

ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

**EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10
(FGF-10) EM FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS E ANTRAIS JOVENS
DURANTE O DESENVOLVIMENTO OVARIANO EM FETOS
BOVINOS**

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior

BOTUCATU – SP
2008

ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 10 (FGF-10) EM FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS E ANTRAIS JOVENS DURANTE O DESENVOLVIMENTO OVARIANO EM FETOS BOVINOS

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

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Jr.

**BOTUCATU – SP
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Castilho, Anthony César de Souza.

Expressão do fator de crescimento fibroblástico10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos / Anthony César de Souza Castilho. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: José Buratini Júnior

Assunto CAPES: 505051046

1. Bovino - Desenvolvimento - Genética 2. Bovino - Reprodução - Aspectos farmacológicos

CDD 636.20824

Palavras-chave: Fator de crescimento; FGF-10 e bovinos; Folículo-gênese; Folículos pré-antrais,

“O decorrer da vida é como andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio, é preciso se manter em movimento.”

Albert Einstein

Ao meu avô **José** (*in memoriam*), pela torcida
de algum lugar do universo.

“... aprendi a entender que vocês são duas das poucas pessoas que são capazes de me tornar muito feliz! Parei de falar com a mente vazia e comecei a falar palavras guardadas dentro do meu coração que por bastante tempo ficaram caladas. Hoje tenho vocês e meu maior bem: amor de pai e mãe.”

Autor desconhecido

Aos meus queridos pais, **Júlio e Cássia**,
Pelo sacrifício, amor, dedicação e acima de tudo pela grande torcida nesses importantes anos da minha vida.
Lágrimas existiram pela saudade ou até mesmo de alegria, porém nos fizeram ser a cada dia mais: **PAI ,
MÃE E FILHO.**

Amo vocês incondicionalmente.

“...Se eu sei que no final fica tudo bem,
A gente se ajeita
numa cama pequena,
Te faço um poema, te cubro de amor...”

Saulo Fernandes

À minha **namorada** e grande amiga, Jamile.
Desculpas pela ausência, mas grato pela
confiança e amor dedicados nessa
importante fase da nossa vida.
Saiba que todas as conquistas também
foram para você.

Mil beijos!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me ajudar sempre que precisei. Que assim seja.

Ao meu **Mentor**, e grande amigo, pela calma e serenidade dadas quando necessário.

Ao **Prof. Dr. José Buratini Jr. (Orientador)**, pela oportunidade de me integrar a sua equipe de laboratório e pelas imensas ajudas durante esses anos. Obrigado!

À minha avó, **Maria Inês**, por ser minha segunda mãe, pelo amor, carinho e torcida sempre presentes em minha vida. Te amo, Vó.

Às minhas irmãs, **Lais e Letícia**, por fazerem meus fins de semana muito mais feliz. Amo vocês garotas!

Aos meus sogros e torcedores natos, **Dílson e Eloiza** pela forma com que me tratam, pela confiança e acima de tudo por me ajudarem MUITO nesses anos.

Aos meus **avós, tios, tias, primos (em especial meu afilhado José Carlos) e primas**, pelo carinho, torcida e atenção sempre presente.

À **Paula Ripamonte**, pelo convívio, ensinamentos, pelas dicas e aprendizagens mil que tive nesse período.

À minha amiga, **Isabela**, pela amizade, pelas alegrias, risadas e caronas.

À minha outra amiga, **Mariana**, pelo alegre convívio nesses anos, pela vizinhança, pela amizade e diversão que fizeram o tempo voar!!

Ao amigo de “Lab” e de moradia agora, **Diego**, pela alegria de saber levar a vida e pela grande amizade.

Aos meus **amigos da pós-graduação da Farmacologia**, pelo alegres momentos de confraternizações.

Aos **amigos da pós-graduação da FMVZ-Botucatu**, pelas boas risadas que dei nesses dois anos.

Aos meus sempre amigos, **Lílian, Roberto, Luciana, Jaime, e Roberta**, pela grande amizade, pelos raros, mas bons fins de semanas em Bauru. Valeu galera!

Aos **professores e funcionários do Departamento de Fisiologia**. Um agradecimento especial para a secretária **Luciana**, pela atenção e disposição em sempre me ajudar.

Aos **professores e funcionários do Departamento de Farmacologia** pelas aulas ministradas, pelo aprendizado nesses dois anos e alegre convívio. Um agradecimento especial para a secretária e também amiga **Cris**, pela atenção e disposição em sempre me ajudar, e pelas confraternizações bem organizadas.

À **Profa. Dra. Maria Dalva Cesário**, pela importante ajuda durante as análises histológicas e pelas dicas valiosas dadas.

À **Profa. Dra. Reneé Laufer Amorin e seu aluno de mestrado Pedro**, pela importante ajuda durante as imunohistoquímicas pelas dicas valiosas dadas.

Aos **funcionários da seção de pós-graduação, Lu, Maria Helena e Sérgio**, pela ajuda e colaboração durante todo o meu mestrado.

Ao **Prof. Christopher A. Price**, do Centro de Pesquisas em Reprodução animal, da Faculdade de Medicina Veterinária, (Universidade de Montreal, Canadá) pela grande e constante ajuda no desenvolvimento desse trabalho. E pelas caipirinhas também !!!

Ao **Prof. Ciro Moraes Barros**, do Departamento de Farmacologia (Unesp-Botucatu), por permitir o nosso acesso no seu laboratório e empréstimos de equipamentos.

Ao **Frigorífico Frigol** (Lençóis Paulista - SP), pela receptividade, permitindo a coleta dos ovários para realização do projeto.

A **FAPESP** (Fundação de amparo à pesquisa no Estado de São Paulo), pela concessão da bolsa durante a realização do meu mestrado.

A **todos** aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse o título de **mestre**, e sei que são muitos, os meus eternos e sinceros agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Desenvolvimento do ovário fetal e dos folículos pré-antrais	3
2.2. Controle do desenvolvimento folicular pré-antral	5
2.3. O papel dos fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)	6
2.4. Subfamília do FGF-7	10
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Obtenção de ovários fetais	15
4.2. Extração de RNA e Transcrição reversa	16
4.3. Expressão gênica de FGF-10 por PCR em tempo real	18
4.4. Preparações histológicas e Imunohistoquímica	22
4.5. População folicular em ovários fetais ao longo da gestação	23
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	
5.1. Análise Histológica	25
5.2. População folicular em ovários fetais ao longo da gestação	33
5.3. Expressão gênica de FGF-10	34
5.4. Imunohistoquímica	35
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR-1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de Eswarakumar et al., 2005. **(Página 7)**

Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs. Adaptado de Eswarakumar et al., 2005. **(Página 8)**

Figura 3. A) Fêmea bovina obtida em abatedouro com aproximadamente 90 dias de gestação. **B)** Aspecto anatômico do sistema reprodutivo feminino: útero (seta delgada) e ovário direito (seta larga). **(Página 16)**

Figura 4. Curvas de amplificação e de dissociação para CYC-A em ovários fetais bovinos aos 60, 75, 90, 120, 150, 210 dias de gestação. **(Página 19)**

Figura 5. Curvas de amplificação e de dissociação para FGF-10 em ovários fetais bovinos aos 60, 75, 90, 120, 150, 210 dias de gestação. **(Página 20)**

Figura 6. Exemplo de curva de amplificação para a determinação da eficiência por amostra utilizando o software “LinRegPCR”. **(Página 21)**

Figura 7 - 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.

(Página 22)

Figura 8. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 60 dias de gestação. Presença de cordões ovígeros (círculo), oogônias (seta delgada) e células da pré-granulosa (seta curta).

(Página 26)

Figura 9. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 75 dias de gestação. Presença de folículos primordiais (seta) em pequeno número na região cortical. **(Página 27)**

Figura 10. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 90 dias de gestação. Presença de folículos primários (seta). **(Página 28)**

Figura 11. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 120 dias de gestação. Destaca-se a majoritária presença de folículos primários (seta). **(Página 29)**

Figura 12. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 150 dias de gestação. Destaca-se o aparecimento de folículos secundários, com a presença das células da teca (CT), granulosa (CG) e oócito (*). **(Página 30)**

Figura 13. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 210 dias de gestação. Presença de folículo antral jovem bem caracterizado pelas células da teca (CT), células da granulosa (CG) e oócito (asterisco). **(Página 31)**

Figura 14. Análise histológica do feto aos 210 dias mostrando a presença de tecido luteal (TL). Estroma (E). **(Página 32)**

Figura 15. Número de folículos contados em 36 campos fotomicrografados de 3 ovários (12 campos por ovário) fetais para cada idade gestacional avaliada (^{A,B} valores diferentes para uma mesma categoria entre as idades; ^{a,b} valores diferentes entre as categorias na mesma idade; P< 0,05). **(Página 34)**

Figura 16. Expressão gênica de FGF-10 quantificada por PCR em tempo real em ovários fetais bovinos ao longo do período gestacional. **(Página 35)**

Figura 17. Imunolocalização do FGF-10 em folículos pré-antrais de ovário fetal aos 210 dias de gestação. **(Página 36)**

Figura 18. Controle negativo (pré-incubação de proteína recombinante FGF-10 com anticorpo primário) para imunolocalização do FGF-10. **(Página 37)**

Figura 19. Imunolocalização do FGF-10 nas oogônias (seta) em ovários fetais bovinos aos 60 dias de gestação. **(Página 38)**

Figura 20. Imunolocalização do FGF-10 nas células da granulosa (CG), células da teca (CT) e oócito (asterisco) de folículo antral jovem bovino. **(Página 39)**

Figura 21. Imunolocalização (A) e controle negativo (B) do FGF-10 em tecido luteal de feto bovino aos 210 dias. **(Página 40)**

Figura 22. Imunolocalização (A) e controle negativo (B) do FGF-10 em vasos sanguíneos. **(Página 41)**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre idade gestacional e medida de *crowm-rump*. **(Página 16)**

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para ciclofilina A e FGF-10. **(S:** oligonucleotídeo iniciador “sense” **A:** oligonucleotídeo iniciador “antisense”); pb (pares de base). **(Página 18)**

Tabela 3. Número de folículos contados em 36 campos fotomicrografados de 3 ovários (12 campos por ovário) fetais para cada idade gestacional avaliada. Porcentagens das diferentes categorias foliculares em relação ao número total de folículos para cada idade gestacional mostradas entre parênteses (^{A,B} valores diferentes entre linhas; ^{a,b} valores diferentes entre colunas; P< 0,05). **(Página 33)**

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
A	“antisense”
ANOVA	análise de variância
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
BMP-15	proteína morfogenética óssea 15
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CG	células da granulosa
CGP	células germinativas primordiais
CT	células da teca
ct	ciclo “threshold”
CYC-A	ciclofilina A
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
EGF	fator de crescimento epidermal
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGF-2	fator de crescimento fibroblástico 2
FGF-4	fator de crescimento fibroblástico 4
FGF-7	fator de crescimento fibroblástico 7

FGF-8	fator de crescimento fibroblástico 8
FGF-9	fator de crescimento fibroblástico 9
FGF-10	fator de crescimento fibroblástico 10
FGFR-1b	receptor 1b para o fator de crescimento fibroblástico
FGFR-2b	receptor 2b para o fator de crescimento fibroblástico
FGFR-3c	receptor 3c para o fator de crescimento fibroblástico
FGFR-4	receptor 4 para o fator de crescimento fibroblástico
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHR	receptor para o hormônio folículo estimulante
hFGF	fator de crescimento fibroblástico homólogo
iFGF	fator de crescimento fibroblástico intracelular
KDa	quilodalton
GDF-9	fator de crescimento e diferenciação 9
KGF-I	fator de crescimento de queratinócitos 1
KGF-II	fator de crescimento de queratinócitos 2
KL	“Kit-ligand”
LH	hormônio luteinizante
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
MOIFOPA	manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
ng	nanograma
pb	pares de bases

PCR	reação em cadeia pela polimerase
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA_{se}	enzima que degrada o ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
RT-PCR	reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
S	“sense”
SCF	fator de células troncos
TGF	fator de crescimento transformante
TZP	projeções transzonais

CASTILHO, A.C.S. **Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos.** Botucatu, 2008. Dissertação (Mestrado - Ciências Biológicas - Farmacologia) - Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

O desenvolvimento folicular pré-antral é controlado predominantemente por peptídeos intraovarianos, incluindo os FGFs. O FGF-10 participa de interações parácrinas entre células mesenquimais e epiteliais, regulando a proliferação e diferenciação celular e também tem sido detectado em folículos pré-antrais. No entanto, a expressão do FGF-10 durante o desenvolvimento ovariano fetal e a possível associação com a dinâmica folicular ainda não haviam sido investigados. O objetivo do presente estudo foi investigar o padrão da expressão do FGF-10 durante o desenvolvimento ovariano fetal ao longo da gestação. Trinta fetos bovinos (predominantemente *Bos indicus*) foram obtidos em matadouro e divididos em seis grupos (n=5) de acordo com a idade gestacional, estimada pelo comprimento entre o topo da cabeça e o início da cauda (grupos: 60, 75, 90, 120, 150 e 210 dias de gestação). Um ovário de cada feto foi destinado à análise histológica da população folicular e imunohistoquímica e o outro submetido à extração de RNA total. A expressão gênica do FGF-10 foi investigada por RT-PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos iniciadores bovino-específico. Os valores da expressão foram calculados usando ciclofilina A como controle interno. A imunohistoquímica foi realizada utilizando anticorpo policlonal anti-FGF-10 humano produzido em coelho. A análise histológica revelou presença somente de cordões ovígeros aos 60 dias, aparecimento de folículos primordiais aos 75 dias, presença de folículos primários aos 90 dias, e aumento da população de folículos primários aos 120 dias. Além disso, aparecimento de folículos secundários aos 150 e de folículos antrais

jovens aos 210 dias de gestação. A expressão gênica do FGF-10 foi maior aos 210 dias quando comparados com aos 60, 75 e 90. A proteína FGF-10 foi detectada em células germinativas primordiais, oócitos e células da granulosa de todos os tipos foliculares presente; bem como em células da teca de folículos secundários e antrais jovens. O aumento da expressão gênica do FGF-10 foi temporalmente associado ao aparecimento de folículos antrais jovens exibindo uma camada da teca mais desenvolvida aos 210 dias de gestação. Em conclusão, a expressão de FGF-10 está presente ao longo do desenvolvimento ovariano fetal em todas as classes foliculares e aumentada no fim da gestação, sugerindo sua participação no controle da foliculogênese em pré-antral e, particularmente, da foliculogênese antral em bovinos.

Palavras chaves: FGF-10, ovário fetal, folículos, expressão gênica, bovinos.

