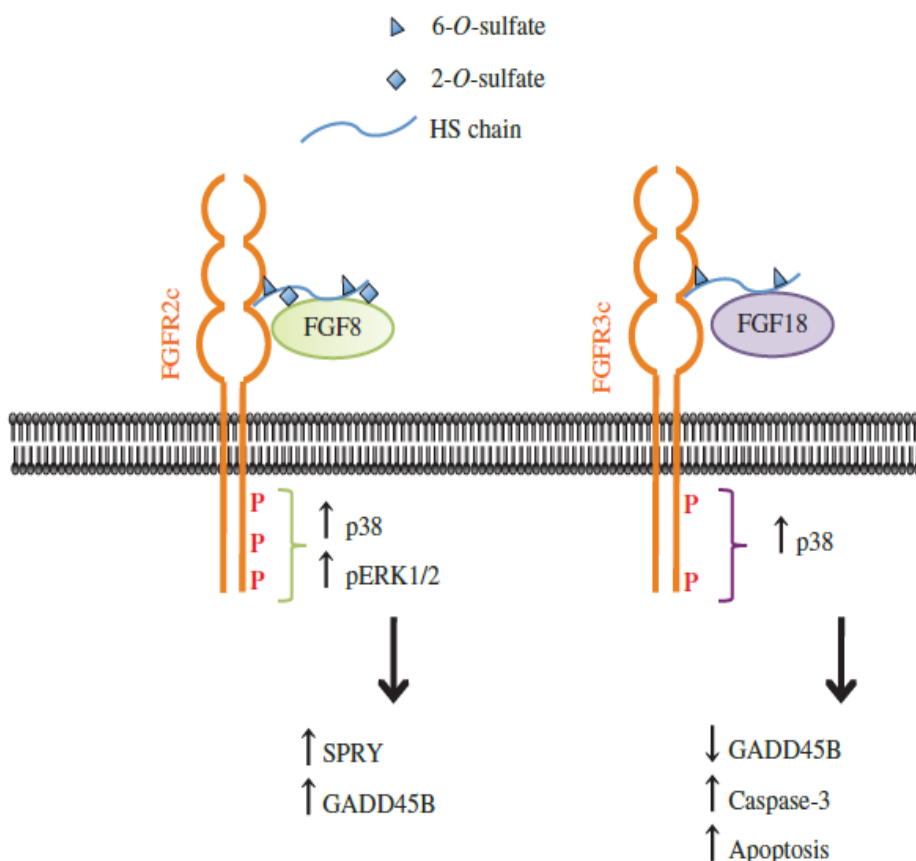
Existe uma ampla variedade de manifestações fisiológicas desse fator em distintos órgãos anatómicos, como fígado, intestino, cérebro, estômago, rins, testículos, baço, músculos esqueléticos e coração. Foi primeiramente relatado em 1998 e sabe-se, nos tempos atuais, que a proteína fibroblástica participa de uma série de processos celulares. Estruturalmente constitui-se por duas potenciais ligações N de glicosilação que a categoriza como uma glicoproteína. De acordo com Haque et al. (2007), das 207 sequências proteicas de aminoácidos codificadas por FGF18, as 26 primeiras são resíduos hidrofóbicos que podem atuar como peptídeos de sinal para secreção.

Um estudo baseado na exposição de células da granulosa originárias do sistema reprodutivo ovino aos FGFs da subfamília FGF8, mostrou que tanto FGF18 como FGF8 induzem a expressão de numerosas proteínas relacionadas com a via MAPK/ERK e, de maneira inclusiva, estimulam a atividade de dois fatores de transcrição marcadamente notáveis para a proliferação, sobrevivência e crescimento celular (MARASHI; TORABI; BEAUDRY, 2019).

Em todos os casos estudados, até então, sobre células de folículos ovarianos, não há indícios de que os membros FGFs estejam associados ao início do processo apoptótico, no entanto, encontram-se fortes evidências de que FGF18 executa atividades pró-apoptóticas nas células ovarianas da espécie bovina. Nos folículos atresícos, a presença do fator se destaca em comparação aos folículos que estão se desenvolvendo; além disso, sua adição no cultivo de células foliculares *in vitro* ativou caspase-3 e aumentou a quantidade de DNA degradado (PORTELA et al., 2010, 2015). O decréscimo dos níveis do gene de resposta ao dano de DNA (GADD45B) em diversos tipos de células corresponde ao aumento da apoptose e, aliado a isso, descobriu-se que esse fator inibe a expressão de GADD45B nas células da granulosa (Figura

5). Ademais, nas células ovarianas, a maior atividade de MAPK14 (mitogen-activated protein kinase 14) está ligada à ação apoptótica (BU et al., 2006; UMA et al., 2003) e FGF18 resulta na fosforilação dessa via.

Figura 5 – Um modelo hipotético de sinalização divergente de FGF8 e FGF18 em células da granulosa, extrapolado de estudos de morfogênese ramificada.



Neste modelo, o FGF8 se associa com 2-O- e 6-O- sulfatado HS para fosforilar várias tirosinas no domínio quinase do receptor, predominantemente FGFR2c, levando à ativação de MAPK3/1 (ERK1/2) e MAPK14 (p38) (entre outros) e a resposta típica de FGF. Em contraste, FGF18 fosforila menos ou diferentes resíduos de tirosina, levando à ativação do pró-apoptótico p38 sem a ativação do anti-apoptótico ERK1/2, que por sua vez conduz a célula em direção à apoptose mediada pela caspase-3; esta via de sinalização distinta pode estar associada a uma afinidade para HS principalmente 6-O-sulfatado e ativação de FGFR3c predominante. Fonte: (PRICE, 2016).

Os ovários fetais de *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* expressam a abundância de RNAm de *FGF18*, indicando que o mesmo está inserido nos mecanismos de desenvolvimento ovariano, ao passo que sua adição no cultivo de fragmentos do tecido ovárico revelou que possui um efeito bloqueador sobre esteróides responsáveis pela regulação da formação e do crescimento folicular inicial; esse bloqueio é observado identicamente em folículos no estágio

antral, o que torna claro sua potencialidade em controlar a esteroidogênese (DA SILVA et al., 2019; PORTELA et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento dos eventos reguladores durante o processo de maturação final dos folículos ovarianos, tomando como objeto de estudo a relação do FGF18 com o mecanismo da ovulação para a geração de novas pesquisas, visando o aumento da fertilidade na espécie bovina e dos índices de produtividade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Elucidar o efeito do FGF18 sobre os níveis progesterônicos na fase pré-ovulatória.
- ❖ Analisar a presença do fator na resposta das células ao LH ao avaliar a expressão de genes induzidos por este hormônio.
- ❖ Identificar diferença na expressão enzimática de COX-2 na aplicação do FGF18 no cultivo *in vitro* das células da granulosa.
- ❖ Investigar a relação do FGF18 com a Via Hippo no período pré-ovulatório.

ARTIGO

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ROLE OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 18 IN REGULATING THE CASCADE OF
PREOVULATORY EVENTS IN CATTLE

Dalila do Nascimento Reis, Daniele Missio, Mariani Farias Fiorenza, Christopher A. Price,
Paulo Bayard Dias Gonçalves, Valério Marques Portela

Molecular Reproduction and Development, 2022

Role of fibroblast growth factor 18 in regulating the cascade of preovulatory events in cattle

Dalila do Nascimento Reis¹, Daniele Missio¹, Mariani Farias Fiorenza¹, Christopher A. Price², Paulo Bayard Dias Gonçalves¹⁻³, Valério Marques Portela¹

¹Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada.

³Molecular and Integrative Physiology of Reproduction Laboratory, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Fibroblast growth factor 18 (FGF18) may be an essential co-factor in regulating the ovulatory process. In association with luteinizing hormone (LH), the activity of both increased in granulosa cells, culminating in a possible rupture of the follicular wall. The objective of the present study was to investigate the specific action of FGF18 during pre-ovulatory phase in bovine species. FGF18 increased progesterone (P4) levels and decreased abundance of mRNA in the cell proliferation-related genes *BIRC5* and *CYR61* whereas expression of *EREG*, *EGR1* and *EGR3* genes only increased with addition of LH and FGF18 to the culture medium. After the addition of LH in the presence or absence of FGF18, there was no significant effect on the mRNA abundance of *AREG*, *COX-2*, *ANKRD1*, *CTGF* and *YAPI*. This paper demonstrates that FGF18 may be an important factor for regulation of P4 and LH actions in ovarian granulosa cells, which are critical to the proper functioning of a female's reproductive tract.

Keywords: FGF18; ovulation; granulosa cells.

INTRODUCTION

Process of mature oocyte release from ovarian follicle only occurs in preovulatory follicles with adequate concentrations of receptors for luteinizing hormone (LH) in granulosa cells, under conditions of increased frequency of LH pulses, when follicle reaches a diameter \geq 12 mm in *Bos taurus* (Sartori et al., 2001). Through cAMP signaling pathway LH peak levels triggers epidermal growth factor-like growth factors (EGF), AREG, EREG, and β -cellulin (BTC) (Park et al., 2004). While gonadotropin peak promotes an alteration of steroidogenic pathways, LH appears to stimulate progesterone (P4) synthesis in porcine granulosa cells (Veldhuis & Klase, 1982). PTGS enzyme, also known as cyclooxygenase (COX), has two isoforms, PTGS1 and PTGS2, which differ mostly in their expression pattern and their regulation in mammals (Williams & Dubois, 1996). The first of them is significant for physiological functions such as homeostasis and mucosal protection, and is constitutively expressed in many tissues to ensure prostanoid synthesis (DeWitt & Smith, 1995). In opposition, the second is an inducible enzyme related to pathophysiological processes; additionally, high levels of gonadotropins rise the expression of PTGS2 in a layer of granulosa cells, however no change is found in the expression of PTGS1 (J. A. S. Richards, 1997). In cattle, protein and mRNA expression for *PTGS2* occurred in granulosa cells of preovulatory follicles (J. Liu & Sirois, 1998).

