

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

Elisabeth Schmidt da Silva

**Fator de crescimento fibroblástico 18 (FGF18) modula a expressão de
CTGF em CCOs e embriões bovinos produzidos *in vitro***

Santa Maria, RS

2021

Elisabeth Schmidt da Silva

**FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 18 (FGF18) MODULA
A EXPRESSÃO DE CTGF EM CCOs E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programada 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 obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS

2021

Silva, Elisabeth Schmidt

Fator de crescimento fibroblástico 18 (FGF18) modula a expressão de CTGF em CCOs e embriões bovinos produzidos in vitro / Elisabeth Schmidt Silva.- 2021.
43 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, 2021

1. Via Hippo 2. Desenvolvimento embrionário 3. Fator de crescimento fibroblástico 18 n I. Bayard Dias Gonçalves, Paulo II. Valdetar Marques Portela Júnior, Valério III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da unsm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt patta com 10/1728.

Declaro, ELISABETH SCHMIDT SILVA, 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.

**FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 18 (FGF18) MODULA
A EXPRESSÃO DE CTGF EM CCOs E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***


Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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 Medicina Veterinária**.

Aprovado em 01 de março de 2021



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

(Presidente/Orientador)



Marcos Henrique Barreta, Dr. – (UFSC)



Juliana Germano Ferst, Dr. – (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS

2021

DEDICATÓRIA

Dedico minha dissertação aos meus pais que tanto fizeram e fazem por mim. Pelos dias em que não pude me fazer presente pois tinha prazos a cumprir. Dedico também ao meu orientador Paulo Bayard e meu coorientador Valério Portela por terem acreditado em mim, e terem me dado a oportunidade de aprender e crescer junto a vocês no laboratório.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me permitido passar por esses dois anos com saúde e lucidez, me guiando sempre pelo melhor caminho.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e incentivam a estudar, e dar o meu melhor em tudo que eu faço, pois sem vocês teria sido muito difícil essa caminhada.

Ao meu orientador Paulo Bayard por ter me dado um voto de confiança quando me aceitou para ser sua aluna de mestrado. Aprendi muito nesses dois anos, tanto pessoal como profissionalmente. Muito obrigada.

Ao meu coorientador Valério Portela por ter me dado a oportunidade de dar aulas, e a oportunidade de aprender junto ao senhor essa via que temos tanto mais a aprender. Obrigada pelos anos que pudemos trabalhar juntos no laboratório.

Ao professor Alfredo que sempre nos seus momentos de descanso vinha a sala dos pós para conversar e oferecer suas histórias de vida e aprendizado. Fica aqui o meu muito obrigada.

Ao professor Marcos Barreta que junto ao professor Valério Portela me ofereceram as células para que o estudo pudesse ser completado.

As manas que me acolheram tão bem a três anos atrás, vocês são incríveis gurias, só tenho a agradecer imensamente pela oportunidade de poder trabalhar ao lado de vocês. Obrigada pelos vários happy hour tanto no tio Schin, no tio Piu como no Moritinha. Aos demais colegas de laboratório, todos vocês me ensinaram um pouco, e desse pouco eu cresci e aprendi muito.

Aos estagiários do BioRep, os quais tive a oportunidade de ensinar e aprender junto a vocês.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ter realizado meu sonho em uma instituição de excelência.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FAPERGS e FINEP por proporcionar as condições necessárias para a realização dessa pesquisa. Agradeço especialmente ao CNPq pela bolsa de estudos que me permitiu concretizar o mestrado.

Deixo aqui meu muito obrigada a todos que de alguma forma eu pude ter o prazer de conhecer e aprender junto a vocês. Sou eternamente grata a equipe BioRep por ter deixado eu fazer parte dessa história.

RESUMO

FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 18 (FGF18) MODULA A EXPRESSÃO DE CTGF EM CCOs E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

AUTORA: Elisabeth Schmidt da Silva

ORIENTADOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Em 1995 a via Hippo foi inicialmente descoberta na *Drosophila melanogaster*, e desde então diversos pesquisadores vêm tentando entender melhor essa via. A via Hippo está relacionada a processos de proliferação celular, tanto em células foliculares ovarianas como no desenvolvimento embrionário. Os efetores dessa via, YAP e TAZ atuam como coativadores de transcrição de genes de proliferação e sobrevivência celular como CTGF e CYR61. Porém o fator de crescimento de fibroblasto também induz a expressão de CTGF. E segundo estudos recentes foi descoberto que o fator de crescimento fibroblástico 18 (FGF18) está presente na tuba uterina durante o desenvolvimento embrionário inicial. Isso nos levou a pensar que o FGF18 teria alguma função durante o desenvolvimento embrionário. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar se o FGF18 modula a via Hippo através da expressão de genes alvos de proliferação celular (CTGF e CYR61) durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial. Para isso três experimentos foram realizados. No primeiro experimento complexos cumulus oocito (CCOs) de bovinos foram maturados *in vitro* durante 6, 12 e 24 horas na presença de concentrações graduais de FGF18(0, 10 e 100ng/mL). No segundo experimento os CCOs foram maturados 3, 6 e 9 horas na presença de 0 ou 100ng/mL de FGF18. No experimento três CCOs foram colocados para maturação e foram divididos em três grupos. Um grupo considerado grupo controle no qual CCOs foram maturados, realizada a fertilização *in vitro* (FIV) e depois cultivados *in vitro* (CIV) sem a adição de FGF18. Um grupo no qual 100ng/mL de FGF18 foram adicionados durante as 24 horas da maturação *in vitro* e após foi realizado a fertilização e o cultivo em meios sem adição de FGF18. E um terceiro grupo os CCOs foram cultivados (CIV) por sete dias na presença de 100ng/mL de FGF18. Neste grupo a MIV e FIV foram realizadas na ausência de FGF18. Os genes avaliados nos três experimentos foram os genes de proliferação celular, CTGF e CYR61. O experimento um que teve o objetivo de avaliar a adição de concentrações graduais durante a maturação houve um aumento ($p < 0,05$) da expressão gênica para CTGF no grupo tratado com 100ng/mL as 12 horas. No experimento dois em que o objetivo era avaliar a concentração de 100ng/mL houve uma diminuição ($p < 0,05$) do grupo tratado em relação ao grupo controle as três horas. E no experimento três em que o objetivo era avaliar a adição de FGF18 durante o desenvolvimento embrionário, houve diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado com FGF18 durante a CIV. Desde forma concluímos que FGF18 modula a expressão de CTGF em períodos críticos da maturação nuclear do oócito, da expansão do cumulus e do desenvolvimento embrionário inicial.

Palavras-chave: Via Hippo. Desenvolvimento embrionário. Fator de crescimento de fibroblasto 18.

ABSTRACT

FIBROBLAST GROWTH FACTOR 18 (FGF18) MODULATES CTGF EXPRESSION IN COCs AND BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

AUTHOR: Elisabeth Schmidt da Silva

ADVISOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

In 1995, the Hippo pathway was initially discovered in *Drosophila melanogaster*, and since then several researchers have been trying to better understand this pathway. The Hippo pathway is involved in cell proliferation processes, both in ovarian follicular cells in the early embryonic development. The effectors of this pathway YAP e TAZ act as transcription coactivators of cell proliferation and survival genes such as CTGF and CYR61. However, the fibroblast growth factor also induces CTGF expression. However, recent studies by the group found that fibroblast growth factor 18 (FGF18) is present in the fallopian tube during early embryonic development. This led us to think that FGF18 would have some role during embryonic development. Therefore, the aim of the following study was to determine whether FGF18 modulates the Hippo pathway through the expression of target genes for cell proliferation (CTGF and CYR61) during oocyte maturation and early embryonic development. To acquire the results of the objective, three experiments were carried out, with in vitro maturation (IVM) of cumulus oocyte complexes (COCs) in the first and second experiments, with the addition of FGF18 during IVM, and the structures were collected at different times. In the first experiment, gradual concentrations of FGF18 (0, 10 and 100ng / mL) were added and there was a control group without the addition of FGF18, and 6, 12 and 24 hours of maturation were collected. In the second experiment, a concentration of 100ng / mL of FGF18 was added during IVM, there was a control group and the structures were collected at 0, 3, 6 and 9 hours of maturation. In the experiment, three COCs were put to maturation and were divided into three groups. A group considered a control group in which COCs were matured, with in vitro fertilization (IVF) and then in vitro culture (IVC) without the addition of FGF18. A group in which, during maturation, FGF18 was added only during IVM and afterwards fertilization and culture were carried out in media without the addition of FGF18. In a third group, COCs were put to mature, fertilized and, when put to culture, FGF18 was added in the medium. The genes evaluated in the three experiments were the cell proliferation genes, CTGF and CYR61. In experiment one, which aimed to evaluate the addition of gradual concentrations during maturation, there was an increase ($p < 0.05$) in CTGF gene expression in the group treated with 100ng / mL at 12 hours. In experiment two, in which the objective was to assess the concentration of 100ng / mL, there was a decrease ($p < 0.05$) in the treated group compared to the control group at three hours. And in experiment three in which the objective was to evaluate the addition of FGF18 during embryonic development, there was a statistical difference ($p < 0.05$) in the group treated with FGF18 during IVC. Therefore, we conclude that FGF18 modulates CTGF expression in critical periods of oocyte nuclear maturation, cumulus expansion and early embryonic development in cattle.