CASTILHO, A.C.S. **Expression of fibroblastic growth factor 10 (FGF-10) in preantral and early antral follicles during ovarian development in bovine fetuses.** Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas -Farmacologia) Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Preantral follicular development is controlled predominantly by intraovarian peptides including FGFs. FGF-10 participates in paracrine interactions between epithelial and mesenchymal cells, regulating cellular differentiation and proliferation, and has already been detected in preantral follicles. The expression of FGF-10 during fetal ovary development and the possible association with formation of preantral follicles in the fetal ovary has not been investigated. The objective of this study was to investigate the expression pattern of FGF-10 during fetal ovarian development along gestation. Thirty bovine fetuses (predominantly *Bos indicus*) were obtained at a local abattoir, and divided into six groups (n=5) according to the crown-rump length as an estimative of age (groups: 60, 75, 90, 120, 150 e 210 days of gestation). One ovary of each fetus was submitted to histological analysis of the follicle population and immunohistochemistry, and the other was reserved for total RNA extraction. FGF-10 mRNA expression was investigated by Real time PCR using bovine specific primers. Expression values were calculated using Cyclophilin A as the internal control. Immunohistochemistry was performed using a rabbit polyclonal anti-human FGF-10 antibody. The histological analysis revealed the presence of only ovigerous cords at 60 days, disappearance of ovigerous cords and appearance of primordial follicles at 75 days, appearance of primary follicles at 90 days, an increased in primary follicles number at 120 days, appearance of secondary follicles at 150 days, and appearance of early antral follicles at 210 days. FGF-10 mRNA expression was detected in fetal ovaries throughout gestation

and was greater at 210 days in comparison with 60, 75 and 90 days of gestation. FGF-10 protein was detected in germ cells, oocytes and granulosa cells of all follicle classes, and in theca cells of secondary and early antral follicles. The increase in FGF-10 gene expression was temporally associated with the appearance of early antral follicles exhibiting a more developed theca layer at 210 days of gestation. In conclusion, FGF-10 expression is present along fetal ovary development in all follicle classes and increases towards the end of gestation, suggesting its participation in the control of preantral and, particularly, early antral folliculogenesis in cattle.

Key-words: FGF-10, fetal ovary, follicles, gene expression, cattle.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento da fisiologia ovariana em espécies de interesse econômico ou ameaçadas de extinção é de grande interesse para um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo dessas espécies, além de seu valor como conhecimento básico. Neste contexto, uma maior compreensão dos fatores que controlam a atividade ovariana é necessária para o progresso das biotécnicas da reprodução que otimizam a utilização de material genético feminino, entre elas, a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

Embora a maioria dos estudos sobre o desenvolvimento folicular foque o estágio antral, um melhor entendimento da fisiologia pré-antral é necessário para a compreensão do processo em sua totalidade, uma vez que eventos pré-antrais podem determinar o desempenho dos folículos no estágio antral. Sabe-se que as gonadotrofinas desempenham um papel essencial na regulação do desenvolvimento folicular antral, bem como nos estágios finais do desenvolvimento pré-antral, o que motivou numerosas pesquisas nessa área. Porém, peptídeos intra-ovarianos têm função preponderante no controle dos folículos pré-antrais, tema menos explorado e conhecido, sobretudo em bovinos.

Dentre os vários fatores de crescimento envolvidos no controle do desenvolvimento pré-antral incluem-se os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs). Vários membros desta família (FGF-2, FGF-8, FGF-7 e FGF-10) mostraram-se expressos em folículos pré-antrais bovinos.

O fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) está envolvido em uma série de interações celulares no pulmão, próstata e epitélio glandular endometrial em diferentes

espécies. No ovário bovino, a sua expressão foi detectada em células da teca e oócitos de folículos antrais, onde ele parece regular a diferenciação esteroidogênica das células da granulosa. No entanto, embora se saiba da expressão de FGF-10 em folículos pré-antrais bovinos, é desconhecida a participação do mesmo nos mecanismos que regulam o desenvolvimento do ovário fetal e o aparecimento das distintas populações foliculares pré-antrais durante a gestação. Deste modo, a análise do padrão de expressão do FGF-10 ao longo do desenvolvimento ovariano fetal, utilizando-se como referência a dinâmica folicular pré-antral, pode contribuir para esclarecer a participação do mesmo na regulação da foliculogênese ovariana fetal na espécie bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento do ovário fetal e dos folículos pré-antrais

Na ausência de genes que determinem a formação dos testículos, o primórdio gonadal se desenvolve em ovário (PARROT & SKINNER, 1999) pelo estabelecimento da linhagem germinativa no ovário fetal. Tal processo ocorre pela migração das células germinativas primordiais (CGPs) até a crista genital, através do endoderma intestinal e mesentério dorsal. Essas células são oriundas do mesoderma extraembrionário (saco vitelíneo), tem formato grande e apresentam poucas organelas citoplasmáticas, além de um número variável de partículas de glicogênio e lipídeos (MOTTTA et al., 1997), que são utilizadas como fonte de energia durante o processo migratório. Vale ressaltar, que esse processo é dividido em duas fases: na primeira destaca-se a transferência passiva para a crista genital devido ao crescimento do embrião, seguida de auto-propulsão independente de movimentos morfogênicos, estimulada e direcionada por substâncias quiomiotáxicas produzidas localmente (GOSDEN, 1995). Uma característica marcante da fase de migração é a multiplicação das CGPs, que passam por de 6 a 8 divisões mitóticas durante esse processo (ERICKSON, 2001). A estruturação e estabelecimento folicular pré-antral também incluem intensa colonização do ovário fetal por células mesonéfricas, que se acredita serem as precursoras das células foliculares somáticas (células da pré-granulosa; PICTON, 2000).

A formação dos folículos acontece quando os oócitos primários tornam-se envoltos por uma única camada de células achatadas, denominadas de células da pré-granulosa, constituindo o folículo primordial (WANDJI et al., 1996). Esse processo envolve mudanças qualitativas e quantitativas, incluindo alterações no metabolismo e

estrutura folicular, caracterizando-se pelo aumento de organelas citoplasmáticas e interrupção da meiose oocitária em dictióteno da prófase I (oócito quiescente; GOSDEN & BOWNES, 1995).

Após sua formação, na dependência de estímulos ainda não completamente elucidados, os folículos primordiais deixam o pool dos folículos em repouso, iniciando o crescimento oocitário, enquanto as células da granulosa tornam-se cubóides e começam a se multiplicar, constituindo assim, a transição do folículo primordial para o primário (WANDJI et al., 1996).

O aparecimento das células da granulosa cuboidais não é um evento randômico. Em bovinos, isto se dá quando existem pelo menos sete células visíveis em corte-transversal, tornando-se cada vez menor a porcentagem de células achatadas presentes nos folículos (BRAW-TAL, 2002). Posteriormente, o aparecimento de folículos secundários inicia-se com o desenvolvimento da segunda camada de células da granulosa, progredindo com a adição de outras (FORTUNE & EPPIG, 1979).

Vale destacar que o aparecimento dos estágios pré-antrais no ovário tem padrão temporal espécie-específico. Nos bovinos, todos os estágios pré-antrais manifestam-se no ovário fetal durante a gestação (ERICKSON, 1986). Os dados sobre o momento específico de aparecimento de cada categoria pré-antral são divergentes. RUSSE (1983) relatou o aparecimento de folículos primordiais, primários e secundários com aproximadamente 90, 140 e 210 dias de gestação, respectivamente, no feto bovino. Já TANAKA et al. (2001) observaram o aparecimento dos mesmos estágios de desenvolvimento com aproximadamente 74, 91, 120 dias de gestação, respectivamente, além de aumento no número dos folículos secundários até os 150 dias de gestação.

2.2. Controle do desenvolvimento folicular pré-antral

O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento folicular pré-antral é controverso. Receptores de FSH (FSHR) foram detectados em folículos primários bovinos (WANDJI et al., 1992) e a estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral foi alcançada pela adição de FSH ao meio de cultura. Entretanto, considera-se que o FSH desempenha um papel secundário neste estágio de desenvolvimento (GUTIERREZ et al., 2000; MCNATTY et al., 1999; WEBB et al, 2003). Alternativamente, o início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores produzidos localmente (MCNATTY et al., 1999).

O oócito tem papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (GILCHRIST et al., 2004). Comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo *gap* permitem transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (ALBERTINI et al., 2001). Interessantemente, este tipo de comunicação entre o oócito e células somáticas parece ser regulada durante o desenvolvimento, uma vez que as TZPs retraem quando o folículo atinge o estágio antral, o que se acredita ser, pelo menos em parte, um efeito da ação do FSH (ALBERTINI et al., 2001).

A comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre por sinalização parácrina. Dentre vários fatores de crescimento produzidos pelo oócito ou células da granulosa, o fator de células tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante) e membros da família dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β),

particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9B) têm recebido a maior parte da atenção recentemente (WEBB et al., 2003). Contudo, vários outros fatores de crescimento estão envolvidos na sinalização parácrina/endócrina pré-antral incluindo ativina e folistatina (SILVA et al., 2006), inibina, EGFs (fatores de crescimento epidermal), VEGF (fator de crescimento endotélio vascular; YANG & FORTUNE, 2007) e fatores de crescimento fibroblástico (FGFs; MCNATTY et al., 1999).

2.3. O papel dos fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

Os FGFs 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). Esses peptídeos apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos ou patológicos, como o desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização e oncogênese (BASILICO et al., 1992).

Análises filogenéticas em ratos demonstram que essa família de peptídeos encontra-se dividida em sete subfamílias: FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, iFGF e hFGF, (ITOH & ORNITZ, 2008). Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGFs 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 quatro 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 (Ig-like); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. São nos domínios D3 que “splicing” alternativos nos FGFR-1, 2 e 3 geram isoformas funcionais dos tipos b e c (FGFRIIIb e FGFRIIIc; Figura 1; revisado por Eswarakumar et al., 2005).

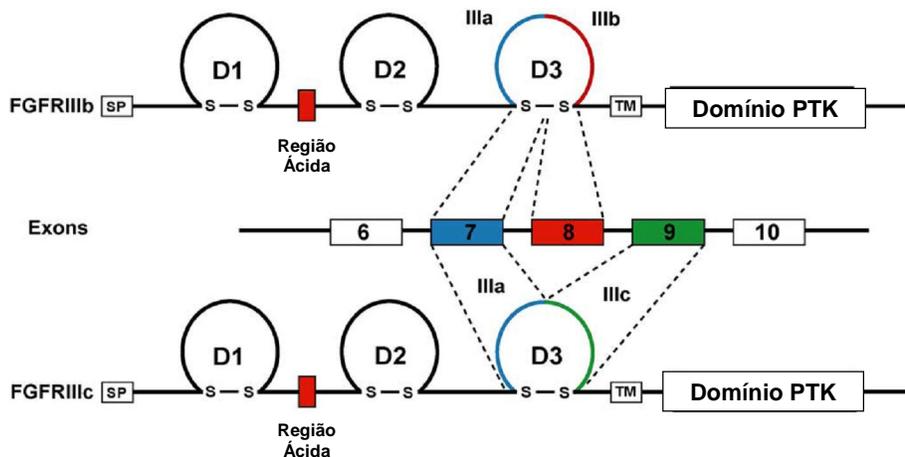


Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR-1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de Eswarakumar et al., 2005.

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).

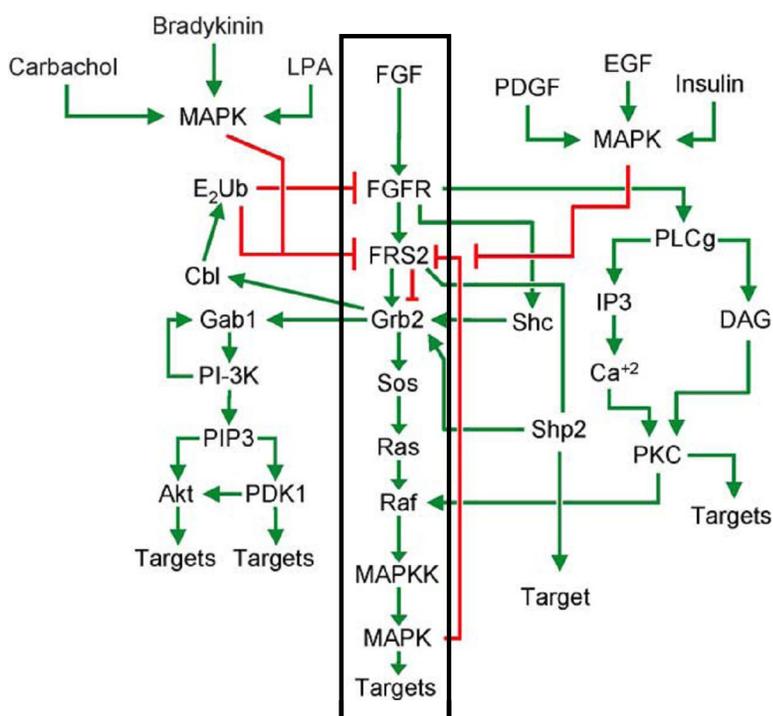


Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs.

Adaptado de Eswarakumar et al., 2005.

A foliculogênese está incluída dentre os processos fisiológicos nos quais participam os FGFs, sendo o FGF-2, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o membro da família melhor estudado nesse contexto. No ovário bovino, o FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da granulosa (CG) e da teca (CT) de folículos pré-antrais em crescimento e antrais (VAN WEZEL et al., 1995). Estudos de ligação revelaram que os receptores para FGF-2 estão principalmente localizados na camada de células da granulosa (WANDJI et al., 1992). Demonstrou-se que o FGF-2 é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais em culturas de fragmentos de ovários de ratas e de promover proliferação de células da granulosa (NILSSON et al., 2001; GOSPODAROWICZ et al., 1989). Entretanto, o FGF-2 não teve efeito sobre a ativação espontânea de folículos primordiais, que é comumente observada em cultura de explantes ovarianos bovinos (DERRAR et al., 2000).

Outro membro desta família de peptídeos potencialmente interessante para foliculogênese pré-antral é o FGF-8, primeiramente descrito como um fator sinalizador crucial para o desenvolvimento embrionário e oncogênese (CROSSLEY & MARTIN, 1995; TANAKA et al., 1992). Dos cinco genes codificadores de receptores para FGF (FGFR; (KIM et al., 2001; SLEEMAN et al., 2001), o FGF-8 ativa preferencialmente o FGFR-4 e o subtipo 'c' do FGFR-3 (ORNITZ et al., 1996). No ovário de camundongas, a expressão gênica do FGF-8 mostrou-se restrita ao oócito (VALVE et al., 1997), sugerindo sua participação na sinalização às células foliculares a partir do oócito. Contudo, os RNAm que codificam o FGFR-4 ou -3c não foram consistentemente detectados no ovário de roedores (ASAKAI et al., 1994; PUSCHECK et al., 1997).

Recentemente, em bovinos, a expressão gênica do FGF-8, FGFR-3c e -4 foi detectada em “pools” de folículos primordiais, primários e secundários obtidos a partir de ovários fetais (BURATINI et al., 2005). Os sinais de expressão do FGF-8 e FGFR-3c mostraram-se simultâneos e foram mais freqüentes em folículos secundários do que primordiais. Desta forma, o padrão de expressão gênica observado sugere que a expressão do FGF-8 e de seus receptores é regulada ao longo do desenvolvimento e que o FGFR-3c é o receptor predominante para o FGF-8 em folículos pré-antrais bovinos (BURATINI et al., 2005).

Dados disponíveis na literatura também indicam participação do FGF-7 e FGF-10 no controle da foliculogênese pré-antral em bovinos (BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2007).

2.4. Subfamília do FGF-7

Há discordâncias sobre quais membros constituem essa família. Porém, segundo ITOH & ORNITZ (2008), a mesma 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). Esses fatores estão envolvidos em uma série de processos e interações celulares epitélio-mesenquimais, como, proliferação de queratinócitos, morfogênese endometrial e pulmonar e reparo tecidual (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999; TAYLOR et al., 2001; BEER et al., 2000).

O FGF-7 é uma proteína de 28 KDa, majoritariamente expressa por células derivadas do mesênquima, a fim de regular a atividade de células epiteliais adjacentes.

Devido ao seu potente efeito mitogênico em queratinócitos de camundongos, é também conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos I ou KGF-I (WARE & MATTHAY, 2002). A expressão do FGF-7 foi detectada em vários tecidos como pele, folículos capilares, pulmão, próstata, glândula mamária, útero e ovário, onde se sustenta que ele promova diferenciação e proliferação de células epiteliais (RUBIN et al., 1995).

