

ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

**EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FATOR
DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 7 (FGF7)
E SEUS RECEPTORES
EM FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS**

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Jr.

**BOTUCATU – SP
2011**

ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

**EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FATOR
DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 7 (FGF7)
E SEUS RECEPTORES
EM FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas – Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Jr.

**BOTUCATU – SP
2011**

"Mais importante do que o
conhecimento, é a
imaginação."

Adaptado de Albert Einstein

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

Capítulo I. Revisão de literatura.

Capítulo II. Expressão do fator de crescimento fibroblástico (FGF22) e do receptor, FGFR1B, durante o desenvolvimento folicular antral em bovinos.

Capítulo III. Expressão dos membros da subfamília do FGF7 (FGF7, FGF10 e FGF22) e seus receptores (FGFR1B e FGFR2B) em folículos antrais durante o desvio folicular em novilhas da raça Nelore.

Aos meus queridos pais (**Júlio e Cássia**), à minha noiva e amor (**Jamile**) e às minhas irmãs (**Laís e Letícia**), pelo amor, compreensão, carinho e alegrias que sempre se fizeram constantes em nossas vidas. Vocês foram os pilares que sustentaram essa conquista.

INTRODUÇÃO

Ao longo das duas últimas décadas surgiu uma enorme quantidade de informações sobre a fisiologia ovariana, porém o entendimento completo dos mecanismos que controlam todos os eventos relacionados à foliculogênese ainda não

foi atingido. Sabe-se que as gonadotrofinas desempenham papel chave na regulação do desenvolvimento folicular antral, bem como na indução da ovulação. Contudo, fortes evidências indicam a participação de peptídeos intra-ovarianos de ação parácrina em todas as fases do desenvolvimento folicular, dentre eles, os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs).

Os FGFs estão agrupados em sete subfamílias, sendo que os membros dessas subfamílias apresentam características estruturais e/ou funcionais semelhantes e afinidade aos mesmos receptores. A subfamília do FGF7 é composta pelo FGF3, FGF7, FGF10 e FGF22 (ITOH & ORNITZ, 2008), os quais se ligam a dois principais receptores, o FGFR1B e FGFR2B. Quanto à participação dos membros dessa subfamília na foliculogênese, destaca-se a expressão do FGF10 em oócitos e células da teca de folículos antrais bovinos e suas ações sobre as células da granulosa (BURATINI et al., 2007). A expressão do FGF10 mostrou-se diminuída nas células da teca de folículos estrogênicos, o que, combinado a dados funcionais indica efeito supressor do FGF10 sobre a esteroidogênese das células da granulosa (CG). Portanto, há evidências de que o FGF10 possa ser um fator regulador importante da diferenciação das CG e que ele deve ser suprimido para a continuidade do crescimento folicular após o recrutamento.

Assim como o FGF10, o FGF7 também é expresso em CT de folículos antrais e da mesma forma possui ação anti-esteroidogênica sobre as células da granulosa bovinas cultivadas (PARROTT et al., 1994; PARROTT & SKINNER, 1998 ab; BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2007). Contudo, como sua expressão não é regulada ao longo do desenvolvimento folicular antral, sua participação parece não ser tão

importante quanto à do FGF10. Quanto ao FGF22, a literatura não dispõe de dados sobre a expressão e função deste membro da subfamília do FGF7 no ovário bovino.

Desta forma, este trabalho objetivou investigar a participação de FGFs pertencentes à subfamília do FGF7 e seus receptores na regulação da foliculogênese antral por meio da caracterização dos seus padrões de expressão. A ação anti-esteroidogênica dessa família motivou especificamente a investigação da expressão dos mRNA dos seus componentes ao redor do desvio folicular a fim de avaliar seu envolvimento nos mecanismos de seleção do folículo dominante na espécie bovina.

Capítulo I

Revisão de literatura

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Desenvolvimento folicular ovariano

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001). O estabelecimento da linhagem germinativa no ovário fetal ocorre pela migração das células germinativas primordiais (CGP), oriundas do endoderma extraembrionário (parede do saco vitelíneo), até a crista genital, através do endoderma intestinal e mesentério dorsal (MOTTA et al., 1997). A formação dos folículos acontece quando os óocitos primários tornam-se envoltos por uma única camada de células achatadas, denominadas células da pré-granulosa, constituindo o folículo primordial (WANDJI et al., 1996). Em suma, o processo que leva a formação do folículo primordial é basicamente caracterizado pela formação e migração das CGP, colonização ovariana por células mesonéfricas, formação e proliferação das oogônias que iniciam o processo de meiose com interrupção no dictióteno e, por fim, o desenvolvimento, proliferação e diferenciação das células da granulosa (CG).

Inúmeros estudos têm demonstrado que o desenvolvimento folicular pré-antral independe de estímulo gonadotrófico agudo e que mecanismos autócrinos e parácrinos de controle mediados por fatores de crescimento desempenham um papel hegemônico nessa fase (MCNATTY et al., 1999). Vários peptídeos intraovarianos como o KL (“kit ligand”), membros da família dos fatores de crescimento transformantes β (TGF- β) como o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), a ativina, a inibina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs), fatores de crescimento epidermais (EGFs) e fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) têm sido apontados como fatores

reguladores importantes do desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral (FINDLAY, 1994; VAN DEN HURK et al., 1997; MONNIAUX et al., 1997ab; WEBB et al., 2003; BURATINI et al., 2005ab; BURATINI et al., 2007; MACHADO et al., 2009).

1.2. Controle do desenvolvimento folicular antral

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas, com apresentação de uma, tão raro quanto 4, duas (RHODES et al., 1995) ou três (FIGUEIREDO et al., 1997) ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Em zebuínos, há maior incidência de três ondas, sendo notificada a presença de até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (FIGUEIREDO et al., 1997). Essas variações podem ocorrer em função de vários fatores como dieta, manejo, produção de leite, período de lactação e pós-parto imediato (GINTHER et al., 1996).

Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento sincronizada por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Destes, apenas um continua o seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros regridem (folículos subordinados), estabelecendo-se então o fenômeno do desvio folicular.

A divergência ou desvio folicular é definida como o momento em que as taxas de crescimento dos dois maiores folículos diferenciam-se e é seguida pela continuidade do desenvolvimento do folículo dominante e regressão dos outros (GINTHER et al., 1996).

Em novilhas da raça Nelore, a divergência ocorre entre os dias 2,5 a 2,8 dias após a ovulação (SARTORELLI et al., 2005, GIMENES et al., 2008)

Distintamente da fase pré-antral, mecanismos endócrinos são preponderantes na regulação do desenvolvimento folicular antral, destacando-se as gonadotrofinas (FSH e LH) e os hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona). Entretanto, vários estudos sustentam a participação de fatores ovarianos parácrinos nos mecanismos de controle, inclusive na mediação e modulação da ação das gonadotrofinas (FORTUNE, 1994; GONG et al., 1996; MONNIAUX et al., 1997a; WEBB et al., 2003). Uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento folicular (ADAMS et al., 1992; FORTUNE, 1994). O número de folículos selecionados dentre os recrutados para dar continuidade ao desenvolvimento folicular rumo à ovulação, varia conforme o número de ovulações por ciclo estral característico de cada espécie. Através da secreção de estradiol e inibina, o folículo dominante causa redução dos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (GINTHER et al., 1996). Acredita-se que a refratariedade do folículo dominante aos níveis decrescentes de FSH se deve, ao menos em parte, à aquisição de receptores para o LH, gonadotrofina responsável pelo desenvolvimento e maturação folicular terminal (GINTHER et al., 1996). Finalmente, se a regressão luteal ocorre ainda durante a fase de crescimento do folículo dominante, a queda dos níveis de progesterona permite o aumento da frequência dos pulsos de LH, culminando no pico de LH necessário à ovulação e à maturação oocitária com retomada da meiose, a qual havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular. Caso contrário, o folículo dominante regride e deixa de inibir a secreção de

FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (MONNIAUX et al., 1997ab).

A produção de estrógeno e o crescimento dos folículos dependem da ação coordenada do FSH e LH em seus receptores. O modelo de duas células/dois hormônios (FORTUNE & QUIRK, 1988) sugere que CG e células da teca (CT) estão envolvidas na produção do estradiol através da interação do FSH com seus receptores (FSHr) presentes nas CG e do LH com seus receptores (LHr) presentes nas CT. O início da esteroidogênese se dá pela conversão do colesterol, o qual foi anteriormente transportado para dentro das mitocôndrias pela enzima STAR (steroidogenic acute regulatory protein), em pregnenolona através de enzima citocromo *P450 cholesterol scc* ("side chain clivage") nas células da teca (FORTUNE, 1986; CONLEY & BIRD, 1997). Posterior e majoritariamente em ruminantes (via delta 5 da esteroidogênese), a pregnenolona é primeiramente convertida em 17-OH pregnenolona (pela 17 α didroxilase, P450 c17), posteriormente em diidroepiandrosterona (DHEA) pela citocromo P450 17c17 delta5 liase nas CT, que, por sua vez, é convertida em androstenediona pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD). Finalmente, a androstenediona pode seguir dois caminhos: ou ser convertida em testosterona pela 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase e essa por sua vez aromatizada em estradiol nas células da granulosa pela enzima aromatase (P450 arom) ou a androstenediona ser convertida em estrona pela P450 aromatase e depois em estradiol pela 17 β hidroxiesteróide desidrogenase (CONLEY & BIRD, 1997).

Um aumento na frequência dos pulsos de LH constitui o estímulo necessário para que as células da teca forneçam andrógenos para as células da granulosa, como substrato para aromatização dos andrógenos e produção de estradiol. Já as CG, são

influenciadas pelo FSH, através de seu receptor, aumentando a atividade da aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos em 17 β -estradiol (RICHARDS et al., 1987). No momento da divergência ou desvio, o folículo dominante tem concentrações intrafoliculares de estradiol maiores que os subordinados, o que condiz com a menor atividade estrogênica de folículos subordinados em relação aos dominantes em estudos in vitro. Após a seleção, ocorre aumento da expressão gênica para receptores de gonadotrofinas e enzimas esteroidogênicas no folículo dominante (FORTUNE et al., 2001). Merece destaque nesse contexto a participação do IGF-1, o qual além de estimular a proliferação mitótica das células da granulosa, aumenta a produção de esteróides por essas células, induzida pelo FSH (SPICER et al., 1993).

1.3. O sistema FGF

Os FGF compõem uma família de pelo menos 25 membros (FGF 1-25); (KATOH & KATOH, 2005), tendo sido apenas 23 membros descritos em mamíferos (ITOH & ORNITZ, 2004). Tais fatores apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização e oncogênese (BASILICO et al., 1992). Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam potentes atividades neurotróficas e angiogênicas. Essas moléculas estão expressas em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento e também em tecidos adultos, o que indica que elas desempenham papel importante como fatores de crescimento e diferenciação durante toda a vida (IGARASHI et al., 1998).

Os eventos celulares mediados pelos FGFs acontecem via ativação de sete principais receptores, FGFR-1 a FGFR-4, que se localizam na membrana plasmática e têm atividade intracelular tirosina quinase. Estruturalmente esses receptores são caracterizados por uma porção extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs. A porção extracelular por sua vez está dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (domínios Ig-like); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. É no domínio D3, que “splicing” alternativo dos genes FGFR1, 2 e 3 geram isoformas funcionais dos tipos b e c (FGFRIIIb e FGFRIIIc); Figura 1; revisado por Eswarakumar et al., 2005).

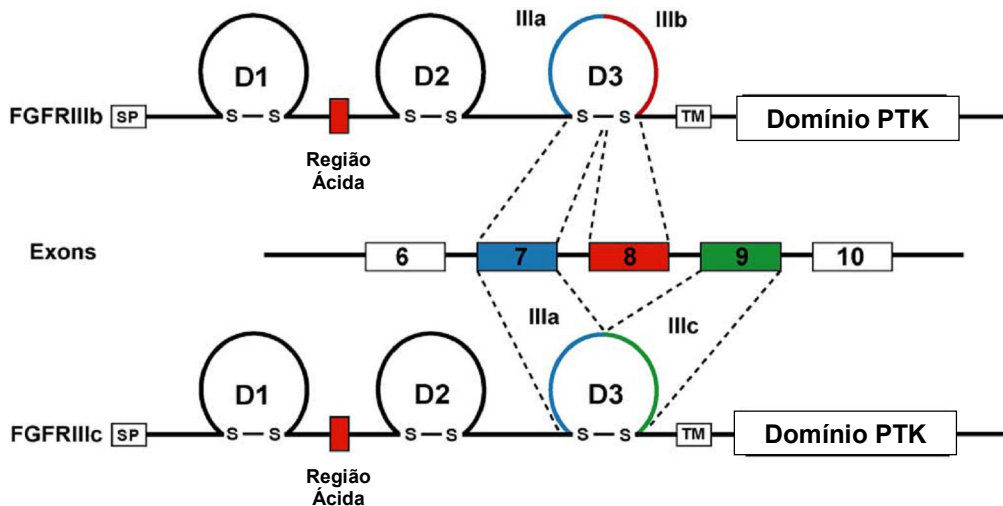


Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativo no domínio extracelular D3 gerando as isoformas b e c dos receptores FGFR1, 2 e 3. (domínio PTK = domínio intracelular tirosina quinase; TM = porção transmembrana). Adaptado de Eswarakumar et al., 2005.

