

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FATOR DE CRESCIMENTO
FIBROBLÁSTICO 8 (FGF8, FGF17 E FGF18) E DOS RECEPTORES DE FATORES DE
CRESCIMENTO FIBROBLASTICO (FGFRs) DURANTE O DESENVOLVIMENTO E
REGRESSÃO DO CORPO LÚTEO BOVINO**

DIEGO MARCONDES GUERRA

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior

Botucatu - SP

2010

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FATOR DE CRESCIMENTO
FIBROBLÁSTICO 8 (FGF8, FGF17 E FGF18) E DOS RECEPTORES DE FATORES DE
CRESCIMENTO FIBROBLASTICO (FGFRs) DURANTE O DESENVOLVIMENTO E
REGRESSÃO DO CORPO DO LÚTEO BOVINO**

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 Júnior

Botucatu - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. E TRAT. DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU -
UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Guerra, Diego Marcondes.

Expressão dos membros da subfamília do fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF8, FGF17 e FGF18) e dos receptores de fatores de crescimento fibroblástico (FGFRs) durante o desenvolvimento e regressão do CL bovino / Diego Marcondes Guerra. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista;
Instituto de Biociências de Botucatu, 2010

Orientador: José Buratini Júnior

Assunto Capes: 21001006

1. Farmacologia. 2. Bovino – Crescimento. 3. Bovino –
Melhoramento genético.

Palavras-chave: Bovino; CL; Expressão gênica; Fator de
Crescimento Fibroblástico.

*Aos meus pais José Luiz e Lia Mara
por tudo que fizeram, pelos verdadeiros ensinamentos e
principalmente pela alegria que conduzem a vida.*

*À minha noiva e futura esposa Daniele
que me ampara e que me fortalece.
Obrigado pela dedicação absoluta.*

*A família Marcondes Guerra
(aos meus avós Rúbio, Terezinha,
la, José Marcondes, aos 17 tios e 13 primos) pela eterna presença.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus e a outros amigos**, por iluminar o meu caminho e por me manter forte diante das dificuldades;

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Buratini Jr.** pelo exemplo de profissional e dedicação nestes 4 anos de convivência;

Ao **Dr. Christopher A. Price** da Universidade de Montreal pela enorme paciência e principalmente pelos ensinamentos transmitidos;

Aos membros da banca: **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa** e **Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira**, pelos ensinamentos e por fazer parte deste momento.

Ao **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros** do Departamento de Farmacologia (Unesp-Botucatu), pela amizade e consideração;

À **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa**, pela realização dos experimentos de imunohistoquímica e pela prontidão em ajudar sempre que necessário;

Aos amigos e sempre professores **Cabral** e **Adauto**, por terem começado isso tudo;

Às minhas “irmãs” que sempre estarão comigo **Bruna** e **Stefânia**;

Aos meus inseparáveis amigos (Família) de Poços de Caldas, **Alexandre, Bruninho, Caco, Cíntia, Cris, Daniel, Diogo, Dudu, Josi, Lídia, Talita, Victor** e **Viviane**;

A **Família Satapra (Rafa, Dé, Eduardo e Léo)**, por me acolher, por serem fundamentais e que sempre ficarão comigo;

Aos “velhos” e grandes amigos de lab Bura **Anthony, Mari, Paula** e **Isabela** responsáveis pelos ensinamentos que levarei adiante;

Aos “novos” e também grandes amigos de lab Bura **Ester, Paula Fernanda, Felipe** e **Rúbia**.

Aos amigos do lab *Ciro*, **Cíntia**, **Fernanda**, **Isabeli**, **Janahí**, **José Renato**, **“Pablo”**, **Pegorer**, **Rafa**, **Raquel**, **Ronaldo**, **Vinícius** pelo companheirismo e boas risadas;

Ao **Dr. Dieter Shams** e **Dr. Bajram Berisha**, pela contribuição nos experimentos *in vivo* envolvendo os FGFs no CL bovino.

Aos professores e amigos do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do Instituto de Biociências - IBB - UNESP - Botucatu, pelos agradáveis momentos de convivência, por tornar o aprendizado mais divertido;

Aos professores e amigos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade e colaboração;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, do Departamento de Física e Biofísica e do Departamento de Farmacologia, em especial, **Janete**, **Cris**, **Paulão**, **Luís** e **Luciana** (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), pela amizade e apoio;

À **Luciene**, **Luciana** e **Herivaldo** da pós-graduação, pelas inúmeras vezes que me ajudaram e pela atenção dedicada no dia-a-dia;

Aos proprietários e funcionários do Frigorífico Frigo[®] de Lençóis Paulista-SP, pelo apoio à pesquisa;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa no meu mestrado.