Ovulation is a reproductive process controlled by the production of intrafollicular hormones and by gene expression of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (PTGS-2), Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) as well as other factors, including metalloproteases and disintegrins synthesis that are vital for follicular wall rupture (Murdoch, 2000). In bovines, this process is marked by a dynamic interaction of factors not yet completely elucidated, culminating in the rupture of the ovulatory stigma and release of the oocyte (Espey & Lawrence, 1980). The ovulation process is initiated at the moment the follicle is stimulated

by the pre-ovulatory peak of LH. This hormone initiates intense remodeling of the extracellular matrix and induces cleavage of cell membrane proteins, involving proteases, collagenases and vasoactive factors (Espey & Lawrence, 1980).

In different cell types, there is a likelihood of association between EGF/EGR signaling pathway and EGRs on proliferative, antiapoptotic, or migratory stimulation (Santino et al., 2017). EGRs (1-3) participate in estrogenic actions in the uterine environment, prominently EGR1, which shows to be a critical transcription factor in hormone regulation when its action on major cell types of the uterus in mice was evaluated (Kim et al., 2014, 2018). In porcine and mouse ovaries, other research detected mRNA expression for *EGR3* (Shin et al., 2017).

Moreover, Hippo signaling pathway plays an important role in granulosa cell behavior during ovulation (Sun & Diaz, 2019) and downregulation of its effectors YAP (Yes-Associated Protein) and TAZ (Transcriptional Co-Activator with PDZ-binding motif) is directly associated with ovarian disturbances that result in anovulation (Plewes et al., 2018).

There is a lot of evidence that members of the FGF superfamily are involved in ovarian function. For example, FGF10 is more expressed in follicles that stop producing oestrogens than in those that are producing them and in bovines, it inhibits oestradiol secretion by granulosa cells (Buratini et al., 2007). In reproductive system, FGFs 2, 9 and 18 have an important function in gonadal development and sexual differentiation (Cotton et al., 2008). It was well demonstrated that the main source of FGF18 production is theca cells and that the expression of FSH receptor, cyclin D2, GADD45B and key enzymes for synthesis of steroids decrease in granulosa cells treated with FGF18 (Portela et al., 2010). In this process, genes controlling cell proliferation such as IGF-1 (Zhou et al., 1997), FSH receptor (Richards et al., 1980), estrogen receptor (Sharma et al., 1999) cyclin D2 (Robker & Richards, 1998) and others (Richards, 2001) are rapidly induced to decrease their expression by the ovulatory peak of LH. During this phase, LH peak also leads to declining steroidogenic enzymes production (Richards, 1994). For this

reason, we hypothesized that FGF18 was involved in regulating the follicular rupture process by influencing LH and P4 actions and the expression of some components related to ovulation and cell survival, such as the COX-2 enzyme and genes selected.

Although several factors have been discovered and models proposed for study of signaling pathways involving events such as ovulation and luteinization, there are still unknown routes between the gonadotropin peak and the rupture of follicle with the release of mature oocyte capable of being fertilized. FGFs are described as elements involved not only in modulating ovarian function in cattle, but also in rats, mice and humans (Buratini et al., 2005, 2007; Koos & Olson, 1989 & Sugiura et al., 2007). Therefore, our present study aims to verify the effect of FGF18 on some components that participate in regulator events of granulosa cells during final follicle maturation. For this, we proposed to: elucidate the effect of FGF18 on progesterone levels in the pre-ovulatory phase; analyze the presence of FGF18 in the response of cells to LH by evaluating the expression of genes induced by this hormone; identify difference in the enzymatic expression of COX-2 in the application of FGF18 in the *in vitro* culture, and investigate association of the factor with the Hippo signaling pathway on pre-ovulatory period.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Ovaries were obtained from adult bovine females at random stages of the estrous cycle from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in PBS at 35°C containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1 µg/ml). Granulosa cells were aspirated from large follicles (≥10 mm in diameter) and washed three times in culture medium (DMEM-F12) by centrifugation at 900 g for 10 minutes. Cell viability was estimated using 0.4 % trypan blue. Cells were seeded in 24-well culture plates (Sarstedt®) at a density of 1×10^6

viable cells per well in 1 ml DMEM-F12 supplemented with sodium bicarbonate (10 mM), BSA (0.1 %), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), FSH (1 ng/ml), insulin (10 ng/ml) and 2 % fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained at 37 °C in 5 % CO₂ for 24 h. After this period, the culture medium was replaced (100%) with DMEM-F12 without FBS 18h before the beginning of treatment. According to Portela et al. (2011) pretreatment with FBS, FSH and insulin in the first 24 h of culture is crucial for the increase of COX-2 expression and progesterone production in response to LH treatment.

Nucleic acid extraction and reverse transcriptase reaction

Total RNA was extracted using a PureLink RNA Mini Kit-based protocol, according to manufacturer's instructions (Invitrogen), and quantified by UV absorbance at 260 nm through NanoDrop technology. DNase I treatment was performed after purification (referent to the PureLink™ RNA Mini Kit manual) to assure highly pure RNA without genomic DNA contamination. The RNA was subjected to reverse transcription by adding RNase-free water, 5x Mix iScript (containing primer and dNTPs) and iScript enzyme in a total volume of 20 µl. The reaction was terminated by incubation at 25 °C for 5 min, 46°C for 20 min, 95°C for 1 min and 4°C for ∞.

Polymerase chain reaction – PCR

Variability in mRNA quantities was assessed by amplification of histone (H2AFZ), for the reason it is one of the most commonly selected and recommended genes for stability when taking as a basis the use of other constitutive genes, such as GAPDH. All proposed genes were measured by real-time PCR in a thermocycler (Biorad, Hercules, CA, USA), using GoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA) for efficient amplification of mRNAs. For these experiments, common cyclic thermal parameters were used (3 minutes at 95 °C, 40 cycles of 15 seconds at 95 °C, 30 seconds at 60 °C, and 30 seconds at 72 °C) used to amplify each transcript. To verify no extra products, dissociation curve analyses of each transcript was

performed. Samples were processed in duplicates and expressed relative to H2AFZ as a constitutive gene. A standard curve was generated to identify efficiency of the primers used; to do this, two-fold serial dilutions of the samples were performed and genes were measured according to standard curve results. Primers for the genes used in the study are given in Table 1.

Progesterone quantification

Culture medium was collected and stored in cryogenic tubes, frozen and stored at -20°C until the time of analysis. Progesterone dosages were performed using an ELISA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) as described by Beg et al. (2001). The steroid concentration in the culture medium was corrected for cell number using steroid secretion per mass of total protein as modeled as described by Portela et al. (2011). Progesterone was measured in duplicate as described previously, with mean intra- and interassay coefficients of variation of 7.2% and 18%, respectively. The sensitivity of the assay was 4 pg/tube, equivalent to 20 ng/1g protein as described by Portela et al. (2011).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with JMP software (SAS institute, Cary NC). Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed (Shapiro-Wilk test). Gene expression (mRNA) and steroid concentration results were compared by analysis of variance (PROC GLM; General Linear Models Procedure). The main effect was the different treatments and the random effect was the different replications, and the time effect was also evaluated, as well as the time-treatment interaction. Dependent variables were tested for normality and a normalization method was applied according to the distribution of the data. For treatment effects, the mean between groups was compared using least squares means and was adopted as significance level $P < 0.05$.

EXPERIMENTAL DESIGN

Experiment 1: Effect of FGF18 on progesterone levels in the pre-ovulatory phase

To determine the FGF18's mechanism of action on granulosa cell behavior through P4 levels, some cells from large follicles were cultured and treated with LH, FGF18 (PeproTech – Brasil FUNPEC, Ribeirão Preto, SP) in 50 µL PBS and LH plus FGF18 (10 ng/ml) while others were left untreated (control group). After adding the treatments, all cells remained in culture for 6, 12 and 24h, and finally the medium was collected for P4 dosage.

Experiment 2: Evaluation of the FGF18 presence in the response of cells to LH and enzymatic expression

Sayasith et al. (2006) reported that EGR1 is inducible by the preovulatory LH surge in cattle, and according to Han et al. (2017), the typical response of cells to FGFs is mediated at least in part by EGR1 (or EGR1 and EGR3). In our previous results, the effects of LH on the expression of key genes controlling the ovulatory process in granulosa cells from large follicles is dose-dependent and can be potentiated by some co-factors produced by follicular cells (Portela et al., 2011). In this way, our goal was to evaluate the effect of FGF18 on the granulosa cell response to LH. To this end, cell culture was performed with the cells being treated with 10 ng/ml LH in the presence or absence of FGF18, also at the same concentration. At the end of each culture time-point (6, 12 and 24h), the granulosa cells were extracted and used to evaluate the mRNA expression of *AREG*, *EREG*, *EGR1*, *EGR3* genes as well as *COX-2* enzyme.

Experiment 3: Effect of FGF18 on the expression of Hippo pathway's target genes in preovulatory granulosa cells

To study the hypothesis that FGF18 is a cofactor that regulates the expression of genes involved in granulosa cell behavior, a culture system was used in which cells were treated with the same treatment groups and collected at the same times as described above. Samples were harnessed for the evaluation of mRNA expression of Ankyrin Repeat Domain Contamination

Protein 1 (*ANKRD1*), Connective Tissue Growth Factor (*CTGF*), Yes-Associated Protein 1 (*YAP1*), Baculoviral IAP Repeat-Containing 5 (*BIRC5*), also known as survivin, and Cysteine-Rich Angiogenic Inducer 61 (*CYR61*).

RESULTS

Experiment 1

Treatment with FGF18 significantly increased P4 concentration ($P < 0.05$) in the first period of culture, while its supplementation in subsequent period tended to inhibit hormone production, with complete inhibition within 24h. The other treatment groups did not significantly influence the P4 concentration (Figure 1).