A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com heparina ou proteoglicanos (heparan sulfato), conferindo maior estabilidade à ligação e dimerização dos FGFRs. A sinalização intracelular desse complexo (FGF-FGFR-Heparina) é mediada através do recrutamento de uma família de proteínas sinalizadoras, conhecidas como FRS2, até os locais de ligação com as tirosinas fosforiladas. Após essa ligação, complexos do tipo Grb2 são responsáveis pela ativação da via intracelular, Ras/Raf/ MAP quinase (ESWARAKUMAR et al., 2005; Figura 2).

Além dos quatro tipos de receptores com domínio tirosina quinase, também merece menção o FGFR5 (também conhecido como FGFR1, WIEDEMANN & TRUEB, 2000). Diferentemente dos outros FGFR, esse receptor não apresenta o domínio tirosina quinase (WIEDEMANN & TRUEB, 2001), possuindo ao invés deste, um curto domínio rico em cisteína. A presença deste domínio diferenciado aliada a dados da atividade inibitória deste receptor sobre o crescimento cartilaginoso (TRUEB et al., 2003), sugere função de receptor armadilha, provavelmente sequestrando e modulando a sinalização de FGFs (TRUEB & TAESCHLER, 2006).

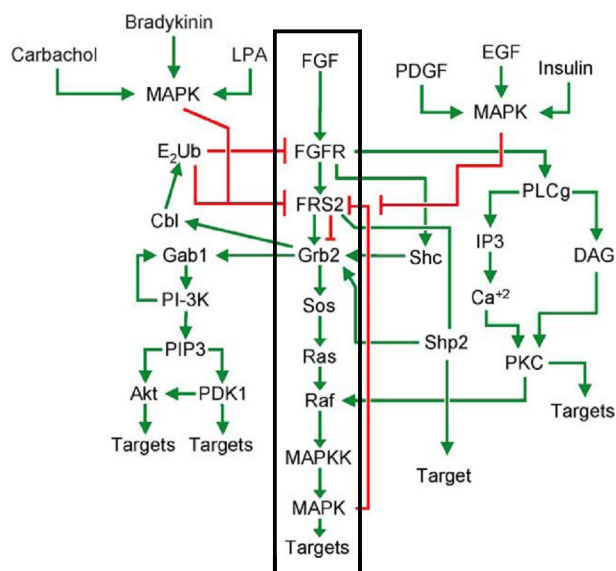


Figura 2. Cascata intracelular da ativação de FGFRs por FGFs em destaque na caixa preta. Adaptado de ESWARAKUMAR et al., 2005.

A foliculogênese está incluída dentre os processos fisiológicos nos quais participam os FGF e seus receptores, sendo o FGF2, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o membro da família melhor estudado nesse contexto. No ovário bovino, o mRNA do FGF2 foi predominantemente localizado nas células da teca de folículos antrais (KOOS & OLSON, 1989; STIRLING *et al.*, 1991; VAN WEZEL *et al.*, 1995; BERISHA *et al.*, 2000). No que se refere à interação entre as células da granulosa e células da teca, o FGF2 em inibir a esteroidogênese, promover a proliferação celular e prevenir a apoptose nas células da granulosa (GOSPODAROWICZ & BIALECKI 1979; BAIRD & HSUEH 1986; YAMOTO *et al.*, 1993; LAVRANOS *et al.*, 1994; VERNON & SPICER 1994; CAO *et al.*, 2006). O FGF2 tem sido considerado inibidor da secreção de estradiol em favor da secreção de progesterona e potente fator angiogênico (BAIRD & HSUEH, 1986). Além disso, o aumento de sua expressão na fase final do crescimento do folículo pré-ovulatório, sugere que suas ações devem ser mais importantes no desenvolvimento luteal do que no desenvolvimento folicular (BERISHA *et al.*, 2004).

Outro membro desta família já estudado em folículos ovarianos é o FGF8, primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (TANAKA *et al.*, 1992; CROSSLEY & MARTIN, 1995), que ativa preferencialmente o FGFR-4 e o subtipo 'c' do FGFR-3 (ORNITZ *et al.*, 1996). A

expressão gênica do FGF8 foi detectada em oócitos, CG e CT de folículos antrais bovinos (BURATINI et al., 2005). Em relação aos seus receptores, destaca-se a expressão do FGFR-3C em CT e CG, e do FGFR-4 em CT de folículos antrais bovinos. A expressão do FGFR-3C mostrou-se aumentada em CG de folículos grandes e estrogênicos, enquanto que a expressão do FGFR-4 mostrou-se maior em folículos antrais pequenos, o que sugere que esses receptores mediam ações específicas em tipos celulares distintos no controle de fases avançadas ou iniciais do desenvolvimento folicular antral (BURATINI et al., 2005).

Ainda pertencente à subfamília do FGF-8, outros dois membros, o FGF17 e FGF18, recentemente tiveram sua expressão e função investigada durante o desenvolvimento folicular antral na espécie bovina. O mRNA do FGF17 foi majoritariamente detectado em óocitos de folículos antrais e em menor grau nas CG e CT. A abundância do mRNA para o FGF17 foi menor em CG e CT de folículos saudáveis do que em folículos atrésicos. Além disso, a adição de FSH ou análogo de IGF-1 no sistema de cultura de CG diminuiu a expressão gênica de FGF17, e o tratamento com o FGF17 diminuiu a secreção de estradiol e progesterona. Esses dados sugerem o envolvimento do FGF17 no controle da diferenciação das células da granulosa rumo a atresia (MACHADO et al., 2009).

Já o mRNA do FGF18 foi detectado predominantemente nas células da teca e, contrariamente ao observado em roedores, o mRNA do FGF18 não foi detectado em oócitos bovinos. A adição do FGF18 em cultivo de células da granulosa inibiu a secreção de estradiol e progesterona, bem como a expressão do mRNA das enzimas esteroidogênicas (aromatase, 17β -HSD, P450 scc, 3β -HSD e STAR) e do receptor de

FSH. Além disso, o FGF18 induziu morte celular e alterou a expressão de genes reguladores do ciclo celular, sugerindo seu envolvimento na indução da atresia folicular (PORTELA et al., 2010).

1.4.Subfamília do FGF7

Análises filogenéticas em ratos demonstraram a existência de sete subfamílias de FGFs: subfamílias do FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9, iFGF (fatores de crescimento fibroblástico intracelular) e hFGF (fatores de crescimento homólogos aos FGFs), (ITOH & ORNITZ, 2008). Em relação à subfamília do FGF7, existem discordâncias sobre quais membros a constituem. Porém, segundo ITOH & ORNITZ, 2008, esta subfamília é composta por 4 membros (FGFs 3, 7, 10 e 22), que interagem com dois principais receptores, o FGFR-2B e o FGFR-1B (ITOH & ORNITZ, 2004). Membros dessa subfamília já foram detectados em folículos antrais bovinos. O FGF7, também conhecido como KGF-I (fator de crescimento dos queratinócitos I), mostrou-se constantemente expresso em CT de folículos antrais bovinos e capaz de inibir a atividade da aromatase e estimular a proliferação de CG (PARROTT et al., 1994; PARROTT & SKINNER, 1998 ab; BERISHA et al., 2004, BURATINI et al., 2007).

1.5. FGF10

O FGF10, também conhecido como KGF-II (fator de crescimento dos queratinócitos II), é uma proteína de aproximadamente 26 Kda, originalmente isolada do mesênquima pulmonar de ratos e identificada como essencial para a regulação de eventos morfogênicos. Sendo assim, acredita-se que o FGF10 desempenha papel

importante na organogênese, especialmente no pulmão (IGARASHI et al., 1998), o que pode ser confirmado pela ausência completa de pulmões em camundongos “knock out” para o FGF10 (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999). Atribuiu-se ao FGF10, a função de potente fator quimiotático para as porções distais do pulmão, agindo como direcionador do crescimento celular (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999). Além disso, o FGF10 também já foi relatado como mediador parácrino dependente de andrógenos no tecido prostático (LU et al., 1999).

O FGF10 é bastante semelhante ao FGF7, tanto no que se refere à estrutura e seqüência do gene, quanto às propriedades funcionais. Ambos apresentam alta afinidade pelo FGFR-2B, o qual é altamente expresso no epitélio pulmonar de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento (PETER et al., 1992; IGARASHI et al., 1998, OHUCHI et al., 2000). Esta similaridade sugere que o FGF7 e o FGF10 atuam de forma sinérgica (IGARASHI et al., 1998). Contudo, o FGF10 não atua somente via ativação de FGFR-2B, mas também por intermédio do FGFR-1B, que se mostrou capaz de ativar a via da MAP quinase em explantes de pele e cérebro de ratos após tratamento com FGF10 (BEER et al., 2000).

No que se refere à participação do FGF10 no controle da fisiologia reprodutiva, destaca-se inicialmente a detecção da expressão gênica do FGF10, juntamente com a do FGF7, no útero neonatal ovino. Acredita-se que ambos participem da regulação da morfogênese endometrial, onde o FGF10 atuaria como fator quimiotático direcionador do crescimento e ramificação glandular, e o FGF7 estimularia a proliferação de células epiteliais (TAYLOR et al., 2001).

Recentemente, a expressão do mRNA do FGF10 foi detectada em oócitos e CT de folículos antrais bovinos (BURATINI et al., 2007), bem como no corpo lúteo bovino (CASTILHO et al., 2008). Como as CG expressam receptores para o FGF10 (FGFR-2B; BERISHA et al., 2004), sugere-se o envolvimento do FGF10 na sinalização parácrina oriunda do oócito e CT alvejando as CG (BURATINI et al., 2007). Os níveis de mRNA do FGF10 diminuíram com as concentrações intrafoliculares de estradiol em CT, indicando que ele é regulado ao longo do desenvolvimento (BURATINI et al., 2007). Isto, combinado à observação de que o FSH estimula a expressão do FGFR-2B em CG (BURATINI et al., 2007), sugere que o FGF10 de origem tecal regula as CG murais de folículos antrais recém-recrutados.

Além disso, dados funcionais demonstraram efeito supressor do FGF10 sobre a esteroidogênese nas CG (BURATINI et al., 2007), indicando que ele atua como modulador da diferenciação das CG e que sua expressão deve ser atenuada para a continuidade do crescimento folicular após o recrutamento.

1.6. FGF22

Este membro da subfamília do FGF7 teve sua expressão inicialmente detectada na placenta humana e pele de ratos, a partir de onde o gene foi clonado e sua estrutura e seqüência descritas. Além disso, baixos níveis de FGF22 também foram encontrados no tecido cerebral de ratos (NAKATAKE et al., 2001). O FGF22 foi classificado como membro da subfamília do FGF7 devido à similaridade quanto à estrutura protéica em relação aos demais membros dessa subfamília. Estudos de atividade mitogênica demonstraram que o FGF22 ativa o FGFR-2B, bem como o FGFR-1B, de modo semelhante ao encontrado para o FGF10 (ZHANG et al., 2006). Muito pouco se sabe

sobre a participação deste FGF em processos celulares. Sabe-se apenas que sua expressão encontra-se aumentada na pele em estágios iniciais do processo de reparo tecidual (BEYER et al., 2003). Até a realização do presente trabalho, não havia informações disponíveis sobre a expressão do FGF22 no ovário bovino.

Capítulo II

Expressão do fator de crescimento fibroblástico 22 (FGF22) e do receptor, FGFR1B, durante o desenvolvimento folicular antral em bovinos.