A expressão do RNAm do FGF-7 foi detectada em todas as categorias foliculares pré-antrais em bovinos (BURATINI et al., 2007). O tratamento com FGF-7 inibiu a fragmentação apoptótica do DNA e aumentou o diâmetro e a expressão da inibina-a de folículos pré-antrais cultivados (HSUEH et al., 2000). Embora os mecanismos não tenham sido esclarecidos, estes resultados indicam o FGF-7 como um fator de diferenciação e sobrevivência celular envolvido no controle da foliculogênese pré-antral.

O FGF-10, 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 FGF-10 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 FGF-10 (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999). Atribuiu-se ao FGF-10, 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 FGF-10 também já foi relatado como mediador parácrino dependente de andrógenos no tecido prostático (LU et al., 1999).

O FGF-10 é bastante semelhante ao FGF-7, 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 FGF-7 e o FGF-10 atuam de forma sinérgica ou redundante em algumas situações (IGARASHI et al., 1998). Contudo, o FGF-10 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 Kinase em explantes de pele e cérebro de ratos após tratamento com FGF-10 (BEER et al., 2000).

Em relação a sua participação no controle da fisiologia reprodutiva, destaca-se inicialmente a detecção da expressão gênica do FGF-10, juntamente com a do FGF-7, no útero neonatal ovino. Acredita-se que ambos participem da regulação da morfogênese endometrial, onde o FGF-10 atuaria como fator quimiotático direcionador do crescimento e ramificação glandular, e o FGF-7 estimularia a proliferação de células epiteliais (TAYLOR et al., 2001).

Recentemente, a expressão do RNAm do FGF-10 foi detectada em oócitos e células da teca de folículos antrais bovinos (BURATINI et al., 2007), bem como no corpo lúteo bovino (CASTILHO et al., 2008). Como as células da granulosa expressam os receptores para o FGF-10 (o FGFR-2b; BERISHA et al., 2004), sugere-se o envolvimento do FGF-10 na sinalização parácrina oriunda do oócito e células da teca alvejando as células da granulosa (BURATINI et al., 2007). Além disso, os níveis de RNAm do FGF-10 diminuíram com o aumento das concentrações intrafoliculares de estradiol em células da teca, indicando que ele é regulado ao longo do

desenvolvimento. Dados funcionais indicam que o FGF-10 não altera a atividade proliferativa, mas inibe a produção de estradiol em meio de cultivo de células da granulosa (BURATINI et al., 2007). Esses resultados, aliados à observação de que o FSH estimula a expressão do FGFR-2b em células da granulosa (BURATINI et al., 2007), sugerem que o FGF-10 de origem tecal regula a diferenciação das células da granulosa de folículos antrais recém-recrutados e que a sua expressão deve ser suprimida para a continuidade do desenvolvimento folicular.

Dados preliminares obtidos recentemente em nosso laboratório indicam a participação do FGF-10 também no controle da fase pré-antral do desenvolvimento folicular. Em congruência com esta hipótese, o RNAm codificador do FGF-10 foi detectado em folículos pré-antrais primordiais, primários e secundários obtidos de fetos bovinos (BURATINI et al., 2007). No entanto, a possível regulação da expressão do FGF-10, bem como sua relação com a dinâmica folicular pré-antral durante o desenvolvimento ovariano de fetos bovinos ao longo da gestação não haviam sido investigadas até o presente estudo.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1. Objetivo Geral

Investigar o padrão de expressão do FGF-10 em ovários fetais bovinos ao longo da gestação.

3.2. Objetivos específicos

- a) Investigar o padrão da expressão gênica do FGF-10 ao longo do desenvolvimento ovariano fetal em bovinos.
- b) Investigar o padrão de expressão protéica do FGF-10 ao longo do desenvolvimento ovariano fetal em bovinos.
- c) Investigar a associação da dinâmica folicular em ovários fetais e a expressão de FGF-10 ao longo da gestação.

3.3. Hipóteses

→ A intensidade de expressão do FGF-10 varia ao longo do desenvolvimento ovariano fetal bovino.

→ A expressão do FGF-10 está associada com a dinâmica folicular nos ovários fetais bovinos ao longo da gestação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção de ovários fetais

Pares de ovários fetais foram obtidos de fêmeas bovinas em matadouro (Figura 3), sendo um deles destinado à extração de RNA total e posterior investigação da expressão gênica do FGF-10 por RT-PCR em tempo real e o outro para análise histológica, contagem folicular e investigação da expressão protéica do FGF-10 por imunohistoquímica.

A idade dos fetos foi estimada pelo comprimento entre o topo da cabeça e o início da cauda (medida *crown rump*), utilizando-se como referência RÜSSE (1983) e TANAKA et al., (2001). Trinta fetos foram utilizados (n=5 para cada grupo) com aproximadamente 75, 90, 120 e 150 dias de gestação, os quais, de acordo com TANAKA et al, (2001), são os momentos aproximados em que ocorre o aparecimento dos folículos primordiais, primários, secundários e antrais jovens, respectivamente, no ovário fetal bovino em *Bos taurus*. Animais com 60 dias de gestação também foram utilizados, a fim de investigar a expressão do FGF-10 no período em que o ovário já está diferenciado e povoado por células germinativas primordiais em diferenciação (oogônias). Além disso, a fim de garantir a representação de ovários com maior número de folículos antrais jovens, optou-se por incluir o grupo com 210 dias de gestação no presente estudo (Tabela 1).

Os ovários fetais bovinos utilizados para extração de RNA total foram transportados em RNA later[®] (Ambion) até o laboratório, enquanto que aqueles destinados à imunohistoquímica foram transportados em solução de formol a 10%.



Figura 3. **A)** Fêmea bovina obtida em abatedouro com aproximadamente 90 dias de gestação. **B)** Aspecto anatômico do sistema reprodutivo feminino: útero (seta delgada) e ovário direito (seta larga).

Tabela 1. Relação entre idade gestacional e medida de *crowm-rump*.

Idade Gestacional (dias)	Medida Crown Rump (cm)
60	6 a 8
75	9 a 11
90	14.6 a 15.6
120	23.4 a 25.4
150	36.9 a 40.9
210	66.1 a 70.1

4.2. Extração de RNA e Transcrição reversa

Ovários fetais inteiros foram imersos em 1ml de solução Trizol[®] (Invitrogen), triturados em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e submetidos ao protocolo Trizol[®] (Invitrogen) de extração de RNA total. Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 10 µl de água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (Biophotometer[®], Eppendorf).

A fim de evitar contaminação por DNA genômico, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa. 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 (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o “kit” SuperScript III[®] (Invitrogen), cujo protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dT) (500µg/ml), 1µl de DNTP Mix (10nM) e 3 µl de água destilada e autoclavada. 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, adicionou-se à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl). Na seqüência, foi acrescentado 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 armazenadas em freezer (-20°C) até a análise por PCR em tempo real.

4.3. Expressão gênica de FGF-10 por PCR em tempo real

Para avaliação da expressão gênica do FGF-10 nos ovários fetais ao longo da gestação utilizou-se o protocolo de amplificação do “kit” Power Sybr Green Master Mix® – Applied Biosystems. A expressão do RNAm do gene constitutivo ciclofilina A foi utilizada como normalizadora da expressão gênica de FGF-10.

As reações de amplificação para CYC-A e FGF-10 foram realizadas em placas de 96 poços, as quais continham 12,5 µl de Power Sybr Green Master Mix® – Applied Biosystems, 1µl de cDNA (diluição 1:5) e oligonucleotídeos iniciadores bovino-específico completando o volume final de 25 µl. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse experimento encontram-se enumerados abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para ciclofilina A e FGF-10. (**S:** oligonucleotídeo iniciador “sense” **A:** oligonucleotídeo iniciador “antisense”); pb (pares de base).

Gene	Seqüência	Tamanho do Fragmento	Temperatura de Anelamento	Eficiência de Amplificação	[] Final Primer
CYC-A	S 5' GCC ATG GAG CGC TTT GG 3' A 5' CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T 3'	65 pb	60°C	98%	300 nM
FGF-10	S 5' CCA CCA ACT CCT CTT CTT CTT CCT 3' A 5' ATA CTG TAC GG CAG TTC TCC TTC 3'	202 pb	61° C	90%	175 nM

As condições para amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15s (desnaturação) e 60°C (CYC-A) ou 61°C (FGF-10) por 1 min (anelamento e extensão), seguido de curva de dissociação padrão. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão.

A eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram caracterizadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente (Figuras 4 e 5).

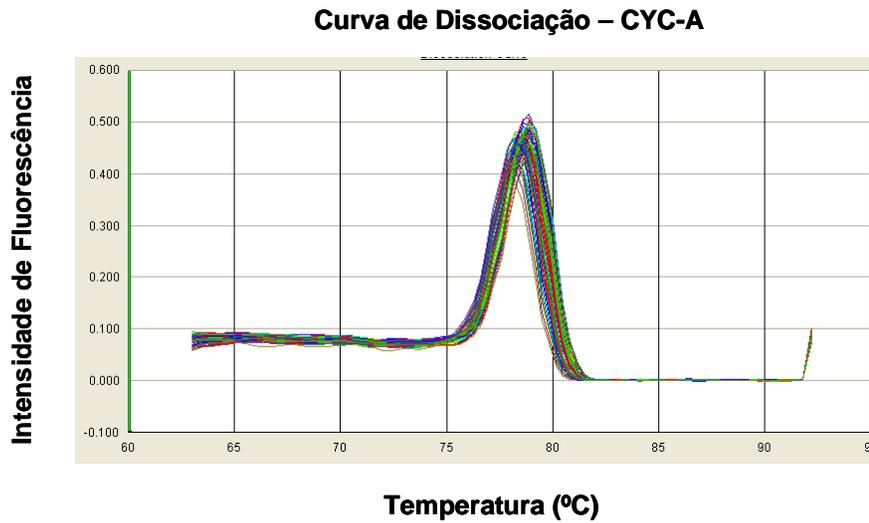
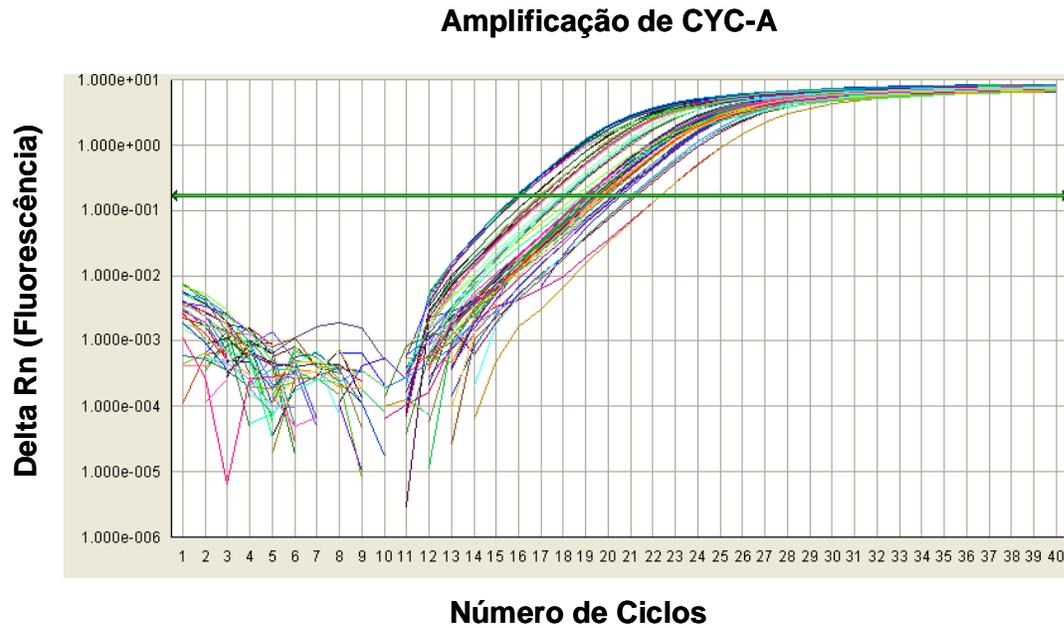


Figura 4. Curvas de amplificação e de dissociação para CYC-A em ovários fetais bovinos aos 60, 75, 90, 120, 150, 210 dias de gestação.

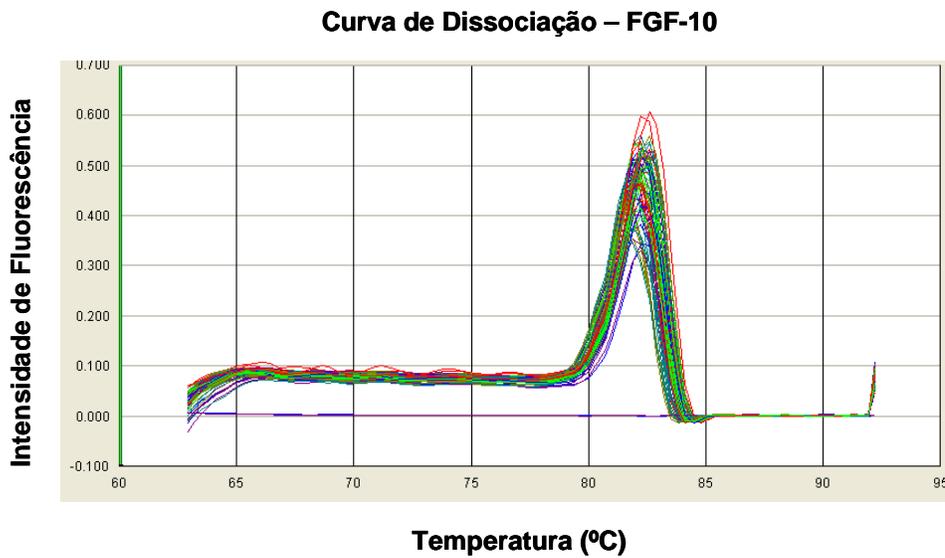
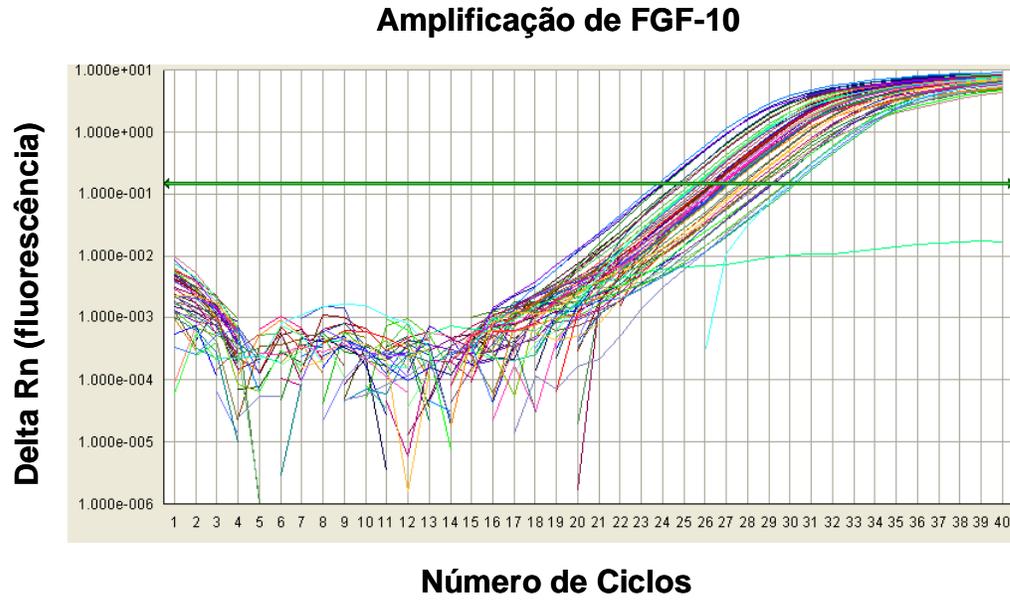


Figura 5. Curvas de amplificação e de dissociação para FGF-10 em ovários fetais bovinos aos 60, 75, 90, 120, 150, 210 dias de gestação.