Keywords: Hippo Pathway. Embryonic development. Fibroblast growth factor 18.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figure 1: Relative abundance of target gene mRNA of the Hippo pathway (CTGF and CYR61), during IVM of bovine COCs produced *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of different concentrations of recombinant human FGF18 (0, 10 or 100ng/ml) in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion for 6 (a, d), 12 (b, e) or 24 (c, f) hours. Cultures were replicated five times with a total of 25 COCs. * Indicates statistical difference ($P < 0,05$).

Figure 2: Relative abundance of target gene mRNA of the Hippo pathway (CTGF and CYR61), during IVM of bovine COCs produced *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of recombinant human FGF18 (0 or 100ng/ml) in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion for 0 (Control; a, e), 3 (b, f), 6 (c, g) or 9 (d, h) hours. Cultures were replicated five times with a total of 25 COCs. * Indicates statistical difference ($P < 0,05$).

Figure 3: Relative abundance of mRNA of Hippo pathway genes (CTGF and CYR61) in day 7 blastocyst. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of 100 ng/mL of FSH and without (Control and IVC) or with FGF18 (100ng/mL, IVM). In the *in vitro* embryo culture (IVC) group, the presumptive embryos were cultured with FGF18 (100ng/mL). The experiment was replicated five times, and a total of 150 COCs were used for each treatment group. Different letters indicate statistical significance ($p < 0,05$) among the groups.

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CCOs	Complexo cumulus-oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CG	Células da granulosa
CTGF	Connective tissue growth factor
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
FIV	Fertilizao <i>in vitro</i>
FGFs	Fator de crescimento de fibroblastos
FGF18	Fator de crescimento de fibroblasto 18
FSH	Hormnio folículo estimulante
Hpo	Hippo
LATS1	Large tumor suppressor 1
LATS2	Large tumor suppressor 2
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MST1	mammalian Ste20-like kinases 1
MST2	mammalian Ste20-like kinases 2
NOV	Nephroblastoma overexpressed
RNAm	cido ribonucleico (RNA) mensageiro
TAZ	Transcriptional co-ativator with PDZ-binding motif
TEAD	TEA domain family
YAP	Yes-associated protein
YAP1	Yes-associated protein 1

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MATURAÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS OOCITOS	15
2.2 VIA HIPPO	16
2.3 VIA HIPPO NO CONTEXTO REPRODUTIVO	18
2.4 FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18	19
2.5 VIA HIPPO E FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 18	20
3. ARTIGO	22
4. CONCLUSÃO	37

1. INTRODUÇÃO

A família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF's) é composta por 22 proteínas, a maioria das quais é secretada através de receptores transmembranares e atuam em diversas atividades biológicas, entre elas a angiogênese o desenvolvimento embrionário, as vias de sinalização endócrina, a proliferação e a diferenciação celular (BÖTTCHER & NIEHRS, 2005; OCÓN-GROVE et al., 2008). O fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18) faz parte dessa grande família de proteínas, e está presente no ovário, nas células da teca e granulosa (DA SILVA et al., 2019). O FGF18 é secretado nas células da teca e atua nas células da granulosa de folículos em processo de atresia, se autorregulando (PORTELA et al., 2015).

As células da grânulosa têm uma íntima ligação com o oócito e com as células do cumulus. Nesse sentido, sabe-se que apesar de FGF18 ser identificado em oócitos de camundongos (PRICE, 2016), esse não está presente em oócitos bovinos (PORTELA et al., 2015) e sim nas células da teca e granulosa de ruminantes (BURATINI et al., 2007; PORTELA et al., 2015). O oócito interage com as células do cumulus formando o “*Complexo do Cumulus-Oophorus*” (CCO), o que é essencial para a formação e desenvolvimento do gameta feminino, pois essa interação auxilia na maturação nuclear e citoplasmática do oócito, e conseqüentemente, na competência oocitária em suportar o desenvolvimento embrionário inicial (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012). FGFs induzem a expressão de um gene de proliferação celular o CTGF, que é importante para o desenvolvimento embrionário (HAN et al., 2020). E estudos recentes descobriram que FGF18 é expresso em células epiteliais da tuba uterina durante o desenvolvimento embrionário indicando, portanto, essa proteína pode ter um papel muito importante na proliferação celular durante o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos.

Existem diversas vias como por exemplo a via Wnt e Notch (SANZ-EZQUERRO et al., 2017b) e rotas celulares atuantes e regulando o desenvolvimento embrionário. A via Hippo tem um papel crucial, pois a falta da atividade dessa via acaba havendo morte embrionária ou retardo no desenvolvimento embrionário (LORTHONGPANICH & ISSARAGRISIL, 2015). Desde seu descobrimento, a via Hippo vem sendo estudada incansavelmente por pesquisadores que tentam desvendar cada vez mais seus enigmas, como por exemplo no papel do controle fisiológico e desregulação em doenças humanas (MA et al., 2019) em câncer em humanos (HARVEY et al., 2013) na angiogênese (BOOPATHY & HONG, 2019a) no sistema imune de mamíferos (YAMAUCHI & MOROISHI, 2019) e durante o desenvolvimento embrionário

(DAVIS & TAPON, 2019). Já se sabe que essa via está envolvida no tamanho e desenvolvimento de órgãos e regeneração de tecidos (BOOPATHY & HONG, 2019b).

Quando a via Hippo está inativa a fosforilação da proteína 1 associada a Yes (YAP) e o coativador transcricional PDZ (TAZ) que são os efetores dessa via, não acontece. Isso faz com que esses efetores sejam ativados, e por estarem livre no citoplasma translocam-se para o núcleo e interagem principalmente com os fatores de transcrição do membro da família de domínio TEA (TEAD). No núcleo o complexo, YAP/TAZ-TEAD atuam como fatores de transcrição para alguns genes alvos, como CTGF e CYR61 (SHOME et al., 2020) genes estes que regulam a proliferação celular e crescimento de tecidos (SERRANO et al., 2013; BOOPATHY & HONG, 2019a).

Já se sabe que YAP está implicado com as células da granulosa antes e depois da ovulação em camundongos. Pois os oócitos ativam a sinalização YAP1, promovendo assim a sobrevivência e proliferação das células da granulosa antes da ovulação, enquanto suprimem a diferenciação celular, assim sendo, os sinais ovulatórios inibem a atividade YAP1 para permitir que as células se diferenciem (SUN & DIAZ, 2019).

Já no desenvolvimento embrionário a via Hippo regula genes de proliferação celular como CTGF e CYR61 (SHOME *et al.*, 2020) e também tem um papel significativo na diferenciação de linhas celulares, pois diferencia as células do blastocisto em massa celular interna e trofoblasto, pois nas células interna ou seja na massa células interna, YAP está presente no citoplasma ou seja não está transcrevendo genes, enquanto nas células externa no trofoblasto YAP e TAZ estão no núcleo da célula transcrevendo genes de proliferação celular (NISHIOKA et al., 2009).

Sendo assim está claro que há alguma relação entre FGF18 e a via Hippo, pois o FGF18 está presente na tuba uterina e já está relatado que os FGFs induzem a produção de CTGF. Por outro lado, os efetores da via Hippo atuam como fatores de transcrição ao se ligar a TEAD, transcrevendo CTGF. Desta forma, esse trabalho tem por objetivo determinar se o FGF18 modula a via Hippo através da expressão de genes alvos de proliferação celular (CTGF e CYR61) durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATURAÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS OOCITOS

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia que visa um maior número de embriões de vacas de alta qualidade em um menor número de tempo. Pois vacas receptoras são quem geram os embriões das vacas de alto padrão genético. Desta forma a vaca de alto padrão que geraria um terneiro ao ano, passa a ter 5 ou mais terneiros ao ano devido as receptoras gerarem seus terneiros.

A produção *in vitro* de embriões realizada em laboratório de pesquisa, compreende quatro etapas: 1 - a aspiração dos complexos cumulus oócitos (CCOs) de folículos ovarianos oriundos de frigorífico ou aspirados de vacas (OPU); 2 - maturação *in vitro* dos CCOs; 3 – fertilização *in vitro*; 4 – cultivo dos zigotos.

A maturação dos CCOs é uma etapa muito importante e deve permitir a maturação citoplasmática, molecular e nuclear dos oócitos. Para que ocorra a expansão do cumulus é importante que o CTGF que é transcrito por genes da família Hippo (HERMANN et al., 2021) ative a proteína quinase ativada por mitogenio (MPK) que consequentemente ativa o fator promotor de maturação (MPF) que leva a quebra da vesícula germinativa (OHASHI et al., 2003; HIGAKI et al., 2017).

Durante a produção de embriões *in vitro* ao retirar os oócitos do folículo por aspiração folicular, eles ainda não estão aptos a serem fecundados e darem sequência a produção do embrião. Para que ocorra a fertilização do oócito é necessário que o cumulus que o rodeia se expanda, e que o oócito saia do estágio de prófase I e chegue a metáfase II (SUH et al., 2002). Deve acontecer três maturações nesse período, a maturação citoplasmática, é quando acontece a reorganização das organelas, a maturação molecular, é quando ocorre a síntese de proteínas, e a maturação nuclear, é quando o oócito sai do estágio de prófase I e chega a metáfase II (FULKA et al., 1998).