RESUMO

O FGF3, FGF7, FGF10 e FGF22 são membros da subfamília do FGF7 e atua via FGFR2B e FGFR1B. Em folículos antrais bovinos, o FGF10 foi detectado em oócitos e

células da teca, os níveis de mRNA foram negativamente correlacionadas com as concentrações intrafoliculares de estradiol. O FGF7 também foi expresso nas células da teca e assim como o FGF10, inibiu a produção de estradiol em células da granulosa (CG). O primeiro objetivo do presente trabalho foi determinar os padrões espaciais e temporais da expressão do FGF22 e do FGFR1B em antrais bovinos. Como a expressão do FGFR1B foi alterada pelo *status* nas células da granulosa, nós decidimos então usar o sistema de cultivo para acessar a regulação da expressão gênica pelo FSH e IGF-1, Folículos antrais maiores do que 5mm de diâmetro foram dissecados de ovários bovinos provenientes de abatedouro, CG e células da teca (CT) foram separadas e o RNA total extraído. As concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular foram mensuradas por RIE e os folículos foram agrupados de acordo com a razão E2:P4 de <0,01 (atrésicos, n=15), 0,01-1 (transicional, n=15) e >1 (saudável, n=15). Complexos cumulus-oócito (COCs) foram aspirados de folículos morfologicamente saudáveis e agrupados pelo diâmetro folicular (1-3; 3,1-6; 6,1-8 e >8mm, n=4), os oócitos e células do cumulus foram separados e o RNA total extraído de cada tipo celular de 20 COCs. Para testar os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre a expressão do mRNA do FGFR1B, células da granulosa de folículos pequenos (2-5mm) foram cultivadas em meio livre de soro com FSH (0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1ng/ml) ou análogo de IGF-1 (0; 5; 10; 50 e 100 ng/ml). A expressão do mRNA do FGF22 e do FGFR1B foi acessada por RT-PCR em tempo real usando oligonucleotídeos iniciadores bovino-específico e o GAPDH, ciclofilina e histona H2A como controles endógenos. A presença das proteínas FGF22 e FGFR1 foi acessada por imunohistoquímica. O mRNA do FGFR1B foi detectado em CT, CG, células do cumulus, mas não em oócitos. O mRNA do FGF22 foi detectado em CT, células do cumulus, inconsistente em CG, e ausente

em oócito. As proteínas FGF22 e FGFR1 foram detectadas em CT e CG. Para ambos genes, a abundância de mRNA foi maior em CT de folículos transicionais quando comparados com folículos saudáveis ($P < 0,05$) e não variou com o tamanho do folículo nas células do cumulus. Nas CG, o IGF-1 inibiu a expressão do mRNA do FGFR1B ($p < 0,05$). A expressão intensificada em folículos transicionais sugere um papel para o FGF22 no controle da atresia folicular. A atenuação da influência do FGF22 em folículos saudáveis via inibição dos receptores de FGFs parece ser uma importante ação pró-sobrevivência do IGF-1.

Palavras-chaves: FGF22, FGFR1B, folículos antral, bovino.

ABSTRACT

FGF3, FGF7, FGF10 and FGF22 are member of the FGF7 subfamily and acts via FGFR2B and FGFR1B. In bovine antral follicles, FGF-10 was detected in oocytes and theca cells, mRNA levels were negatively correlated with intrafollicular concentrations of

estradiol. FGF7 was also expressed in theca cells and like as FGF10, inhibited estradiol production from granulosa cells (GC). The first aim of this study was to determine the spatial and temporal patterns of FGF22 and FGFR1B expression in bovine antral follicles. As FGFR1B expression was altered by follicle status in granulosa cells, we then used culture studies to assess regulation of gene expression by FSH and IGF-1. Antral follicles greater than 5mm in diameter were dissected from abattoir ovaries, GC and theca cells (TC) separated and total RNA extracted. Estradiol and progesterone concentrations of the follicular fluid were measured by RIA and follicles were grouped according to $E_2:P_4$ ratios of $<0,01$ (atretic, $n=15$), $0,01-1$ (transitional, $n=15$) and >1 (healthy, $n=15$). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from morphologically healthy follicles grouped by size (1 to 3, 3.1 to 6, 6.1 to 8 and >8 mm; $n=4$); oocytes and cumulus cells were separated and total RNA extracted from pools of each cell type obtained from 20 COCs. To test the effects of FSH and IGF1 on FGFR1B mRNA expression, granulosa cells GC from small follicles (2-5 mm) were cultured in serum-free medium with either FSH (0, 0.05, 0.1, 0.5 or 1 ng/ml) or IGF-1 analog (0, 5, 10, 50 or 100ng/ml). Expression of FGF22 and FGFR1B mRNA was assessed by real time RT-PCR using bovine-specific primers and GAPDH, cyclophilin and histone H2A as endogenous controls. Presence of FGF22 and FGFR1 proteins was assessed by immunohistochemistry. FGFR1B mRNA was detected in TC, GC, cumulus cells, but not in oocytes. FGF22 mRNA was detected in theca cells, cumulus cells, inconsistent in GC and was absent in oocytes. FGF22 and FGFR1 proteins were detected in TC and GC. For both target genes, mRNA abundance was higher in TC from transitional follicles compared with healthy follicles ($P < 0.05$), and did not vary with follicle size in cumulus cells. In GC, IGF-1 inhibited FGFR1B mRNA expression ($P < 0.05$). The enhanced

expression in transitional follicles suggests a role for FGF22 in the control of follicle atresia. The attenuation of FGF22 influence on healthy follicles via the inhibition of FGF receptors appears to be an important pro-survival action of IGF-1.

Keywords: FGF22, FGFR1B, antral follicle, bovine.

1. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

→ Localizar a expressão do FGF22 e do receptor FGFR1B em folículos antrais bovinos;

→ Investigar o padrão temporal de expressão dos mRNA do FGF22 e do FGFR1B durante a foliculogênese antral bovina;

→ Testar os efeitos do FSH e IGF-1 sobre a expressão do mRNA do FGF22 e do FGFR1B em células da granulosa bovinas.

2. HIPÓTESES

→ O FGF22 e o FGFR1B estão presentes em folículos antrais bovinos.

→ A expressão dos mRNA do FGF22 e do FGFR1B é regulada ao longo do desenvolvimento folicular.

→ A expressão do mRNA do FGF22 e do FGFR1B é regulada pelo FSH e pelo IGF-1 em células da granulosa bovinas cultivadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de células da teca e células da granulosa

Amostras de RNA total de CT e CG foram recuperadas separadamente de folículos antrais individualizados. Para tanto, ovários bovinos foram coletados em matadouro e transportados em solução fisiológica gelada (cerca de 5° C) até o laboratório, onde folículos antrais com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm foram dissecados. O fluido folicular foi reservado e mantido a -80°C até a determinação das concentrações de estradiol e progesterona por radioimunoensaio (RIE). As células da granulosa foram

isoladas por centrifugação do fluido folicular (1.200g por 1min) e lavagem da cavidade folicular por “flushing”. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. O “pellet” de células resultante foi imerso em 1 ml de Trizol (Invitrogen Life Technologies®), triturado em homogeneizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e mantido em freezer -80 até a extração do RNA total. Após a remoção das CG, a camada de CT foi destacada da face interna da parede folicular com o auxílio de pinças oftálmicas e lavada em solução fisiológica estéril mediante aspirações e ejeções sucessivas com seringa de 1ml, a fim de eliminar CG remanescentes. Em seguida, a camada da teca também foi imersa em 1ml de solução Trizol e seguiu o mesmo protocolo acima citado para as CG. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

Para investigar a regulação da expressão dos mRNA do FGF22 e do FGFR1B ao longo do desenvolvimento folicular, os folículos obtidos foram agrupados segundo o “status” folicular conforme as razões entre as concentrações intra-foliculares de estradiol e progesterona [E:P; saudáveis: >1, transicionais: 0,01-1, atrésicos: <0,01 (GRIMES & IRELAND, 1986; IRELAND et al., 1994)]. As médias das concentrações de esteróides no fluido folicular e o diâmetro folicular de cada classe folicular estão

representa
dos na
tabela 1.

	<u>Saudáveis (n=15)</u>	<u>Transicionais (n=15)</u>
Estradiol (ng/ml)	184,9 ± 76,1 *	14,5 ± 2,6 **
Progesterona (ng/ml)	40,8 ± 6,9	51,8 ± 15,6
Diâmetro (mm)	9,3 ± 0,2	9,7 ± 0,5
Intervalo de diâmetro (mm)	8 - 11	7.5 - 15

Símbolos

diferentes na mesma linha significam diferença estatística.

Tabela 1. Média (\pm EPM) das concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona e diâmetros foliculares dos folículos classificados como saudáveis e transicionais.

Uma vez que a expressão dos genes endógenos não se mostrou estável entre a classe de folículos atrésicos e as demais nas células da granulosa, somente os folículos transicionais e saudáveis foram utilizados nas análises de expressão gênica (tabela 2).

Média de cts do genes endógenos		
Genes	Classes foliculares	Média de cts
<u>GAPDH (CG)</u>	Saudável	20,1
	Transicional	22,5
	Atrésico	25,5
<u>Ciclofilina (CT)</u>	Saudável	19,3
	Transicional	20,4
	Atrésico	21,4

Tabela 2. Médias dos cts (ciclo threshold) dos genes endógenos, GAPDH e ciclofilina, nas células da teca e da granulosa nas diferentes classes foliculares.

Antes da investigação da expressão do FGF22 e do FGFR1B por PCR, as amostras de RNA de células da teca e da granulosa foram submetidas ao teste de contaminação cruzada pela avaliação da expressão da enzima 17 α -hidroxilase (CYP17)

nas CG e P450 aromatase (CYP19) nas CT, conforme descrito por BURATINI et al., (2005).

3.2. Obtenção dos “pools” de oócitos e células do *cumulus*

Complexos *cumulus*-oócito (COC) foram obtidos por aspiração de folículos antrais de ovários bovinos provenientes de matadouro em colaboração com Ester Siqueira Caixeta e a Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode (Embrapa, Cenargen, Brasília). Foram utilizados apenas folículos saudáveis conforme os critérios: (1) presença de extensa e fina vascularização da parede folicular e (2) aparência brilhante e translúcida. Após a ruptura folicular, a presença de CG com aparência regular e saudável foi visualizada em estereomicroscópio. Posteriormente, os COCs foram removidos e somente oócitos com citoplasma granulado homogêneo com pelo menos 3 camadas de células do *cumulus* foram usados neste experimento. De 4 a 5 “pools” de oócitos e suas correspondentes células do *cumulus* (obtidas por desnudamento mecânico) foram obtidos a partir de 20 folículos agrupados conforme o diâmetro: 1,0 - 3, ; 3,1 - 6; 6,1 – 8; \geq 8mm. As amostras contendo 20 oócitos ou as células do *cumulus* correspondentes foram submetidas ao protocolo RNAasy (Qiagen, Mississauga, ON, Canadá) de extração de RNA total.

Em decorrência da baixa concentração de RNA dos “pools” de oócitos, somente o RNA total de células do *cumulus* foi passível de mensuração por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

3.3. Cultivo de células da granulosa com FSH ou IGF-1

Em virtude do mRNA do FGFR1B ter sido detectado em CG, a regulação da expressão gênica pelo FSH e IGF-1 foi investigada utilizando-se o sistema de cultivo de CG disponível no laboratório do colaborador Prof. Dr. Christopher A. Price na Universidade de Montreal.

O cultivo das CG foi realizado segundo WEBB et al., (1997), e adaptado por SILVA & PRICE, (2000). Folículos ≤ 5 mm de diâmetro foram dissecados dos ovários, e as CG recuperadas por “*flushing*”, lavadas duas vezes por centrifugação durante 20 minutos cada, e suspensas em meio DMEN/F12 (Gibco®) com Hapes (20nM), bicarbonato de sódio (10nM), selenito de sódio (4 ng/ml), BSA (0.1%; Sigma-Aldrich), penicillina (100 IU/ml), estreptomicina (100 µg/ml), transferrina (2,5 µg/ml), aminoácidos não-essenciais (1.1 mM), androstenediona (10^{-7} M –no início da cultura e 10^{-6} M a cada passagem) e insulina (10 ng/ml). A esse cultivo foi adicionado FSH (AFP-5332B, NIDDK, Bethesda, MD, USA; doses de 0; 0,05; 0,1; 0,5 e 1ng/ml); ou análogo de IGF-1 (LR3, Sigma-Aldrich; doses de 0; 5; 10, 50 e 100 ng/ml). O cultivo foi mantido a 37°C em 5% CO₂ por 6 dias, com troca de 70% do meio a cada 2 dias. Para cada dose analisada em cultivo, foram realizadas três replicatas (n=3) para análise da expressão dos genes alvos. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ao pellet obtido foi adicionado 1ml de Trizol (Invitrogen®). As células foram trituradas em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e armazenadas em freezer – 80°C até a extração de RNA.

3.4. Protocolos para investigação da expressão de mRNA e proteína

3.4.1. Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen® e Ominiscript - Qiagen®)

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo Trizol (Invitrogen®) para as CG e CT ou RNeasy (Qiagen), no caso dos oócitos ou células do cumulus,. Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®), com exceção dos “pools” de oócitos.

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total (para CT e CG), 0,45 µg das células do *cumulus* ou 8µl do RNA total de oócitos. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foram utilizados os seguintes “kits”:

→ Para as CG, CT, células do cumulus e oócitos: SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada

com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 ul de água estéril. Essa solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foram adicionados à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNaseOUT Inhibitor” (40unidades/µl). Na seqüência, foi acrescido 1µl (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no PCR.

→ Para as células da granulosa cultivadas: Omniscript (Qiagen) cujo protocolo constitui-se após tratamento com DNase, pela adição de 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM), 2µl de tampão “First Strand” (10X), 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl), 1µl de Omniscript (4unidades/µl; Qiagen) com posterior incubação a 37°C por 1 hora. As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no PCR.

3.4.2. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes alvo de cada um dos experimentos propostos foi investigada por ensaio de PCR em tempo real a partir do mRNA proveniente de:

✓CT, CG, células do cumulus e oócitos de folículos antrais: expressão dos mRNA do FGF22 e FGFR1B;

✓CG cultivadas com FSH ou IGF-1: expressão do mRNA do FGFR1B e FGF22.

Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no ABI Prisma 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos correspondentes (tabela 3).