Experiment 2

Compared to the individual addition of LH or FGF18, only the association of LH with FGF18 had a statistically significant effect ($P < 0.05$) in *EGR1* ($P = 0.01$) and *EGR3* ($P = 0.02$) mRNA abundance. There was then an increase on EGRs expression at 6h post-treatment. As for the gene expression of EREG, the addition of LH separately or together with FGF18 caused a higher mRNA abundance of epiregulin at 6h, but this gene expression levels with LH reduced over time, while there was a small improvement of expression under the dose of LH plus FGF18 in the longer time of culture. The addition of FGF18 alone had less of an enhancing effect compared to the other groups, except in the later *in vitro* periods. Treatments applied at a dose of 10 ng/ml did not induce a significant effect on *COX-2* and *AREG* mRNA (Figure 2).

Experiment 3

Surprisingly, the genes *ANKRD1*, *CTGF* and *YAP1* did not have a statistically significant expression with the application of the treatments, while the application of only FGF18 to the medium caused a significant ($P < 0.05$) reduction in the expression of *BIRC5* and *CYR61* genes when cultivation time was longer (Figure 3).

DISCUSSION

Our results demonstrated that treatment with growth factor was able to anticipate the effect of P4 in the early stages of the culture *in vitro* model. With that, comes up the possibility of this factor decreasing the expression of SERPINE 2 by enhancing the secretion of P4 by the granulosa cells, since the increase in its production reduces the secretion of estradiol (Peluso, 2006), which is highly and positively correlated with the production of SERPINE 2 (Cao et al., 2006). In addition, this event favors the mature oocyte release because of the increased expression of ADAM proteins. Besides, there is evidence that FGF18 potentiates LH action not only on theca cells likewise on preovulatory granulosa cells.

Progesterone influences also tissue from other organs in the body, such as bone tissue, and even acts together with other hormones on the cardiovascular system and the lipid profile (Jewson et al., 2020). It has been known for decades that it plays a critical role in the performance of ovarian follicular cells, from their development until the moment the hormone begins to regulate the ovulation process. In the follicular growth phase, its effects inhibit mitosis and apoptosis of granulosa cells in culture (Peluso & Pru, 2014). We have previously described that the FGF18 protein is capable of inhibiting steroidogenesis in developing follicles (Portela et al., 2010). Thusly, it is characterized by exhibiting strong evidence associated with atresia, because in addition to altering the cycle progression of granulosa cells cultured *in vitro*, this factor had its expression elevated in the theca cells and fluid of follicles at the beginning of regression when compared to dominant ones (Portela et al., 2010). However, similarly to what has been reported, we show with these results here that FGF18 alone treatment had a similar effect, whereas P4 inhibition occurred in the prolonged time of culture, even with the dose of 10 ng/ml. Therefore, we have evidence that cell exposure *in vitro* culture medium, depending on its duration, can significantly interfere with the regulation of the ovulatory mechanism.

The inclusion of FGF18 in the *in vitro* culture of follicular cells conditioned to the preovulatory period might cause an effect modulated from other factors along the ovulatory mechanism, since the evaluation of its specific action, based on the non-supraphysiological dose of the treatments did not significantly influence ovulation-inducing genic expression. Our data revealed an influence of FGF18 on the expression levels of some key genes of the Hippo signaling pathway that is not through YAP, since there was no evidence of modulation between the pathway's main effector and growth factor, moreover, much of the signaling components require further research. Alternately, YAP and TAZ are known to be transcriptional coactivators that interact with members of the transcription enhancer factor (TEA)-domain (TEAD) family of DNA-binding factors (TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4) and a modulation in the activities of YAP/TAZ-TEAD complex results in the response of a significant number of genes (Pocaterra et al., 2020). Based on this, it is assumed that both CTGF and ANKRD1 genes may not have been influenced in their expression due to the lack of TEADs activation.

Unlike other factors that may also control the stage of follicle rupture, such as angiotensin, maybe this factor may not potentially act to accelerate the complete maturation of ovarian tissue that is directly connected with oocyte development. Due to the fact that angiotensin II (AGT-2) induces ovulation by increasing the intrafollicular production of prostaglandin (Acosta et al., 1999), P4 (Siqueira et al., 2012) and increases the expression in granulosa cells of key genes for ovulation control, such as PTGS-2, AREG, EREG and of the disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) (Portela et al., 2011). We can assume that there is no direct effect of FGF18 on this cell type when we perform an *in vitro* culture, but on the other hand, this experimental model indicated that there was a considerable change in the secretion of P4 that is also important for the control of the ovulatory process. Contradictorily to our data regarding the function of FGF18 in ovarian cell culture, in bone tissue it is one of

the fibroblast growth factors that regulate the formation of mature osteoclasts via cyclooxygenase 2 (Shimoaka et al., 2002).

A study that detected the presence of COX-2 in human preovulatory follicles showed that granulosa cells in the period before ovulation produce this enzyme, on the other side, these cells stop producing it in the post-ovulation period (Tokuyama et al., 2001). Consistent with the result presented, there was an indication that granulosa produces COX-2 at the first hours of the culture where cells were conditioned to pre-ovulation, with a tendency of reduction in enzyme expression over time. Meanwhile, the treatment applied with LH and FG18 at a concentration of 10 ng/ml may not have been enough to demonstrate its actions on COX-2 activity. The same observation could be made about *AREG* mRNA, since in ovulatory follicles, members of the epidermal growth factor family mediate LH action. *EREG* mRNA was under influence of LH effect stimulation, even when FG18 was added to the medium. Hence, it is assumed that this growth factor has a pathway of action that stimulates the activity of LH on activation of EGF receptor signaling, especially when the cells are cultured for 6h.

At first, according to the outcomes of the applicability of our treatment groups over culture medium, there were no indications that FGF18 may have altered the expression of key genes for the control of ovulation through the YAP/TAZ-TEAD complex. Once its addition did not interfere with CTGF and ANKRD1 transcription, known to be one of the target genes of effectors YAP/TAZ. We could not state that the growth factor under study can act in association with the Hippo signaling pathway because LH dose used on our experiment could not enough to FGF18 improves LH effect on granulosa cells. Still, at the final time of checking the permanence of the cells in culture, two genes related to the function of the pathway were tested and had higher gene expression, while medium treatment with growth factor alone reduced significantly this expression. A research shows that the factor, unlike other FGF family members, has the mechanism to increase apoptosis in granulosa cells (Jiang et al., 2013). In

preovulatory follicles, survivin expression tends to decrease at the early stages of atresia (Johnson et al., 2002), thus FGF18 is presumed to have caused a direct effect on the action of antiapoptotic genes. Physiological changes even under artificial conditions could have occurred with the samples because during the estrous cycle there are times when levels of P4 and estradiol counteract each other. Hence, supplementation with FGF18 at the last stage of culture may have had an inhibitory effect on these two steroid hormones, reflecting over reduced expression of CYR61 and BIRC5. Previous work shows that estrogen levels regulate both CYR61 and survivin in human endometrium and that they are inhibitor genes of apoptosis in different cell types (Maclaughlan et al., 2007; Nabils et al., 2010).

Fibroblast growth factors act through transmembrane receptor tyrosine kinase type (FGR) expressed by four known genes that, through alternative splicing, give rise to proteins with varying affinity for different FGFs (Zhang et al., 2006). FGFs 2, 9, 13, and 18 are among the most studied and have well-described functions in organogenesis and embryonic development (Thisse & Thisse, 2005). Another FGF of interest for ovarian physiology is FGF8, which compounds the same subfamily of FGF18. In adult mice, FGF8 expression occurs almost exclusively in oocytes (Valve et al., 1997). However, in cattle, mRNA expression for *FGF8* is present not only in oocytes but also in the theca and granulosa cells (Buratini et al., 2005).

Jiang et al. (2013) identified by microarray analysis that both FGFs have a direct action on *EGR1*, a fact that is not in conformity with our finding, since FGF18 significantly induced *EGR1* mRNA abundance solely with LH presence. Moreover, our results show that the two substances together similarly stimulate *EGR3* mRNA abundance in the same period of culture, which points us to an important function of FGF18 in mediating the effect of LH and probably in the EGF signaling pathway in bovine granulosa cells *in vitro*.

CONCLUSION

The data presented in this article revealed that the inductive effect of FG18 on the granulosa cell culture for ovulation might be conducted by unknown factors. There was a considerable increase in the concentration of P4 with the addition of fibroblastic factor to the medium, but most of the genes tested responded better to the stimulus of LH treatment in conjunction with FGF18. In addition, the specific effect of this protein appears to influence ovulatory mechanism, as the expression of almost all genes associated with ovulation decreases at the time when an increase in P4 levels occurs. We can conclude that presence of this growth factor during the regulation of the preovulatory cascade of events is important for controlling the effects of LH and P4.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Brazilian research development agencies: CAPES, CNPq, FINEP and FAPERGS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.B.D.G. and C.A.P. contributed to the research development. V.M.P. and D.N.R. contributed to the research article drafting, study design, analysis, interpretation of data and preparation of figures and table. M.F.F. and D.M. performed the experiments and contributed to the acquisition of data. V.M.P. did the statistical analysis.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Acosta, T. J., Berisha, B., Ozawa, T., Sato, K., Schams, D., & Miyamoto, A. (1999). Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: Effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction*, *61*, 1419–1425. doi:10.1095/biolreprod61.6.1419
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J. (2001). Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, *64*, 432–441. doi:10.1095/biolreprod64.2.432
- Buratini, J., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S., & Price, C. A. (2005). Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, *130*, 343–350. doi:10.1530/rep.1.00642
- Buratini, J., Pinto, M. G. L., 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. *Biology of Reproduction*, *77*, 743–750. doi:10.1095/biolreprod.107.062273
- Buratini, J., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S., & Price, C. A. (2005). Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, *130*(3), 343–350. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00642>