Aos que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1. Desenvolvimento do CL.....	21
3.2. Controle do desenvolvimento luteínico	22
3.3. O sistema FGF	24
3.3.1. Subfamília do FGF8	27
3.3.2. O sistema FGF no desenvolvimento luteínico	29
4. REFERÊNCIAS	33
5. ARTIGO PUBLICADO	39
Abstract	40
Introduction	40
Materials and Methods	
<i>Tissues</i>	42
<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	43
<i>Immunohistochemistry</i>	44
<i>Statistics</i>	44
Results.....	45
Discussion	48
References	50
6. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	54
Resumo	55
Introdução.....	56
Materiais e Métodos	
Experimento 1: Expressão do RNAm do FGF8, 17, 18 e de seus receptores (FGFR3C e FGFR4) durante o desenvolvimento luteínico	
<i>Obtenção de corpos lúteos</i>	58
<i>Extração de RNAm total e transcrição reversa</i>	59
<i>Expressão gênica por PCR em tempo real</i>	59
<i>Imunohistoquímica</i>	61

Experimento 2: Expressão do RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 durante a luteólise induzida.

<i>Obtenção de corpos lúteos</i>	62
<i>Extração de RNAm total e transcrição reversa</i>	63
<i>Expressão gênica por PCR em tempo real</i>	63
<i>Análise da expressão gênica por PCR em tempo real</i>	64
Análise estatística.....	64
Resultados.....	65
Discussão	73
Referências.....	76
7. CONCLUSÕES FINAIS	79

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de ESWARAKUMAR et al. (2005) – **(Página 25)**

Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs, adaptado de ESWARAKUMAR et al. (2005). **(Página 26)**

Artigo publicado

Fig 1. FGFR mRNA expression in bovine CL at different stages of development. Representative samples for each stage of CL development are shown in the composite gel. Numbers of PCR cycles were 32, 30 and 35 for FGFR1B, FGFR1C and FGFR2C, respectively. NC: negative PCR control (water replacing cDNA). PC: positive PCR control (fetal liver for FGFR1B and FGFR1C and fetal brain for FGFR2C). Amplicon sizes were 136, 125, 139 and 850 base pairs (bp) for FGFR1B, FGFR1C, FGFR2C and GAPDH, respectively. **(Página 45)**

Fig 2. FGFR mRNA abundance in bovine CL at different stages of development. CL were collected from the abattoir and classified as corpora hemorrhagica (stage I), developing (stage II), developed (stage III) and regressed CL (stage IV). Gene expression was measured by semiquantitative PCR, and data expressed relative to the housekeeping gene, GAPDH. Number of CL analyzed in each group is given in parentheses. Data are means \pm SEM. **(Página 46)**

Fig 3. Immunohistochemical localization of FGFR1 and FGFR2 protein in bovine CL. Ovaries were obtained from an abattoir and fixed in paraformaldehyde for immunohistochemistry. FGFR1 (Panel A; bar=30 μ m) and FGFR2 (Panel B; bar=50 μ m) were localized to small (white arrows) and large (black arrows) luteal cells. FGFR1 was also detected in cells putatively identified as endothelial/stromal cells (gray arrow). No staining was observed in the absence of primary antibody (Panel C; bar=30 μ m). **(Página 47)**

Artigo para publicação

Figura 1. Modelo matemático da expressão relativa por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em uma amostra em relação à amostra controle e à expressão do gene endógeno. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do 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 64)**

Figura 2. Expressão dos RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 quantificada por PCR em tempo real em corpos lúteos bovinos ao longo do desenvolvimento. **(Página 65)**

Figura 3. Abundância relativa do RNAm durante a luteólise induzida em bovinos. A luteólise foi induzida nos CLs maduros pela injeção de PGF2 α e foram coletados por ovariectomia em tempos determinados. O RNAm do FGF18, FGFR3C and FGFR4 foi mensurado por RT-PCR em tempo real e média \pm EPM são expressão em relação ao gene endógeno CYC-A ($P < 0.05$). **(Página 68)**

Figura 4. Imunolocalização do FGF18 no CL bovino (A) e controle negativo (B). FGF18 foi detectado nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) e em vasos sanguíneos (seta cinza). **(Página 69)**

Figura 5. Imunolocalização do FGFR3 no CL bovino. O FGFR3 foi detectado nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) nos estádios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), e em vasos sanguíneos (seta cinza). Controle negativo para imunolocalização do FGFR3 (E). **(Página 70)**

Figura 6. Imunolocalização do FGFR3 no CL bovino. Foto ilustrativa da marcação perinuclear do FGFR3 (setas pretas). **(Página 71)**

Figura 7. Imunolocalização do FGFR4 no CL bovino. O FGFR4 foi detectado fracamente nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) nos estádios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D). Controle negativo para imunolocalização do FGFR4 (E). **(Página 72)**

LISTA DE TABELAS

Artigo para publicação

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores. **(Página 60)**

Tabela 2. Média de Cts (ciclos threshold) e amostras positivas para cada gene nos diferentes estádios do desenvolvimento luteínico. **(Página 66)**

LISTA DE ABREVIATURAS

µg micrograma

µl microlitro

µM micromolar

A “antisense”