Gene	Sequência	Temp. de Anelamento (°c)	[] Oligo
GAPDH	S 5' GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA 3' A 5' CCC TCC ACG ATG CCAAAG T 3'	62	150 nM
Ciclofilina	S 5' GCC ATG GAG CGC TTT GG 3' A 5' CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T 3'	60	300 nM
Histona H2a	S 5' GAG GAG CTG AAC AAG CTG TTG 3' A 5' TTG TGG TGG CTC TCA GTC TTC 3'	60	300 nM
FGF22	S 5' GAC TCT ATG GGT CGC GGT TCT 3' A 5' GTT GTA GCC GTT CTC CTC GAT T 3'	59	300 nM
FGFR1B	S 5' ACG TCC TGG TGA CGC AGG 3' A 5' CCG GTG CCA TCC ATT TGA 3'	60	300 nM

Tabe
la 3.
Seq
uênc
ia

dos oligonucleotídeos iniciadores (**S**: oligonucleotídeo iniciador “sense” **A**: oligonucleotídeo iniciador “antisense”).

3.4.3. Análise dos dados de PCR em tempo real

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra utilizando o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram delimitados e a média desses valores determinou o Threshold para cada gene. A eficiência de cada

gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo para cada tipo celular analisado (tabela 4).

Eficiência dos genes alvos		
Genes	Tipo Celular	Eficiência (%)
<u>FGF22</u>	CT	89%
	CG	95%
	Cumulus	96%
	CG cultivada com FSH	96%
	CG cultivada com IGF-1	87%
<u>FGFR1B</u>	CT	88%
	CG	82%
	Cumulus	92%
	CG cultivada com FSH	87%
	CG cultivada com IGF-1	89%

Tabela 4. Eficiências médias da amplificação dos genes alvo nos diferentes tipos celulares analisados.

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno para cada tipo celular (GAPDH, Histona H2A ou Ciclofilina A). Para selecionar o gene endógeno mais estável para cada tipo celular, os três genes supracitados tiveram seu padrão de expressão comparados usando o software gNorm para Microsoft Excel (medgen.ungent.be/genorm; RAMAKERS et al., 2003). Para as células da granulosa

murais, o GAPDH mostrou-se como o melhor gene endógeno, enquanto que a ciclofilina A foi indicada, como melhor gene endógeno para as CT e células do cumulus e a histona H2A para as células da granulosa cultivadas com FSH ou IGF-1.

A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001, figura 1).

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Figura 1. - Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito gene referência; $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.

3.4.4. Imunohistoquímica

A expressão protéica do FGF22 e do FGFR1 foi investigada por imunohistoquímica utilizando a infra-estrutura já disponível no Departamento de Patologia (FMVZ, UNESP-Botucatu). Os ovários bovinos provenientes de abatedouro foram bipartidos e fixados em paraformaldeído 10% tamponado por 24 horas e submetidos ao processamento histológico usual (submersos em parafina e cortados em micrótomo).

Os cortes (5 μ m) foram colocados em lâminas com poli-L-lisina, desparafinizados em xilol duas vezes por 20 minutos e hidratados em banhos sucessivos de 3 min em etanol 100%, 95% e 85%. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos

cortes em solução citrato (pH 6,0; 0,5mM) a 125°C utilizando panela Pascal (DakoCytomation) durante 10min. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com metanol (92%) e peróxido de hidrogênio (8%) por 10 min, seguido por lavagens em água destilada e uma lavagem em solução Tris 0.5 M (pH 7.4). Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com os anticorpos humanos policlonais produzidos em coelho, anti-FGF22 (2ng/ml; cat. NBP1-00820, Novus Biologicals) e anti-FGFR1 (2ng/ml; ab71928, abcam) *overnight* (18 horas) a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em Tris (pH 7.4) e depois incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora (ADVANCEDTM; Dako; Carpinteria; CA; USA). A imunomarcação foi detectada com DAB líquido por 3 minutos (diaminobenzidina; Dako). Para o FGF22, o controle negativo foi produzido através de pré-incubação do anticorpo primário com excesso de proteína do FGF22 humana recombinante (3867-FG; R&D Systems), antes da incubação nas lâminas. Para o FGFR1, a pré-incubação do anticorpo primário foi realizada com excesso de peptídeo bloqueador comercialmente disponível (ab71927, abcam).

3.5. Radioimunoensaio

As concentrações de estradiol e progesterona foram mensuradas no fluido folicular utilizando os kits para estradiol (DSL-4400) e progesterona (DSL-3400; Diagnostics Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas). As curvas padrão foram preparadas a partir de estradiol e progesterona liofilizados (Sigma-Aldrich®) in PBS-gelatina (0,02M fosfato de sódio; 0,15M cloreto de sódio; 0,1% de gelatina; 0,01% de azida sódica; pH=7,5). O intervalo de concentrações utilizadas na curva padrão foi de

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

3.6. Análise estatística

A fim de testar os efeitos dos estágios de desenvolvimento folicular e dos tratamentos sobre a expressão dos genes alvo, foi realizada a seguinte sequência de análise:

→ Teste de normalidade dos dados e de homogeneidade de variâncias entre grupos com transformação para logaritmos quando necessário para realização de análise paramétrica.

→ ANOVA foi utilizada para verificar o efeito do diâmetro folicular sobre a expressão gênica de FGF22 e FGFR1B nas células do cumulus e o efeito do tratamento com FSH e IGF-1 sobre os níveis de mRNA do FGF22 e do FGFR1B em células da granulosa bovina cultivadas.

→ A comparação dos valores relativos da expressão do mRNA do FGF22 e FGFR1B em CG e CT nos diferentes grupos de desenvolvimento folicular foi realizada por teste t não pareado. As amostras de folículos atrésicos não fizeram parte da análise

estatística, uma vez que demonstravam variabilidade nos valores de cts para os genes endógenos.

→ A comparação dos valores relativos da expressão do mRNA do FGFR1B em células da granulosa cultivadas com diferentes doses de IGF-1 foi realizada por teste de Tukey.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os dados estão apresentados por média \pm EPM.

4. RESULTADOS

O mRNA do FGF22 foi detectado nas células da teca, células do cumulus e mostrou-se ausente em oócitos e células da granulosa, enquanto que o mRNA do FGFR1B foi expresso em todos os tipos celulares analisados com exceção do oócito.

A expressão do mRNA de ambos os genes alvos foi maior em células da teca de folículos transicionais comparados a folículos saudáveis ($p < 0,05$). O estágio de desenvolvimento folicular não afetou significativamente os níveis de mRNA do FGFR1B nas células da granulosa ($p = 0,08$, figura 2).

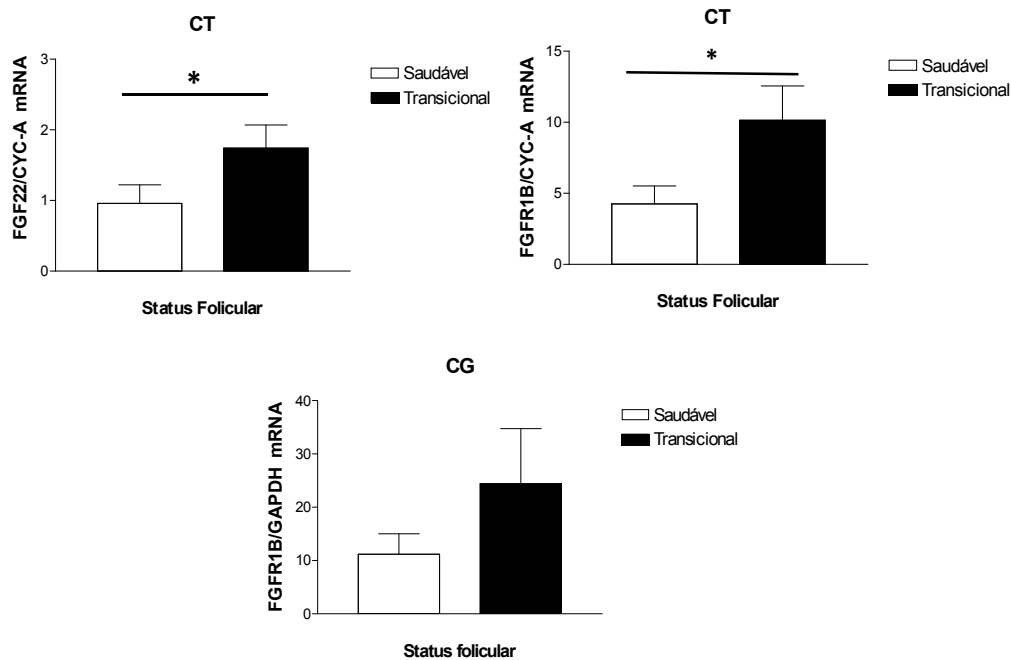


Figura 2. Valores relativos (média ± EPM) da expressão dos mRNA do FGF22 e FGFR1B em células da granulosa (CG) e células da teca (CT) de folículos antrais bovinos saudáveis (n=14) e transicionais (n=14). Asterisco indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Além disso, a expressão dos mRNA do FGF22 e do FGFR1B não variou com o diâmetro folicular nas células do cumulus (figura 3).

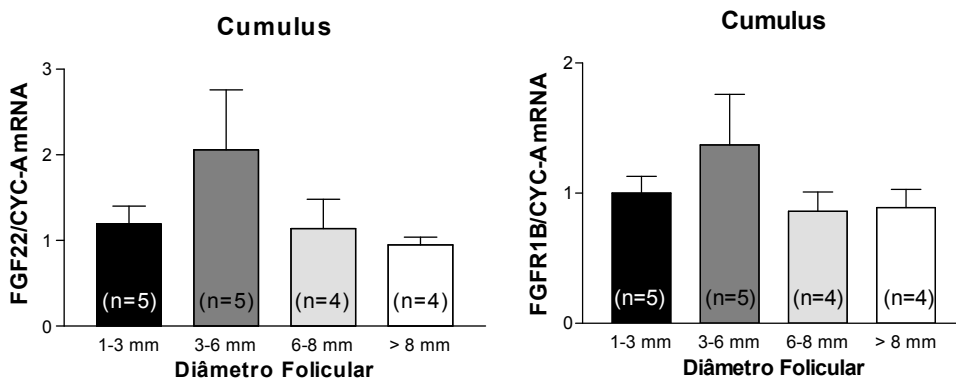


Figura 3. Valores relativos (média \pm EPM) da expressão dos mRNA do FGF22 e FGFR1B em células do cumulus de provenientes de folículos de diferentes diâmetros. Números entre parênteses indicam o número de amostras analisadas.

A detecção do FGF22 no cumulus, mas não nas murais, gerou a hipótese de que a teca possa controlar a expressão do mRNA do FGF22 nas células da granulosa. Para testar esta hipótese medimos a expressão do FGF22 em CG cultivadas (figura 4), sem a influência das células da teca. A análise dos valores médios de Cts (tabela 4) demonstraram maior a expressão do mRNA do FGF22 nas células da granulosa cultivadas com FSH ou IGF1.

Média de cts do FGF22 e do FGFR1B		
Genes alvos	Tipos celulares	Média de cts
	CT	35,7
	CG	38,4
	CG cultivada com FSH	34,9
	CG cultivada com IGF-1	33,3
<i>FGF22</i>	<i>Cumulus</i>	34,4
	CT	26,3
	CG	29,1
	CG cultivada com FSH	25,1
	CG cultivada com IGF-1	23,6
<i>FGFR1B</i>	<i>Cumulus</i>	24,9

Tabela 4. Médias no número de Cts dos genes alvos (FGF22 e FGFR1B) nos diferentes tipos celulares.

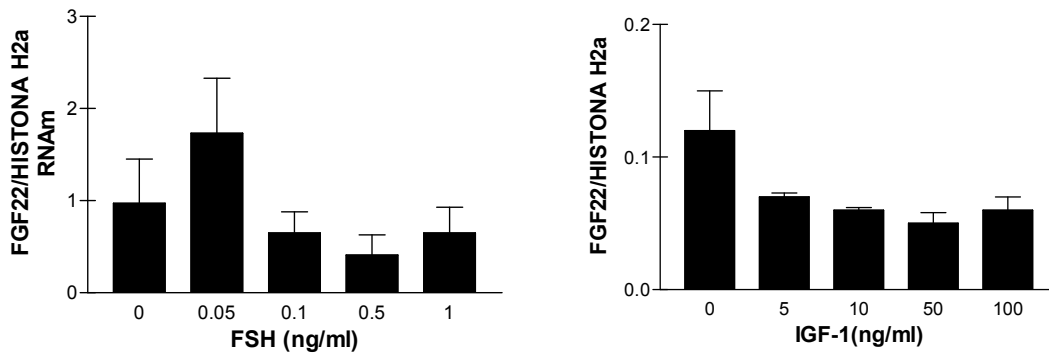


Figura 4. Efeitos do FSH e IGF-1 sobre os níveis de mRNA do FGF22 (média \pm EPM) em células da granulosa cultivadas (n=3; $p>0,05$).