Fisiologicamente antes de acontecer a ovulação ocorre um pico do hormônio luteinizante (LH) que induz a maturação do oócito diminuindo os níveis de cAMP (SEN & CAIAZZA, 2013) levando a quebra das junções GAP ocorrendo a produção do ácido hialurônico causando a mucificação e expansão do cumulus levando a ovulação. *In vitro* a expansão do cumulus é causado pelo hormônio folículo estimulante (FSH) (EPPIG, 1979).

CTGF é expresso nas células do cumulus, e conforme estudo realizado por (NAGASHIMA et al., 2011) quando nocauteado nessas células ocorre igual a expansão do cumulus porem passam por defeitos durante a ovulação. A fêmea quando nocaute de CTGF, passa a ter subfertilidade devido a vários defeitos reprodutivo. Durante o cultivo embrionário a via Hippo está presente na forma inativa (hippo of) e ativa (hippo on) nos blastômeros do blastocisto. Pois LAST1/2 fosforilam YAP que fica retido no citoplasma da célula, sendo assim TEAD permanece inativo e essas células passam a ser os blastômeros internos, ou seja, a massa células interna, enquanto em outros blastômeros YAP não é fosforilado se ligando a TEAD levando a ativação desse gene que passa a transcrever demais genes nos blastômeros externos do blastocisto ou seja no trofoblasto (NISHIOKA et al., 2009)

2.2 VIA HIPPO

A via Hippo foi descoberta a partir de estudos com genes que aumentam a proliferação celular e o tamanho dos órgãos da *Drosophila melanogaster*. A origem do seu nome é devido a uma proteína chave a quinase Hippo (Hpo), a qual recebeu esse nome devido as mutações que ocorrem em seu gene e levam a um crescimento tecidual exagerado e o indivíduo portador apresenta um fenótipo semelhante a um hipopótamo (do inglês, *hippopotamus ou hippo*) (HUANG et al., 2005).

Por ser caracterizada por uma cascata de sinalização, a via Hippo regula vários processos biológicos, dentre eles o crescimento células, o controle e tamanho de órgãos e a regeneração de tecidos (MA et al., 2019). Esta via no contexto reprodutivo pode ser ativada por diversos receptores como o receptor acoplado a proteína G, a via Wnt, o TGF – β e Notch (WU & GUAN, 2021).

Esta via consiste em uma cascata de proteínas quinases, e ela é encontrada tanto ativa como inativa. Quando a via Hippo está na sua forma ativa (hippo on), as quinases MST1 e MST2 fosforilam LAST e LAST2 (CALLUS et al., 2006), as quais fosforilam YAP e TAZ. YAP e TAZ fosforilados são reconhecidos pela proteína 14-3-3 que inativa a função pró-proliferativa, fazendo com que esses efetores permaneçam no citoplasma ou sejam degradados (FREEMAN & MORRISON, 2011).

Por outro lado, quando a via está inativa (Hippo of) YAP e TAZ translocam-se para o núcleo, formando complexos com fatores de transcrição da família TEAD (*transcriptional*

enhancer fator TEF – 1, também conhecido como TAE *domain Family member*; TEAD1, TEAD2, TEAD3 e TEAD4), e esse complexo modula a atividade transcricional de genes alvo envolvidos com a sobrevivência e proliferação celular (MAUVIEL et al., 2012). Os principais genes alvo do complexo YAP/TAZ/TEAD são o CTGF (*connective tissue growth factor*) e CYR61 (*CYSTEINE-RICH ANGIOGENIC INDUCTER 61*), que são genes relacionados com a sobrevivência e proliferação celular (HEATH et al., 2008; LAI et al., 2011) (figura 1).

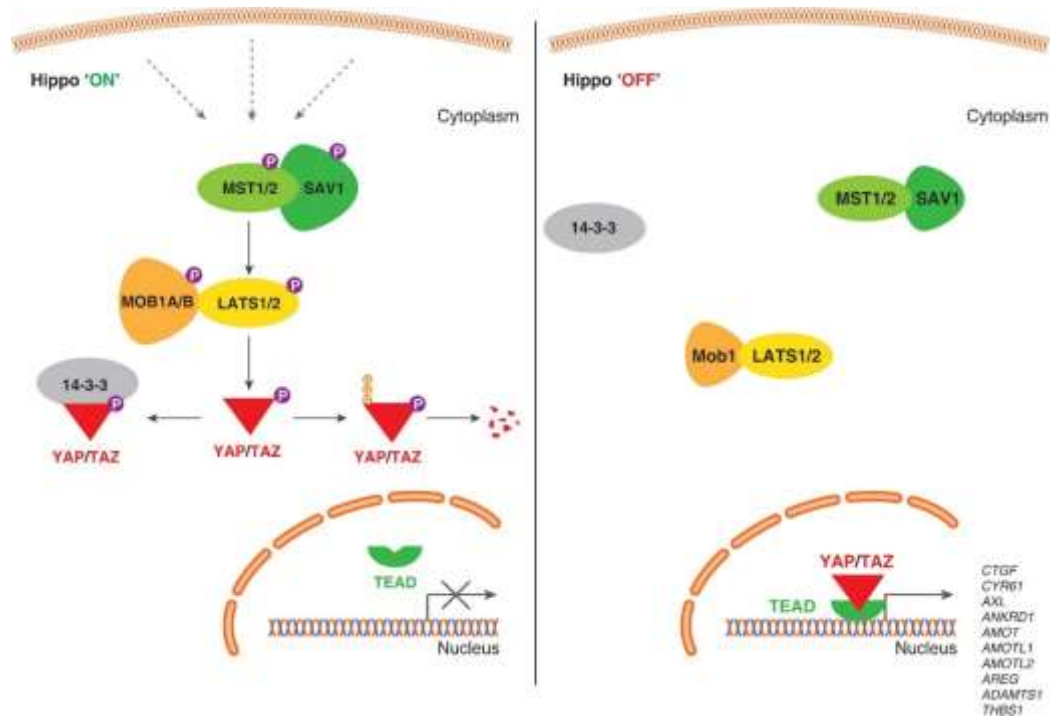


Figure 1 Representação esquemática da via de sinalização Hippo-YAP / TAZ. Quando na forma ativa, MST1/2 (em mamíferos) fosforila LATS1/2, que por sua vez, fosforila YAP1/TAZ, resultando na degradação ou na retenção citoplasmática da proteína. Quando na forma inativa, não ocorre a fosforilação de YAP1/TAZ, as quais translocam para o núcleo formando complexos com os fatores de transcrição da família TEAD e estimulando a transcrição de genes alvo. Fonte: (BOOPATHY & HONG, 2019a)

CTGF e CYR61 fazem parte de uma família de genes composta por mais quatro membros, são eles, NOV, WISP1, WISP2 e WISP3. Inicialmente o nome dessa família era CCN, devido ao descobrimento dos três primeiros genes CYR61 que corresponde a CCN1, CTGF corresponde a CCN2 e NOV que corresponde a CCN3 (PERBAL, 2001; KUBOTA & TAKIGAWA, 2013).

2.3 VIA HIPPO NO CONTEXTO REPRODUTIVO

A via Hippo tem suas funções bem definidas na determinação do tamanho de órgãos, pois ela participa de mecanismos de diferenciação, proliferação e apoptose de células de diversos tecidos, e também está envolvida na embriogênese (MENG et al., 2016). Porém, em relação a fisiologia reprodutiva há diversos relatos ligando a via Hippo a fisiologia ovariana (NAGASHIMA et al., 2011; JI et al., 2017).

Segundo Plewes e colaboradores (PLEWES et al., 2019) YAP1 é proeminentemente expresso nas células da granulosa de folículos antrais, enquanto nas células da teca é menos proeminente. Embora a expressão de YAP1 fosse citoplasmática, ou seja *hippo on* não transcrevendo genes de proliferação celular, a expressão é mais intensa no núcleo tanto das células da granulosa como nas células da teca, e por YAP estar no núcleo ele ativa TEAD que juntos esse complexo transcreve genes de proliferação celular. E o corpo lúteo YAP tem expressão tanto citoplasmática como nuclear, ou seja, no corpo lúteo pode haver ou não a transcrição de genes de proliferação celular.

Estudos recentes têm demonstrado que a via Hippo pode desempenhar um papel importante na regulação da fisiologia e patologia ovariana de mamíferos (KAWASHIMA & KAWAMURA, 2018), os principais componentes da via Hippo (YAP e TAZ) são expressão no ovário de rato (XIANG et al., 2015). Em razão de haver evidências de que o tratamento com androgênio e estrogênio promovem a localização nuclear de YAP nas células foliculares, isso indica que YAP é necessário para a proliferação das células da granulosa (CG) de camundongos (PLEWES et al., 2019). YAP é expresso no citoplasma de células somáticas, quanto TAZ é expresso no núcleo (SUN et al., 2015), isso indica que podem ser regulados diferencialmente e ter funções diferentes no ovário (PLEWES et al., 2019). A inativação de *last1/2*, que fosforilam YAP/TAZ na via Hippo nas células da granulosa de roedores, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, acaba levando a alteração da morfologia, na função e na expressão gênica da granulosa. A não expressão de *LAST 1/2* resulta no aumento dos níveis de YAP e TAZ total, bem como de seus genes alvo, CTGF, CYR61, e NOV provavelmente sendo responsável pela diferenciação das células da granulosa em outras linhagens celulares (TSOI et al., 2019).