ANOVA análise de variância

cDNA ácido desoxirribonucléico complementar

CL corpo lúteo

ct ciclo “threshold”

CYC-A ciclofilina A

DNase enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico

ECs células endoteliais

E2 estrógeno

FGF fator de crescimento fibroblástico

FGFb fator de crescimento fibroblástico básico

FGF2 fator de crescimento fibroblástico 2

FGF7 fator de crescimento fibroblástico 7

FGF8 fator de crescimento fibroblástico 8

FGF10 fator de crescimento fibroblástico 10

FGF17 fator de crescimento fibroblástico 17

FGF18 fator de crescimento fibroblástico 18

KGF1 fator de crescimento dos queratinócitos 1

KGF2 fator de crescimento dos queratinócitos 2

FGFR1B receptor 1b para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR1C receptor 1b para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR2B receptor 2b para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR2C receptor 1b para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR3B receptor 1b para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR3C receptor 3c para o fator de crescimento fibroblástico

FGFR4 receptor 4 para o fator de crescimento fibroblástico

FSH hormônio folículo estimulante

LH hormônio luteinizante

M molar

mg miligrama

ml mililitro

mM milimolar

ng nanograma

P4 progesterona

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”

GUERRA, D.M. **Expressão dos membros da subfamília do FGF8 (FGF8, FGF17 e FGF18) e dos receptores de fatores de crescimento fibroblástico (FGFRs) durante o desenvolvimento e regressão do corpo lúteo bovino.** Botucatu, 2010. Dissertação (Mestrado – Ciências Biológicas – Farmacologia) – Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

A compreensão dos mecanismos moleculares controladores do desenvolvimento, função e regressão do CL bovino é necessária para o aprimoramento da manipulação hormonal ovariana. Fortes evidências sugerem o envolvimento de fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) na regulação do crescimento e regressão do CL. “Splicing” alternativo de 4 genes formam sete subtipos de FGFRs com afinidade variável por diferentes FGFs. Os membros da subfamília do FGF8 (FGF8, 17 e 18) ativam eficientemente o FGFR3C e 4 e podem atuar em cooperação nos tecidos que expressão estes receptores. O objetivo deste trabalho foi determinar o padrão de expressão dos FGFRs e dos membros da subfamília do FGF8 no CL bovino (CL). Os CLs foram obtidos de ovários de abatedouro e classificados em 4 estádios de desenvolvimento (estádio/1= corpo hemorrágico, estágio/2= CL em desenvolvimento, estágio/3= CL maduro/início da luteólise funcional e estágio/4= luteólise estrutural). O RNAm foi mensurado por PCR semiquantitativo e a proteína localizada por imunohistoquímica. A expressão do RNAm codificante das isoformas ‘B’ e ‘C’ de FGFR1 e FGFR2 foi detectada no CL bovino por PCR associado à eletroforese e foi acompanhada pela localização da proteína nas pequenas e grandes células luteínicas. A expressão do RNAm do FGFR1C e 2C não variou durante o desenvolvimento luteínico, distintamente a expressão do FGFR1B aumentou no estágio 3. Embora os FGFRs 3B, 3C e 4 tenham sido detectados de forma inconsistente por PCR associado à eletroforese, o RNAm do FGFR3C e FGFR4 foram detectados por PCR em tempo real em todos os estádios do desenvolvimento luteínico. O RNAm do FGF18 foi detectado por PCR em tempo real em todos os estádios do desenvolvimento luteínico e sua abundância do RNAm do FGF18 foi maior no estágio 3 comparado com os estádios 1, 2 e 4. Em contraste, os RNAm do FGF8 e 17 foram detectados fracamente no CL bovino. O padrão de expressão dos RNAm do

FGF18, FGFR3C e FGFR4 foi investigado durante a luteólise induzida. Para tanto, fêmeas bovinas adultas (*Bos Taurus*-Vacas holandesas leiteiras) receberam injeção de PGF2 α , CLs foram coletados por ovariectomia transvaginal às 0, 0,5, 2, 4, 12, 24, 48 e 64 horas após o tratamento e a expressão dos RNAm foi mensurada por RT-PCR em tempo real. A expressão do RNAm do FGF18 e FGFR4 não variou durante a luteólise induzida. No entanto, a expressão do FGFR3C alcançou valores máximos 4 horas após a injeção de PGF2 α , após que diminui a valores semelhantes ao controle (0 hora). A análise imunohistoquímica revelou a presença do FGF18, FGFR3 e FGFR4 em pequenas e grandes células luteínicas e também em vasos sanguíneos. O recepto FGFR3 foi detectado no citoplasma e núcleo ao longo do desenvolvimento luteínico. Sendo assim, o padrão de expressam do FGF18 e dos receptores sugere participação no controle da diferenciação luteal, particularmente durante a luteólise funcional. A localização da proteína do FGF18 e do FGFR3 em vasos sugere a participação destes genes no controle da angiogênese e da vascularização do CL bovino.