Como o mRNA do FGFR1B foi detectado nas células da granulosa, decidiu-se avaliar se a expressão deste receptor é regulada pelo FSH e IGF-1 em células da granulosa cultivadas. O tratamento com IGF-1 inibiu a expressão do FGFR1B a partir da dose 10ng/ml ($p<0,05$), porém o FSH não alterou os níveis do mRNA do FGFR1B (figura 5).

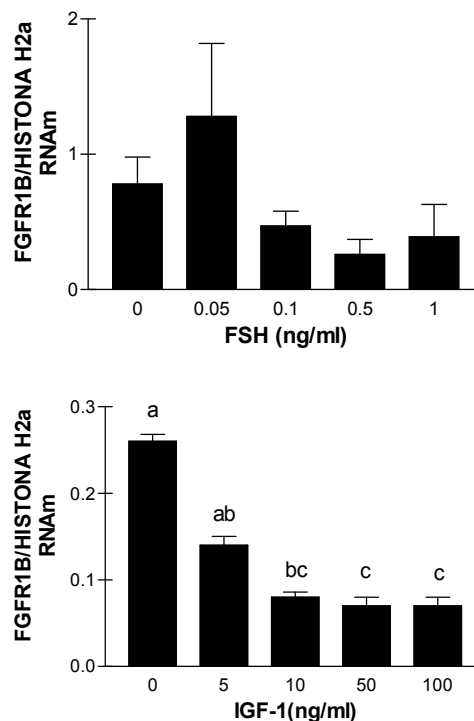


Figura 5. Efeitos do FSH e IGF-1 sobre os níveis de mRNA do FGFR1B (média \pm EPM) em células da granulosa cultivadas. Barras com letras diferentes significam diferença (n=3; p<0,05).

A imunohistoquímica revelou a presença de FGF22 (figura 6) e do FGFR1 (isoforma não-específica; figura 7) nas células da granulosa e células da teca e também em vasos sanguíneos. Além disso, observou-se imunomarcação fraca no estroma. Nenhuma marcação foi observada quando os anticorpos do FGF22 e do FGFR1 foram pré-incubados com excesso da proteína FGF22 e peptídeo bloqueador, respectivamente.

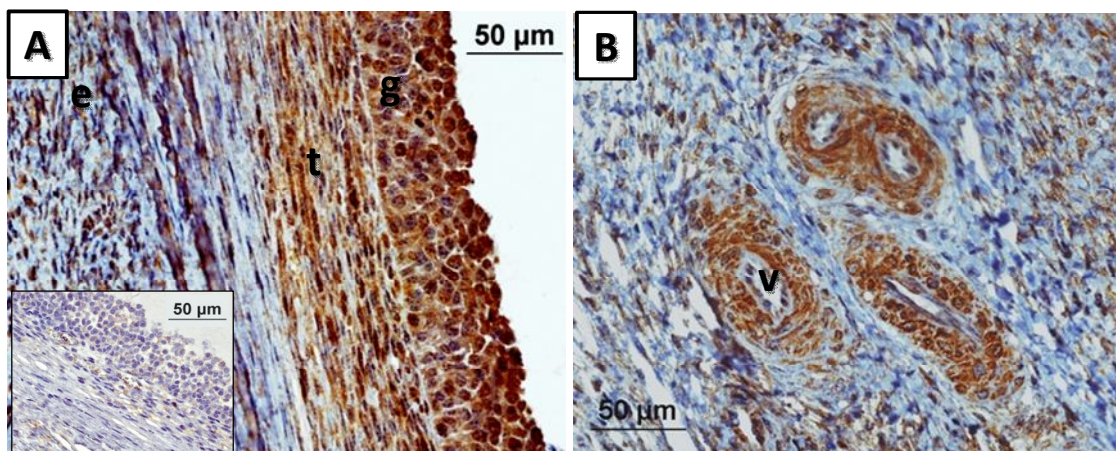


Figura 6. Imunolocalização do

FGF22 em folículo antral (A) e vasos sanguíneos (B). Inseto (controle negativo; pré-incubação do anticorpo com excesso de proteína). g=granulosa, t=teca e s=estroma.

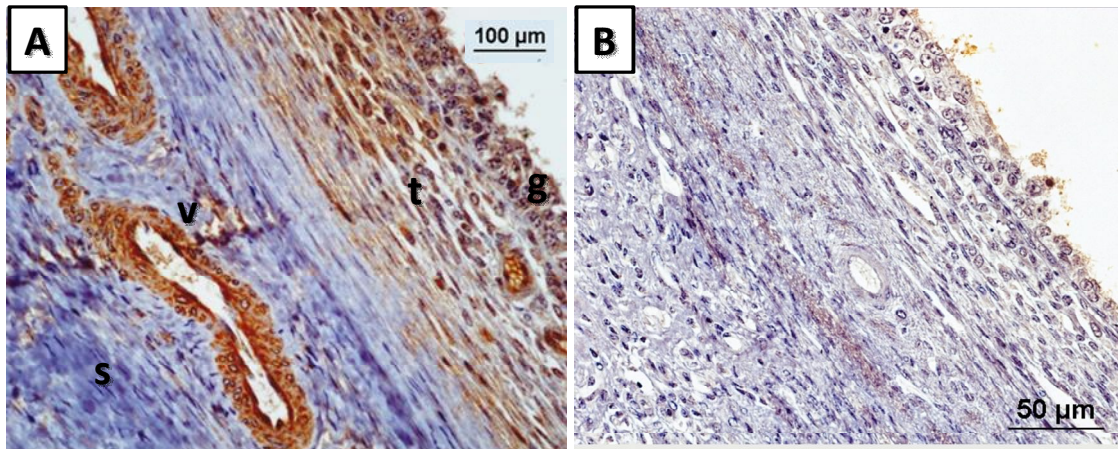


Figura 7. Imunolocalização

do FGFR1 em folículo antral e vasos sanguíneos (A). Controle negativo (B): pré-incubação do anticorpo com excesso de peptídeo bloqueador. g=granulosa, t=teca e s=estroma.

5. DISCUSSÃO

Esses dados demonstram pela primeira vez a expressão do FGF22 e do FGFR1B em folículos antrais bovinos. Os achados mais interessantes foram os maiores níveis de mRNA do FGF22 e do FGFR1B em células da teca de folículos transitórios quando comparados a folículos saudáveis e a inibição da expressão gênica do FGFR1B em células da granulosa pelo IGF-1, sugerindo o envolvimento do sistema FGF22/FGFR1B nos mecanismos que controlam a regressão folicular.

No que se refere à presença do FGF22 no sistema reprodutivo feminino, o mRNA do FGF22 havia sido detectado apenas na placenta (NAKATAKE et al., 2001). No presente trabalho, demonstramos que o mRNA do FGF22 é expresso pelas células da teca, mas não de maneira consistente pelas células da granulosa *in vivo*, conforme descrito para os outros membros da subfamília do FGF7 (BURATINI et al., 2007). No

oócito, alguns FGFs tem sido localizados, incluindo o FGF2, FGF8, FGF10 e FGF17 (VAN WEZEL et al., 1995; BURATINI et al., 2005; BURATINI et al., 2007; MACHADO et al., 2009), porém isso não é um fenômeno extensivo a todos FGFs, uma vez que o mRNA para o FGF7 foi detectada nas células da teca, mas não em oócitos (BURATINI et al., 2007). Logo, a ausência de FGF7 e FGF22 em oócitos sugere que o FGF10 deva ser o principal fator da subfamília do FGF7 presente no oócito envolvido com o desenvolvimento e competência oocitária. Essa hipótese se reforça mais ainda, uma vez que o mRNA do FGF10 já se mostra expresso desde os primórdios da foliculogênese pré-antral em fetos bovinos (CASTILHO et al., 2008).

Os maiores níveis de mRNA do FGF22 encontrados nas CT de folículos transicionais quando comparados aos folículos saudáveis, sugere a participação deste FGF na atresia folicular, conforme descrito para o FGF18 (PORTELA et al., 2009). Além disso, não se pode descartar a possibilidade de participação no controle da esteroidogênese das células da granulosa, conforme descrito para o FGF7 e o FGF10 (PARROT & SKINNER, 1998; BURATINI et al., 2010). No entanto, estudos funcionais sobre o envolvimento do FGF22 sobre esteroidogênese de CG cultivadas e os mecanismos envolvidos nesse processo ainda precisam ser analisados para verificar se o FGF22 segue o mesmo padrão encontrado para outros membros da subfamília FGF7 ou pertencente às outras subfamílias de FGFs, utilizando para isso o modelo de célula estrogênica conforme demonstrado para o FGF2, FGF7, FGF10, FGF17 e FGF18, os quais inibiram a secreção de estradiol (PARROT & SKINNER, 1998; CAO et al., 2006; BURATINI et al., 2007; MACHADO et al., 2009; PORTELA et al., 2010).

Quanto à participação dos receptores no controle do desenvolvimento folicular antral, merece destaque a expressão do FGFR1B nas células da granulosa mural com

menores valores numéricos em folículos saudáveis ($p=0.08$). Embora sem diferença, esses valores são sugestivos para indicar a possível participação deste receptor no desenvolvimento folicular antral. A confirmação de tal hipótese se deu pela diminuição nos níveis de mRNA do FGFR1B nas células da granulosa pelo IGF-1, conforme descrito para o FGFR2B por BURATINI et al.(2007), o que sugere que tanto o FGFR1B quanto o FGFR2B devam ser suprimidos para permitir o desenvolvimento folicular em bovinos. Portanto, a habilidade do IGF-1 em suprimir a expressão do FGFR1B e do FGFR2B pode ser considerada uma maneira de estabelecer sua ação pró-sobrevivência em folículos antrais. Contrariamente a ausência de efeito do FSH sobre a expressão do FGFR1B em células da granulosa cultivadas verificadas no presente trabalho está a estimulação da expressão do mRNA do FGFR2B em CG cultivadas pelo FSH (BURATINI et al., 2007). A divergência encontrada entre esses estudos pode ser decorrente do uso de doses diferentes de FSH utilizadas, sendo até 100x maior no estudo de BURATINI et al., (2007), no entanto não exclui a possibilidade do FSH levar a efeitos opostos nesses receptores.

Embora o mRNA para o FGF22 não tenha sido encontrado consistentemente nas células da granulosa, a respectiva proteína mostrou-se presente na camada de CG. Essa forte imunomarcação no citoplasma das células da granulosa pode refletir a ligação do FGF22 aos seus receptores (FGFR2B e FGFR1B), expressos nas CG de folículos antrais bovinos com posterior internalização deste complexo (BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2007). Esta idéia é suportada pela evidência de internalização de receptores ligados a FGFs exógenos em diversos tipos celulares (BELLEUDI et al., 2002; OLSNES et al., 2003, WESCHE et al., 2006). Outro significativo achado foi a presença da proteína FGF22 no núcleo das células foliculares ovarianas. Como a

proteína FGF22 também foi detectada no citoplasma dessas células, sugere-se uma possível translocação da proteína para o núcleo. Vale destacar que a translocação de FGFs endógenos já foram reportadas para o FGF1, FGF2 e FGF3 (ZHAN et al., 1992; KIEFER & DICKSON et al., 1995; SHENG et al., 2004). No entanto, embora a detecção do FGF22 pareça ser específica e a pré-incubação do anticorpo com a respectiva proteína tenha abolido a marcação no controle negativo, existe a possibilidade de que o anticorpo reaja com outros FGFs.

6. CONCLUSÃO

A presença do FGF22 e do FGFR1B em folículos antrais bovinos, os menores níveis de mRNA do FGF22 e FGFR1B em folículos saudáveis em relação a folículos transicionais e a supressão do mRNA do FGFR1B pelo IGF-1, sugerem a participação desse sistema no controle da regressão folicular. Além disso, os presentes dados indicam que a supressão deste sistema seja necessária para a continuidade do crescimento folicular em direção à ovulação.

Capítulo III

Expressão dos membros da subfamília do FGF7 (FGF7, FGF10 e FGF22) e seus receptores (FGFR1B e FGFR2B) em folículos antrais durante o desvio folicular em novilhas da raça Nelore.