Também em camundongos, foi relacionada a regulação da via Hippo no CCO com a ovulação, onde na ausência do estímulo ovulatório o oócito secreta fatores que suprimem a atividade da via, ativando YAP. Em contrapartida quando estimulada a ovulação, ocorre a

degradação e fosforilação de YAP, permitindo a diferenciação das células do cumulus (SUN & DIAZ, 2019). A deleção condicional em células foliculares de CTGF, talvez o mais importante gene alvo de YAP/TAZ/TEAD, afeta o desenvolvimento folicular, ovulação e luteólise em camundongos (NAGASHIMA et al., 2011)

No blastocisto de camundongos também já está caracterizada a via Hippo sendo que as células externas, ou seja, células do trofoblasto apresentam YAP no núcleo estando associado a TEAD, promovendo a transcrição de genes de proliferação como CTGF e CYR61 (NEGRÓN-PÉREZ & HANSEN, 2018). Enquanto os blastômeros internos apresentam YAP/TAZ no citoplasma da célula onde podem ser degradados, não transcrevendo genes de proliferação celular (SHARMA & MADAN, 2020).

2.4 FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18

O fator de crescimento fibroblástico foi inicialmente identificado como uma proteína capaz de induzir a proliferação de fibroblastos, porém hoje em dia a família dos fatores de crescimento de fibroblasto é composta por vinte e duas proteínas, as quais possuem diversas funções por meio de ligação e ativação dos receptores do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR) e está dividida em sete subfamílias (PORTELA et al., 2010; YUN et al., 2010). Segundo Han e colaboradores (HAN et al., 2020) os FGFs no cultivo de células da granulosa *in vitro* induzem a expressão de CTGF, gene este também transcrito quando a via Hippo está na sua forma inativa (Hippo Of).

O fator de crescimento fibroblástico 18 (FGF18) faz parte dessa família de proteínas, e está envolvido no crescimento e desenvolvimento do esqueleto (MARIE, 2003). Porém a função do FGF18 não está limitada apenas ao desenvolvimento do esqueleto, mas também está envolvida em vários outros tecidos (HU et al., 1998; KAWANO et al., 2005). Estudos tanto *in vivo* como *in vitro* demonstraram que o FGF18 está envolvido na morfogênese, angiogênese e desenvolvimento de uma variedade de células (SHIMOAKA et al., 2002; ISHIBE et al., 2005).

No sistema reprodutivo, o FGF18 desempenha papéis no desenvolvimento gonadal e na diferenciação sexual (CORY et al., 2007). E já se sabe que o FGF18 é expresso nas células da teca, fracamente nas células da granulosa e não é expresso em oócitos de bovinos (PORTELA et al., 2010). As células da teca são a principal fonte de FGF18 no ovário, e quando FSH está atuando no início de uma onda folicular acaba também estimulando o principal receptor de

FGF18 (FGFR3), tornando as células da granulosa susceptíveis a ação de FGF, e FGF18 atuando nas células da granulosa acaba inibindo a esteroidogênese (PORTELA et al., 2010). Quando realizada a injeção intrafolicular de FGF18 em folículos em crescimento, estes entraram em processo de atresia folicular (PORTELA et al., 2015).

No útero o FGF18 é expresso no endométrio humano (YERLIKAYA et al., 2016) e no estroma uterina do camundongo (LI et al., 2011). O FGF18 também é regulado por estrogênio em camundongos *in vivo* (LI et al., 2011). Já se sabe que quando célula da granulosa de ovinos são tratadas com FGF18, este acaba induzindo a regulação positiva de numerosas proteínas associadas a via MAPK/ERK vias essas envolvidas na sobrevivência celular (AMIN MARASHI et al., 2019).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial já se sabe que o FGF18 está envolvido no desenvolvimento de diversos órgãos (HAQUE et al., 2007) como no pulmão (USUI et al., 2004) músculos (MARUOKA et al., 1998) e trato intestinal (HU et al., 1998). O FGF28 também desempenha um papel importante de sobrevivência, proliferação e diferenciação de células progenitoras da adenohipófise (HERZOG et al., 2004).

2.5 VIA HIPPO E FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 18

É sabido que a via Hippo está envolvida em processos oncogênico. Segundo Calses e colaboradores (CALSES et al., 2019), após analisar mais de nove mil tumores, YAP e TAZ mostraram estar frequentemente amplificados em cânceres de cabeça, pescoço e ginecológico, enquanto LATS 1/2 são geralmente mutáveis em cânceres gastrointestinais e ginecológicos.

Já se sabe que o FGF18 também está envolvido como um potente indutor oncogênico de tumor gástrico (TG), e um estudo realizado por Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2020) o FGF18 foi adicionado em cultivo de células de tumor gástrico e avaliaram o sequenciamento de RNA, e foi possível destacar que efetor da via Hippo YAP e um gene transcrito por essa via CTGF foram regulados positivamente. Nesse mesmo estudo foi realizado a adição de verteporfina um bloqueador da via Hippo no meio e avaliou-se o nível de proteína, e resultou em baixos níveis para o receptor do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGFR2) e o mesmo resultado foi possível observar para Yap. Sendo assim está claro que a verteporfina atuou conform seu mecanismo bloqueando a atividade da via Hippo, por apresentar YAP em níveis mais baixos.

Desta forma está claro que o FGF18 e a via Hippo tem alguma ligação, pois já está relatado que os FGFs induzem a expressão de CTGF e a via Hippo também atua transcrevendo esse gene, e estudos realizados pelo grupo de pesquisa descobriram que o FGF28 é expresso pelas células do oviduto e que esse fator de crescimento reduz a capacidade de desenvolvimento de zigotos, apresentando baixa qualidade e retardo em sua cinética de desenvolvimento, porém o mecanismo ainda não foi descoberto.

3. ARTIGO

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

FGF18 MODULATES CTGF mRNA EXPRESSION IN CUMULUS-OOCYTE
COMPLEXES AND EARLY EMBRYOS: PRELIMINARY DATA

Elisabeth Schmidat da Silva, Carolina dos Santos Amaral, Marcos Henrique Barreta, Alfredo
Quites Antoniazzi, Rogério Ferreira, Fernando Mesquita, Valério Valdetar Marques Portela
Júnior, Paulo Bayard Dias Gonçalves

Zygote, 2021

FGF18 modulates CTGF mRNA expression in cumulus-oocyte complexes and early bovine embryos: Preliminary data

Elisabeth Schmidt da Silva¹, Carolina dos Santos Amaral¹, Marcos Henrique Barreta², Alfredo Antoniazzi¹, Rogério Ferreira³, Fernando Mesquita⁴, Valério Portela¹, Paulo Bayard Gonçalves^{1-4*}

¹ Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

² Laboratory of Animal Reproduction Physiology, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 89520-000, Brazil.

³ Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, SC, 88.035-901, Brazil

⁴ Molecular and Integrative Physiology of Reproduction Laboratory, Universidade Federal do Pampa, Uruguai, RS, 97501-970, Brazil.

*Correspondence address email: pbayard@gmail.com

The Hippo pathway is involved in the proliferation of intrafollicular cells and in the early embryonic development, mainly because effectors of this pathway are key transcription regulators of genes such as CTGF and CYR61, which are involved in cell proliferation. Recent studies by our group found that fibroblast growth factor 18 (FGF18) is present in the oviduct during early embryonic development, leading to the hypothesis that FGF18 may have a role during embryonic development. Therefore, the aim of the following study was to determine whether FGF18 modulates the expression of Hippo pathway target genes, CTGF and CYR61, during oocyte maturation and early embryonic development. Three experiments were carried out, with *in vitro* maturation (IVM) of cumulus oocyte complexes (COCs) and embryo culture. In experiment one, FGF18 (100ng/ml) induced an increase ($p < 0.05$) in CTGF gene expression on CCOs 12 hours post-exposure. In experiment two, FGF18 (100ng/ml) induced a reduction ($p < 0.05$) in CTGF expression on CCOs three hours post-exposure. In the third experiment, Day 7 embryos exposed to FGF18 during oocyte IVC expressed greater CTGF mRNA abundance, whereas FGF18 exposure during embryo IVM did not alter CTGF expression in comparison to untreated controls. The preliminary data presented here shows that FGF18 modulates CTGF

expression in critical periods of oocyte nuclear maturation, cumulus expansion and early embryonic development in cattle.

Keywords: Hippo Pathway; Embryonic development; Fibroblast growth factor 18; Cell proliferation genes; Bovine.

Introduction

The fibroblast growth factors (FGFs) family is composed of 22 proteins, which are proteins that span the plasma membrane of a cell contain an extracellular domain that binds to its ligands, and an intracellular domain important for the signaling relay. FSGs have been associated with several biological activities, including angiogenesis, ambryonic development, endocrine signaling pathway, cell proliferation and differentiation (BÖTTCHER & NIEHRS, 2005; OCÓN-GROVE et al., 2008).

As a member of the FGF family, fibroblast growth factor 18 (FGF18) has been detected in theca and granulosa cells of cattle (JIANG et al., 2013; PORTELA et al., 2015). FGF18 is secreted by theca cells and acts on the granulosa cells during atresia. Intra-follicular injection experiments in cows revealed that exogenous FGF18 supplementation caused the interruption of follicular growth and steroidogenesis (PORTELA et al., 2010; DA SILVA et al., 2019).