Palavras chave: bovino; CL; expressão gênica; fator de crescimento fibroblástico.

GUERRA, D.M. **Expression of FGF8 subfamily (FGF8, FGF17 and FGF18) and of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) during development and regression of the bovine corpus luteum.** Botucatu, 2010. Dissertação (Mestrado – Ciências Biológicas – Farmacologia) – Instituto de Biociências, IBB, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

The molecular mechanisms controlling the development, function and regression of the bovine corpus luteum are necessary for the improvement of reproductive biotechnologies. Strong evidence suggests the involvement of fibroblast growth factors (FGFs) in the regulation of growth, and regression of the corpus luteum (CL). Alternative splicing of 4 genes give rise to seven subtypes of FGFRs with varying affinity for different FGFs. FGF8 subfamily members (FGF8, 17 and 18) efficiently activate FGFR3C and FGFR4 and may act in cooperation in tissues expressing these receptors. The objective of the present study was to determine the pattern of expression of FGF8 subfamily members and FGFRs in the bovine CL. Bovine CLs were obtained from abattoir ovaries and classed into four stages of development (stage 1= corpus hemorrhagicum, stage 2= developing CL, stage 3= mature/early functional luteolysis CL, and stage 4= structural luteolysis). Expression of mRNA was measured by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by gel analysis (FGFR1-4) and real time RT-PCR (FGF8 subfamily members, FGFR3C and FGFR4) and proteins were localized by immunohistochemistry. Expression of mRNA encoding 'B' and 'C' spliced forms of FGFR1 and FGFR2 was readily detected in the bovine CL and was accompanied by isoform non-specific protein localization. FGFR1C and FGFR2C mRNA expression did not vary throughout CL lifespan, whereas FGFR1B was upregulated in the mature CL (stage III). FGFR3B, FGFR3C and FGFR4 expression was inconsistent in the bovine CL as assessed by PCR associated with gel analysis. FGF18, FGFR3C and FGFR4 mRNA was detected by real time PCR in all four developmental stages, and FGF18 mRNA abundance was higher in stage 3 (2.89 ± 0.05 ; mean \pm SEM) compared with stages 1 (0.3 ± 0.27), 2 (0.56 ± 1.27) and 4 (0.99 ± 0.32). The mRNA expression pattern of FGF18, FGFR3C and FGFR4 was assessed during induced luteolysis. In contrast, FGF8 and FGF17 mRNA expression was weakly and inconsistently

detected in the bovine CL. Adult cows (*Bos Taurus*-Holstein Friesian) were injected with the PGF2 α and CL were collected by transvaginal ovariectomy at 0, 0.5, 2, 4, 12, 24, 48, and 64 hr after treatment (n=5/time point), and mRNA abundance was measured by real-time RT-PCR. FGF18 and FGFR4 mRNA expression did not change during induced luteolysis, whereas FGFR3C mRNA abundance peaked at 4 hours after PGF2 α injection and was significantly decreased 24 hours post-treatment in relation to peak levels. Immunohistochemical analysis clearly revealed the presence of FGF18 and FGFR3 in small and large do CL cells and in blood vessels, whereas FGFR4 protein was weakly and inconsistently detected. FGFR3 was localized to the cytoplasm and also to the nucleus of large and small do CL cells. In conclusion, the expression patterns of FGF18 and its receptors suggest their participation in the control of do CL differentiation, particularly in the mature CL and during functional luteolysis. The localization of FGF18 and FGFR3 proteins to blood vessel suggests they may play roles in the control of angiogenesis and vascularization in the bovine CL.

Key words: Gene expression; fibroblast growth factors (FGFs); corpora lutea; bovine

1. INTRODUÇÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares controladores do desenvolvimento, função e regressão do CL bovino é necessária para o aumento da eficiência reprodutiva. O controle da função luteínica pela utilização de agentes luteolíticos é fundamental para as estratégias hormonais que manipulam a atividade ovariana objetivando a superestimulação e sincronização da ovulação. O CL é uma glândula transiente caracterizada por rápida remodelagem, crescimento, diferenciação e morte de células provenientes da granulosa, teca, capilares e fibroblastos (CHANING, 1986; O'SHEA et al., 1989). A formação, esteroidogênese, manutenção e regressão do CL estão entre os mais significativos eventos na reprodução de mamíferos. A função do CL é caracterizada pela produção de P4 e todas as características estruturais e funcionais desta glândula transitória são voltadas para este fim. Devido à importância do CL para a manutenção da gestação, os mamíferos desenvolveram mecanismos controladores da liberação de P4 em níveis adequados durante a gestação. Sabe-se que fatores luteínicos desempenham um papel essencial na regulação do desenvolvimento e síntese de P4. Dentre estes fatores envolvidos no controle do desenvolvimento e regressão do CL incluem-se os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) e seus receptores (FGFRs).