- Cao, M., Nicola, E., Portela, V. M., & Price, C. A. (2006). Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Matrix Biology*, 25(6), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.05.005>
- Espey, L. L. (1980). Ovulation as an Inflammatory Reaction -- A Hypothesis. *Biology of Reproduction*, 22, 73-106. <https://doi.org/10.1095/biolreprod22.1.73>
- Fan Heng-Yu, Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. *Science*, 324 (5929), 938–942. <https://doi.org/10.1126/science.1171396>
- Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y., & Tanabe, T. (1995). Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24965–24971. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24965>
- Jewson, M., Purohit, P., & Lumsden, M. A. (2020). Progesterone and abnormal uterine bleeding/menstrual disorders. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 69, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.05.004>
- Jiang, Z., Guerrero-Netro, H. M., Juengel, J. L., & Price, C. A. (2013). Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, FGF8 and FGF18, in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 375(1–2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.017>
- Johnson, A. L., Langer, J. S., & Bridgham, J. T. (2002). Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology*, 143(9), 3405–3413. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220107>

- Kim, H. R., Kim, Y. S., Yoon, J. A., Lyu, S. W., Shin, H., Lim, H. J., Hong, S. H., Lee, D. R., & Song, H. (2014). Egr1 is rapidly and transiently induced by estrogen and bisphenol A via activation of nuclear estrogen receptor-dependent ERK1/2 pathway in the uterus. *Reproductive Toxicology*, *50*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.010>
- Kim, H. R., Kim, Y. S., Yoon, J. A., Yang, S. C., Park, M., Seol, D. W., Lyu, S. W., Jun, J. H., Lim, H. J., Lee, D. R., & Song, H. (2018). Estrogen induces EGR1 to fine-tune its actions on uterine epithelium by controlling PR signaling for successful embryo implantation. *FASEB Journal*, *32*(3), 1184–1195. <https://doi.org/10.1096/fj.201700854RR>
- Liu, J., Carriere, P. D., Dore, M., & Sirois, J. (1997). Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, *57*(6), 1524–1531. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1524>
- Liu, Jianmin, & Sirois, J. (1998). Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of Reproduction*, *58*(6), 1527–1532. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.6.1527>
- MacLaughlan, S. D., Palomino, W. A., Mo, B., Lewis, T. D., Lininger, R. A., & Lessey, B. A. (2007). Endometrial Expression of Cyr61. *Obstetrics & Gynecology*, *110*(1), 146–154. <https://doi.org/10.1097/01.aog.0000269047.46078.28>
- Nabils, N. H., Broaddus, R. R., McCampbell, A. S., Lu, K. H., Lynch, H. T., Chen, L. M., & Loose, D. S. (2010). Sex hormone regulation of survivin gene expression. *Journal of Endocrinology*, *207*(2), 237–243. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0128>
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L. C., & Conti, M. (2004). EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science*, *303*(5658), 682–684. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>

- Peluso, J. J. (2006). Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biology of Reproduction*, 75(1), 2–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.049924>
- Peluso, J. J., & Pru, J. K. (2014). Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function. *Reproduction*, 147(5), 169–178. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0582>
- Plewes, M. R., Hou, X., Zhang, P., Wood, J., Cupp, A., & Davis, J. S. (2018). Yes-associated protein (YAP) is required in maintaining normal ovarian follicle development and function. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/406256>
- Pocaterra, A., Romani, P., & Dupont, S. (2020). YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(2), 1–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.230425>
- Portela, Valerio M., Machado, M., Buratini, J., 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. *Biology of Reproduction*, 83(3), 339–346. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084277>
- Portela, Valério M., Zamberlam, G., Gonçalves, P. B. D., de Oliveira, J. F. C., & Price, C. A. (2011). Role of angiotensin ii in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 85(6), 1167–1174. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094193>
- Santino, P., Martignani, E., Miretti, S., Baratta, M., & Accornero, P. (2017). Mechanisms of modulation of the Egr gene family in mammary epithelial cells of different species. *General and Comparative Endocrinology*, 247, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.01.020>

- Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C. P., Ginther, O. J., & Wiltbank, M. C. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, *65*(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1403>
- Shimoaka, T., Ogasawara, T., Yonamine, A., Chikazu, D., Kawano, H., Nakamura, K., Itoh, N., & Kawaguchi, H. (2002). Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(9), 7493–7500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108653200>
- Shin, H., Seol, D. W., Nam, M., Song, H., Lee, D. R., & Lim, H. J. (2017). Expression of Egr3 in mouse gonads and its localization and function in oocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *30*(6), 781–787. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0798>
- Sun, T., & Diaz, F. J. (2019). Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1), 9–12. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0552-1>
- Tarcic, G., Avraham, R., Pines, G., Amit, I., Shay, T., Lu, Y., Zwang, Y., Katz, M., Ben-Chetrit, N., Jacob-Hirsch, J., Virgilio, L., Rechavi, G., Mavrothalassitis, G., Mills, G. B., Domany, E., & Yarden, Y. (2012). EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *The FASEB Journal*, *26*(4), 1582–1592. <https://doi.org/10.1096/fj.11-194654>
- Thisse, B., & Thisse, C. (2005). Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology*, *287*(2), 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.011>
- Tokuyama, O., Nakamura, Y., Muso, A., Honda, K., Ishiko, O., & Ogita, S. (2001). Expression and distribution of cyclooxygenase-2 in human periovulatory ovary. *International Journal of Molecular Medicine*, *8*(6), 603–606. <https://doi.org/10.3892/ijmm.8.6.603>

- Valve, E., Penttilä, T. L., Paranko, J., & Härkönen, P. (1997). FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(1), 173–177. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6256>
- Veldhuis, J. D., & Klase, P. A. (1982). Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochemical Journal*, 202(2), 381–386. <https://doi.org/10.1042/bj2020381>
- Wang, J., Zhao, Y., Gu, K., Yu, P., Zhang, B., Wang, W., Yang, J., & Xu, Y. (2014). The novel porcine gene early growth response 4 (Egr4) is differentially expressed in the ovaries of Erhualian and Pietrain pigs. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(4), 587–598. <https://doi.org/10.1071/RD12380>
- Williams, C. S., & DuBois, R. N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(3 33-3). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.3.g393>
- Zhang, X., Ibrahim, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15694–15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601252200>
- Zhou, J., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., & Bondy, C. (1997). Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Molecular Endocrinology*, 11, 1924–1933. doi:10.1210/mend.11.13.0032

Figure legends

Figure 1: Effect of FGF18 and LH on secretion of progesterone (P4) from bovine granulosa cells. Cells were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Data are means \pm SEM of three independent replicates. Asterisk denotes differences between control and treatment groups ($P < 0.05$).

Figure 2: Effect of FGF18 and LH on expression of key genes for the ovulatory process and COX-2 enzyme. Cells from large follicles (≥ 10 mm) were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Abundance of mRNA was measured by real-time PCR. Data are means \pm SEM of three independent replicates. For mRNA, means without common letters are significantly different ($P < 0.05$); no letters indicates no significant effect of treatment. Asterisk denotes differences between control and treatment groups ($P < 0.05$).

Figure 3: Effect of FGF18 and LH on expression Hippo pathway's target genes during preovulatory process. Cells from large follicles (≥ 10 mm) were cultured for 18h in serum-free medium without supplementation and collected for the times shown after FGF18 and LH (10 ng/ml) addition on treatment groups. Abundance of mRNA was measured by real-time PCR. Data are means \pm SEM of three independent replicates. For mRNA, means without common letters are significantly different ($P < 0.05$); no letters indicates no significant effect of treatment.

Table 1. Genes and primer sequence used.

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
H2AFZ	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC
EGR1	TCCCCTGTTTACAATGGTTT	TGGGAGAAAAGGTGGTTGTC
EGR3	GGAGCAAATGAAATGTTGGTG	AGGAAAACCTATGGGGAATG
AREG	CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT	CGTTCTTCAGCGACACCTTCA
EREG	ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA	TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT
CTGF	AGCTGAGCGAGTTGTGTACC	TCCGAAAATGTAGGGGGCAC
CYR61	GGCTCCCCGTTTTGGAATG	TCATTGGTAAACGCGTGTGGA
BIRC5	CTGAGAACGAGCCCGACTTG	ATGTTCTTCTATAGGGTCGTCATCT
ANKRD1	ATCAGTGC GCGGGATAAGTT	GGGAGTATCTCCTTCCCGGT
YAP1	TCCTTTGAGATCCCTGACGATG	TGACGTTTCTCTGGGAGAGC
COX-2	CCTGTGTTCCACCAGGAGAT	CCCTGGCTAGTGCTTCAGAC

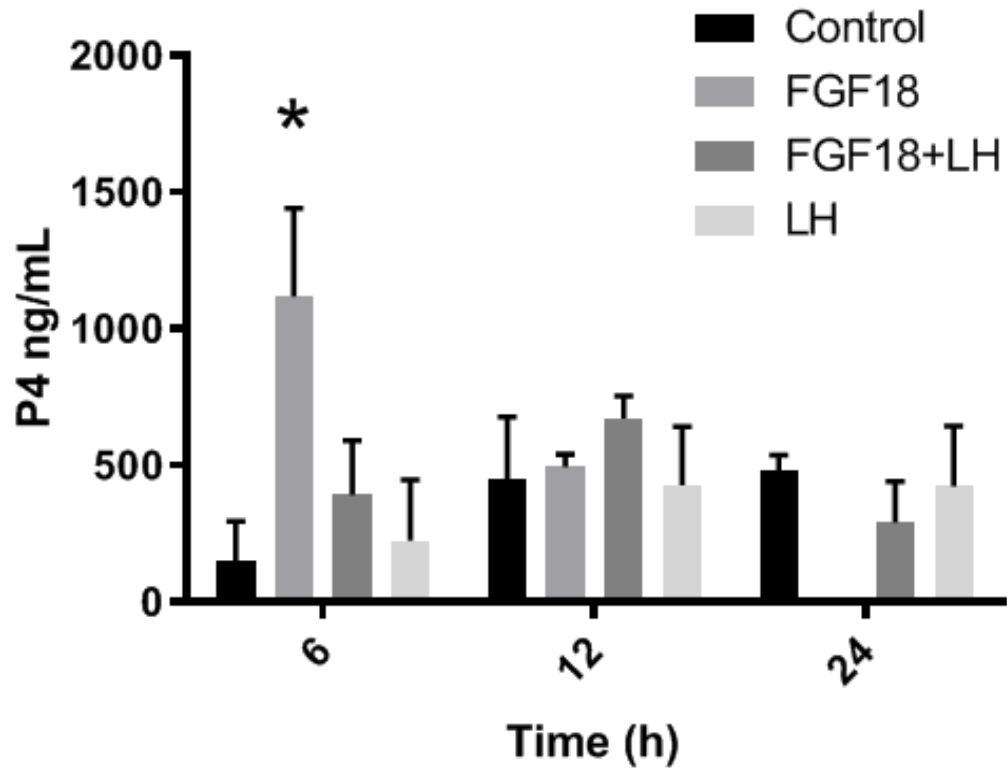


Figure 1.