The granulosa cells have a close connection with the oocyte and the cumulus cells. In this regard, whereas mouse oocytes express FGF18 (DA SILVA et al., 2019), the growth factor has not been detected in bovine oocytes (PORTELA et al., 2010). The oocyte interacts intimately with the cumulus cells forming the “Cumulus-Oocyte Complex” (COC), which is essential for the formation and development of the female gamete. Such an intimate interaction helps in the nuclear and cytoplasmic maturation of the oocyte, leading to oocyte competence in supporting early embryonic development (SANCHEZ & SMITZ, 2012). According to studies carried out by Han and contributors (HAN et al., 2020) FGFs induced the expression of CTGF, a gene involved in cell proliferation and cell survival.

Preliminary studies by the group have shown that the oviduct secretes FGF18 during embryonic development, thus indicating that this protein may have an important role in cell proliferation during the initial embryonic development in cattle.

The Hippo pathway has a crucial role in the regulation of embryonic development as in its inactive state leads to delayed embryonic development or embryonic death (LORTHONGPANICH & ISSARAGRISIL, 2015). When the Hippo pathway is inactive, the transcription activators YAP and TAZ are maintained unphosphorylated, being allowed to translocate into the nucleus and interact mainly with the transcription factors of the TEA (TEAD1/2/3/4) domain family member. In the nucleus, the complex YAP/TAZ-TEAD acts as transcription factors for target genes such as CTGF and CYR61 (SERRANO et al., 2013), which are known regulators of cell proliferation and tissue growth.

Oocyte maturation can be understood as the set of biological modifications by which the oocyte acquires competence to support fertilization and the beginning of embryonic development. Several molecules and pathways that regulate cell proliferation are closely related to the regulation of oocyte maturation and early embryonic development. Because FGFs induce CTGF expression and FGF18 is present in the uterine tube, it is clear that the Hippo pathway that induces CTGF expression has some connection with fibroblast growth factors. This work aims to determine whether the set of target molecules regulated by FGF18 include cell proliferation regulators related to Hippo, CTGF, and CYR61, during oocyte maturation and early embryonic development.

Material and methods

Cow ovaries were obtained from a local abattoir El'Golli and transported to the laboratory in saline solution (0,9% NaCl; 30°C) containing 100 UI/ml of penicillin and 50 µg/ml of streptomycin sulfate. Cumulus oocyte complexes (COCs) from 3 to 8 mm diameter follicles were aspirated with a vacuum pump (vacuum rate of 15 ml of water/minute). The COCs were recovered and selected under a stereomicroscope. Grade 1 and 2 COCs were randomly distributed into 500 µl of maturation medium in four-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and cultured in incubators at 38.5°C (101.3°F) in a 5% CO₂ and 95% air saturation humidity atmosphere varying during 24h of maturation. The maturation medium consisted of TCM 199, containing Earle's salts and L-glutamine (Gibco Labs, Grand Island, NY, USA), supplemented with 25 mM HEPES, 0.2 mM pyruvic acid, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, 5.0 µg/ml LH (Lutropin-V®), 0,5 µg/ml FGF(Folltropin - V®), 10% fetal bovine serum (FBS: Gobco Labs, Grand Island, NY, USA) 100UI/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin sulfate.

***In vitro* fertilization (IVF)**

After *in vitro* maturation (IVM), bovine oocytes were fertilized *in vitro* with tested semen after thawing and separation through discontinuous Percoll (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brazil) gradient. Sperm cells were diluted and added to the COCs plate with final concentration adjusted to 2×10^6 sperm/ml in Fert-TALP medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ heparin, 20 $\mu\text{g/ml}$ penicilinamine, 10 mM hypotaurine and 1 mM epinephrine. Fertilization was carried out by co-culture of sperm and oocytes for 18-20h in four-well plates in the same atmospheric conditions used for maturation. IVF day was considered as day 0 of embryo development.

***In vitro* embryo culture (IVC)**

After IVF, presumptive bovine zygotes were denuded by vortexing, and then cultured in a culture chamber at 38.5°C under a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in 500 μl of SOF medium in four-well plates (Nunc, Roskild, Denmark). Cleavage rates were evaluated 48h after fertilization and blastocyst rates were assessed on day 7 of embryo development. Blastocysts assessed on day 7 were rinsed three times in PBS and collected in Trizol at 80°C for subsequent RNA extraction.

RNA extraction, reverse transcription and real time PCR

The total RNA was extracted from COCs and day 7 blastocysts according to TRIzol® instructions. Briefly, the extraction used 1000 μl TRIzol® reagent (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) and 200 μl chloroform, followed by purification of the aqueous phase with GlycoBlue (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and 700 μl isopropyl alcohol. Quantification and assessment of RNA purity was performed using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA; 260/280nm absorbance ratio). RNA was treated with 0.1U DNase Amplification Grade (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 15 minutes at 27°C to neutralize any DNA molecules. DNase was inactivated with 1 μl EDTA for 10 minutes at 65°C. Reverse transcription was performed adding 1U iScript cDNA synthesis Kit (BioRad, Hercules CA, USA) for 5 minutes at 25°C followed by 30 minutes at 42°C and 5 minutes at 85°C. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was conducted in a thermocycler (BioRad, Hercules, CA, USA) using 2 μl of cDNA and 8 μl of MIX containing forward and reverse bovine specific primers (Table1), nuclease-free water and GoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA). Amplification was performed with initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by

40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 30 seconds. To optimize the qPCR assays, serial dilutions of cDNA templates were used to generate a relative standard curve. Samples were run in duplicates and the results of all genes were analyzed as relative fold difference, using RPS18 and GAPDH as reference genes, according to (PFAFFL, 2001).

Experimental desing

Experiment 1:

The study assessing the effect of FGF18 exposure during IVM on COC expression of Hippo-related molecules, CTGF and CYR61, used an FSH-induced cumulus expansion model, and it was divided into two experiments. The experiment 1 assessed the effects of different concentrations of recombinant human FGF18 (0, 10 and 100ng/ml) in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion, at different time points, while each sampling time had three treatment groups. The COCs were distributed randomly in 400 µL of maturation medium in a Nunc four-well plate, where they were matured and collected at 6, 12 and 24h of *in vitro* (IVM). After sampling, the COCs were stored in TRIzol at -80°C for later RNA extraction. The experiment was replicated five times and a total of 25 COCs were used for each treatment condition. This experiment was conducted specially to assess the effect of different FGF18 concentrations on Hippo pathway-related target molecules (i.e., CTGF and CYR61) during IVM.

Experimento 2:

In the second experiment, the IVM treatment groups were 0 and 100 ng/ml of FGF18 in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion. In this experiment, the COCs were also randomly distributed in 400 µL of maturation medium; however, they were collected at 0, 3, 6 and 9 hours of IVM.

Experiment 3:

In the third experiment, the early embryonic development was evaluated. In this experiment, three groups were formed: control group (untreated), IVM group (treated with 100 ng / mL of FSH and FGF18 only during IVM), and *in vitro* embryo culture (IVC) group (100 ng / mL of FSH during IMV and FGF18 was added to the presumptive embryo only during the embryo culture period). Since there was no difference between the concentrations tested in experiment 1, FGF18 concentration was 100 ng/mL. All

groups were collected at embryonic day 7 and stored in Trizol until RNA extraction. The experiment was replicated five times, and a total of 150 COCs were used for each treatment group.

Statistical analysis

The data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. All data were analyzed through analysis of variance followed by multiple pairwise comparisons (Tukey - Kramer HD test) using the JMP software (13.1.0; SAS Institute Inc, Cary, NC). The results are presented as mean \pm standard error of the mean $p < 0.05$ was considered significant.

Results

CTGF mRNA expression is altered by FGF18 treatment at 3 e 12h

CTGF and *CYR61* mRNA abundance was assessed at different time points to investigate whether FGF18 affected Hippo-dependent gene expression. In the first experiment, there was increased mRNA expression of CTGF in COCs induced by 100ng/ml of FGF18 at 12h of *in vitro* maturation ($p < 0.05$). There was no effect of FGF treatment on gene expression at 6 and 24h of IVM (Fig. 1).

In the second experiment, 100 ng/ml of FGF18 reduced ($p < 0.05$) *CTGF* mRNA abundance at 3h compared to the untreated control group. There were no gene expression changes observed at 0, 6 and 9h of IVM. FGF18 treatment did not change the mRNA expression to *CYR61* in any of the evaluated times (Fig. 2

Treatment with FGF18 during ICV increase CTGF mRNA expression

CTGF and *CYR61* mRNA abundance was assessed in a study of FGF18 exposure either during oocyte maturation or during embryo culture to analyze whether FGF18 would affect the Hippo pathway in different moments of *in vitro* embryo production, resulting in the final embryo.

The treatment with FGF18, both during maturation and during embryonic culture, did not affected mRNA levels for *CYR61* gene in bovine embryos in the blastocyst stage. However, embryos cultured in the presence of FGF18 had higher levels of CTGF mRNA ($p < 0.05$), in comparison with embryos cultured without FGF18, or those embryos derived from oocytes matured in the presence of FGF18 (Fig. 3).