RESUMO

Os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) estão agrupados em diversas subfamílias de acordo com as propriedades estruturais e funcionais, e possuem diferentes papéis fisiológicos, incluindo a regulação da foliculogênese. A subfamília do FGF7 inclui o FGF3, FGF7, FGF10 e o FGF22, os quais ativam os receptores, FGFR2B e FGFR1B. O FGF7 e o FGF10 são expressos pelas células da teca e inibem a

secreção de estradiol nas células da granulosa em bovinos. Nós recentemente demonstramos que o FGF22 é expresso em células da teca bovina. Folículos obtidos de abatedouro, considerados saudáveis pela estimativa do tamanho e da concentração de esteróides, indicaram que a expressão do FGF10 e do FGF22, mas não a do FGF7, é regulada e suprimida em folículos dominantes. Para investigar o envolvimento da subfamília do FGF7 no controle da seleção do folículo dominante, nós mensuramos a expressão do mRNA dos membros da subfamília do FGF7 e receptores em folículos dominantes e subordinados ao redor do desvio folicular em novilhas da raça Nelore. O ciclo estral foi sincronizado e a ovulação foi detectada por ultrassom a cada 12 horas. As novilhas foram abatidas nos dias 2 (n=4); 2,5 (n=5) e 3 (n=4) após a ovulação, as células da teca e da granulosa foram isoladas dos dois maiores folículos e submetidas a extração de RNA total. Os folículos foram classificados como dominante e subordinado de acordo com a abundância do mRNA da CYP19 nas células da granulosa, e a abundância dos mRNA dos genes alvos foi mensurada por RT-PCR em tempo real. A abundância do mRNA do FGF7 foi maior nas células da teca de folículos subordinados quando comparados a folículos dominantes no dia 2,5 após a ovulação e o mesmo padrão foi observado para o FGF10 nos dias 2,5 e 3 após a ovulação. A abundância do mRNA do FGF22 não foi alterada pelo tempo ou classe folicular. A abundância do mRNA do FGFR1B e do FGFR2B foi maior nas células da teca e da granulosa, respectivamente, de folículos subordinados quando comparados com folículos dominantes no dia 2. Em conclusão, a expressão do mRNA do FGF7, FGF10 e FGFR1n nas células da teca e do FGFR2B nas células da granulosa, é diminuída em folículos dominantes antes do esperado desvio folicular morfológico, o que sugere

fortemente um papel dos membros da subfamília do FGF7 na regulação da seleção do folículo dominante.

Palavras-chaves: Subfamília do FGF7, desvio folicular, granulosa, teca, bovino.

ABSTRACT

Fibroblast growth factors (FGFs) are grouped into several FGF subfamilies according to structural and functional properties, and play a number of different physiological roles including regulation of folliculogenesis. The FGF7 subfamily includes FGF3, FGF7, FGF10 and FGF22, which activate FGFR2B and FGFR1B. FGF7 and FGF10 are expressed by theca cells and inhibit estradiol secretion from granulosa cells in cattle. We have recently demonstrated that FGF22 is also expressed by bovine theca cells. The assessment of abattoir obtained follicles with health status estimated by size or steroid content indicated that mRNA expression of FGF10 and FGF22, but not of FGF7, is developmentally regulated and suppressed in dominant follicles. To investigate the involvement of the FGF7 subfamily in the control of dominant follicle selection we

measured mRNA expression of FGF7 family members and receptors in dominant and subordinate follicles around the time of follicle deviation in Nelore heifers. Estrous cycles of thirteen heifers were synchronized and ovulation was detected by ultrasound monitoring every 12 hours. Heifers were slaughtered 2 (n=4), 2.5 (n=5) and 3 (n=4) days after ovulation, theca and granulosa cells were isolated from the two largest follicles and submitted to total RNA extraction. Follicles were classified as dominant and subordinate according with CYP19 mRNA abundance in granulosa cells, and mRNA abundance of target genes was measured by real time RT-PCR. FGF7 mRNA abundance was greater in theca cells from subordinate follicles compared with dominant follicles on day 2.5 and the same was observed for FGF10 on days 2.5 and 3. FGF22 mRNA abundance was not altered by time or follicle class. FGFR1B and FGFR2B mRNA abundance was greater in theca and granulosa cells, respectively, from subordinate compared with dominant follicles on day 2. In conclusion, mRNA expression of FGF7, FGF10 and FGFR1B in theca and of FGFR2B in granulosa cells is decreased in dominant follicles before at the expected time of follicle morphological divergence, which strongly suggests a role for the FGF7 subfamily in the regulation of dominant follicle selection.

Keywords: FGF7 subfamily, follicle deviation, granulosa, theca, cattle.

1. OBJETIVOS

→ Investigar a expressão gênica dos membros da subfamília FGF7 (FGF7, FGF10 e FGF22) e dos seus receptores (FGFR1B e FGFR2B) em folículos antrais ao redor do desvio folicular.

2. HIPÓTESE

A expressão dos membros da subfamília FGF7 e de seus receptores é menor em folículos dominantes em relação aos subordinados ao redor do desvio folicular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas nesse experimento provêm de projeto em colaboração coordenado pelo Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, no qual foram obtidas CT e CG de folículos de novilhas Nelores (n=21) recuperadas ao redor do desvio folicular.

As novilhas (n=21) tinham idade entre 24 a 36 meses e foram suplementadas 2 vezes ao dia (concentrado, PB: 16% e NDT: 60%), em regime de pasto (*coast cross*) com acesso irrestrito a água e sal mineralizado.

3.1. Caracterização do momento da seleção (desvio) folicular

Para que todas as novilhas apresentassem estágios de desenvolvimento folicular similares, o estro e a ovulação foram sincronizados (figura 1).

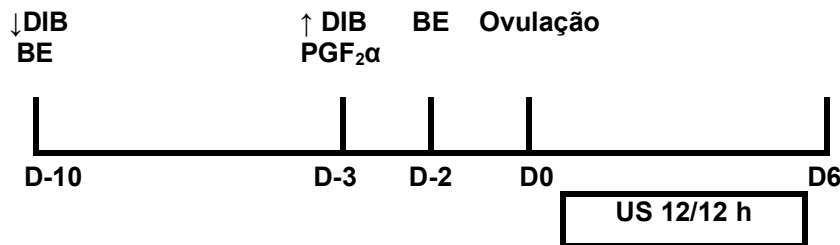


Figura 1.
Protocolo

de sincronização da ovulação e acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*).

No D-10 as novilhas receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona de segundo uso (1,0 g, DIB[®], Syntex, Argentina), associado à aplicação de benzoato de estradiol (BE, 2,5 mg, Estrogin[®] via IM). O dispositivo intravaginal foi removido no D-3 e os animais receberam uma aplicação de PGF₂α (d-cloprostenol, 500 µg, Prolise[®], IM). Vinte e quatro horas mais tarde, foi administrado 1,0 mg de BE (via IM) e a partir deste dia, o crescimento do folículo dominante foi acompanhado através de ultra-sonografia (US), realizada a cada 12 horas.

3.2. Ultra-sonografia

Após a ovulação (D0) o desenvolvimento dos folículos com mais de 3 mm de diâmetro foi acompanhado através de exame US, realizado a cada 12 horas, até pelo menos o sexto dia após a ovulação, de forma a permitir a identificação do início do desvio folicular. O momento da ovulação foi considerado como a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira ocasião em que ele não foi observado no monitor do ultra-som. Após a identificação do momento do desvio folicular na primeira etapa, as novilhas foram novamente sincronizadas com o protocolo citado acima e acompanhados por US como já mencionado.

3.3. Obtenção das células da teca e da granulosa

As novilhas foram abatidas para a obtenção dos ovários nos seguintes momentos: 12 horas antes do momento predito do desvio (dia 2), no momento do desvio (dia 2,5) e 12 horas pós-desvio (dia 3). O maior e o menor folículo foram dissecados dos ovários e mensurados com auxílio de paquímetro. Após a remoção das CG, centrifugação e obtenção do pellet de CG, o mesmo foi transferido para solução Trizol e armazenado em freezer -80°C até a extração de RNA total. O fluido folicular foi reservado e também mantido a -80°C até a determinação das concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona por radioimunoensaio (RIE). Posteriormente, as camadas da teca foram destacadas e imersas em 1 ml de solução Trizol (Invitrogen®), trituradas em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25), e mantidas em freezer -80°C até à extração de RNA total. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

Uma vez obtidos os dois tipos celulares, a contaminação cruzada dessas amostras foi testada pela expressão gênica das enzimas 17 α hidroxilase (CYP17) nas

CG e CYP19 (aromatase) nas CT, conforme descrito por BURATINI et al., 2005b, garantindo assim a identidade e pureza das amostras coletadas.

A expressão do FGF7, FGF10, FGF22, FGFR1B (nas células da teca) e do FGFR2B (nas células da granulosa) foi quantificada por RT-PCR em tempo real, conforme descrito abaixo.

3.4. Protocolos para investigação da expressão de mRNA

3.4.1. Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen® e Ominiscript - Qiagen®)

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo Trizol (Invitrogen®). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o seguinte protocolo:

→ SuperScript III (Invitrogen[®]), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 ul de água estéril. Essa solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl). Na sequência, foi acrescido 1µl (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e se iniciou a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no PCR.

3.4.2. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes alvo de cada um dos experimentos propostos foi investigada por ensaio de PCR em tempo real a partir do mRNA proveniente de:

✓ Células da teca ao redor do desvio: expressão gênica do FGF7, FGF10, FGF22 e FGFR1B

✓ Células da granulosa ao redor do desvio: expressão gênica da CYP19 (aromatase) e do FGFR2B.

Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos correspondentes (Tabela 1).

Gene	Sequência	Temp. de Anelamento (°c)	[] Oligo
GAPDH	S 5' GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA 3' A 5' CCC TCC ACG ATG CCA AAG T 3'	62	150 nM
Ciclofilina	S 5' GCC ATG GAG CGC TTT GG 3' A 5' CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T 3'	60	300 nM
Histona H2a	S 5' GAG GAG CTG AAC AAG CTG TTG 3' A 5' TTG TGG TGG CTC TCA GTC TTC 3'	60	300 nM
FGF7	S 5' TCC ACG ATG CAAC AAG CT3' A 5' GTT GTA GCC ACG ATG CCA AAG 3'	60	300 nM
FGF10	S 5' AAG GAG ATG TCC GCT GGA GAA AGC TA 3' A 5' ACT GTA CGG GCA GTT CTC CTT CTT3'	60	300 nM
FGF22	S 5' GAC TCT ATG GGT CGC GGT TCT 3' A 5' GTT GTA GCC GTT CTC CTC GAT T 3'	59	300 nM
FGFR1B	S 5' ACG TCC TGG TGA CGC AGG 3' A 5' CCG GTG CCA TCC ATT TGA 3'	60	300 nM
FGFR2B	S 5' TGT GGT TGG AGG TGA TGT 3' A 5' CGA GTG CTT CAG AAC CTT G 3'	58	300 nM
Aromatase	S 5' TGA CCA GAT CCA AAC CAG ACA CCA 3' A 5' ATG AGG TTG CTA AGA GTC GGC ACA 3'	62	400 nM

s iniciadores (**S**: oligonucleotídeo iniciador “sense” **A**: oligonucleotídeo iniciador “antisense”).

3.4.3. Análise dos dados de PCR em tempo real

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra em questão utilizando o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram

delimitados e a média desses valores determinou o “*threshold*” para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo para cada tipo celular analisado (tabela 2).

Eficiência dos genes alvos		
Tipo celular	Genes	Eficiência (%)
<u>TECA</u>	FGF7	96%
	FGF10	94%
	FGF22	97%
	FGFR1B	88%
	FGFR2B	95%
<u>GRANULOSA</u>	FGFR1B	92%
	AROMATASE	96%

Tabela 2. Eficiências médias da amplificação dos genes alvo.

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno para cada tipo celular (GAPDH, Histona H2A ou Ciclofilina A). Para selecionar o gene endógeno mais estável para cada tipo celular, os três genes supracitados tiveram seu padrão e expressão comparados usando o geNorm para Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; RAMAKERS et al., 2003). Para as células da granulosa, o GAPDH mostrou-se como o melhor gene endógeno, enquanto que a ciclofilina A foi indicada, como melhor gene endógeno para as células da teca.

A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001, figura 2).

$$\text{Razão} = \frac{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}$$

(E_{alvo}) / (E_{ref})

Figura 2. - Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito gene referência; ΔCP_{alvo} é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCP_{ref} é desvio de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.

A caracterização dos folículos ovarianos ao redor do desvio (dia 2 com n=4; dia 2,5 com n=5 e dia 3 com n=4) incluiu o diâmetro (tabela 3) e a expressão gênica da enzima CYP19 (aromatase, figura 3)

Status Folicular	Dias após ovulação		
	2	2.5	3
FD	5,5	6,7 ± 0,2	8,37 ± 0,74
FS	5,12 ± 0,31	5,8 ± 0,33	6,62 ± 0,37
P value	P>0,05	P=0,07	P=0,05

Tabela 3. Diâmetro (média ± EPM) dos folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS) ao redor do desvio em novilhas Nelore

Em decorrência de problemas técnicos com os kits inicialmente adquiridos pelo laboratório coordenado pelo colaborador Prof. Ciro Moraes Barros, parte das amostras de fluido folicular foram esgotadas antes das concentrações de estradiol e progesterona serem corretamente mensuradas. Sendo assim, optou-se pela mensuração da expressão do mRNA da CYP19 para distinguir o futuro folículo dominante (com maior

expressão de CYP19) do maior subordinado (com menor expressão de CYP19), conforme descrito por SISCO et al.,(2003), a partir do dia 1,5 da onda folicular. Conforme esperado, nas amostras em que a concentração de estradiol pôde ser mensurada, os valores máximos de concentração de estradiol e expressão de CYP19 foram coincidentes.

3.5. Análise estatística

A fim de testar os efeitos dos estágios de desenvolvimento folicular e dos tratamentos sobre a expressão dos genes alvo e diâmetro folicular foi realizada a seguinte seqüência de análise:

→ Teste de normalidade dos dados e de homogeneidade de variâncias entre grupos com transformação para logaritmos quando necessário para realização de análise paramétrica.