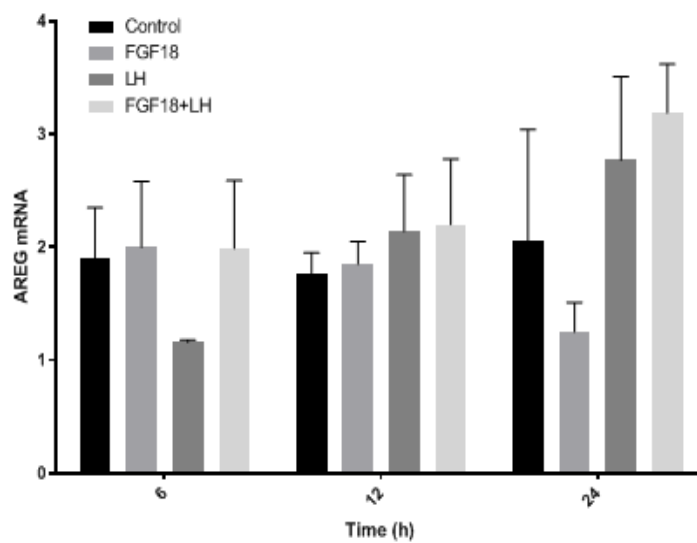
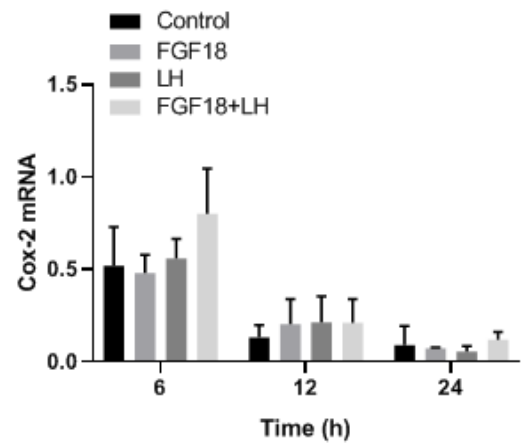
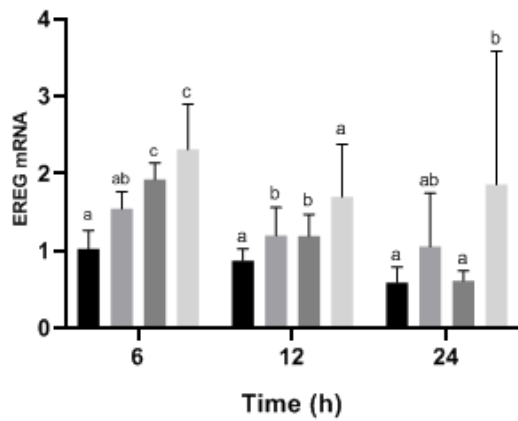
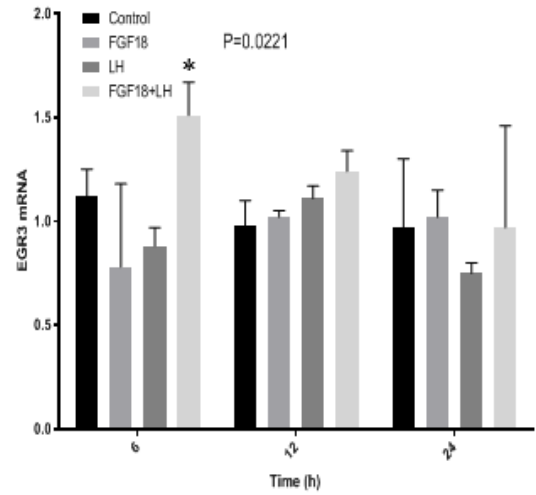
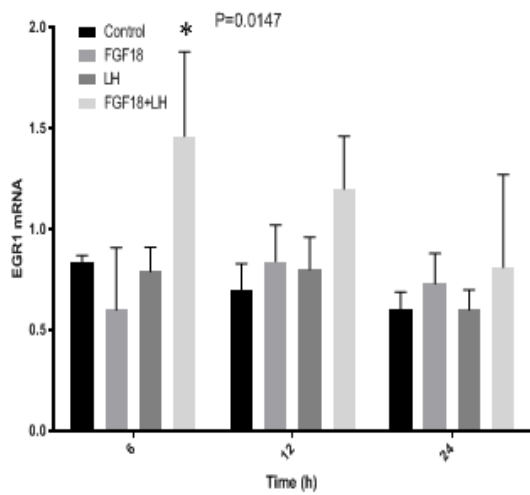


Figure 2.

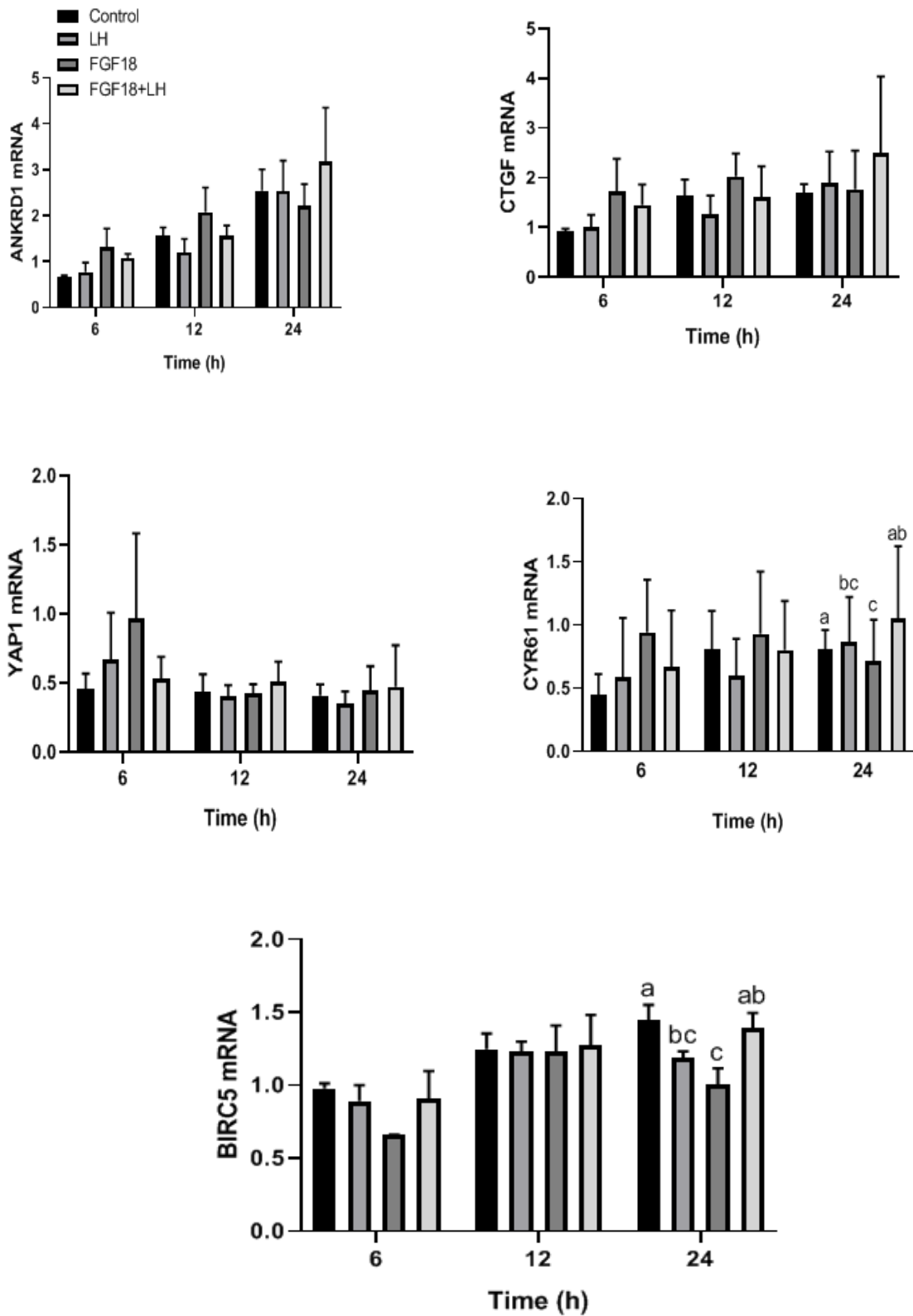


Figure 3.

4 CONCLUSÃO

Na finalidade de elucidar o mecanismo de ação do fator de crescimento de fibroblastos 18 durante eventos pré-ovulatórios na espécie monovulatória, este estudo demonstrou que a presença desse fator é importante no controle dos níveis da progesterona e do hormônio luteinizante, os quais são indispensáveis ao adequado dinamismo do ciclo reprodutivo feminino. Conforme os resultados obtidos, a aplicação do fator na dose administrada sobre o cultivo da granulosa alterou estatisticamente de modo significativo a expressão de alguns genes relacionados com a sobrevivência celular, o que caracteriza sua provável indução pró-apoptótica, apesar da parcial exploração metabólica das células foliculares. Como a maioria dos genes testados responderam melhor ao estímulo do tratamento do LH junto com FGF18 e que a quantidade de progesterona se correlaciona com genes associados à ovulação, pode-se dizer que o fator de crescimento parece influenciar no processo de ruptura folicular.

REFERÊNCIAS

BOULET, Anne M.; CAPECCHI, Mario R. Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 371, n. 2, p. 235–245, 2012. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.08.017. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.017>. Acesso em: 15 nov. 2021.