A eficiência de amplificação de cada gene analisado foi estimada utilizando-se o programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003; Figura 6). Para tanto, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra.

Já para a determinação do “threshold” de cada reação foram utilizadas as médias de no mínimo 4 pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial das amostras analisadas. Posteriormente, os valores de ct (ciclo “threshold”) foram exportados para uma planilha e organizados de acordo com as idades gestacionais de cada grupo.

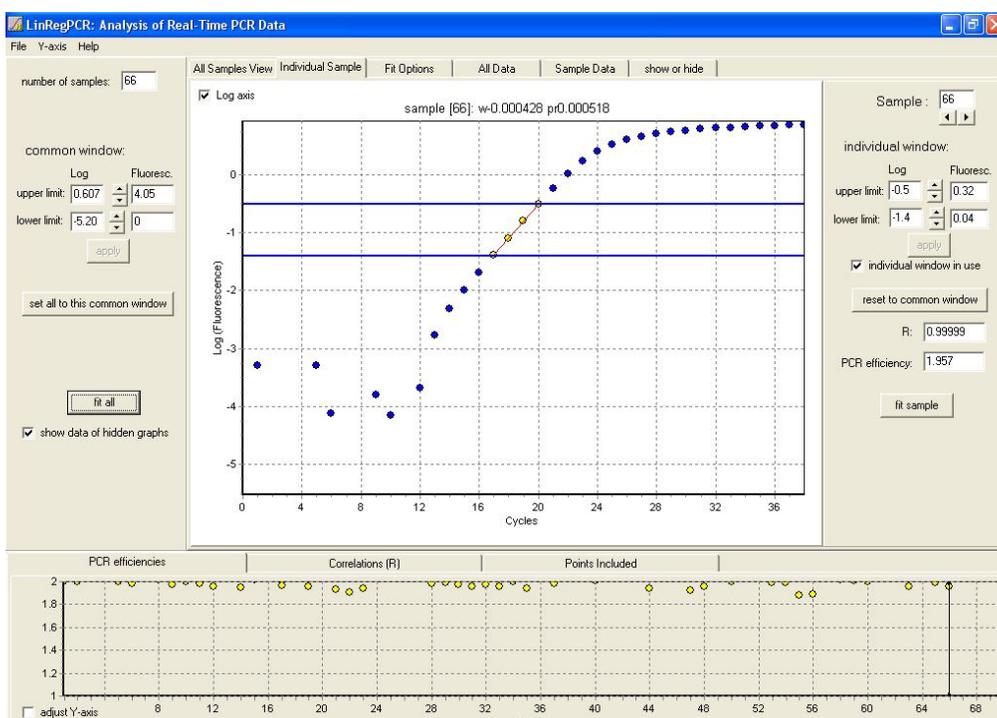


Figura 6. Exemplo de curva de amplificação para a determinação da eficiência por amostra utilizando o software “LinRegPCR”.

Os valores de expressão gênica do FGF-10 foram normalizados pela expressão do gene constitutivo, ciclofilina A. A expressão relativa do FGF-10 em ovários nos diferentes dias gestacionais foi quantificada pela seguinte equação (Pfaffl et al., 2001; Figura 7).

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

Figura 7 - 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.

4.4. Preparações histológicas e Imunohistoquímica

As lâminas para as análises histológicas e para imunohistoquímica foram confeccionadas utilizando os protocolos do Laboratório de Imunohistoquímica, no Departamento de Patologia (FMVZ, Unesp-Botucatu).

A expressão protéica do FGF-10 foi investigada por imunohistoquímica nos ovários fetais bovinos fixados em paraformaldeído. Para tanto, o tecido fixado foi mergulhado em parafina e cortado em micrótomo. Os cortes obtidos (5µm) foram colocados em lâminas com poli-L-lisina e desparafinizados em xilol e hidratados em banhos sucessivos de 3 min em etanol 95% e 85%. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em solução EDTA (pH 8.0) a 96°C em banho-maria por 30 min. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com metanol (95%) e peróxido de hidrogênio (5%) 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 o anticorpo humano policlonal produzido em coelho anti-FGF-10 (1 µg/ul; cat. H-121, Santa Cruz) durante 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em Tris (pH 7.4) e depois incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (EnVision Dual Link System®; DakoCytomation). A imunomarcagem foi detectada com DAB líquido (DakoCytomation). O controle negativo foi produzido através de pré-incubação do anticorpo primário (1.25 µg/mL) com FGF-10 recombinante (2,5 µg/mL; cat.100-27: Peptide Inc) por duas horas a temperatura ambiente, antes da incubação nas lâminas.

4.5. População folicular em ovários fetais ao longo da gestação

Para a análise de uma possível correlação entre a população de cada tipo folicular e a expressão gênica de FGF-10 ao longo do desenvolvimento ovariano fetal, 3 cortes histológicos de 3 diferentes ovários (9 cortes por idade gestacional) de cada grupo foram fotomicrografados em 4 diferentes campos. Desta forma, um total de 36

campos foi utilizado a fim de quantificar o número de folículos primordiais, primários, secundários e antrais jovens em cada período gestacional analisado. Posteriormente, calculou-se a proporção de cada categoria folicular nos ovários fetais em cada período gestacional.

4.6. Análise estatística

O efeito da idade gestacional sobre a expressão gênica de FGF-10 foi testado por ANOVA paramétrica. No entanto, ANOVA não paramétrica foi utilizada para testar o efeito da população folicular sobre a expressão gênica de FGF-10, uma vez que esses dados não apresentaram distribuição normal. Posteriormente, as médias da expressão gênica do FGF-10 de cada idade gestacional foram comparadas por contraste ortogonal ($\alpha < 0,05$), enquanto que as proporções das diferentes categorias foliculares em cada dia da gestação, bem como as proporções de cada categoria folicular ao longo dos dias da gestação, foram comparadas pelo teste de Wilcoxon ($\alpha < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa JMP (SAS, versão 7.0).

5. RESULTADOS

5.1. Análise Histológica

Análise histológica revelou aos 60 dias de gestação um ovário fetal totalmente povoado por oogônias, sendo marcante a formação e estabelecimento dos cordões ovígeros contendo além de oogônias, células da pré-granulosa. Nas lâminas analisadas não foi encontrado nenhum folículo pré-antral ou antral jovem (Figura 8).

Aos 75 dias de gestação, observou-se aparecimento de folículos primordiais esparsos e circundados por poucas células da granulosa pavimentosas. Além disso, ainda havia o progressivo desaparecimento dos cordões ovígeros (Figura 9).

Aos 90 dias de gestação, notou-se o aparecimento de folículos primários (Figura 10), os quais se tornaram mais numerosos aos 120 dias de gestação (Figura 11).

Aos 150 dias de gestação observou-se o estabelecimento de folículos secundários (Figura 12). Já aos 210 dias de gestação, foram visualizados todos os tipos foliculares pré-antrais (primordial, primário e secundário), bem como folículos antrais jovens com as camadas das células da granulosa e da teca, além de complexo *cumulus oophorus* (Figura 13). Vale ressaltar que excepcionalmente nesse período, a análise histológica ovariana de um dos fetos revelou a presença de um tecido de aparência luteal e extremamente vascularizado (Figura 14).



Figura 8. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 60 dias de gestação. Presença de cordões ovígeros (círculo), oogônias (seta delgada) e células da pré-granulosa (seta curta).

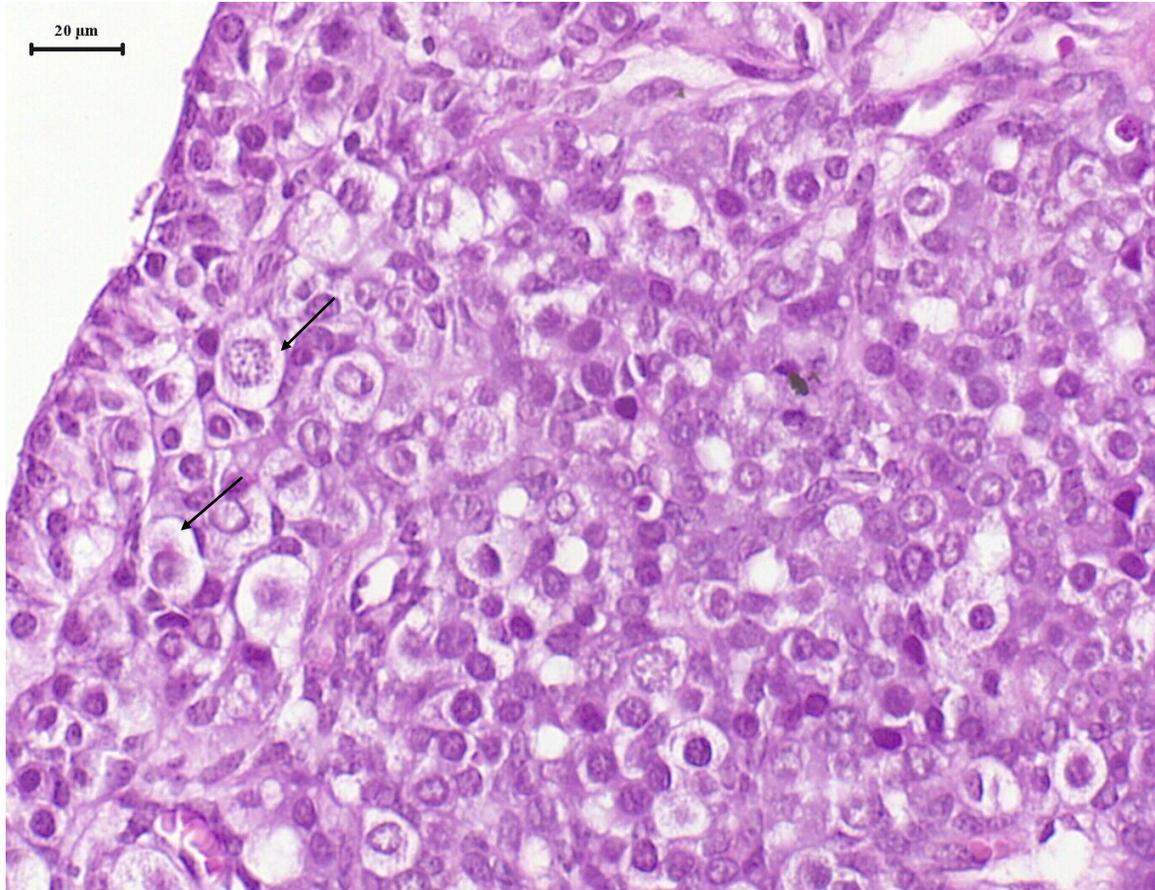


Figura 9. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 75 dias de gestação. Presença de folículos primordiais (seta) em pequeno número na região cortical.

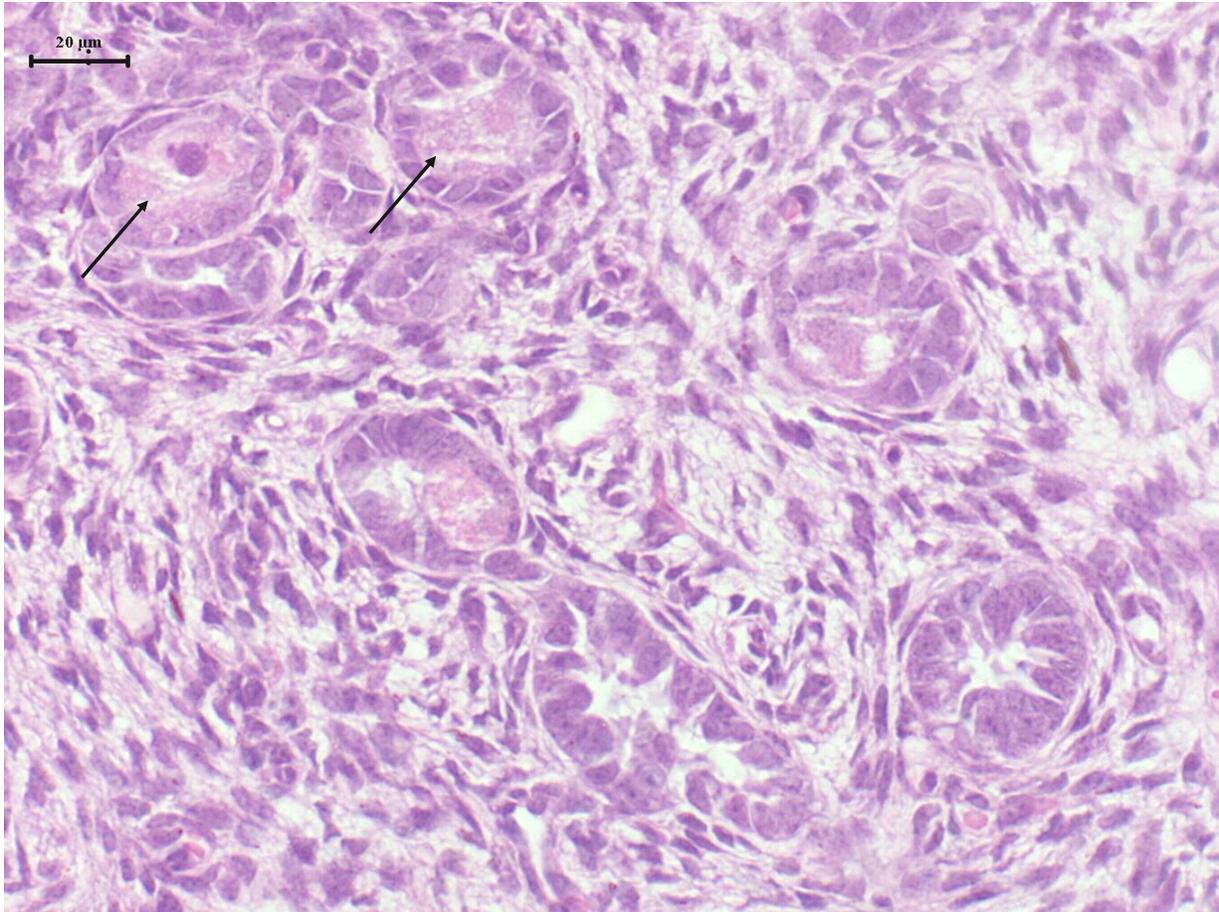


Figura 10. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 90 dias de gestação. Presença de folículos primários (seta).