→ O efeito do status folicular (dominante X subordinado) sobre a expressão dos genes alvos e do diâmetro folicular em cada dia ao redor do desvio folicular foi analisado por teste t de amostras pareadas.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os dados estão apresentados em média \pm EPM.

4. RESULTADOS

O valor relativo da expressão de CYP19 foi maior nas CG de folículos dominantes comparados aos subordinados nos dias 2 e 2,5, mas não diferiu entre os grupos no dia 3 (figura 3).

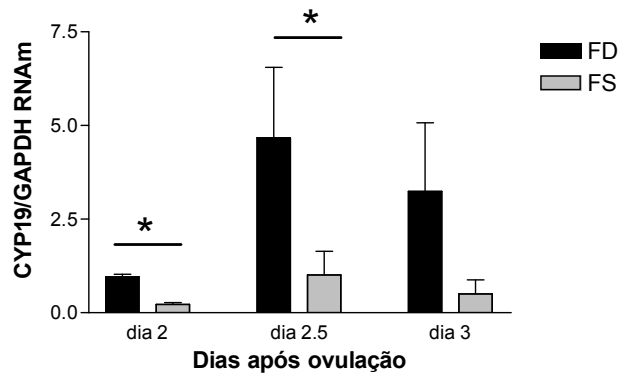


Figura 3. Valores relativos da expressão do mRNA da CYP19 (média \pm EPM) em folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos. * ($P < 0,05$).

A expressão do mRNA do FGF7 foi maior nas CT de folículos subordinados comparados ao dominantes apenas no dia 2,5 após a ovulação (figura 4).

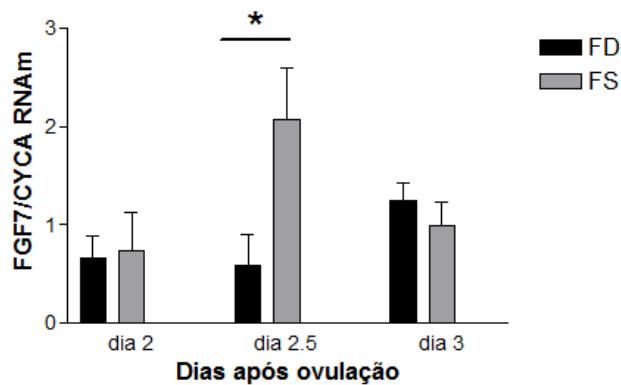


Figura 4. Valores relativos da expressão do mRNA do FGF7 (média \pm EPM) nas CT de folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos. * ($P < 0,05$).

A expressão do mRNA do FGF10 foi maior nas CT provenientes de folículos subordinados comparados aos dominantes nos dias 2,5 e 3 após ovulação (figura 5).

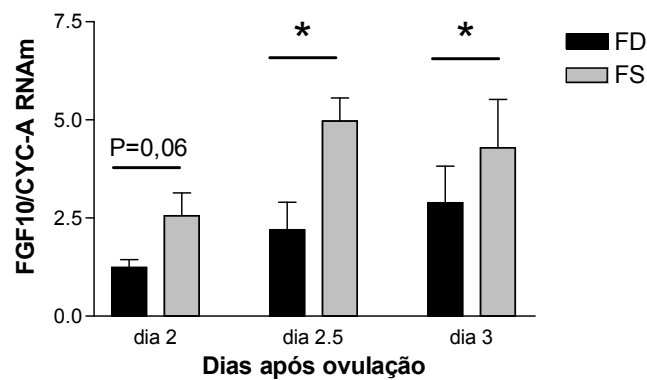


Figura 5. Valores relativos da expressão do mRNA do FGF10 (média \pm EPM) nas CT de folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos. * ($P < 0,05$).

Já a expressão do FGF22 não diferiu entre as classes foliculares ao redor do desvio folicular (figura 6).

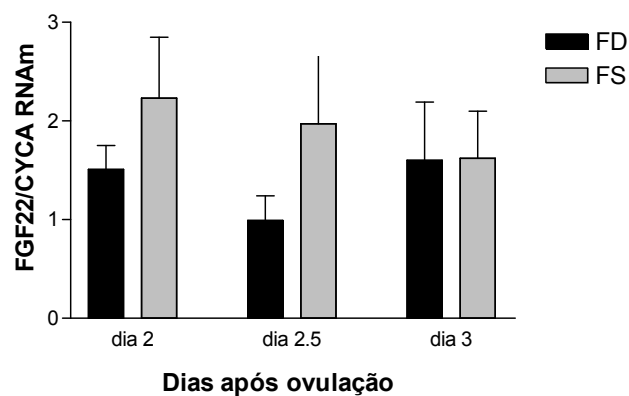


Figura 6. Valores relativos da expressão do mRNA do FGF22 (média \pm EPM) nas CT de folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos.

Uma vez que os testes de contaminação cruzada indicaram 3 amostras de CG contaminadas com CT, fez-se necessária sua exclusão nos experimentos para quantificação dos receptores, FGFR1B e FGFR2B, nas CG ao redor do desvio. Portanto, na análise da expressão dos genes alvo nas CG utilizamos o seguinte número de amostras: dia 2 (n=3), dia 2,5 (n=4) e no dia 3 (n=3).

A expressão do FGFR1B e do FGFR2B mostrou-se maior nas CT (figura 7) e CG (figura 8) de folículos subordinados, respectivamente, somente no dia 2 ao redor do desvio folicular.

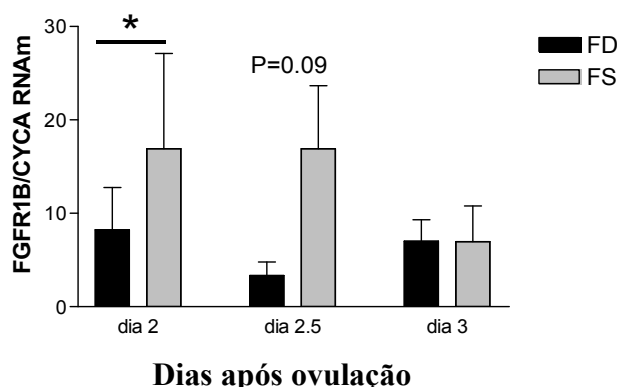


Figura 7. Valores relativos da expressão do mRNA do FGFR1B (média \pm EPM) nas CT de folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos. * (P<0,05).

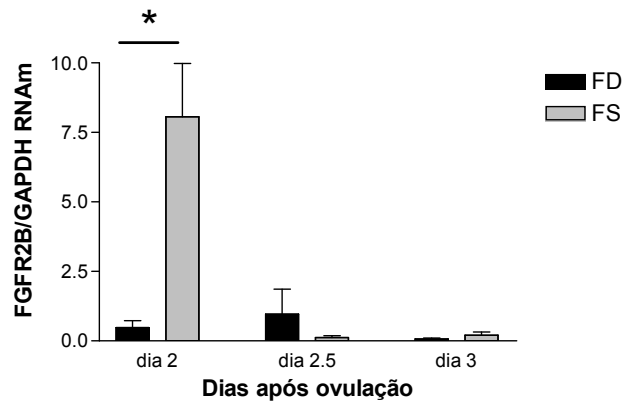


Figura 8. Valores relativos da expressão do mRNA do FGFR2B (média \pm EPM) nas CG de folículos dominantes (FD) e subordinados (FS) ao redor do desvio folicular em bovinos. * ($P < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós demonstramos pela primeira vez a expressão dos membros da subfamília de fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF7) e seus receptores em folículos antrais bovinos durante o desvio folicular na espécie bovina. Os maiores valores de expressão encontrados para o FGFR1B e FGFR2B antes do desvio folicular morfológico, e o início do envolvimento do FGF10 neste contexto reforçam a hipótese de participação deste sistema no controle da seleção folicular na espécie bovina.

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante ainda não estar completamente elucidado, sabe-se do envolvimento de diversos fatores nesse processo, entre eles, os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), que parecem desempenhar papel crítico neste processo. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (FORTUNE et al., 2004).

A redução das proteínas ligantes de IGF (IGBPs) tem sido associada a aumento da atividade proteolítica da proteína plasmática associada à prenhez A (PAPP-A, MONGET et al., 2003) e a expressão de seu mRNA, em bovinos, é mais abundante no folículo dominante em crescimento do que em folículo pequenos não selecionados (FAYAD et al., 2004, FORTUNE et al., 2004). Embora não se tenha encontrado diferenças nas concentrações de IGF-1 total de folículos dominantes em relação aos subordinados (DE LA SOTA et al., 1996), a concentração de IGF-I livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes da observação de diferenças no diâmetro e na concentração de estradiol (BEG et al., 2002). Essas observações, sugerem a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intra-folicular, diferencialmente regulado em folículos dominantes e subordinados, o que permitiria ao maior folículo, ter uma dominância bioquímica antes do estabelecimento da dominância morfológica (FORTUNE et al., 2004). No entanto, pouco ainda se sabe sobre a influência dos fatores de crescimento fibroblásticos nos mecanismos reguladores do processo de desvio folicular na espécie bovina. Anteriormente aos dados aqui demonstrados, somente o FGF18 já havia sido encontrado em maior abundância nas células da teca de folículos subordinados quando comparados aos folículos dominantes (PORTELA et al., 2010). No entanto, nesse estudo, os autores não demonstraram o perfil da expressão do FGF18 ao redor do desvio folicular.

Os menores valores relativos de mRNA do FGF10 em folículos dominantes em relação aos subordinados à partir do dia 2.5 após a ovulação sugerem a participação do FGF10 no desvio folicular na espécie bovina. Além disso, ainda que os níveis de mRNA do FGF10 não tenham sido estatisticamente diferentes entre folículos dominantes e

subordinados antes do desvio morfológico, o valor limítrofe de P (0,06) no dia 2 sugere que, embora não tenhamos detectado diferença estatística utilizando um número limitado de animais em função do alto custo deste experimento, a diferença pode ser relevante do ponto de vista biológico.

Para o FGF7, merecem destaque os menores níveis de mRNA nas células da teca de folículos dominantes comparados aos seus subordinados somente aos 2,5 dias após a ovulação, com posterior equivalência de valores entre essas classes foliculares no dia 3 após a ovulação. Esses dados sugerem que o FGF7 talvez não seja um fator preponderante para a seleção de um futuro folículo dominante antes do desvio morfológico ocorrer, porém não se pode descartar a possibilidade de ação sinérgica com outros FGFs, ou até mesmo com o FGF10, para geração de atividade anti-estrogênica nos folículos subordinados no dia 2,5 após a ovulação, uma vez dados anteriores demonstraram a capacidade deste FGF em inibir a esteroidogênese em células da granulosa bovinas cultivadas (PARROT & SKINNER, 1998a). Uma vez que a expressão do FGF10 parece diferir mais precocemente do que o FGF7 entre folículos dominantes e subordinados, pode se sugerir que o FGF10 tenha uma participação mais decisória no controle da seleção folicular.

Quanto a expressão e regulação do mRNA do FGFR1B e do FGFR2B ao redor do desvio folicular, destaca-se a maior expressão dos receptores FGFR2B (nas células da granulosa) e do FGFR1B (nas células da teca) no segundo dia após a ovulação no futuro folículo subordinado. Corroborando com os dados ao redor do desvio folicular, vale ressaltar a menor abundância de mRNA para FGF1B nas células da teca de folículos saudáveis quando comparados a folículos transitórios e a inibição da expressão do FGFR1B em células da granulosa bovinas cultivadas promovida pela

adição de IGF-1. Estudos anteriores demonstraram efeitos opostos do FSH e IGF sobre a expressão do FGFR2B e FGFR1B em células da granulosa cultivadas, enquanto o IGF-1 inibiu a expressão de ambos, o FSH apenas estimulou a expressão do FGFR2B (BURATINI et al., 2007). Sendo assim, o FSH parece sensibilizar os folículos recrutados às ações dos FGFs. Além disso, o folículo selecionado seria menos sensível à ação anti-esteroidogênica dos membros da subfamília do FGF7, uma vez que o aumento da disponibilidade de IGF neste folículo induziria diminuição na expressão dos FGFR. Essas observações apontam para uma aparente interação entre os sistemas IGF e FGF no controle da seleção folicular. Os maiores valores do mRNA do FGFR2B encontrados em folículos subordinados no dia 2 após a ovulação, com posterior queda nos dias subsequentes, podem estar em parte proporcionalmente relacionados os maiores níveis de FSH nesse mesmo período, com retomada dos valores basais em novilhas da raça Nelore (BURATINI et al., 2000). Assim, drástica diferença observada no dia 2 entre o folículo subordinado e o dominante quanto a expressão do FGFR2B, sugere que a atividade do sistema FGF7 ao redor do desvio seja regulada principalmente no nível dos receptores. Os dados apontam para maior sensibilidade do folículo subordinado tanto aos ligantes com expressão regulada ao redor do desvio (FGF7 e 10), quanto ao ligante de expressão estável (FGF22). Sendo assim a capacidade esteroidogênica do folículo subordinado parece ser inibida de forma mais intensa pela ação conjunta dos três membros da família FGF7 investigados neste estudo.