Discussion

This exploratory study of FGF18 sheds light on its effect on Hippo pathway-regulated genes during early embryonic development (pre-implantation). This is the first study that assessed the effect FGF18 on mRNA expression of CTGF and CYR61 during early embryonic development. It was possible to demonstrate that whereas FGF18 alters CTGF mRNA expression, no effect on CYR61 mRNA was observed. This leads us to hypothesize that FGF18 may not have directly affected the Hippo Pathway

The supplementation of FGF18 to culture medium in maturation did not change mRNA levels for CYR61 in any experiment. However, the abundance of CTGF mRNA was decreased at 3 h and increased at 12 h when COCs were treated with FGF18. The level of CTGF mRNA was increased when zygotes were *in vitro* culture up to blastocyst in the presence of FGF18. This is interesting because CTGF plays an important role in embryonic development (KRUPSKA et al., 2015). CTGF acts on the activation of MAP kinase (MAPK) and Smad-dependent pathways, which are important for oocyte maturation (JIANG et al., 2013). In this study, CTGF were regulated by FGF18, which may activate MAPK; however, we did not investigate those pathways.

Interestingly, FGF18 caused downregulation of CTGF in COCs at 3 hours and upregulation at 12 hours of maturation. At these time points, bovine oocytes undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) and cumulus granulosa cells go through expansion and mucification, respectively. These results agree with previous studies that observed an increase in CTGF expression at the end of cumulus expansion LIU (LIU et al., 2018).

During embryonic development, the abundance of CTGF (but not CYR61) mRNA was higher in day 7 blastocyst than the control when the embryos were treated with FGF18. The CTGF and CYR61 genes seem to be expressed by the trophectoderm in blastocyst (SANZ-EZQUERRO et al., 2017a). The Hippo pathway may be participating in the regulation of cell proliferation and differentiation during embryo development, as observed in other cell types (Yu and Guan, 2013). Although we have not directly investigated this mechanism, there is evidence that FGF18 regulates, through the Hippo pathway, the cell proliferation and, probably, differentiation processes during embryonic development.

The preliminary data presented here shows that FGF18 modulates CTGF mRNA expression in critical periods of oocyte nuclear maturation and cumulus expansion (3 end 12h) and early embryonic development in cattle (IVC).

Acknowledgements

The authors would like to thank Frigorífico El'Golli for providing the bovine ovaries.

Funding

This work was supported by grants and fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

REFERENCIAS

- Böttcher, R. T. and Niehrs, C. (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*, 26, 63-77.
- da Silva, R. B., Yang, M. Y., Caixeta, E. S., Castilho, A. C., Amorim, R. L., Price, C. A., Fortune, J. E. and Buratini, J. (2019) Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Molecular reproduction and development*, 86, 166-174.
- Han, P., Relav, L. and Price, C. A. (2020) Regulation of the early growth response-1 binding protein NAB2 in bovine granulosa cells and effect on connective tissue growth factor expression. *Mol Cell Endocrinol*, 518, 111041.
- Jiang, Z., Guerrero-Netro, H. M., Juengel, J. L. and 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. *Mol Cell Endocrinol*, 375, 97-105.
- Krupska, I., Bruford, E. A. and Chaqour, B. (2015) Eyeing the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) group of genes in development and diseases: highlights of their structural likenesses and functional dissimilarities. *Human Genomics*, 9, 24.
- Liu, Q., Zhang, J., Wen, H., Feng, Y., Zhang, X., Xiang, H., Cao, Y., Tong, X., Ji, Y. and Xue, Z. (2018) Analyzing the Transcriptome Profile of Human Cumulus Cells Related to Embryo Quality via RNA Sequencing. *Biomed Res Int*, 2018, 9846274.
- Lorthongpanich, C. and Issaragrisil, S. (2015) Emerging Role of the Hippo Signaling Pathway in Position Sensing and Lineage Specification in Mammalian Preimplantation Embryos. *Biol Reprod*, 92, 143.
- Ocón-Grove, O. M., Cooke, F. N., Alvarez, I. M., Johnson, S. E., Ott, T. L. and Ealy, A. D. (2008) Ovine endometrial expression of fibroblast growth factor (FGF) 2 and conceptus

- expression of FGF receptors during early pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*, 34, 135-145.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Portela, V. M., Dirandeh, E., Guerrero-Netro, H. M., Zamberlam, G., Barreta, M. H., Goetten, A. F. and Price, C. A. (2015) The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. *Biol Reprod*, 92, 14.
- Portela, V. M., Machado, M., Buratini, J., Jr., Zamberlam, G., Amorim, R. L., Goncalves, P. and Price, C. A. (2010) Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol Reprod*, 83, 339-346.
- Sanchez, F. and Smitz, J. (2012) Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1896-1912.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Munsterberg, A. E. and Stricker, S. (2017) Editorial: Signaling Pathways in Embryonic Development. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 76.
- Serrano, I., McDonald, P. C., Lock, F., Muller, W. J. and Dedhar, S. (2013) Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat Commun*, 4, 2976.

Figure legends

Figure 1: Relative abundance of target gene mRNA of the Hippo pathway (CTGF and CYR61), during IVM of bovine COCs produced *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of different concentrations of recombinant human FGF18 (0, 10 or 100ng/ml) in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion for 6 (a, d), 12 (b, e) or 24 (c, f) hours. Cultures were replicated five times with a total of 25 COCs. * Indicates statistical difference ($P < 0,05$).

Figure 2: Relative abundance of target gene mRNA of the Hippo pathway (CTGF and CYR61), during IVM of bovine COCs produced *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of recombinant human FGF18 (0 or 100ng/ml) in FSH (100ng/ml)-induced cumulus expansion for 0 (Control; a, e), 3 (b, f), 6 (c, g) or 9 (d, h) hours. Cultures were replicated five times with a total of 25 COCs. * Indicates statistical difference ($P < 0,05$).

Figure 3: Relative abundance of mRNA of Hippo pathway genes (CTGF and CYR61) in day 7 blastocyst. Cumulus-oocyte complexes were matured in the presence of 100 ng/mL of FSH and without (Control and IVC) or with FGF18 (100ng/mL, IVM). In the *in vitro* embryo culture (IVC) group, the presumptive embryos were cultured with FGF18 (100ng/mL). The experiment was replicated five times, and a total of 150 COCs were used for each treatment group. Different letters indicate statistical significance ($p < 0,05$) among the groups.

Table 1. Primers used for expression analysis of candidate genes

GENE	Access number	Sequence
RPS18	NM_001033614.2	F: CTCCTCGCGAGGATCCATTG R: GCTCCCAAGATCCAACACTAC
GAPDH	NM_001034034.2	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GTCATAAGTCCCTCCACGA
CTGF	AF000137.1	F: AGCTGGAGCGACTTGTGT ACC R:TCCGAAAATGTAGGGGGGCAC
CYR61	NM_001034340.2	F: GGC TCC CCG TTT GGA ATG R:TCATTGGTAACGCGTGTGGA

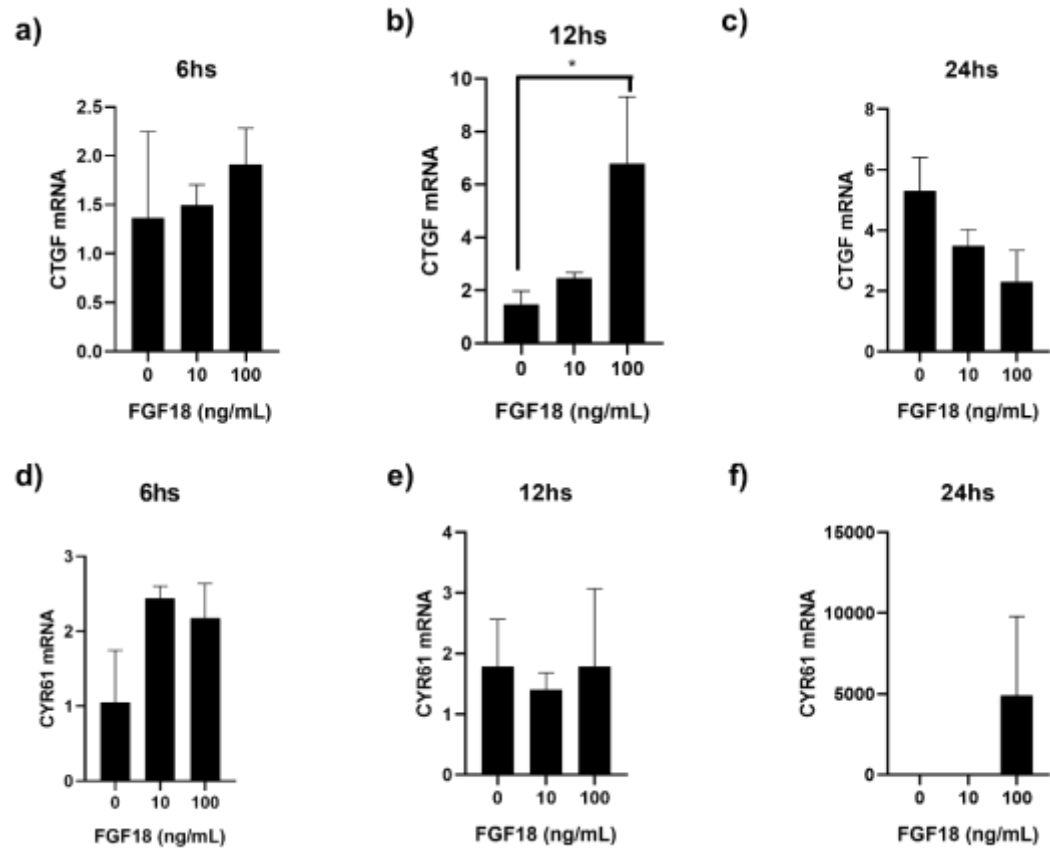


Figure 1.