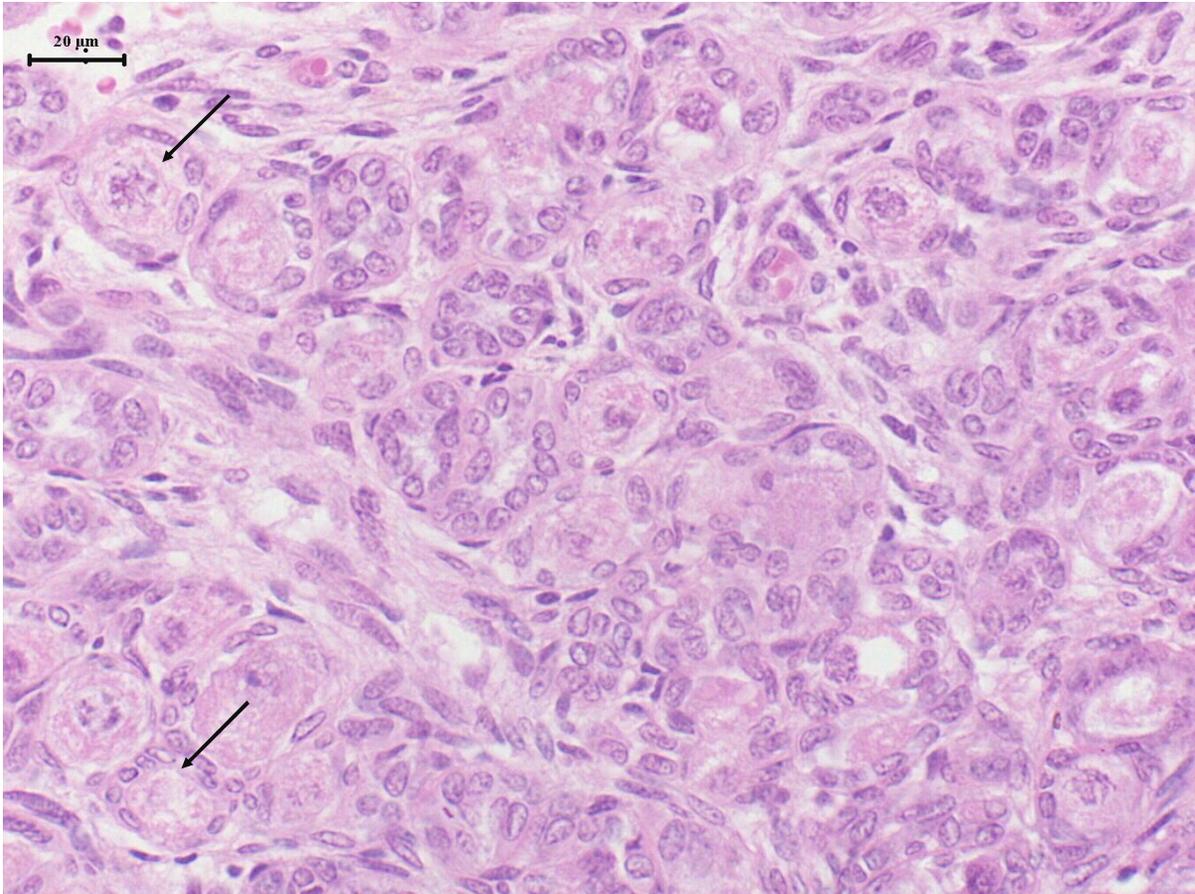


Figura 11. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 120 dias de gestação. Destaca-se a majoritária presença de folículos primários (seta).

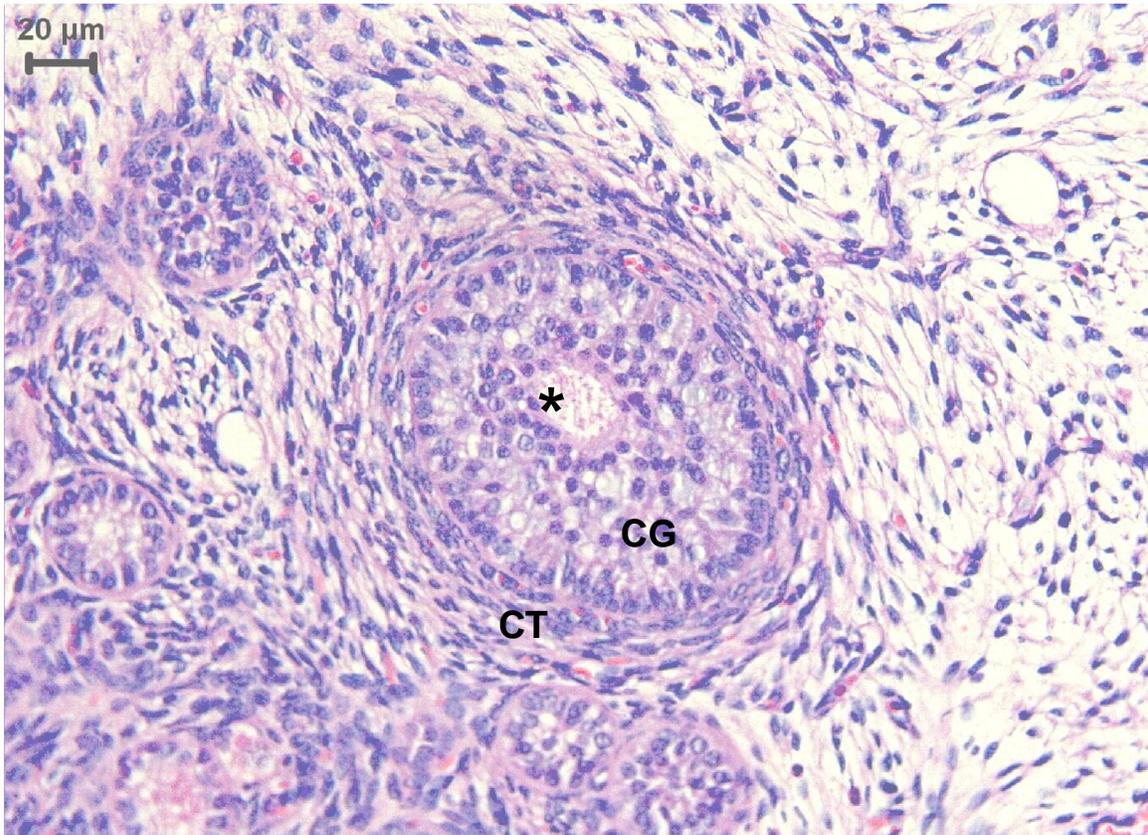


Figura 12. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 150 dias de gestação. Destaca-se o aparecimento de folículos secundários, com a presença das células da teca (CT), granulosa (CG) e oócito (*).

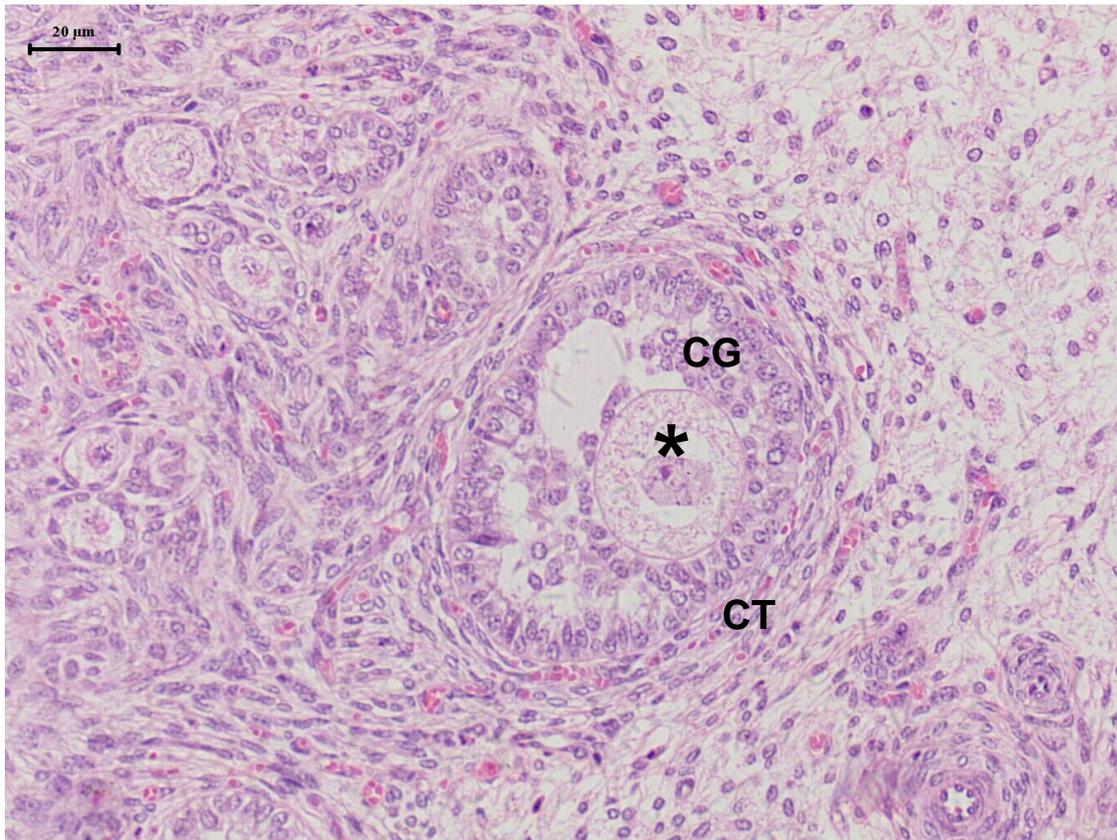


Figura 13. Análise histológica de ovário fetal bovino aos 210 dias de gestação. Presença de folículo antral jovem bem caracterizado pelas células da teca (CT), células da granulosa (CG) e oócito (asterisco).

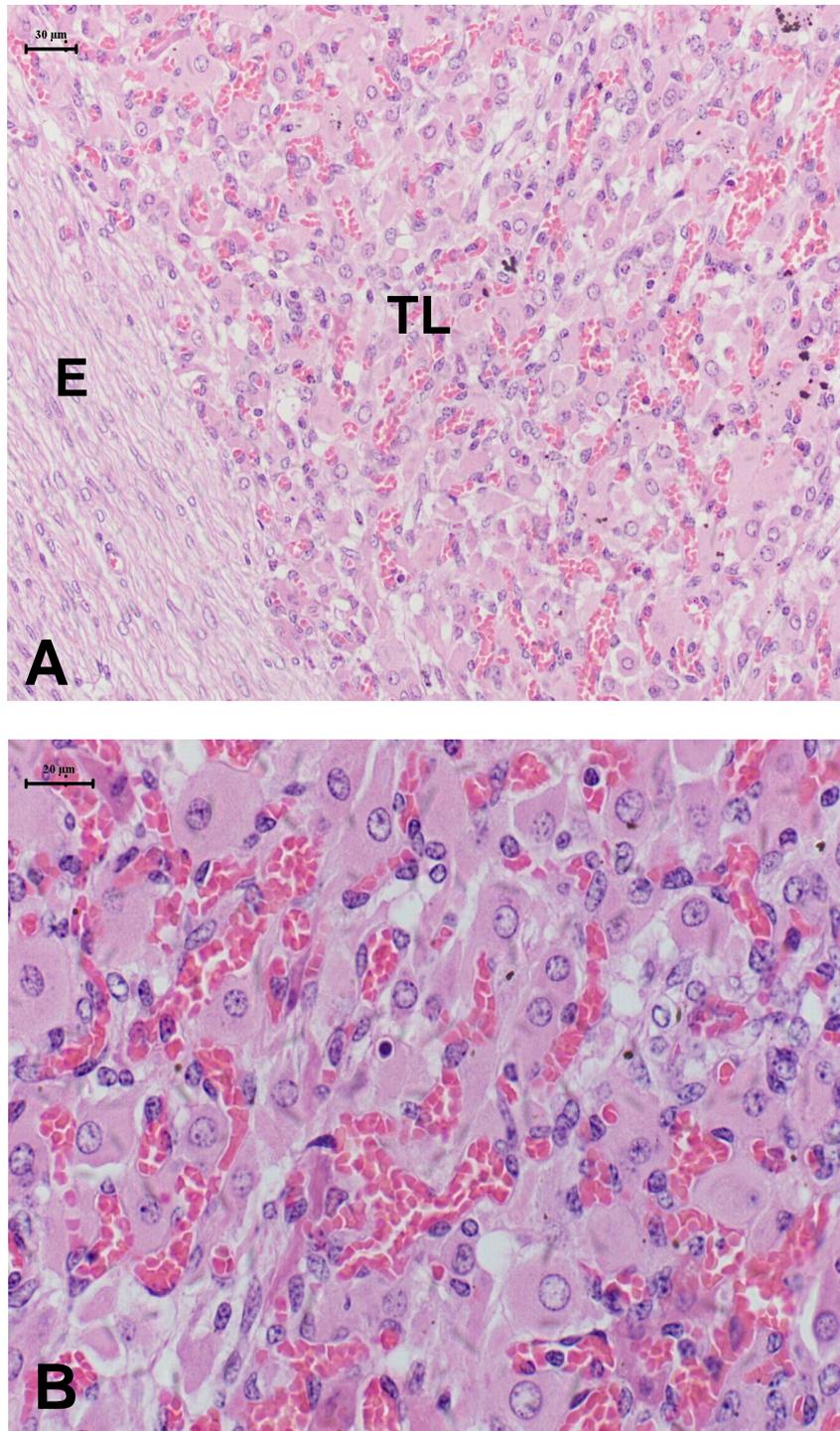


Figura 14. Análise histológica do feto aos 210 dias mostrando a presença de tecido luteal (TL). Estroma (E).

5.2. Proporção folicular em ovários fetais ao longo da gestação

A proporção de folículos primários foi maior quando comparada com os demais tipos foliculares presentes nos ovários fetais a partir dos 120 dias de gestação (Tabela 3, Figura 15).

Tabela 3. Número de folículos contados em 36 campos fotomicrografados de 3 ovários (12 campos por ovário) fetais para cada idade gestacional avaliada. Porcentagens das diferentes categorias foliculares em relação ao número total de folículos para cada idade gestacional mostradas entre parênteses (^{A,B} valores diferentes entre linhas; ^{a,b} valores diferentes entre colunas; P < 0,05).