Assim, os dados obtidos sobre a expressão do FGF10 e de seus receptores ao redor do desvio, sustentam a hipótese de que a supressão deste sistema seja necessária no futuro folículo dominante antes do desvio morfológico, dados que se sustentam pela ação anti-estrogênica do FGF10 em células da granulosa bovina

cultivadas (BURATINI et al., 2007). Adicionalmente, pode-se sugerir que a ação anti-estrogênica do FGF10 no folículo antral seja majoritariamente proveniente do aumento na expressão de seus receptores, os quais aumentariam a sensibilidade ao efeito anti-esteroidogênico do FGF10 nos futuros folículos subordinados antes mesmo do desvio morfológico.

Já, embora o FGF22, não tenha apresentado diferença de expressão entre os folículos subordinados e dominantes em nenhum dos dias analisados ao redor do desvio folicular, não se deve descartar a participação deste FGF no controle da foliculogênese antral da espécie bovina. Desta forma, talvez o FGF22 não tenha uma ação desencadeadora para o início do desvio folicular, porém atue sinergicamente com outros FGFs na indução da atresia folicular na espécie bovina.

Em suma, nossos resultados indicam o envolvimento de membros da subfamília do FGF7 e mais contundentemente de seus receptores, tanto via modulação da produção do ligante nas células da teca, quanto via modulação da capacidade de resposta pelos seus receptores nos mecanismos reguladores da seleção folicular.

6. Conclusão

O presente trabalho demonstrou que a transcrição do sistema FGF7, principalmente do FGFR1B nas células da teca e do FGFR2B nas células da granulosa, encontra-se aumentada nos folículos subordinados antes do desvio morfológico, indicando seu envolvimento no controle da seleção folicular. A drástica e precoce diferença entre o

dominante e subordinado quanto à expressão do FGFR2B na granulosa sugere que a atividade do sistema FGF7 seja principalmente modulada por meio deste receptor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* v.94, p.177-188, 1992.

BAIRD, A.; HSUEH, A. J. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul. Pept.* V. 16, p.243–250, 1986.

BASILICO, C., MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* v.59, p. 115-65, 1992.

BEER HANS-DIETMAR, VINDEVOGHE LAURENCE, GAIT, MARY J., REVESTD JEAN- ROXANNEI MICHEL., MASON IVOR, DICKSON CLIVE, WERNER SABINE. Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 1-IIIb Is a Naturally Occurring Functional Receptor for FGFs That Is Preferentially Expressed in the Skin and the Brain. *The journal of biological chemistry.* V 275. p 16091-16097, 2000.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* v.66, p.120-126, 2002.

BELLEUDI, F.; CERIDONO, M.; CAPONE, A.; SERAFINO, A.; MARCHESE, C.; PICARDO, M.; FRATI, L.; AND TORRISI, M. The endocytic pathway followed by the keratinocyte growth factor receptor. *Histochemistry and Cell Biology*, v.118, p. 1–10, 2002.

BERISHA B, SINOWATZ F, SCHAMS D. Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 67, p. 162-171,2004.

BERISHA, B.; SHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol*, v.167, p.371-382, 2000.

BEYER TA, WERNER S, DICKSON C, GROSE R. 2003. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Experimental Cell Research*, 287: 228–236.

BURATINI JR., J.; GLAPINSKI, V.F.; GIOMETTI, I.C.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I. B.; AVELLAR, M.C.W.; BARROS, C.M.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and – 4, in fetal bovine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. v.70, p.255-61, 2005a.

BURATINI JR., 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. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*. 2005b.

BURATINI, J.JR.; PINTO, M.G.; CASTILHO, A.C.; AMORIN, 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. *Biol Reprod*. v.77, p.743-750, 2007.

CAO, M.; NICOLA, E.; PORTELA, V. M.; PRICE, C. A. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in nonluteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. *Matrix Biol*. v.25, p.342–354, 2006.

CASTILHO, A.C.; GIOMETTI, I.C.; BERISHA B.; SCHAMS, D.; PRICE, C.A.; AMORIN, R.L.; PAPA, P.C.; BURATINI, J.JR. Expression of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor-2B, in the corpus luteum. *Mol Reprod Dev*, 75:940-945, 2008.

CASTILHO, A.C.S. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10) em folículos pré-antrais e antrais iniciais durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. (Dissertação de mestrado, UNESP).

CONLEY, A.J.; BIRD, I.M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod*, v.56(4), p.789-799, 1997.

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

DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol. Reprod.* v.55, p.803-812, 1996.

ESWARAKUMAR, V.P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.16(2), p.139-149, 2005.

FAYAD, T.; LÉVESQUE, V.; SIROIS, J.; SILVERSIDES, D.W.; LUSSIER, J.G. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol. Reprod.* v.70, p.523-533, 2004.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS C. M.; PINHEIRO O. L. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*. v.47, p.1489-1505, 1997.

FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* v.6, p.127-39,1994.

FORTUNE, J.E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod*. V.35(2), p. 292-292, 1986.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* v.50, p.225-32, 1994.

FORTUNE, J.E., SIROIS, J., QUIRK, S.M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. v.29, p.95-109, 1988.

FORTUNE, J.E.; HILBERT, J.L. Estradiol secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycles: the development of responses to follicle-stimulating hormone *versus* luteinizing hormone. *Endocrinology*.1986; v.118, p. 2395–2401, 1986.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* v.65, p.648-654, 2001.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H. et al. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas nelore (*Bos Indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 33, p.210, 2008.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. of Reprod.* v. 55, p.1187-1194, 1996. GINTHER, O.J.; BEG, M.A.;

DONADEU, F.X. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*. v.78, p.239-257,2003.

GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.* 55, p.68-74,1996.

GOSPODAROWICZ, D.; BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology*, v.104, p.757–764, 1979.

GRIMES, R.W.; IRELAND, J.J. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro.. *Biol Reprod*, v.35, p. 725-732, 1986.

IGARASHI, M., FINCH, P. W., AARONSON, S. A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 13230-13235, 1998.

IGARASHI, M., FINCH, P. W., AARONSON, S. A., Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 13230-13235, 1998.

IRELAND, J.; GOOD, T.; KNIGHT, P.; IRELAND, J. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod*, v.50, p.1265–1276, 1994.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trend in Genetics*. V. 20, 2004.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental dynamics*. V. 237, p. 18-27, 2008.

KATOH, M.; KATOH, M. Comparative genomics on FGF8, FGF17, and FGF18 orthologs. *Int J Mol Med.*, v. 16(3), p. 493-496, 2005.

KIEFER, P. & DICKSON, C. Nucleolar association of fibroblast growth factor 3 via specific sequence motifs has inhibitory effects on cell growth. *Mol and Cell Biology*, v.15, p. 4364–4374, 1995.

KOOS, R. D.; OLSON, C. E. Expression of basic fibroblast growth factor in the rat ovary: detection of mRNA using reverse transcription– polymerase chain reaction amplification. *Mol. Endocrinol.* v.3, p.2041–2048, 1989.

LAVRANOS, T.C.; RODGERS, H.F.; BERTONCELLO, I.; RODGERS, R.J. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp. Cell Res*, v.211, p.245-251, 1994.

LU, W., LUO, Y., KAN, M., MCKEEHAN, W. L. Fibroblast growth factor-10: A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 10222-10230, 1999.

MACHADO, M. F.; PORTELA, V. M.; PRICE, C. A.; DA COSTA, I. B.; RIPAMONTE, P.; AMORIM, R. L.; BURATINI, J., JR. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J. Endocrinol.* v. 202, p. 347–353, 2009.

MCNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; QUIKER, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertile. Suppl.* v. 54, p. 3-16, 1999.

MIN, H., DANILENKO, D.M., SCULLY, S.A., BOLON, B., RING, B.D., TARPLEY, J.E., DEROSE, M., SIMONETT, W.S. FGF-10 is required for both limb and lung

development and exhibits striking functional similarities to *Drosophila* branches. *Genes Dev.*, v. 12, p. 3156-3161, 1998.

MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M.C.; MANIERE, S.; ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol. Reprod.* v.68, p.77-86, 2003.

MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLÉMENT, F.; BOSCH, M.; PISSELET, C.; MONGET, P.; MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*51, p.3-23, 1997a.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology.* v.47, p.3-12, 1997b.

MOTTA P.M.; NOTTOLA S.A.; MAKABE, S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European J.Obs.Gynaecol. Reprod.* v. 75, p. 5-10, 1997.

NAKATAKE, Y.; HOSHIKAWA, M.; ASAKI, T.; KASSAI, Y.; ITOH, N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517:460-463, 2001.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* v. 8, p. 17-20, 2001.

OHUCHI, H., HORI, Y., YAMASAKI, M., HARADA, H., SEKINE, K., KATO, S., ITOH, N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, v. 277, p. 643-649, 2000.

OLSNES, S.; KLINGENBERG, O., WIEDLOCHA, A. Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. *Physiological Reviews* 83 163–182, 2003.

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

ORNITZ, D.M.; ITOH, N.. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2(3). 2001.

PARROTT JA, SKINNER MK.. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Biol Reprod*, v. 139,p. 228-235, 1998a.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor and kit-ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology*, v.139, p.2240-2245, 1998b.

PARROTT, J.A.; VIGNE, J.L.; CHU, B.Z; SKINNER, M.K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology*, 135:569-575,1994.

PETER, K.G., CHEN, W.G., WILLIAMS, L.T. Two FGF receptors are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis. *Development*, v. 114, p. 233-243, 1992.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. p.29-45, 2001.

PORTELA, V. M.; MACHADO, M.; BURATINI, J. JR; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R. L.; GONCALVES, P.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol. Reprod.*v. 83, p.339–346, 2010.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. v. 339, p.62–66, 2003.

RHODES, F.M.; DEATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science*. v.38, p.265-277,1995.

SEKINE, K.; OHUCHI, H.; FUJIWARA, M.; YAMASAKI, M.; YOSHIZAWA, T.; SATO, T.; YAGISHITA, N.; MATSUI, D.; KOGA, Y.; ITOH, N.; KATO, S. FGF-10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Gen.*, v. 21, p. 138-141, 1999.

SHENG, Z.; LEWIS, J.A.; CHIRICO, W.J. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J Biol Chem*, 279: 40153–40160, 2004.

SILVA, J.M; PRICE, C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*. v.62, p.186–191,2000.

SISCO, B.; HAGEMANN, L.J.; SHELLING, A. N.; PFEFFER, P.L. Isolation of Genes Differentially Expressed in Dominant and Subordinate Bovine Follicles. *Endocrinology*. V. 144(9), P.3904–3913, 2003.

STIRLING, D.; WATERMAN, M. R.; SIMPSON, E. R. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* v.91, p.1–8, 1991.

TAYLOR, K.M., CHEN, C., GRAY, C.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Expression of messenger ribonucleic acids for fibroblast growth factors 7 and 10, and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1236-46, 2001.

TRUEB, B.; TAESCHLER, S. Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. *Int J Mol Med.* 2006 Apr;17(4):617-20.
[Mol Endocrinol.](#) v.3(12), p. 2041-2048, 2006

TRUEB, B.; ZHUANG, L.; TAESCHLER, S.; WIEDEMANN, M. Characterization of FGFR1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues. *J Biol Chem.* V.278(36), p.33857-33865, 2003.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology.*v.47, p.73-82, 1997

VAN WEZEL, I.L., UMAPATHYSIVAM, K., TILLEY, W.D., RODGERS, R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.115, p.133-40, 1995.

VERNON, R.K.; SPICER, L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci*, v.72, p.2696-2702, 1994.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol. Reprod.* v. 55, p. 942-948, 1996.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*. v.61, suppl., p.71-90, 2003.

WESCHE, J. MALECKI, J.; WIEDLOCHA, A.; SKJERPEN, C.S.; CLAUS, P.; OLSNES, S. G. FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*. V. 281, p.11405–11412, 2006.

[WIEDEMANN, M.](#); [TRUEB, B.](#) Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. [Genomics](#). v. 69(2), p.275-279, 2000.

WIEDEMANN, M.; TRUEB, B. The mouse *Fgfr1* gene coding for a novel FGF receptor-like protein. *Biochim Biophys Acta*.v.1520(3), p.247-250, 2001.

WIEDEMANN, M.; TRUEB, B. The mouse *Fgfr1* gene coding for a novel FGF receptor-like protein. *Biochim Biophys Acta*.v.1520(3), p.247-250, 2001.

YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Opposite effects of basic fibroblast growth factor on gonadotrophin-stimulated steroidogenesis in rat granulosa cells. *Endocr. J.* v. 40, p.691–697, 1993.

ZHAN, X.; HU, X.; FRIEDMAN, S.; MACIAG, T. Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.188, p.982–991,1992.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O.A.; OLSEN, S.K.; UMEMORI, H.; MOHAMMAD, I.M, ORNITZ, D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Bio Chem*, 281: 15694–15700, 2006.