Os FGFs medeiam respostas celulares pela ativação de uma variedade de receptores tirosina kinase codificados por quatro genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4). "Splicing" alternativo dos genes FGFR1, 2 e 3 dá origem às isoformas 'B' e 'C'. Dos diversos membros da família dos FGFs, (FGF2, FGF7 e FGF10) já foram investigados no tecido luteínico. O FGF2 e o FGF7 estão envolvidos especialmente na angiogênese luteal, com alta expressão do RNAm em decorrência da estimulação pelo LH durante o período de luteinização (BERISHA et al., 2006a; BERISHA et al., 2006b). Recentemente, relatamos a expressão do FGF10 e do FGFR2B durante o desenvolvimento do CL e luteólise induzida (CASTILHO et al., 2008). A expressão do ligante não foi regulada ao longo dos estádios do desenvolvimento luteínico, enquanto que a expressão do receptor diminuiu no início da

luteólise funcional, o que sugere um papel específico para o FGFR2B na apoptose e no remodelamento tecidual do CL em regressão. Além do FGFR2B, a literatura relata a expressão do FGFR1C e FGFR2C no final do desenvolvimento folicular e início da formação do CL (BERISHA et al., 2006a). Em estudos anteriores, detectamos a expressão do FGF8, FGF17 e do FGF18, ambos capazes de ativar o FGFR3C e o FGFR4, em células da teca e da granulosa de folículos antrais (BURATINI et al., 2005). Contudo, nada se conhece sobre a expressão luteal dos membros da subfamília do FGF8 (FGF8, FGF17 e FGF18). A análise do padrão de expressão em estádios luteínicos específicos pode contribuir para esclarecer a participação dos FGFs e de seus receptores na regulação do desenvolvimento e regressão do CL em bovinos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

O presente estudo objetivou:

- 1- Investigar a expressão do FGF8, 17 e 18 e dos FGFRs (FGFR1-4) em corpos lúteos bovinos.

Hipóteses:

- a) Células luteínicas expressam os RNAm codificadores dos membros da subfamília do FGF8 e os FGFRs.
- b) A expressão do RNAm dos FGFs e FGFRs é regulada ao longo do desenvolvimento luteínico.
- c) As respectivas proteínas estão presentes no CL.

- 2- Investigar a expressão do RNAm do FGF8, 17 e 18 e dos FGFRs (FGFR1-4) em corpos lúteos bovinos durante a luteólise induzida.

Hipótese

- a) A PGF2 α regula a expressão dos FGFs e FGFRs.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Desenvolvimento do CL

O desenvolvimento luteínico tem início com a ovulação de um folículo dominante após ter cumprido as fases pré-antral e antral do seu desenvolvimento. O pico de LH além de estimular o crescimento e maturação folicular final, induz a ovulação e formação do CL. Durante a ovulação, o ócito e o fluido folicular são liberados do folículo criando uma cavidade para a formação do CL (JUENGEL & NISWENDER, 1999). O remodelamento tecidual marca o início do desenvolvimento luteínico. O desenvolvimento dos novos vasos sanguíneos é de fundamental importância para o processo de formação e regressão do CL (AUGUSTIN et al., 1995).

O LH possui papel na modulação do desenvolvimento e função do CL. O pico de LH durante a ovulação é um dos fatores estimulatórios na expressão de FGF2 folicular, sugerindo que o LH promove o estímulo inicial para angiogênese luteal (ROBINSON et al., 2007). Essa função é compatível com relatos recentes em que o LH mostrou-se capaz de promover o desenvolvimento de células endoteliais em sistema de cultura composto por células luteínicas esteroidogênicas, endoteliais, fibroblastos e pericitos, reforçando o seu papel na angiogênese (ROBINSON et al., 2008).

O CL é uma glândula heterogênea composta de pequenas e grandes células esteroidogênicas, células imunes, fibroblastos e pericitos (STOCCO et al., 2007). A angiogênese *in vivo* envolve a comunicação entre estes diferentes tipos celulares. Estas células possuem diferenças na morfologia e nas características endócrinas. A interação entre os vários tipos celulares é essencial na manutenção da saúde e na função do CL (DAVIS et al., 2003; NELSON et al., 1992; SANDERS et al., 1996;). Em ruminantes e roedores, as pequenas e grandes células luteínicas diferem-se em alguns parâmetros como, taxa de produção de P4, resposta a diferentes hormônios e na estimulação de seus segundos mensageiros (NELSON et al., 1992). As células esteroidogênicas são originadas por diferenciação das células foliculares remanescentes após a ovulação.