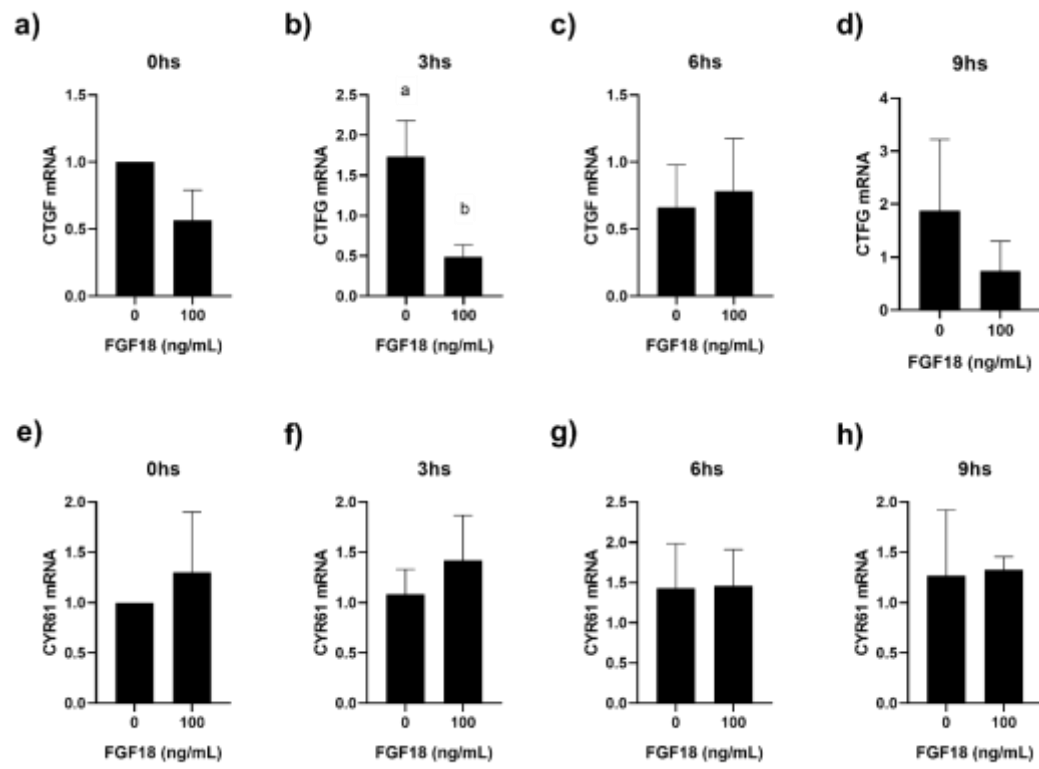


Figure 2.

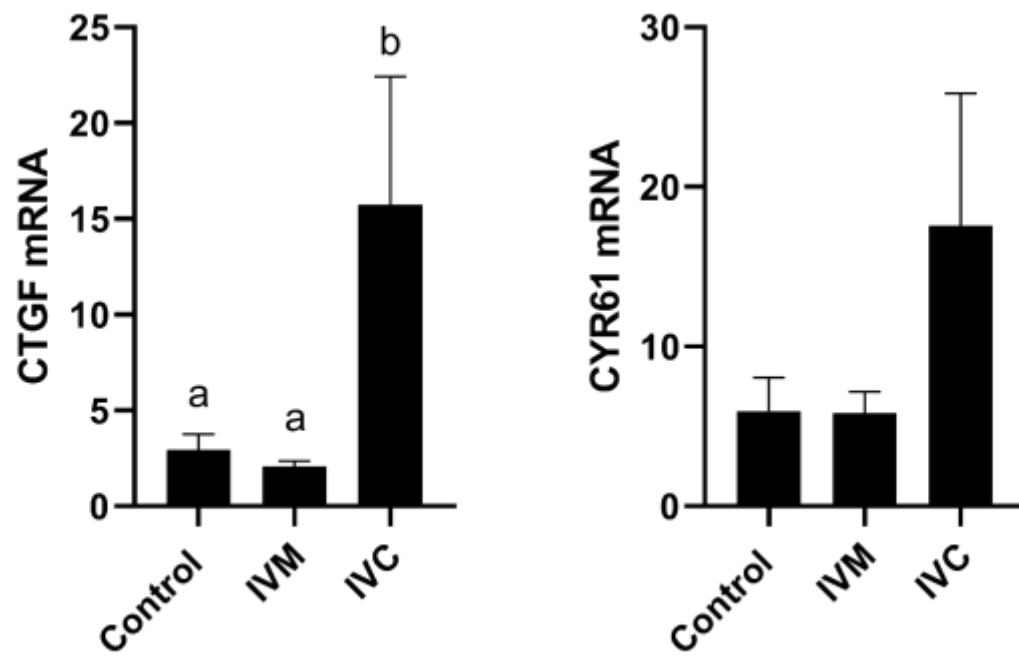


Figure 3

4. CONCLUSÃO

Este estudo inédito demonstra a regulação de CTGF durante a maturação do oócito e do desenvolvimento embrionário inicial. Com base nos resultados obtidos, não é possível concluir se o efeito do FGF18 na expressão dos genes regulados pela via Hippo afeta a maturação do oócito e/ou o desenvolvimento embrionário precoce.

REFERÊNCIAS

AMIN MARASHI, F., et al. Granulosa cells exposed to fibroblast growth factor 8 and 18 reveal early onset of cell growth and survival. **Int J Reprod Biomed**, v.17, n.6, p.435-442. 2019. Disponível em: em. doi: 10.18502/ijrm.v17i6.4815.

BOOPATHY, G. T. K.; W. HONG. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. **Front Cell Dev Biol**, v.7, p.49. 2019a. Disponível em: em. doi: 10.3389/fcell.2019.00049.

BOOPATHY, G. T. K.; W. HONG. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. v.7, n.49. 2019b. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00049>>. Acesso em. doi: 10.3389/fcell.2019.00049.

BÖTTCHER, R. T.; C. NIEHRS. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. **Endocr Rev**, v.26, n.1, p.63-77. 2005. Disponível em: em. doi: 10.1210/er.2003-0040.

BURATINI, J., JR., et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biol Reprod**, v.77, n.4, p.743-50. 2007. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.107.062273.

CALLUS, B. A., et al. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. **Febs j**, v.273, n.18, p.4264-76. 2006. Disponível em: em. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x.

CALSES, P. C., et al. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities. **Trends Cancer**, v.5, n.5, p.297-307. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31174842>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.trecan.2019.04.001.

CORY, A. T., et al. Presumptive pre-Sertoli cells express genes involved in cell proliferation and cell signalling during a critical window in early testis differentiation. **Mol Reprod Dev**, v.74, n.12, p.1491-504. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410545>>. Acesso em. doi: 10.1002/mrd.20722.

DA SILVA, R. B., et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.86, n.2, p.166-174. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1002/mrd.23091.

DAVIS, J. R.; N. TAPON. Hippo signalling during development. **Development**, v.146, n.18. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1242/dev.167106.

EPPIG, J. J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature**, v.281, n.5731, p.483-4. 1979. Disponível em: em. doi: 10.1038/281483a0.

FREEMAN, A. K.; D. K. MORRISON. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. **Semin Cell Dev Biol**, v.22, n.7, p.681-7. 2011. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.08.009.

FULKA, J., JR., et al. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol Hum Reprod**, v.4, n.1, p.41-9. 1998. Disponível em: em. doi: 10.1093/molehr/4.1.41.

HAN, P., et al. Regulation of the early growth response-1 binding protein NAB2 in bovine granulosa cells and effect on connective tissue growth factor expression. **Mol Cell Endocrinol**, v.518, p.111041. 2020. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.mce.2020.111041.

HAQUE, T., et al. A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. **Histol Histopathol**, v.22, n.1, p.97-105. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128416>>. Acesso em. doi: 10.14670/HH-22.97.

HARVEY, K. F., et al. The Hippo pathway and human cancer. **Nat Rev Cancer**, v.13, n.4, p.246-57. 2013. Disponível em: em. doi: 10.1038/nrc3458.

HEATH, E., et al. Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene. **BMC Dev Biol**, v.8, p.18. 2008. Disponível em: em. doi: 10.1186/1471-213x-8-18.

HERMANN, A., et al. The Hippo pathway component Wwc2 is a key regulator of embryonic development and angiogenesis in mice. **Cell Death Dis**, v.12, n.1, p.117. 2021. Disponível em: em. doi: 10.1038/s41419-021-03409-0.

HERZOG, W., et al. Fgf3 signaling from the ventral diencephalon is required for early specification and subsequent survival of the zebrafish adenohypophysis. **Development**, v.131, n.15, p.3681-92. 2004. Disponível em: em. doi: 10.1242/dev.01235.

HIGAKI, S., et al. Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice. **Zygote**, v.25, n.1, p.41-48. 2017. Disponível em: em. doi: 10.1017/s0967199416000290.