BU, S. Z. et al. p38 Mitogen-activated protein kinases is required for counteraction of 2-methoxyestradiol to estradiol-stimulated cell proliferation and induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells via phosphorylation Bcl-2. **Apoptosis**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 413–425, 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-4064-z.

BURATINI, J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles.

Reproduction, [S. l.], v. 130, n. 3, p. 343–350, 2005. DOI: 10.1530/rep.1.00642.

BURATINI, J.; PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R. L.; GIOMETTI, I. C.;

PORTELA, V. M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles.

Biology of Reproduction, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 743–750, 2007. DOI:

10.1095/biolreprod.107.062273.

CHAPMAN, Susan C.; CAI, Qin; BLEYL, Steven B.; SCHOENWOLF, Gary C. Restricted expression of Fgf16 within the developing chick inner ear. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 235, n. 8, p. 2276–2281, 2006. DOI: 10.1002/dvdy.20872.

CHAVES, Roberta Nogueira; TAVARES DE MATOS, Maria Helena; BURATINI, Jo s; RICARDO DE FIGUEIREDO, Jo s. The fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, [*S. l.*], v. 24, n. 7, p. 905–915, 2012. DOI: 10.1071/RD11318.

CHOI, Kwang Hwan; LEE, Dong Kyung; OH, Jong Nam; SON, Hye Young; LEE, Chang Kyu. FGF2 Signaling Plays an Important Role in Maintaining Pluripotent State of Pig Embryonic Germ Cells. **Cellular Reprogramming**, [*S. l.*], v. 20, n. 5, p. 301–311, 2018. DOI: 10.1089/cell.2018.0019.

CHOI, Yohan; WILSON, Kalin; HANNON, Patrick R.; ROSEWELL, Katherine L.; BR ANNSTR OM, Mats; AKIN, James W.; CURRY, Thomas E.; JO, Misung. Coordinated regulation among progesterone, prostaglandins, and egf-like factors in human ovulatory follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [*S. l.*], v. 102, n. 6, p. 1971–1982, 2017. DOI: 10.1210/jc.2016-3153.

CHUA, Steven S.; MA, Zhi Qing; GONG, Lei; LIN, Sue Hwa; DEMAYO, Francesco J.; TSAI, Sophia Y. Ectopic expression of FGF-3 results in abnormal prostate and Wolffian duct development. **Oncogene**, [*S. l.*], v. 21, n. 12, p. 1899–1908, 2002. DOI: 10.1038/sj.onc.1205096.

CLAY, Colin M.; CHERRINGTON, Brian D.; NAVRATIL, Amy M. Plasticity of Anterior Pituitary Gonadotrope Cells Facilitates the Pre-Ovulatory LH Surge. **Frontiers in Endocrinology**, [*S. l.*], v. 11, n. February, p. 1–7, 2021. DOI: 10.3389/fendo.2020.616053.

CONTI, Marco. Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 1653–1661, 2002. DOI: 10.1095/biolreprod.102.004952.

DA SILVA, Rubia Bueno; YANG, Ming Y.; CAIXETA, E. S.; CASTILHO, Anthony C.; AMORIM, R. L.; PRICE, C. A.; FORTUNE, J. E.; BURATINI, J. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, [S. l.], v. 86, n. 2, p. 166–174, 2019. DOI: 10.1002/mrd.23091.

DAVIS, John Robert; TAPON, Nicolas. Hippo signalling during development. **Development (Cambridge)**, [S. l.], v. 146, n. 18, 2019. DOI: 10.1242/dev.167106.

DOS SANTOS, Esdras Corrêa; LALONDE-LARUE, Ariane; ANTONIAZZI, Alfredo Quites; BARRETA, Marcos Henrique; PRICE, Christopher A.; DIAS GONÇALVES, Paulo Bayard; PORTELA, Valério Marques; ZAMBERLAM, Gustavo. YAP signaling in preovulatory granulosa cells is critical for the functioning of the EGF network during ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 541, n. November 2021, 2022. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111524.

FAN HENG-YU, HEDRICK, Stephen M.; RICHARDS, Joanne S. MAP3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, [S. l.], n. May, p. 938–942, 2009. DOI: 10.1126/science.1171396.

FORD-PERRISS, Miriam; ABUD, Helen; MURPHY, Mark. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 493–503, 2001. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2001.03477.x.

FORTUNE, J. E.; WILLIS, E. L.; BRIDGES, P. J.; YANG, C. S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal reproduction**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 60–71, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390049><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2853051>. Acesso em: 29 nov. 2021.

GERSHON, Eran; DEKEL, Nava. Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3390/ijms21124565.

GIMENO, L.; BRÛLET, P.; MARTÍNEZ, S. Study of Fgf15 gene expression in developing mouse brain. **Gene Expression Patterns**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 473–481, 2003. DOI: 10.1016/S1567-133X(03)00059-0.

GONÇALVES, P. B.; GASPERIN, B.; FERREIRA, R.; SANTOS, J. Control of ovulation in mammals. **Animal Reproduction**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 354–361, 2012.

GOSPODAROWICZ, D.; JONES, K. L.; SATO, G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 71, n. 6, p. 2295–2299, 1974. DOI: 10.1073/pnas.71.6.2295.

GOSPODAROWICZ, Denis; ILL, Charles R.; BIRDWELL, Charles R. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. **Endocrinology**, [*S. l.*], v. 100, n. 4, p. 1121–1128, 1977. DOI: 10.1210/endo-100-4-1121.

GUERRERO-NETRO, Hilda M.; CHORFI, Younès; PRICE, Christopher A. Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on steroidogenesis and apoptosis in granulosa cells. **Reproduction**, [*S. l.*], v. 149, n. 6, p. 555–561, 2015. DOI: 10.1530/REP-15-0018.

HAJIHOSSEINI, Mohammad K.; HEATH, John K. Expression patterns of fibroblast growth factors-18 and -20 in mouse embryos is suggestive of novel roles in calvarial and limb development. **Mechanisms of Development**, [*S. l.*], v. 113, n. 1, p. 79–83, 2002. DOI: 10.1016/S0925-4773(01)00656-6.

HAN, Jin Kwan; MARTIN, Gail R. **Embryonic expression of Fgf-6 is restricted to the skeletal muscle lineage** **Developmental Biology**, 1993. DOI: 10.1006/dbio.1993.1212.

HARTUNG, Helge; FELDMAN, Benjamin; LOVEC, Heike; COULIER, Francois; BIRNBAUM, Daniel; GOLDFARB, Mitchell. Murine FGF-12 and FGF-13: Expression in embryonic nervous system, connective tissue and heart. **Mechanisms of Development**, [*S. l.*], v. 64, n. 1–2, p. 31–39, 1997. DOI: 10.1016/S0925-4773(97)00042-7.

HAVELOCK, Jon C.; RAINEY, William E.; CARR, Bruce R. Ovarian granulosa cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [*S. l.*], v. 228, n. 1–2, p. 67–78, 2004. DOI: 10.1016/j.mce.2004.04.018.

HEALLEN, Todd; MORIKAWA, Yuka; LEACH, John; TAO, Ge; WILLERSON, James T.; JOHNSON, Randy L.; MARTIN, James F. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. **Development (Cambridge)**, [S. l.], v. 140, n. 23, p. 4683–4690, 2013. DOI: 10.1242/dev.102798.

HSUEH, Aaron J. W.; KAWAMURA, Kazuhiro. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 114, n. 3, p. 458–464, 2020. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.07.031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.07.031>. Acesso em: 1 dez. 2021.

HSUEH, Aaron J. W.; KAWAMURA, Kazuhiro; CHENG, Yuan; FAUSER, Bart C. J. M. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 1–24, 2015. DOI: 10.1210/er.2014-1020.

IGARASHI, Makoto; FINCH, Paul W.; AARONSON, Stuart A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 21, p. 13230–13235, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.21.13230.

ITOH, Nobuyuki; ORNITZ, David M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 563–569, 2004. DOI: 10.1016/j.tig.2004.08.007.

JI, Shu-Yan; LIU, Xiao-Man; LI, Bo-Tai; ZHANG, Yin-Li; LIU, Hong-Bin; ZHANG, Yu-Chao; CHEN, Zi-Jiang; LIU, Junping; FAN, Heng-Yu. The Polycystic Ovary Syndrome-associated Gene Yap1 is Regulated by Gonadotropins and Sex Steroid Hormones in

Hyperandrogenism-induced Oligo-ovulation in Mouse. **Molecular Human Reproduction**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 698-707, 2017. DOI: 10.1093/molehr/gax046.

JIANG, Z. Z. et al. Survivin is essential for fertile egg production and female fertility in mice. **Cell Death and Disease**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1038/cddis.2014.126.

JIN, Hanyong; WON, Miae; SHIN, Eunyoung; KIM, Hong Man; LEE, Kangseok; BAE, Jeehyeon. EGR2 is a gonadotropin-induced survival factor that controls the expression of IER3 in ovarian granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 482, n. 4, p. 877–882, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.127. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.127>. Acesso em: 1 dez. 2021.

JOHNSON, Randy; HALDER, Georg. The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 63–79, 2014. DOI: 10.1038/nrd4161. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4161>. Acesso em: 3 dez. 2021.

KAWAMURA, Kazuhiro et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 43, p. 17474–17479, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1312830110.

KHAN, Daulat Raheem; FOURNIER, Éric; DUFORT, Isabelle; RICHARD, François J.; SINGH, Jaswant; SIRARD, Marc André. Meta-analysis of gene expression profiles in

granulosa cells during folliculogenesis. **Reproduction**, [*S. l.*], v. 151, n. 6, p. R103–R110, 2016. DOI: 10.1530/REP-15-0594.

KLEIN, C. Novel equine conceptus-endometrial interactions on Day 16 of pregnancy based on RNA sequencing. **Reproduction, Fertility and Development**, [*S. l.*], v. 28, n. 11, p. 1712–1720, 2016. DOI: 10.1071/RD14489.