A regulação molecular da angiogênese no CL é complexa e conta com uma lista de fatores de ação local como o FGFb, VEGF e angiopoetinas. Recentemente, YAMASHITA et al., (2008) reforçaram o envolvimento de alguns fatores no desenvolvimento do CL em bovinos usando anticorpos específicos anti FGFb e VEGF com o objetivo de neutralizar suas ações no tecido luteínico. Os resultados demonstraram que a neutralização local de FGFb e VEGF alterou o comportamento de genes controladores da angiogênese e síntese de P4. Além disso, a neutralização local interferiu diretamente no balanço de ANPT1/ANPT2. As angiopoetinas (ANPT-1 e ANPT-2) e seus receptores tirosina quinase, Tie1 e Tie2 devem ter um papel na modulação da angiogênese e na regressão dos vasos sangüíneos no CL (GOEDE et al., 1998). A ANPT-1 é necessária por manter e estabilizar os vasos sangüíneos, enquanto a ANPT-2 age como um antagonista natural para a ANPT-1 controlando suas ações. As ANPTs competem pelo mesmo receptor, o Tie2. Portanto, a proporção de ANPT-2/ANPT-1 é importante para a estabilidade vascular. Uma alta razão de ANPT-2/ANPT-1 induz a desestabilização dos vasos sangüíneos, o que é pré-requisito para a formação e regressão vascular (SCHAMS & BERISHA, 2004).

A permanência do CL depende da interação entre ovário, hipófise, e os reguladores placentários. Contudo, na ausência da gestação ou por incapacidade do concepto em sinalizar a sua presença, o CL entra em processo de regressão ou luteólise por volta do 14° e 15° dia do ciclo estral comandado por liberação pulsátil de PGF2 α do útero estimulado pela ocitocina e estradiol de origem ovariana (ASSELIN et al., 1998). A regressão do CL não é somente devido à recolocação vascular e tecidual, mas também à morte programada ou apoptose de suas células que é regulada principalmente por membros da família Bcl2 (BONER, 2003).

A luteólise é caracterizada pela queda na capacidade de síntese e secreção de P4 (luteólise funcional), seguida pela involução do tecido e perda das células luteínicas (luteólise estrutural) (KNICKBOCKER et al., 1988; MCGUIRE et al., 1994, MCCRACKEN et al., 1999; NISWENDER et al., 2000; DIAZ et al., 2002).

3.2. O sistema FGF

Os FGFs são proteínas com peso molecular entre 17 e 34 KDa conservadas entre os mamíferos e compartilham de 13 a 71% de homologia na seqüência de aminoácidos (ORNITZ & ITOH, 2001). A família dos FGFs é uma das maiores famílias dos fatores de crescimento composta por 25 membros (FGF 1-25) (KATOH & KATOH, 2005), sendo que 23 FGFs já foram descritos em mamíferos (YAMASHITA et al., 2000). Esses fatores apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos (BASILICO & MOSCATELLI, 1992) e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário regulando a organogênese (THISSE & THISSE, 2005 ZANG). Em tecidos adultos desempenha papel importante na regulação da homeostase, cicatrização e reparo tecidual (FINCH & RUBIN, 2004). Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam potentes atividades neurotróficas e angiogênicas. A biodisponibilidade dessas moléculas parece ser regulada por proteínas carreadoras de fatores de crescimento fibroblástico, as FGFbps, que são responsáveis por liberar os FGFs imobilizados na matriz extracelular (ABUHARBEID et al., 2006).

Cinco genes distintos codificam receptores de alta afinidade que interagem com os membros da família FGF (FGFR1-5) (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Os FGFR1 a 4 codificam receptores do tipo tirosina-quinase localizados na membrana plasmática. 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 (ESWARAKUMAR et al., 2005). A porção extracelular é dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (Ig-like); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. Arranjos transcricionais alternativos (“alternative splicing”) possibilitam a formação de 3 isoformas (A, B e C) do FGFR1, FGFR2 e FGFR3, que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (ORNITZ et al., 1996). Sendo que os domínios D3 geram isoformas funcionais dos tipos B e C, nos FGFR1, 2 e 3 (FGFR1IIB e FGFR1IIC; Figura 1; ESWARAKUMAR et al., 2005). Análise padrão dos transcritos alternativos destes receptores

demonstra que ativação tanto da isoforma “B” quanto da “C” é dependente da linhagem celular. A isoforma B é preferencialmente expressa em tecidos epiteliais, enquanto que a isoforma C é expressa em tecidos mesenquimais (ZANG et al., 2006).

O FGFR5, descoberto mais recentemente, apresenta dois transcritos alternativos: FGFR5 α e β (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Este receptor não apresenta o domínio tirosina quinase intracelular como os outros FGFR, porém os resíduos dos domínios extracelulares importantes para o acoplamento com os ligantes dos FGFs são conservados (SLEEMAN et al., 2001). Estudos de “binding” demonstraram que o FGFR5 tem capacidade de ligação ao FGF2, mas não ao FGF7. No entanto, sua função biológica permanece desconhecida (SLEEMAN et al., 2001).