	<u>Primordiais</u>	<u>Primários</u>	<u>Secundários</u>	<u>Antrais Jovens</u>	<u>Nº Total</u>
Idade Gestacional					
75	478 (100%) ^{Aa}	0 (0%) ^{Ab}	0 (0%) ^{Ab}	0 (0%) ^{Ab}	478
90	368 (73%) ^{Ba}	140 (27%) ^{Bb}	0 (0%) ^{Ac}	0 (0%) ^{Ac}	508
120	144 (29%) ^{Ca}	346 (71%) ^{Cb}	0 (0%) ^{Ac}	0 (0%) ^{Ac}	490
150	136 (30%) ^{Ca}	252 (54%) ^{Cb}	76 (16%) ^{Ba}	0 (0%) ^{Ac}	464
210	176 (32%) ^{Ca}	134 (48%) ^{Bb}	66 (12%) ^{Bc}	38 (8%) ^{Bc}	414

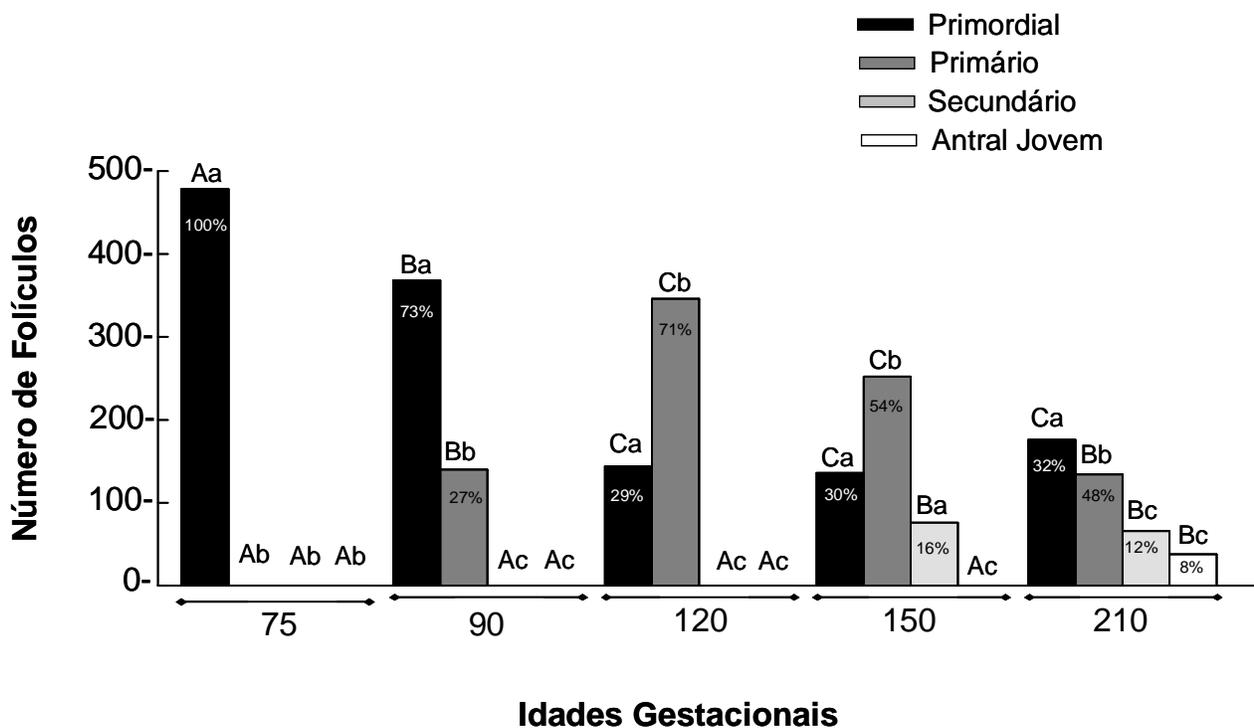


Figura 15. Número de folículos contados em 36 campos fotomicrografados de 3 ovários (12 campos por ovário) fetais para cada idade gestacional avaliada (^{A,B} valores diferentes para uma mesma categoria entre as idades; ^{a,b} valores diferentes entre as categorias na mesma idade; P < 0,05).

5.3. Expressão gênica de FGF-10

A expressão do RNAm do FGF-10 esteve presente nos ovários bovinos de todas as idades gestacionais analisadas e mostrou-se maior aos 210 dias de gestação quando comparado aos 60, 75 e 90 dias (Figura 16).

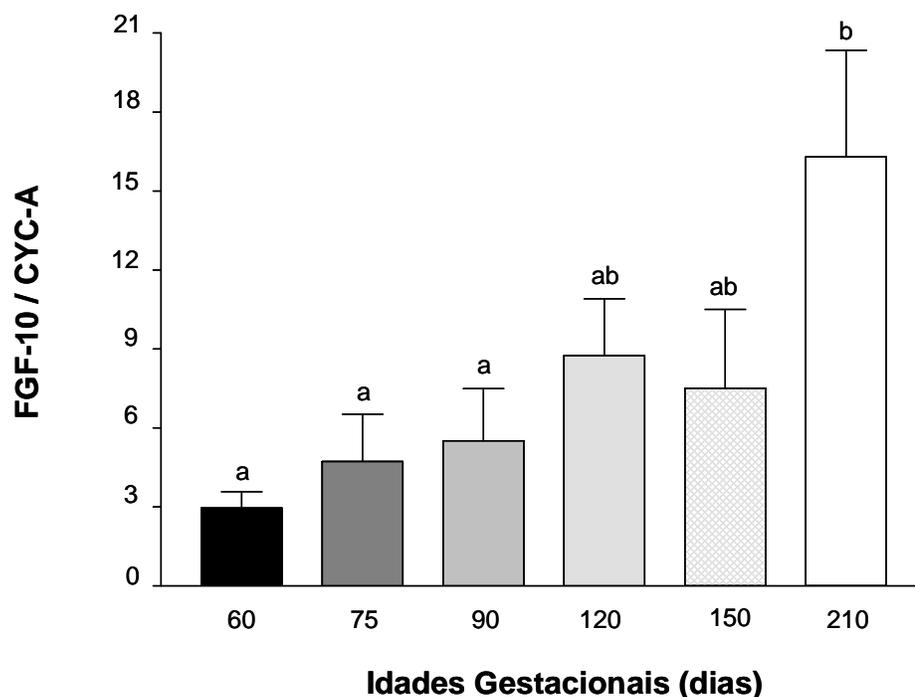


Figura 16. Expressão gênica de FGF-10 quantificada por PCR em tempo real em ovários fetais bovinos ao longo do período gestacional.

5.4. Imunohistoquímica

Embora sem sinais aparentes na diferença de marcação nos folículos ovarianos ao longo da gestação, a proteína do FGF-10 foi detectada por imunohistoquímica em oogônias (Figura 19), oócitos de todos os tipos foliculares ao longo da gestação, células da granulosa de todos os tipos foliculares; células da teca de secundários e antrais jovens (Figuras 17 e 20) e também no tecido de aparência luteal encontrado em um dos fetos analisados (Figura 21). Além disso, destaca-se a localização protéica do FGF-10 em vasos sanguíneos no ovário fetal (Figura 22).

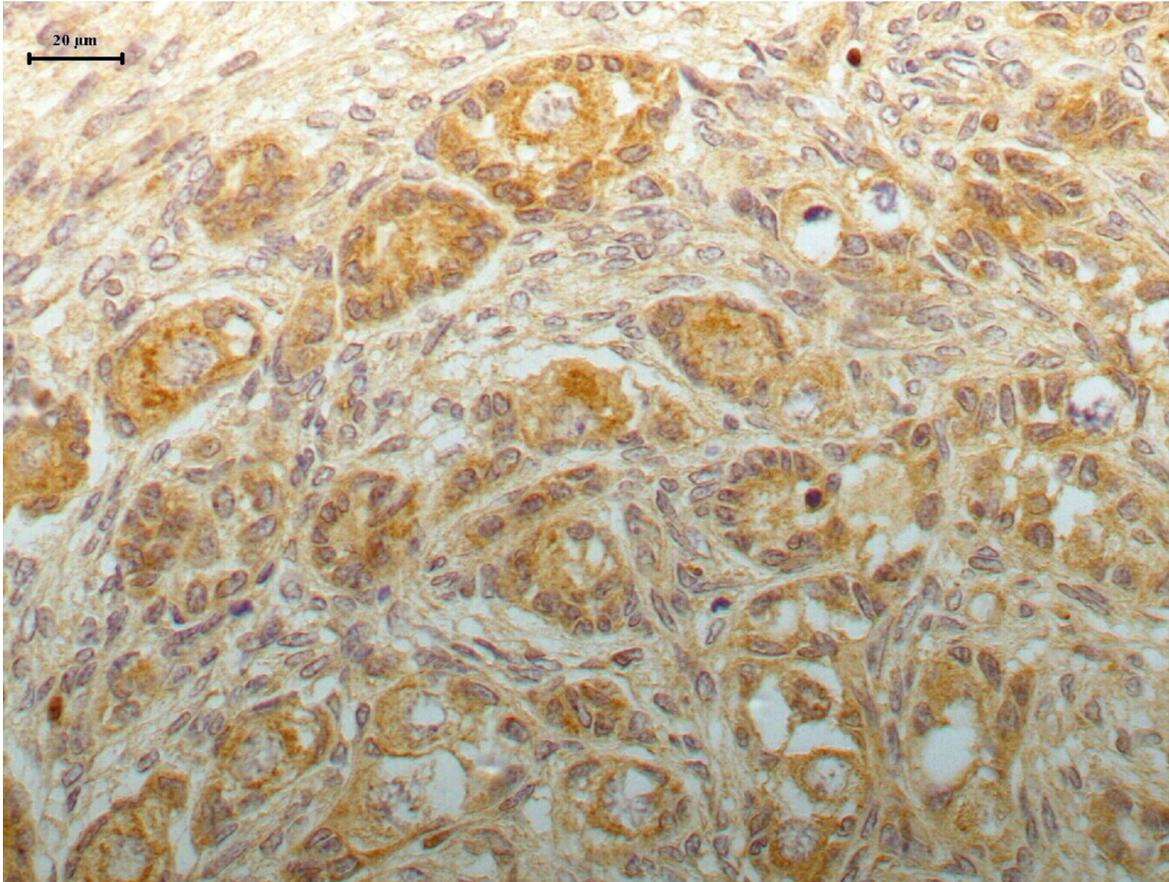


Figura 17. Immunolocalização do FGF-10 em folículos pré-antrais de ovário fetal aos 210 dias de gestação.

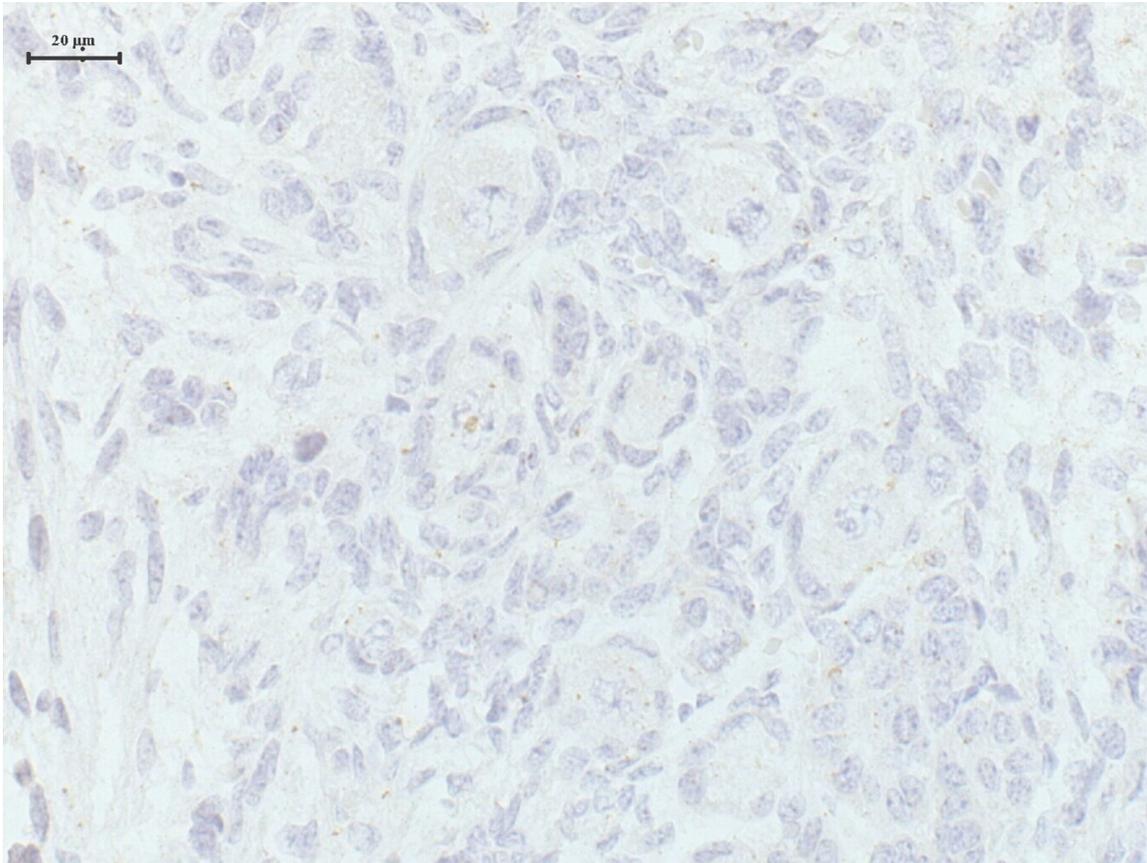


Figura 18. Controle negativo (pré-incubação de proteína recombinante FGF-10 com anticorpo primário) para imunolocalização do FGF-10.

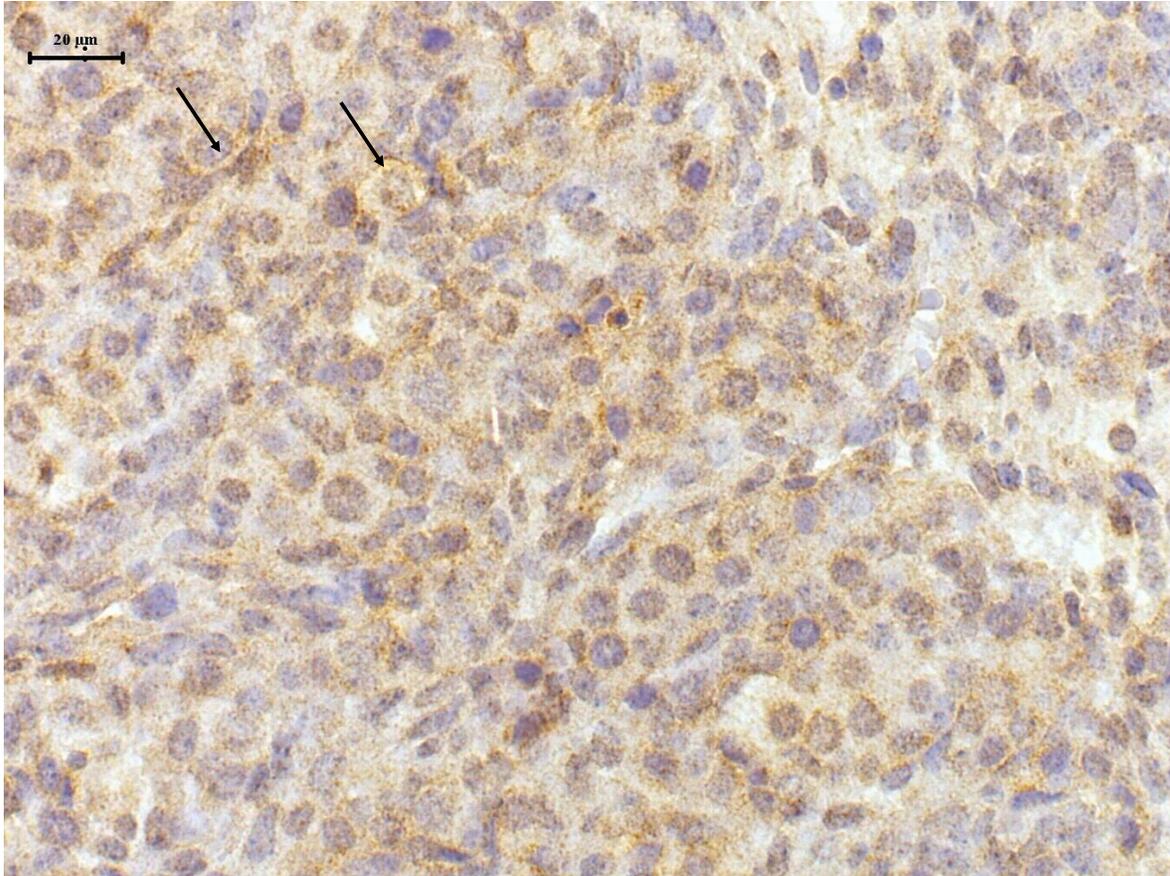


Figura 19. Imunolocalização do FGF-10 nas oogônias (seta) em ovários fetais bovinos aos 60 dias de gestação.