KOOS, Robert D.; OLSON, C. Erik. Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in the Rat Ovary: Detection of mRNA Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Amplification. **Molecular Endocrinology**, [*S. l.*], v. 3, n. 12, p. 2041–2048, 1989. DOI: 10.1210/mend-3-12-2041.

KUROSE, Hitomi; OKAMOTO, Mayumi; SHIMIZU, Miyuki; BITO, Takaaki; MARCELLE, Christophe; NOJI, Sumihare; OHUCHI, Hideyo. FGF19-FGFR4 signaling elaborates lens induction with the FGF8-L-Maf cascade in the chick embryo. **Development Growth and Differentiation**, [*S. l.*], v. 47, n. 4, p. 213–223, 2005. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2005.00795.x.

LAVADO, Alfonso et al. The Hippo Pathway Prevents YAP/TAZ-Driven Hypertranscription and Controls Neural Progenitor Number. **Developmental Cell**, [*S. l.*], v. 47, n. 5, p. 576-591.e8, 2018. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.09.021.

LAVRANOS, Tina C.; RODGERS, Helen F.; BERTONCELLO, Ivan; RODGERS, Raymond J. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: The effects of basic

fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation **Experimental Cell Research**, 1994. DOI: 10.1006/excr.1994.1084.

LEE, Joo Hyeon et al. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 1231–1242, 2008. DOI: 10.1038/emboj.2008.63.

LI, Lin; HUANG, Xuan; HE, Zhiming; XIONG, Yuanyan; FANG, Qun. miRNA-210-3p regulates trophoblast proliferation and invasiveness through fibroblast growth factor 1 in selective intrauterine growth restriction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 4422–4433, 2019. DOI: 10.1111/jcmm.14335.

LI, Qinglei; JIMENEZ-KRASSEL, Fermin; BETTEGOWDA, Anilkumar; IRELAND, James J.; SMITH, George W. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 192, n. 3, p. 473–483, 2007. DOI: 10.1677/JOE-06-0020.

LIN, Chuwen; YAO, Erica; CHUANG, Pao Tien. A conserved MST1/2-YAP axis mediates Hippo signaling during lung growth. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 403, n. 1, p. 101–113, 2015. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.04.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.04.014>. Acesso em: 5 dez. 2021.

LIN, Kimberly C.; PARK, Hyun Woo; GUAN, Kun Liang. Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 42, n. 11, p. 862–872, 2017. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.09.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.003>. Acesso em: 26 jan. 2022.

LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M. 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S. l.], v. 101, n. 3, p. 697–701, 1994. DOI: 10.1530/jrf.0.1010697.

MALIK, Anna R.; URBANSKA, Malgorzata; GOZDZ, Agata; SWIECH, Lukasz J.; NAGALSKI, Andrzej; PERYCZ, Malgorzata; BLAZEJCZYK, Magdalena; JAWORSKI, Jacek. Cyr61, a matricellular protein, is needed for dendritic arborization of hippocampal neurons. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 12, p. 8544–8559, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.411629.

MANSUKHANI, Alka; BELLOSTA, Paola; SAHNI, Malika; BASILICO, Claudio. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. **Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 149, n. 6, p. 1297–1308, 2000. DOI: 10.1083/jcb.149.6.1297.

MARASHI, Fatemeh Amin; TORABI, Ali; BEAUDRY, Francis. Granulosa cells exposed to fibroblast growth factor 8 and 18 reveal early onset of cell growth and survival. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 435–444, 2019. DOI: 10.18502/ijrm.v17i6.4815.

MARSH, John M. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. **Biology of reproduction**, [S. l.], v.14, n.1, p. 30–53, 1976. DOI: [10.1095/biolreprod14.1.30](https://doi.org/10.1095/biolreprod14.1.30).

MARUO, Takeshi; LADINES-LLAVE, Cecilia A.; SAMOTO, Takashi; MATSUO, Hiroya; MANALO, Augusto S.; ITO, Hiroshi; MOCHIZUKI, Matsuto. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. **Endocrinology**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 924–931, 1993. DOI: 10.1210/endo.132.2.8425504.

MCGEE, Elizabeth A.; HSUEH, Aaron J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000. DOI: 10.1210/er.21.2.200.

MONNIAUX, Danielle; ELIS, Sebastien; MAILLARD, Virginie. Folliculogenesis Provided for non-commercial research and educational use . [S. l.], n. October 2020, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-812199-3.64550-4.

O'DONOVAN, Kevin J.; TOURTELLOTTE, Warren G.; MILBRANDT, Jeffrey; BARABAN, Jay M. The EGR family of transcription-regulatory factors: Progress at the interface of molecular and systems neuroscience. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 167–173, 1999. DOI: 10.1016/S0166-2236(98)01343-5.

OHATA, Yasuhisa et al. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1627–1638, 2014. DOI: 10.1002/jbmr.2186.

PANIGONE, Sara; HSIEH, Minnie; FU, Maoyong; PERSANI, Luca; CONTI, Marco. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the

epidermal growth factor receptor pathway. **Molecular Endocrinology**, [*S. l.*], v. 22, n. 4, p. 924–936, 2008. DOI: 10.1210/me.2007-0246.

PARK, Jy Young; SU, You Qiang; ARIGA, Miyako; LAW, Evelyn; JIN, S. L. Catherin.; CONTI, Marco. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, [*S. l.*], v. 303, n. 5658, p. 682–684, 2004. DOI: 10.1126/science.1092463.

PARROTT, Jeff A.; SKINNER, Michael K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, [*S. l.*], v. 139, n. 1, p. 228–235, 1998. DOI: 10.1210/endo.139.1.5680.

PORTELA, Valério M.; DIRANDEH, Essa; GUERRERO-NETRO, Hilda M.; ZAMBERLAM, Gustavo; BARRETA, Marcos H.; GOETTEN, André F.; PRICE, Christopher A. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. **Biology of Reproduction**, [*S. l.*], v. 92, n. 1, 2015. DOI: 10.1095/biolreprod.114.121376.

PORTELA, Valerio M.; MACHADO, Mariana; BURATINI, Jose; ZAMBERLAM, Gustavo; AMORIM, Renee L.; GONCALVES, Paulo; PRICE, Christopher A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, [*S. l.*], v. 83, n. 3, p. 339–346, 2010. DOI: 10.1095/biolreprod.110.084277.

PRENZEL, Norbert; ZWICK, Esther; DAUB, Henrik; LESERER, Michael; ABRAHAM, Reimar; WALLASCH, Christian; ULLRICH, Axel. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. **Nature**, [*S. l.*], [*S. l.*], 402, December, p. 2–6, 1999. DOI: 10.1038/47260.

PRICE, Christopher A. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. **Journal of Endocrinology**, [*S. l.*], v. 228, n. 2, p. R31–R43, 2016. DOI: 10.1530/JOE-15-0414.

RICHANI, Dulama; GILCHRIST, Robert B. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update**, [*S. l.*], v. 24, n. 1, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1093/humupd/dmx029.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, [*S. l.*], v. 60, n. 1, p. 51–89, 1980. DOI: 10.1152/physrev.1980.60.1.51.

RICHARDS, J. S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, [*S. l.*], v. 15, n. 2, p. 209–218, 2001. DOI: 10.1210/me.15.2.209.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, [*S. l.*], v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001. DOI: 10.1095/biolreprod65.5.1403.

SAYASITH, Khampoune; BROWN, Kristy A.; LUSSIER, Jacques G.; DORÉ, Monique; SIROIS, Jean. Characterization of bovine early growth response factor-1 and its gonadotropin-dependent regulation in ovarian follicles prior to ovulation. **Journal of Molecular Endocrinology**, [*S. l.*], v. 37, n. 2, p. 239–250, 2006. DOI: 10.1677/jme.1.02078.

SCHNEIDER, Marlon R.; WOLF, Eckhard. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, [*S. l.*], v. 218, n. 3, p. 460–466, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21635.

SHIMADA, Masayuki; UMEHARA, Takashi; HOSHINO, Yumi. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. **Reproductive Medicine and Biology**, [*S. l.*], v. 15, n. 4, p. 201–216, 2016. DOI: 10.1007/s12522-016-0236-x.

SHIN, Hyejin; SEOL, Dong Won; NAM, Minyeong; SONG, Haengseok; LEE, Dong Ryul; LIM, Hyunjung Jade. Expression of Egr3 in mouse gonads and its localization and function in oocytes. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [*S. l.*], v. 30, n. 6, p. 781–787, 2017. DOI: 10.5713/ajas.16.0798.

SINGH, Balwant; RUTLEDGE, Jean M.; ARMSTRONG, David T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, [*S. l.*], v. 40, n. 4, p. 391–399, 1995. DOI: 10.1002/mrd.1080400402.

SIROIS, Jean; SAYASITH, Khampoune; BROWN, Kristy A.; STOCK, Angelika E.; BOUCHARD, Nadine; DORÉ, Monique. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: A 2004 account. **Human Reproduction Update**, [*S. l.*], v. 10, n. 5, p. 373–385, 2004. DOI: 10.1093/humupd/dmh032.

SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and

steroidogenesis of bovine thecal Cells: Role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 255–263, 1996. DOI: 10.1095/biolreprod54.1.255.

ŠUĆUROVIĆ, Sandra; NIKOLIĆ, Tamara; BROSENS, Jan J.; MULAC-JERICEVIC, Biserka. Spatial and Temporal Analyses of FGF9 Expression during Early Pregnancy. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 2318–2329, 2017. DOI: 10.1159/000480004.

SUGIURA, Koji et al. Erratum: Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells (Development vol. 134 (2593-2603)). **Development**, [S. l.], v. 135, n. 4, p. 786, 2008. DOI: 10.1242/dev.020024.

SUN, Tianyanxin; DIAZ, Francisco J. Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 9–12, 2019. DOI: 10.1186/s12958-019-0552-1.

TANAKA, Satoshi; KUNATH, Tilo; HADJANTONAKIS, Anna-katerina. a - cosk. Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4. **Science**, [S. l.], v. 282, n. 5396, December, p. 2072–2075, 1998. DOI: 10.1126/science.282.5396.2072.