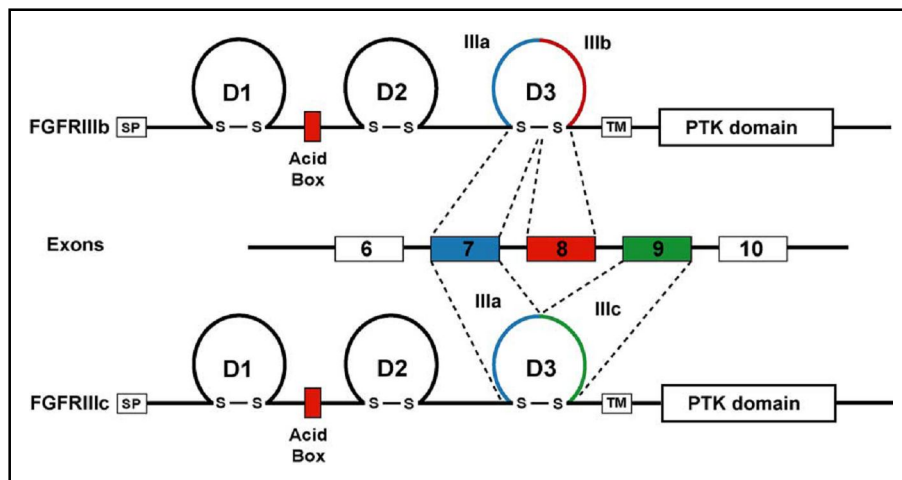


Figura 1. Estrutura dos FGFRs e “splicing” alternativos no domínio extracelular D3 para obtenção das isoformas b e c nos FGFR1, 2 e 3. Domínio PTK (domínio intracelular tirosina quinase). Porção transmembrana (TM). Adaptado de ESWARAKUMAR et al. (2005)

Após interação entre o FGF e o FGFR, ocorre dimerização e trans-fosforilação do receptor para que o sinal seja traduzido em uma resposta biológica (JOHNSON & WILLIAMS, 1993). Além da fosforilação da tirosina, outros sinais de transdução, como o recrutamento da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK), estão envolvidos na geração do efeito proliferativo dos FGFs (CREUZET et al., 1995). A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com heparina ou proteoglicanos (sulfeto de heparina) 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 (substrato do receptor de FGF 2), até os locais de ligação com as tirosinas fosforiladas. Após essa ligação, complexos do tipo Grb2 (proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2) são responsáveis pela ativação da via intracelular, Ras/Raf/MAP quinase (ESWARAKUMAR et al., 2005).

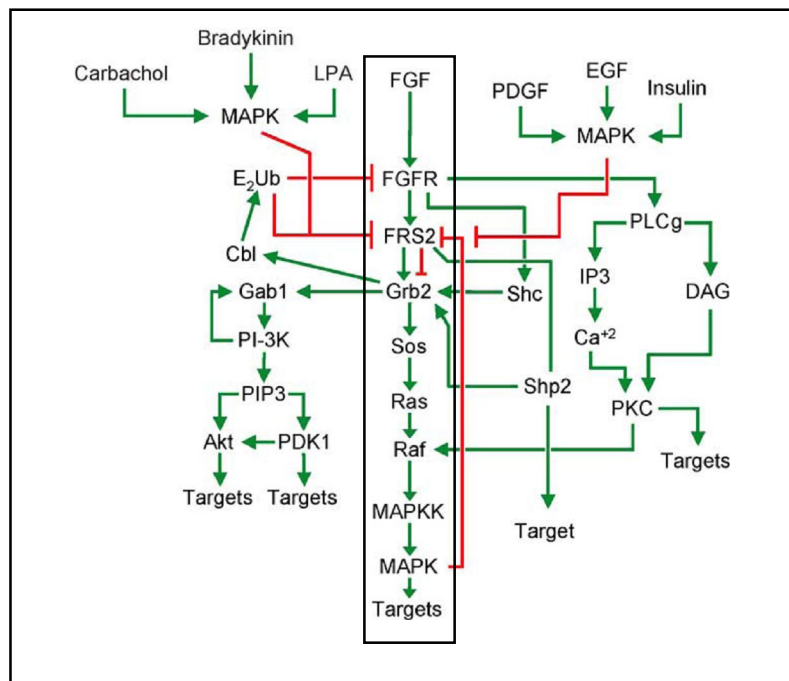


Figura 2. Cascata intracelular (destacada na caixa preta) da ativação de FGFRs por FGFs, adaptado de ESWARAKUMAR et al. (2005).