HU, M. C., et al. FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. **Mol Cell Biol**, v.18, n.10, p.6063-74. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742123>>. Acesso em. doi: 10.1128/mcb.18.10.6063.

HUANG, J., et al. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. **Cell**, v.122, n.3, p.421-34. 2005. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.007.

ISHIBE, T., et al. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. **Clin Cancer Res**, v.11, n.7, p.2702-12. 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814652>>. Acesso em. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2057.

Ji, S. Y., et al. The polycystic ovary syndrome-associated gene *Yap1* is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. **Mol Hum Reprod**, v.23, n.10, p.698-707. 2017. Disponível em: em. doi: 10.1093/molehr/gax046.

JIANG, Z., et al. Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, FGF8 and FGF18, in bovine ovarian granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol**, v.375, n.1-2, p.97-105. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707615>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.mce.2013.05.017.

KAWANO, M., et al. Comprehensive analysis of FGF and FGFR expression in skin: FGF18 is highly expressed in hair follicles and capable of inducing anagen from telogen stage hair follicles. **J Invest Dermatol**, v.124, n.5, p.877-85. 2005. Disponível em: em. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23693.x.

KAWASHIMA, I.; K. KAWAMURA. Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway. **Syst Biol Reprod Med**, v.64, n.1, p.3-11. 2018. Disponível em: em. doi: 10.1080/19396368.2017.1411990.

KRUPSKA, I., et al. Eyeing the *Cyr61/CTGF/NOV (CCN)* group of genes in development and diseases: highlights of their structural likenesses and functional dissimilarities. **Human Genomics**, v.9, n.1, p.24. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40246-015-0046-y>>. Acesso em. doi: 10.1186/s40246-015-0046-y.

KUBOTA, S.; M. TAKIGAWA. The CCN family acting throughout the body: recent research developments. **Biomol Concepts**, v.4, n.5, p.477-94. 2013. Disponível em: em. doi: 10.1515/bmc-2013-0018.

LAI, D., et al. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets *Cyr61* and *CTGF*. **Cancer Res**, v.71, n.7, p.2728-38. 2011. Disponível em: em. doi: 10.1158/0008-5472.Can-10-2711.

LI, Q., et al. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. **Science**, v.331, n.6019, p.912-6. 2011. Disponível em: em. doi: 10.1126/science.1197454.

LIU, Q., et al. Analyzing the Transcriptome Profile of Human Cumulus Cells Related to Embryo Quality via RNA Sequencing. **Biomed Res Int**, v.2018, p.9846274. 2018. Disponível em: em. doi: 10.1155/2018/9846274.

LORTHONGPANICH, C.; S. ISSARAGRISIL. Emerging Role of the Hippo Signaling Pathway in Position Sensing and Lineage Specification in Mammalian Preimplantation Embryos. **Biol Reprod**, v.92, n.6, p.143. 2015. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.114.127803.

MA, S., et al. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. **Annu Rev Biochem**, v.88, p.577-604. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111829.

MARIE, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. **Gene**, v.316, p.23-32. 2003. Disponível em: em. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00748-0.

MARUOKA, Y., et al. Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. **Mech Dev**, v.74, n.1-2, p.175-7. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651520>>. Acesso em. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00061-6.

MAUVIEL, A., et al. Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. **Oncogene**, v.31, n.14, p.1743-56. 2012. Disponível em: em. doi: 10.1038/onc.2011.363.

MENG, Z., et al. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes Dev**, v.30, n.1, p.1-17. 2016. Disponível em: em. doi: 10.1101/gad.274027.115.

NAGASHIMA, T., et al. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. **Mol Endocrinol**, v.25, n.10, p.1740-59. 2011. Disponível em: em. doi: 10.1210/me.2011-1045.

NEGRÓN-PÉREZ, V. M.; P. J. HANSEN. Role of yes-associated protein 1, angiomin, and mitogen-activated kinase kinase 1/2 in development of the bovine blastocyst. **Biol Reprod**, v.98, n.2, p.170-183. 2018. Disponível em: em. doi: 10.1093/biolre/iox172.

NISHIOKA, N., et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. **Dev Cell**, v.16, n.3, p.398-410. 2009. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.003.

OCÓN-GROVE, O. M., et al. Ovine endometrial expression of fibroblast growth factor (FGF) 2 and conceptus expression of FGF receptors during early pregnancy. **Domest Anim Endocrinol**, v.34, n.2, p.135-45. 2008. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.domaniend.2006.12.002.

OHASHI, S., et al. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. **Biol Reprod**, v.68, n.2, p.604-9. 2003. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.102.008334.

PERBAL, B. The CCN family of genes: a brief history. **Mol Pathol**, v.54, n.2, p.103-4. 2001. Disponível em: em. doi: 10.1136/mp.54.2.103.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v.29, n.9, p.e45. 2001. Disponível em: em. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

PLEWES, M. R., et al. Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro†. **Biol Reprod**, v.101, n.5, p.1001-1017. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1093/biolre/ioz139.

PORTELA, V. M., et al. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. **Biol Reprod**, v.92, n.1, p.14. 2015. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.114.121376.

PORTELA, V. M., et al. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biol Reprod**, v.83, n.3, p.339-46. 2010. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.110.084277.

PRICE, C. A. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. **J Endocrinol**, v.228, n.2, p.R31-43. 2016. Disponível em: em. doi: 10.1530/joe-15-0414.

SANCHEZ, F.; J. SMITZ. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v.1822, n.12, p.1896-912. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634430>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.013.

SÁNCHEZ, F.; J. SMITZ. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v.1822, n.12, p.1896-912. 2012. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.013.

SANZ-EZQUERRO, J. J., et al. Editorial: Signaling Pathways in Embryonic Development. **Front Cell Dev Biol**, v.5, p.76. 2017a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28913334>>. Acesso em. doi: 10.3389/fcell.2017.00076.

SANZ-EZQUERRO, J. J., et al. Editorial: Signaling Pathways in Embryonic Development. v.5, n.76. 2017b. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00076>>. Acesso em. doi: 10.3389/fcell.2017.00076.

SEN, A.; F. CAIAZZA. Oocyte maturation: a story of arrest and release. **Front Biosci (Schol Ed)**, v.5, p.451-77. 2013. Disponível em: em. doi: 10.2741/s383.

SERRANO, I., et al. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. **Nat Commun**, v.4, p.2976. 2013. Disponível em: em. doi: 10.1038/ncomms3976.

SHARMA, J.; P. MADAN. Characterisation of the Hippo signalling pathway during bovine preimplantation embryo development. **Reprod Fertil Dev**, v.32, n.4, p.392-401. 2020. Disponível em: em. doi: 10.1071/rd18320.

SHIMOAKA, T., et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. **J Biol Chem**, v.277, n.9, p.7493-500. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741978>>. Acesso em. doi: 10.1074/jbc.M108653200.

SHOME, D., et al. The HIPPO Transducer YAP and Its Targets CTGF and Cyr61 Drive a Paracrine Signalling in Cold Atmospheric Plasma-Mediated Wound Healing. **Oxid Med Cell Longev**, v.2020, p.4910280. 2020. Disponível em: em. doi: 10.1155/2020/4910280.

SUH, C. S., et al. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Rev Endocr Metab Disord**, v.3, n.1, p.5-12. 2002. Disponível em: em. doi: 10.1023/a:1012719316332.

SUN, T.; F. J. DIAZ. Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. **Reprod Biol Endocrinol**, v.17, n.1, p.113. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1186/s12958-019-0552-1.

SUN, T., et al. Lats1 Deletion Causes Increased Germ Cell Apoptosis and Follicular Cysts in Mouse Ovaries. **Biol Reprod**, v.93, n.1, p.22. 2015. Disponível em: em. doi: 10.1095/biolreprod.114.118604.

TSOI, M., et al. Lats1 and Lats2 are required for ovarian granulosa cell fate maintenance. **FASEB J**, v.33, n.10, p.10819-10832. 2019. Disponível em: em. doi: 10.1096/fj.201900609R.

USUI, H., et al. Fgf18 is required for embryonic lung alveolar development. **Biochem Biophys Res Commun**, v.322, n.3, p.887-92. 2004. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.198.

WU, Z.; K. L. GUAN. Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. **Trends Biochem Sci**, v.46, n.1, p.51-63. 2021. Disponível em: em. doi: 10.1016/j.tibs.2020.08.008.

XIANG, C., et al. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice. **Cell Physiol Biochem**, v.35, n.3, p.957-68. 2015. Disponível em: em. doi: 10.1159/000369752.

YAMAUCHI, T.; T. MOROISHI. Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. **Cells**, v.8, n.5. 2019. Disponível em: em. doi: 10.3390/cells8050398.

YERLIKAYA, G., et al. Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.204, p.88-98. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541444>>. Acesso em: doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.07.500.

YUN, Y. R., et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. **J Tissue Eng**, v.2010, p.218142. 2010. Disponível em: em. doi: 10.4061/2010/218142.

ZHANG, J., et al. FGF18-FGFR2 signaling triggers the activation of c-Jun-YAP1 axis to promote carcinogenesis in a subgroup of gastric cancer patients and indicates translational potential. **Oncogene**, v.39, n.43, p.6647-6663. 2020. Disponível em: em. doi: 10.1038/s41388-020-01458-x.