TEJEDOR, Gautier et al. Whole embryo culture, transcriptomics and RNA interference identify TBX1 and FGF11 as novel regulators of limb development in the mouse. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-60217-w.

THISSE, Bernard; THISSE, Christine. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 287, n. 2, p. 390–402, 2005. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.09.011.

UMA, J.; MURALY, P.; VERMA-KUMAR, Shalu; MEDHAMURTHY, R. Determination of onset of apoptosis in granulosa cells of the preovulatory follicles in the bonnet monkey (*Macaca radiata*): Correlation with mitogen-activated protein kinase activities. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 1379–1387, 2003. DOI: 10.1095/biolreprod.103.017897.

USUI, Hiroko; SHIBAYAMA, Masaki; OHBAYASHI, Norihiko; KONISHI, Morichika; TAKADA, Shinji; ITOH, Nobuyuki. Fgf18 is required for embryonic lung alveolar development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 322, n. 3, p. 887–892, 2004. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.198.

VALVE, Eeva; PENTTILÄ, Tarja Leena; PARANKO, Jorma; HÄRKÖNEN, Pirkko. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 232, n. 1, p. 173–177, 1997. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6256.

VELDHUIS, J. D.; KLASE, P. A. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 381–386, 1982. DOI: 10.1042/bj2020381.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of animal science**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 2696–2702, 1994. DOI: 10.2527/1994.72102696x.

VILA-CEJUDO, Marta; ALONSO-ALONSO, Sandra; PUJOL, Anna; SANTALÓ, Josep; IBÁÑEZ, Elena. Wnt pathway modulation generates blastomere-derived mouse embryonic stem cells with different pluripotency features. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 2967–2979, 2020. DOI: 10.1007/s10815-020-01964-7.

VILSMAS, Antonis; BLETSA, Ritsa; MAVROGIANNI, Despina; MAMALI, Georgina; PERGAMALI, Maria. Microarray Analyses Reveal Marked Differences in Growth Factor and Receptor Expression Between 8-Cell Human Embryos and Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 160-177, 2015. DOI: 10.1089/scd.2015.0284.

VOLENTINE, Kendra K.; YAO, Humphrey Hung Chang; BAHR, Janice M. Epidermal growth factor in the germinal disc and its potential role in follicular development in the chicken. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 522–526, 1998. DOI: 10.1095/biolreprod59.3.522.

WANG, Jingjing; ZHAO, Yongyan; GU, Kecui; YU, Ping; ZHANG, Baole; WANG, Wei; YANG, Juanjuan; XU, Yinxue. The novel porcine gene early growth response 4 (Egr4) is differentially expressed in the ovaries of Erhualian and Pietrain pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 587–598, 2014. DOI: 10.1071/RD12380.

WANG, Yajun; GE, Wei. Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: Evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 749–760, 2004. DOI: 10.1095/biolreprod.104.028399.

VELDHUIS, J. D.; KLASE, P. A. Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 381–386, 1982. DOI: 10.1042/bj2020381.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of animal science**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 2696–2702, 1994. DOI: 10.2527/1994.72102696x.

VILA-CEJUDO, Marta; ALONSO-ALONSO, Sandra; PUJOL, Anna; SANTALÓ, Josep; IBÁÑEZ, Elena. Wnt pathway modulation generates blastomere-derived mouse embryonic stem cells with different pluripotency features. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 2967–2979, 2020. DOI: 10.1007/s10815-020-01964-7.

VILSMAS, Antonis; BLETSA, Ritsa; MAVROGIANNI, Despina; MAMALI, Georgina; PERGAMALI, Maria. Microarray Analyses Reveal Marked Differences in Growth Factor and Receptor Expression Between 8-Cell Human Embryos and Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 160-177, 2015. DOI: 10.1089/scd.2015.0284.

VOLENTINE, Kendra K.; YAO, Humphrey Hung Chang; BAHR, Janice M. Epidermal growth factor in the germinal disc and its potential role in follicular development in the

chicken. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 522–526, 1998. DOI: 10.1095/biolreprod59.3.522.

WANG, Jingjing; ZHAO, Yongyan; GU, Kecui; YU, Ping; ZHANG, Baole; WANG, Wei; YANG, Juanjuan; XU, Yinxue. The novel porcine gene early growth response 4 (Egr4) is differentially expressed in the ovaries of Erhualian and Pietrain pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 587–598, 2014. DOI: 10.1071/RD12380.

WANG, Yajun; GE, Wei. Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: Evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 749–760, 2004. DOI: 10.1095/biolreprod.104.028399.

WU, Zhengming; GUAN, Kun Liang. Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 51–63, 2021. DOI: 10.1016/j.tibs.2020.08.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.08.008>. Acesso em: 5 dez. 2021.

YAMASHITA, Yasuhisa; HISHINUMA, Mitsugu; SHIMADA, Masayuki. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. **Journal of Ovarian Research**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–9, 2009. DOI: 10.1186/1757-2215-2-20.

YAMASHITA, Yasuhisa; SHIMADA, Masayuki. The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. **Journal of Reproduction and Development**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 510–514, 2012. DOI: 10.1262/jrd.2012-056.

YANG, Rui; CHEN, Ying; CHEN, Daozhen. Biological functions and role of CCN1/Cyr61 in embryogenesis and tumorigenesis in the female reproductive system (Review). **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 3–10, 2018. DOI: 10.3892/mmr.2017.7880.

YANG, Yongkang et al. Circulating fibroblast growth factor 21 as a potential biomarker for missed abortion in humans. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 116, n. 4, p. 1040–1049, 2021.

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.05.098. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.05.098>. Acesso em: 14 dez. 2021.

YAO, H. H. C.; BAHR, J. M. Germinal disc-derived epidermal growth factor: A paracrine factor to stimulate proliferation of granulosa cells. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 390–395, 2001. DOI: 10.1095/biolreprod64.1.390.

YEHT, John; OSATHANONDH, Rapin. Expression of messenger ribonucleic acids encoding for basic fibroblast growth factor (FGF) and alternatively spliced FGF receptor in human fetal ovary and uterus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 77, n. 5, p. 1367-1371, August, 2008. DOI: 10.1210/jcem.77.5.8077334.

YONEI-TAMURA, Sayuri; ENDO, Tetsuya; YAJIMA, Hiroshi; OHUCHI, Hideyo; IDE, Hiroyuki; TAMURA, Koji. FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in

chick embryos. **Developmental Biology**, [*S. l.*], v. 211, n. 1, p. 133–143, 1999. DOI: 10.1006/dbio.1999.9290.

YOO, Young Gun; LEE, Mi Ock. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 279, n. 35, p. 36242–36249, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M401290200.

YOSHIMURA, Yasunori; DHARMARAJAN, A. M.; GIPS, Sanford; ADACHI, Tomoko; HOSOI, Yoshihiko; ATLAS, Susan J.; WALLACH, Edward E. Effects of prostacyclin on ovulation and microvasculature of the in vitro perfused rabbit ovary. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [*S. l.*], v. 159, n. 4, p. 977–982, 1988. DOI: 10.1016/S0002-9378(88)80184-4.

YUAN, Suzhen; WEN, Jingyi; CHENG, Jing; SHEN, Wei; ZHOU, Su; YAN, Wei; SHEN, Lu; LUO, Aiyue; WANG, Shixuan. Age-associated up-regulation of EGR1 promotes granulosa cell apoptosis during follicle atresia in mice through the NF- κ B pathway. **Cell Cycle**, [*S. l.*], v. 15, n. 21, p. 2895–2905, 2016. DOI: 10.1080/15384101.2016.1208873.

YUE, Minghui; LAN, Yu; LIU, Han; WU, Zhaoming; IMAMURA, Toru; JIANG, Rulang. Tissue-specific analysis of Fgf18 gene function in palate development. **Developmental Dynamics**, [*S. l.*], v. 250, n. 4, p. 562–573, 2021. DOI: 10.1002/dvdy.259.

ZHANG, Bo; TSANG, Paul C. W.; PATE, Joy L.; MOSES, Marsha A. A role for cysteine-rich 61 in the angiogenic switch during the estrous cycle in cows: Regulation by prostaglandin

F 2alpha. **Biology of Reproduction**, [*S. l.*], v. 85, n. 2, p. 261–268, 2011. DOI: 10.1095/biolreprod.110.086645.

ZHANG, Jinglin et al. FGF18, a prominent player in FGF signaling, promotes gastric tumorigenesis through autocrine manner and is negatively regulated by miR-590-5p.

Oncogene, [*S. l.*], v. 38, n. 1, p. 33–46, 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0430-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0430-x>. Acesso em: 14 dez. 2021.

ZHANG, Kun; HANSEN, Peter J.; EALY, Alan D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, [*S. l.*], v. 140, n. 6, p. 815–826, 2010. DOI: 10.1530/REP-10-0190.

ZHANG, Xiuqin; IBRAHIMI, Omar A.; OLSEN, Shaun K.; UMEMORI, Hisashi; MOHAMMADI, Moosa; ORNITZ, David M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 281, n. 23, p. 15694–15700, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M601252200.

ZHENG, Wenjing; ZHANG, Hua; GORRE, Nagaraju; RISAL, Sanjiv; SHEN, Yan; LIU, Kui. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. **Human Molecular Genetics**, [*S. l.*], v. 23, n. 4, p. 920–928, 2014. DOI: 10.1093/hmg/ddt486.

ZHONG, W.; WANG, Q. T.; SUN, T.; WANG, F.; LIU, J.; LEACH, R.; JOHNSON, A.; PUSCHECK, E. E.; RAPPOLEE, D. A. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem

cells. **Molecular Reproduction and Development**, [*S. l.*], v. 73, n. 5, p. 540–550, 2006.

DOI: 10.1002/mrd.20417.

ZHOU, Jian; CHIN, Edward; BONDY, Carolyn. Cellular Pattern of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-I Receptor Gene Expression in the Developing and Mature Ovarian Follicle. **Endocrinology**, [*S. l.*], v. 129, n. 6, p. 3281-3288, 1991. DOI: 10.1210/endo-129-6-381.