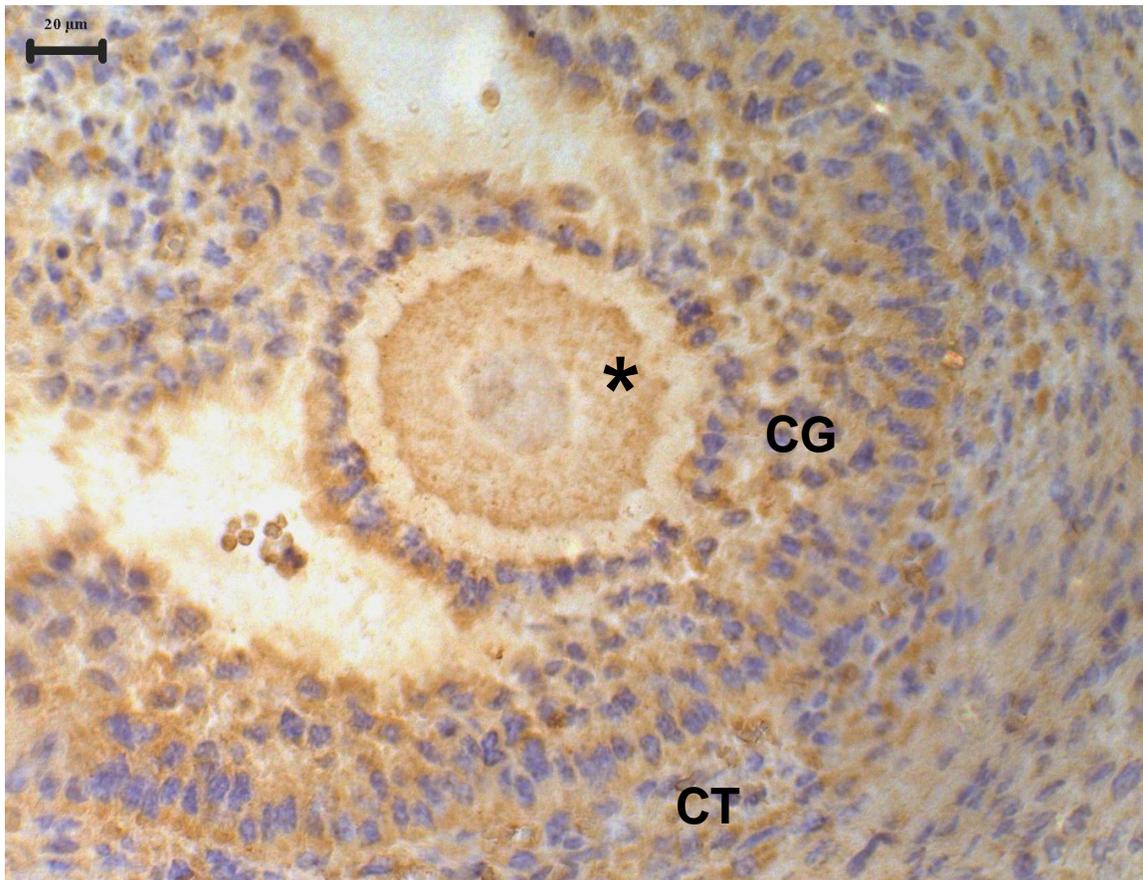


Figura 20. Imunolocalização do FGF-10 nas células da granulosa (CG), células da teca (CT) e oócito (asterisco) de folículo antral jovem bovino.

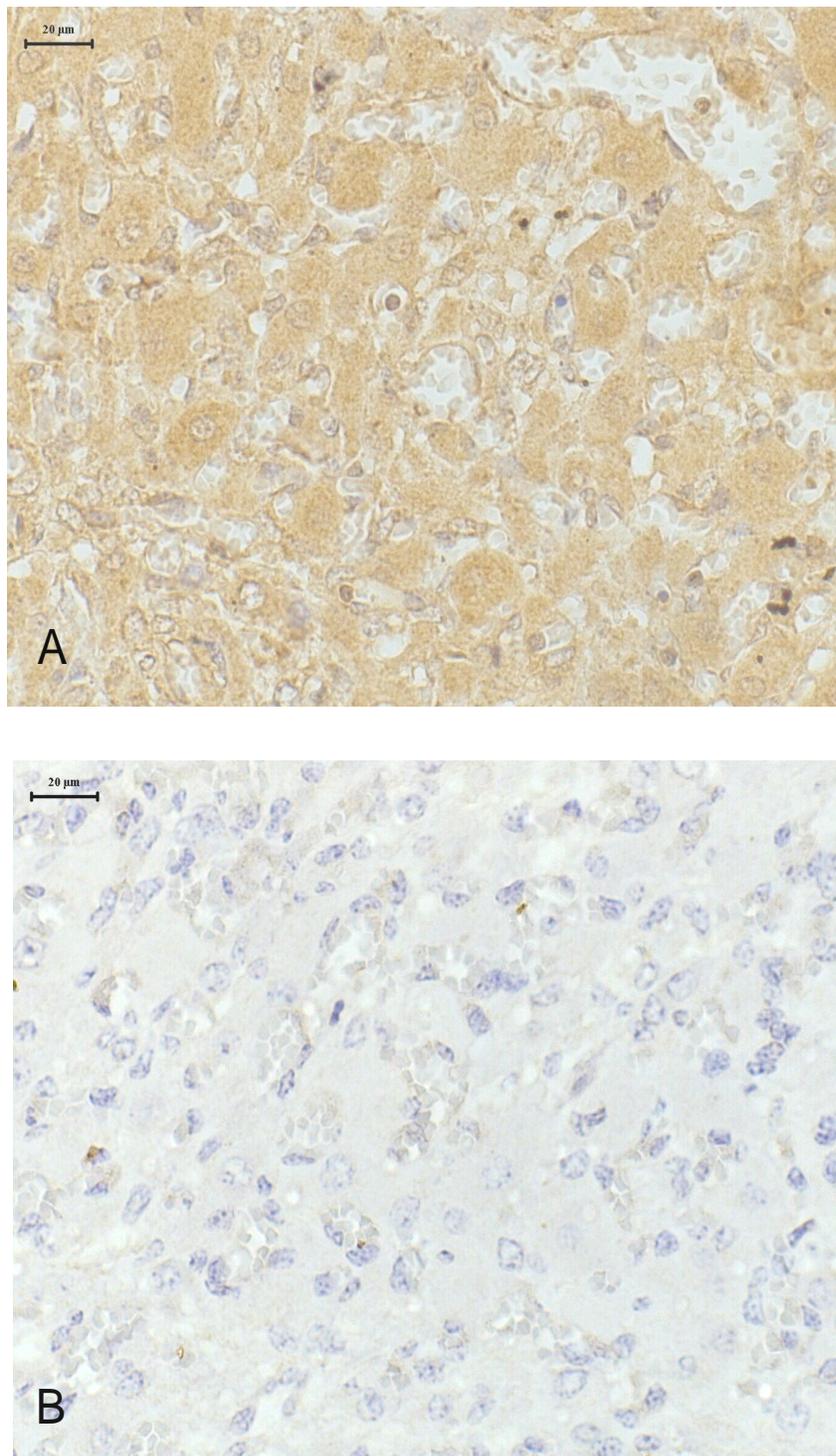


Figura 21. Imunolocalização (A) e controle negativo (B) do FGF-10 em tecido luteal de feto bovino aos 210 dias.

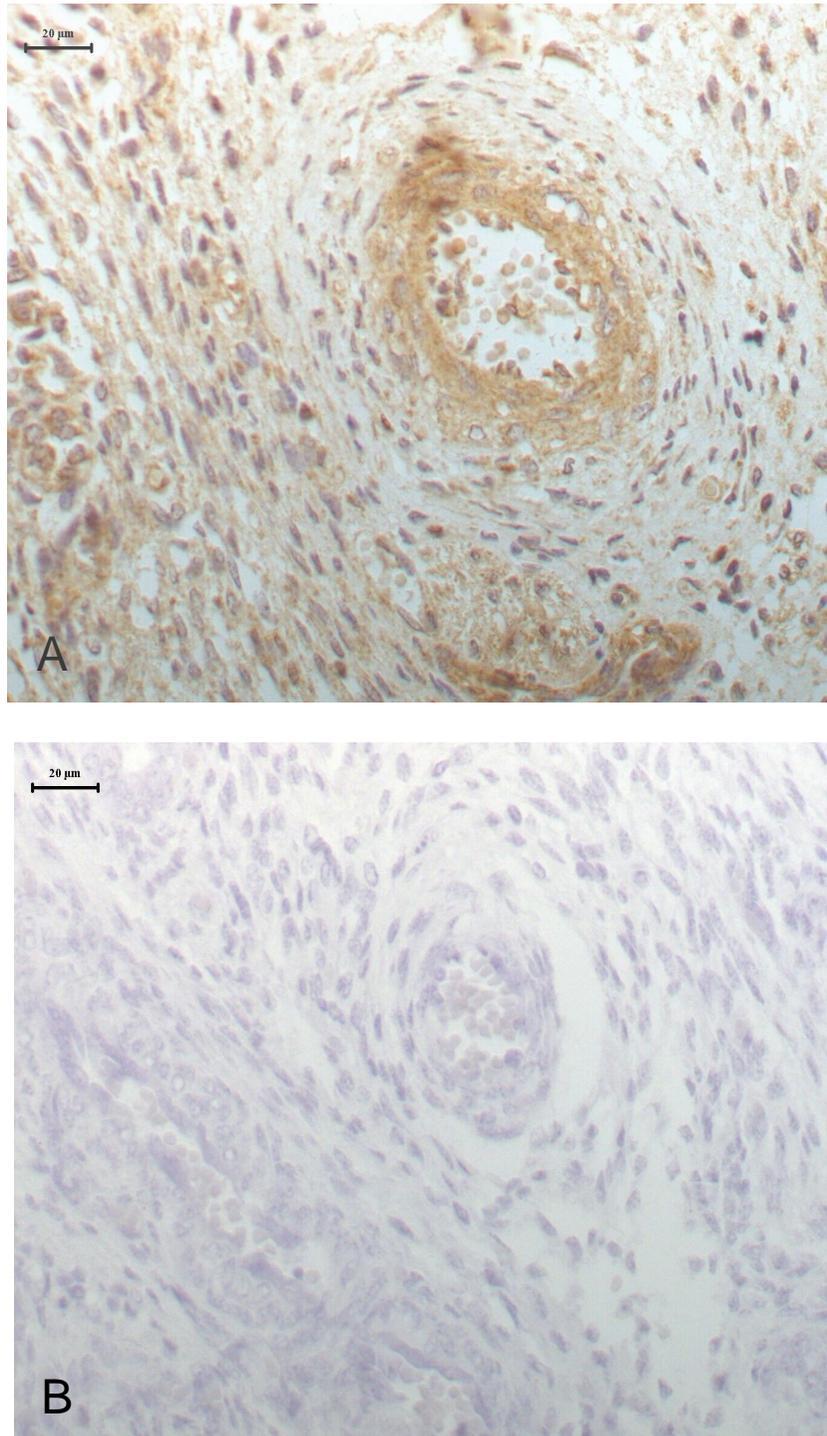


Figura 22. Imunolocalização (A) e controle negativo (B) do FGF-10 em vasos sanguíneos.

6. DISCUSSÃO

Os resultados presentes demonstram pela primeira vez a expressão do FGF-10 ao longo do desenvolvimento pré-antral em ovários fetais bovinos. A expressão gênica do FGF-10 mostrou-se associada à dinâmica folicular fetal e acompanhada pela presença da respectiva proteína em oócitos, células da granulosa e da teca. Portanto, os dados presentes indicam a participação do FGF-10 na regulação da foliculogênese durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos.

Ainda que o presente trabalho tenha sido desenvolvido predominantemente com *Bos indicus*, os dados sobre o surgimento das categorias foliculares dos 75 até os 210 dias de gestação são, de maneira geral, concordantes com os dados obtidos em *Bos taurus* por TANAKA et al. (2001). A divergência entre os dados presentes e os relatados por TANAKA et al. (2001) se refere ao aparecimento de folículos secundários e antrais jovens. Enquanto essas categorias foram detectadas somente aos 150 e 210 dias, respectivamente, no presente estudo, TANAKA et al. (2001) as observaram aos 120 e 150, respectivamente. Esta discrepância pode ser decorrente de diferenças entre as raças utilizadas nos experimentos, bem como do menor número de ovários fetais e idades gestacionais analisados no presente estudo. No entanto, os dados presentes e os relatados por TANAKA et al. (2001) divergem drasticamente em relação aos de RUSSE (1983), que descreve aparecimento tardio de todas as categorias foliculares. Esta diferença pode ser decorrente dos diferentes e mais extensos intervalos gestacionais avaliados por RUSSE (1983).

Em função da ausência de descrição da histologia ovariana fetal no início da gestação em bovinos, as características histológicas aos 60 dias foram avaliadas

utilizando-se como referência estudo prévio em ovinos (SAWYER et al., 2002). No entanto, mesmo tratando-se de espécies diferentes, a histologia mostrou-se bastante similar, destacando-se a formação e estabelecimento dos cordões ovígeros, os quais além de possuírem oogônias, também eram compostos por células da pré-granulosa.

Interessantemente, em um único ovário fetal obtido aos 210 dias de gestação, observou-se tecido de característica bastante eosinofílica e extremamente vascularizado, histologicamente semelhante a um corpo lúteo de ovário adulto. No entanto, até o presente momento a ocorrência desse tipo tecidual não foi relatada em ovários fetais. Além da presença de células com características histológicas muito semelhantes às de células luteínicas grandes e pequenas, a imunolocalização do FGF-10 nesse tecido reforça a hipótese de que de fato seja uma estrutura luteal, uma vez que CASTILHO et al. (2008) demonstraram através de imunohistoquímica e RT-PCR, a expressão do FGF-10 em todos os estágios de desenvolvimento luteal em ovários bovinos adultos.

A expressão gênica do FGF-10 foi detectada em todas as idades gestacionais e foi maior aos 210 dias em comparação aos 60, 75 e 90 dias. Por outro lado, observou-se aumento numérico gradativo da expressão gênica do FGF-10 entre os 60 e 120 dias. O padrão de expressão do FGF-10 parece estar associado à dinâmica folicular dos ovários fetais. O aumento numérico gradativo até os 120 dias mostrou-se temporalmente associado ao aparecimento dos folículos primordiais aos 75 dias e, posteriormente, ao aparecimento e aumento no número de folículos primários entre os 90 e 120 dias. Esta observação sugere que a expressão do FGF-10 é maior em folículos primários do que em primordiais e oogônias.

Os valores significativamente superiores da expressão gênica do FGF-10 aos 210 dias coincidem com o aparecimento de folículos antrais jovens. Dados obtidos a partir de ovários bovinos adultos indicam as células da teca e os oócitos como os sítios de expressão do FGF-10 nos folículos antrais (BURATINI et al., 2007). Entre 150 e 210 dias houve queda no número de folículos primários e manutenção do número de secundários, o que sugere que a expressão aumentada aos 210 dias se deve de fato ao aparecimento de folículos antrais jovens com camada da teca mais desenvolvida, que sabidamente expressa o FGF-10 (BURATINI et al., 2007).

A análise imunohistoquímica revelou a presença do FGF-10 em oócitos e células da granulosa de todos os tipos foliculares, bem como em células da teca de folículos secundários e antrais jovens. A imunomarcacão mostrou-se aparentemente homogênea em oócitos, células da granulosa e células da teca ao longo da gestacão. Observou-se fraca imunomarcacão do FGF-10 no estroma ovariano ao longo da gestacão, o que indica que o RNAm mensurado é majoritariamente proveniente de células foliculares e germinativas.

A imunolocalizacão do FGF-10 nas células da granulosa de todos os tipos foliculares ao longo da gestacão parece ser incongruente com a ausência de expressão gênica do FGF-10 em células da granulosa de folículos antrais bovinos, conforme relatado por BURATINI et al. (2007). No entanto, nesse mesmo estudo, o mesmo padrão de expressão protéica foi relatado em folículos antrais presentes em ovários adultos. Como os receptores para o FGF-10 (FGFR-2b) estão expressos nas células da granulosa e como há evidências de que os FGFs são internalizados após ligacão com o receptor (OLSNES et al., 2003; WESCHE et al., 2006), interpreta-se que a imunomarcacão nas células da granulosa se deve ao reconhecimento do complexo

FGF-10/FGFR-2b internalizado pelo anticorpo. Essa hipótese é suportada pela internalização de FGF-1 e FGF-2 mediada por receptores em diversos tipos celulares (OLSNES et al., 2003; WESCHE et al., 2006). Contudo, não podemos descartar a possível expressão do RNAm do FGF-10 em células da granulosa de folículos pré-antrais.

O aumento de RNAm do FGF-10 simultâneo ao aparecimento dos folículos antrais jovens sugere o envolvimento desse FGF, particularmente, em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular, podendo atuar como indutor de diferenciação celular e regulador da produção estrogênica nas células da granulosa. Essa função é compatível com relatos anteriores em que o FGF-10 mostrou-se capaz de diminuir a produção de estradiol em células da granulosa de folículos antrais cultivadas (BURATINI et al., 2007).

A participação do FGF-10 no desenvolvimento de folículos ovarianos ao longo da gestação poderia estar associada a diversos processos celulares. A associação temporal entre a intensificação da expressão do FGF-10 e o aparecimento de folículos primordiais e primários, bem como aumento no número desses últimos entre os 75 e 120 dias de gestação, condiz com a participação desse fator de crescimento como modulador da ativação de folículos primordiais e formação de folículos primários, conforme descrito para o FGF-7 (McGee et al., 1999). O FGF-7 é estruturalmente bastante semelhante ao FGF-10 (IGARASHI et al., 1998), ativa o mesmo receptor (FGFR-2b; IGARASHI et al., 1998) e estimulou a ativação de folículos primordiais bovinos *in vitro* (McGee et al., 1999). Há evidências de atuação conjunta do FGF-7 e do FGF-10 em interações celulares em outros tecidos como pulmão e útero (PETER et al.,

1992; TAYLOR et al., 2001), o que condiz com o mesmo tipo de cooperação no controle da ativação de folículos primordiais.

A imunolocalização também presente em oogônias aos 60 dias de gestação pode indicar função quimiotática e direcionadora da morfogênese ovariana fetal, assim como já descrito em ratos durante a formação e estabelecimento dos pulmões (MIN et al., 1998; SEKINE et al., 1999). Além disso, nesse período a intensa atividade mitótica das oogônias também pode ser regulada pelo FGF-10, uma vez que esse fator de crescimento é considerado potente indutor de proliferação em diversos tipos celulares como, células uroteliais, queratinócitos, epitélio intestinal e hepatócitos (KOSMAN et al., 2007). Embora o FGF-10 não tenha alterado a proliferação das células da granulosa de folículos antrais em cultivo (BURATINI et al., 2007), não se pode descartar essa função em folículos pré-antrais.

A constante presença do FGF-10 em todos os tipos foliculares ao longo da gestação, também é compatível com seu eventual envolvimento no controle do processo de apoptose. Embora especulativa, essa possível ação anti-apoptótica é sugerida por estudos em que o FGF-10 promoveu proteção a danos causados por estresse oxidativo em epitélio alveolar de ratos (UPADHYAY et al., 2004).

O FGF-10 pode ainda estar envolvido no controle do remodelamento da matriz extracelular, processo importante durante o desenvolvimento ovariano fetal (ROBINSON et al., 2001). De fato, o FGF-10 promoveu ativação de indutores de plasminogênio e de metaloproteinases na placenta humana no primeiro trimestre de gestação, o que demonstra seu envolvimento no processo de remodelamento de matriz extracelular (ANTEBY et al., 2004). A imunolocalização do FGF-10 nas células foliculares e, em menor grau, nos fibroblastos do estroma ovariano, condiz com sua

possível participação na regulação do remodelamento de matriz extracelular durante o desenvolvimento ovariano fetal.

Além das ações já sugeridas, a presença da proteína FGF-10 em vasos sanguíneos no ovário fetal sugere o seu envolvimento no processo de angiogênese. Esses dados são reforçados pela ação estimulatória do FGF-10 sobre o crescimento de células da musculatura lisa de vasos cultivados (ONDA et al., 2003). Essa possível participação condiz com a forte imunomarcção na musculatura lisa de vasos sanguíneos de maior calibre observada no presente estudo.

Em suma, o presente trabalho indica a participação do FGF-10 na regulação do desenvolvimento ovariano pré-antral, conforme sugerido por BURATINI et al. (2007), que detectaram expressão do RNAm do FGF-10 em folículos primordiais, primários e secundários. A associação temporal entre o aumento da expressão gênica do FGF-10 e o surgimento de folículos antrais jovens indica seu envolvimento também na regulação da foliculogênese antral inicial. No entanto, estudos funcionais são necessários para o melhor entendimento sobre as funções desempenhadas pelo FGF-10 nos mecanismos reguladores da foliculogênese e do desenvolvimento ovariano fetal.

Os padrões de expressão observados no presente trabalho, em conjunto com resultados anteriores (BURATINI et al., 2007), indicam a participação do FGF-10 no controle parácrino da diferenciação das células da granulosa de folículos antrais e pré-antrais (Figura 23).

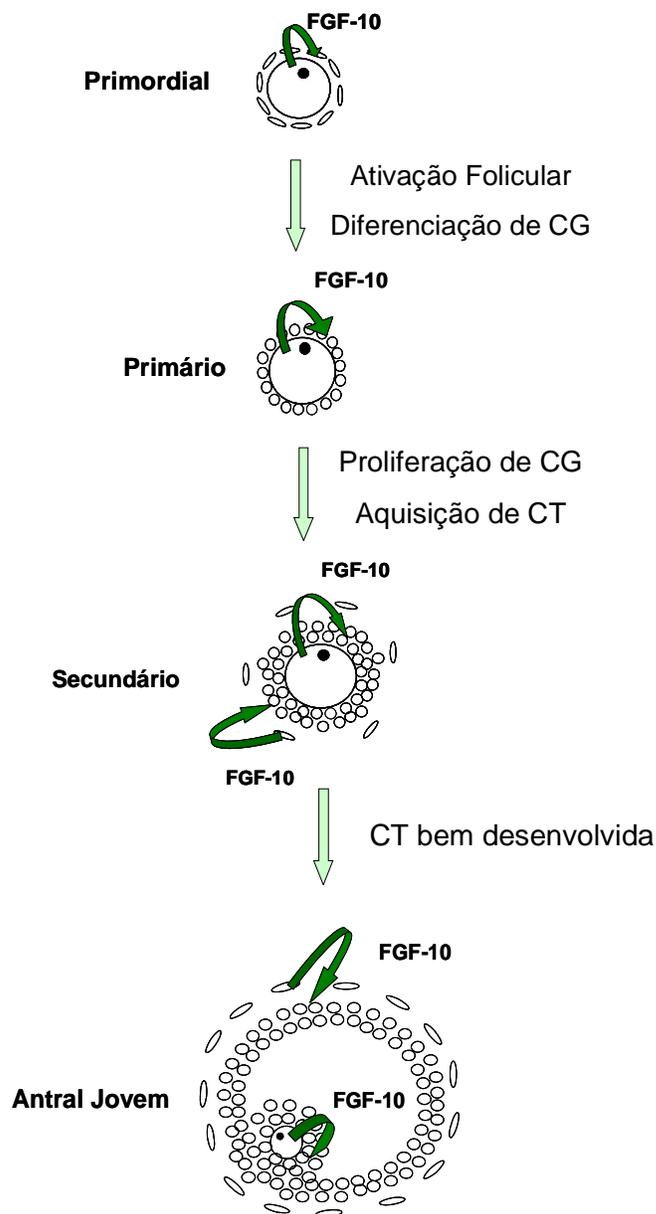


Figura 23. Modelo hipotético das ações mediadas pelo FGF-10 entre os diferentes tipos celulares dos folículos pré-antrais e antrais. A expressão folicular de FGF-10 seria inicialmente proveniente do oócito de folículos primordiais e primários e teria como alvo o seu receptor, o FGFR-2b, presente nas células da granulosa. Posteriormente, nos folículos secundários e antrais jovens, as células da teca também assumiriam a produção de FGF-10, e atuariam conjuntamente com o oócito na indução da diferenciação das células da granulosa.

7. CONCLUSÕES

→ A expressão gênica do FGF-10 está presente ao longo do desenvolvimento ovariano em fetos bovinos.

→ A expressão gênica do FGF-10 aumenta ao longo do desenvolvimento ovariano fetal em bovinos.

→ O padrão da expressão gênica do FGF-10 está associado à dinâmica folicular durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. O aumento do RNAm do FGF-10 coincide com o aparecimento dos folículos antrais jovens e maior desenvolvimento da camada da teca.

→ A proteína FGF-10 está presente nas células germinativas primordiais, oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários durante todo o desenvolvimento ovariano, e em células da teca de folículos secundários e antrais jovens.

→ Em conjunto, os resultados deste trabalho sugerem a participação do FGF-10 no controle da foliculogênese durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M. H., BENECHCHI, E., CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v.121, p. 647-653, 2001.
- ANTEBY EY, NATANSON-YARON S, HAMANI Y, SCIAKI Y, GOLDMAN-WOHL D, GREENFIELD C, ARIEL I, YAGEL S. Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. V. 119p.:27-35. 2005
- ASAKAI, R., SONG, S., ITOH, N., YAMAKUNI, T., TAMURA, K., OKAMOTO, R. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.104, p.75-80, 1994.
- 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.
- BELLUSCI S, GRINDLEY J, EMOTO H, ITOH N, HOGAN BL. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. **Development**. V. 124(23), p. 4867-4878, 1997.

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.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-71, 1997.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 11-18, 2002.

BURATINI, J. Jr ; PINTO, Maicon Gaissler Lorena ; CASTILHO, Anthony César Souza ; AMORIM, Renée L ; GIOMETTI, Ines Cristina ; CAO, Mingju ; NICOLA, Edmir S ; PRICE, Christopher A . Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles **Biology of Reproduction**, , 2007.

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, 2005.

CASTILHO AC, GIOMETTI IC, BERISHA B, SCHAMS D, PRICE CA, AMORIM RL, PAPA PC, BURATINI J JR.Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in the bovine corpus luteum.

Mol Reprod Dev. Vol.75(5),p. 940-945, 2008.

CREUZET, C., LOEB, J., BARBIN, G. Fibroblast growth factors stimulates protein tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase activity in primary cultures of hippocampal neurons. **J. Neurochem.**, v.64, p.1541-7, 1995.

- 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.
- DERRAR, N. PRICE,C.A, SIRARAD, M.A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. **Theriogenology**, v. 54, p. 587-598, 2000.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J Anim Sci.** v. 25, p. 800-805, 1966.
- ERICKSON, G.F. Role of growth factors in ovary organogenesis. **J.Soc.Gynecol. Investig.** V. 8, p. S13-S16, 2001.
- ESWARAKUMAR VP, LAX I, SCHLESSINGER J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.16(2), p.139-149,2005.
- FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.127-39, 1994.
- FORTUNE, J.E., EPPIG, J.J. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. **Endocrinology**, v. 105, p. 760-768, 1979.
- GOSDEN R.G., BOWNES, M. Cellular and molecular aspects of oocyte development. GRUDZINSKAS J.G., YOVICH J.L. (eds.), **Gametes: the oocyte.** Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.23-53.
- GOSPODAROWICZ, D., PLOUET, J., FUJII, D.K. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. **Endocrinology**, v.125, p.1266-76, 1989.

GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I., WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1322-8, 2000.

HSUEH, A. J. W., MCGEE, E. A., HAYASHI, M., HSU, S. Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.163, p.95-100, 2000.

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.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends 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, Y., KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification of FGF-25. **Int. J. Mol. Med**. V.16(4), p.767-770, 2005.

KIM, I., MOON, S., YU, K., KIM, U., KOH, G.Y. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1518, p.152-6, 2001.

KOSMAN J, CARMEAN N, LEAF EM, DYAMENAHALLI K, BASSUK JA. Translocation of fibroblast growth factor-10 and its receptor into nuclei of human urothelial cells. **J Cell Biochem**. V.102,p.769-785, 2007.

- 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.
- MCGEE, E. A., CHUN, S. Y., LAI, S., HE, Y., HSUEH, A. J. W. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth and differentiation of preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 732-738, 1999.
- 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.
- 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.
- NILSSON, E., SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 8, p. s17-s20, 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.
- WESCHE J, MAŁECKI J, WIEDŁOCHA A, SKJERPEN CS, CLAUS P, OLSNES S.FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus.**J Biol Chem** .v. 81,.405-12,006

ONDA M, NAITO Z, WANG R, FUJII T, KAWAHARA K, ISHIWATA T, SUGISAKI Y.

Expression of keratinocyte growth factor receptor (KGFR/FGFR2 IIIb) in vascular smooth muscle cells. **Pathol Int.** v. 53(3), p. 127-132, 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.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S.

Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. **J. Biol. Chem.**, v.275, p. 39523-8, 2000.

PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Kit ligand / stem cell factor induces primordial follicle

development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, p.4262-71, 1999.

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 Res.* v. 29(9), 45, 2001.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle.

Theriogenology, v. 55, p.1193-210, 2001.

PUSCHECK, E.E., PATEL, Y., RAPPOLEE, D.A. Fibroblast growth factor receptor

(FGFR-4), but not FGFR-3c is expressed in the pregnant ovary. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.132, p.169-76, 1997.

ROBINSON LL, SZNAJDER NA, RILEY SC, ANDERSON RA. Matrix metalloproteinases

and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. **Mol Hum Reprod.** vol.7, p. 641-648, 2001.

RUBIN, J.S., BOTTARO, D.P., CHEDID, M., MIKI, T., RON, D., CHEON, H.G., TAYLOR, W.G., FORTNEY, E., SAKATA, H., FINCH, P.W., LAROCHELLE, W.J. Keratinocyte growth factor. **Cell Biol. Int.**, v.19, p.399-411, 1995.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v.24, p.77-92, 1983.

Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biol Reprod.** V. p.34-50, 2002.

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.

SILVA, J.R.V., THARASANIT, T., TAVERNE, M.A.M., VAN DER WEIJDEN, G.C., SANTOS, R.R., FIGUEIREDO, J.R., VAN DEN HURK, D.R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology** **189**, p.113–125, 2006.

SLEEMAN, M., FRASER, J., McDONALD, M., YUAN, S., WHITE, D., GRANDISON, P., KUMBLE, K., WATSON, J.D., MURISON, J.G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. *Gene*, v.271, p.171-182, 2001.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, p. 1-11, 2005.

TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p. 777-82, 2001.

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.

UPADHYAY D, PANDURI V, KAMP DW. Fibroblast growth factor-10 prevents asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 32(3), p. 232-238, 2004.

VALVE, E., PENTTILÄ, T., PARANKO, J., HÄRKÖNEN, P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development.

Biochem. Biophys. Res. Commun., v.232, p.173-7, 1997.

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.

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.

WANDJI, S.A., PELLETIER, G., SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v.47, p.807-13, 1992.

WARE, L., MATTHAY, M.A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v.282, p. 924-940, 2002.

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.

YANG MY, FORTUNE JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. **Mol Reprod Dev**.v.74(9),p.1095-104, 2007.