3.2.1. Subfamília do FGF8

O FGF8, FGF17 e o FGF18 pertencem à subfamília do FGF8, conhecida como família oncogênica fetal (ITOH & ORNITZ, 2004). Membros dessa subfamília apresentam semelhantes seqüências de aminoácidos (HOSHIKAWA et al., 1998; MARUOKA et al., 1998; XU et al., 1999), características bioquímicas incluindo afinidade pelos mesmos FGFRs (ITOH & ORNITZ, 2004) e padrões espaciais de expressão (XU et al., 2000; MARUOKA et al., 1998). O FGF8, FGF17 e o FGF18 ativam preferencialmente os receptores FGFR3C e FGFR4, apresentando ainda afinidade moderada pelo FGFR2C (XU et al., 2000; FORD-PERRISS et al., 2001; ZHANG et al., 2006). Devido à similaridade e especificidade desta subfamília, foi sugerido que esses FGFs tenham aparecido por duplicação de um gene original e que suas funções são redundantes ou cumulativas nos tecidos alvo (XU et al., 1999). Esses fatores de crescimento induzem proliferação e diferenciação celular em diversos tecidos em processos fisiológicos e patológicos (XU et al., 1999; FORD-PERRIS et al., 2001; SHIMOKAWA et al., 2003; HEER et al., 2004; NEZU et al., 2005), ações compatíveis com eventual envolvimento no controle do desenvolvimento folicular.

O FGF 8 foi inicialmente detectado em ovário de ratos (MACARTHUR et al., 1995b) e é especificamente expresso em oócitos de camundongos adultos (VALVE et al., 1997). FGF8 é responsável por estimular a proliferação de células embrionárias (CROSSLEY and MARTIN, 1995) e está conjuntamente relacionado crescimento de tumores (TANAKA et al., 1992; LEUNG et al., 1996; SONG et al., 2000). Análises em RT-PCR semiquantitativo BURATINI et al. (2005a) detectaram a presença do RNAm de FGF8 em folículos primordiais, primários e secundários. Em tecidos fetais humanos, FGF8 foi detectado no pulmão e cérebro, mas não foi encontrada expressão em fígado ou intestino (WU et al., 1997). Em contrapartida, nos tecidos fetais bovinos, foram detectados FGF8 no fígado, mas não no tecido pulmonar. Em tecidos adultos bovinos, FGF8 foi detectado apenas no testículo e ovário. Isto é consistente com estudos de camundongos (MACARTHUR et al., 1995a), mas não com um estudo em ratos (SCHMITT et al., 1996) em que a expressão do FGF8 no coração, cérebro, pulmão e rim também foi descrita.

O FGF17 apresenta semelhanças estruturais e funcionais em relação ao FGF8. A seqüência de aminoácidos é 60% idêntica a do FGF8 e ambos compartilham padrão similar de “splicing alternativo” na região codificadora 5’ (MACARTHUR et al., 1995; XU et al., 1999). No sistema nervoso, o padrão de expressão do FGF17 é semelhante ao do FGF8, o que sugere uma relação funcional entre eles na organização de algumas áreas do cérebro (FORD-PERRIS et al., 2001). No desenvolvimento do cérebro fetal, o FGF17 induz proliferação e direciona o crescimento tecidual (HOSHIKAWA et al., 1998). Em camundongos, a interrupção da sinalização pelo FGF17 diminuiu a proliferação de células precursoras no sistema nervoso (XU et al., 2000) e comprometeu o desenvolvimento cerebelar (FORD-PERRISS et al., 2001). O FGF17 também é expresso no início do desenvolvimento dos membros (MARUOKA et al., 1998), durante a diferenciação de células imaturas progenitoras de osteoblastos (XU et al., 1999). Por ativação do FGFR3C, o FGF17 inibe a proliferação e diferenciação dos condrócitos (NASKI e ORNITZ, 1998). Além disso, o FGF17 é expresso durante o desenvolvimento arterial (XU et al., 1999).

Considerado um fator de crescimento pleiotrópico (múltiplos efeitos de um gene), o FGF18 está envolvido no desenvolvimento de vários sistemas (CORMIER et al., 2005). Primeiramente, ele foi isolado em humanos e camundongos e caracterizado em estudos funcionais que indicaram atividade proliferativa (HU et al., 1998). Posteriormente ele foi detectado em ratos por PCR baseado na homologia e identificado a partir do seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA construída a partir do rim de rato (OHBAYASHI et al., 1998).

Apesar da seqüência de aminoácidos do FGF18 ser altamente semelhante as do FGF8 e FGF17, os padrões temporal e espacial de expressão do RNAm do FGF18 em embriões diferem em relação ao FGF8 e FGF17 (OHBAYASHI et al., 1998). Estudos em camundongos indicam menor expressão do FGF18 no cérebro fetal durante os estádios iniciais do desenvolvimento em comparação ao FGF8 e o FGF17 (XU et al., 2000). Além disso, os locais de expressão predominante também diferem no sistema nervoso (MARUOKA et al., 1998). A atividade proliferativa do FGF18 se estende tanto em tecidos de

origem epitelial quanto mesenquimal, sendo que, no camundongo, os principais órgãos que o expressam são o fígado e intestino delgado (HU et al., 1998). Já em ratos adultos, a expressão do FGF18 foi predominantemente detectada no pulmão (OHBAYASHI et al., 1998). O FGF18 também parece estar associado ao desenvolvimento de tumores, conforme indica a detecção de seu RNAm no câncer de cólon humano (SHIMOKAWA et al., 2003). E na angiogênese de tecidos cardiovasculares atuando como quimioatrativo para migração de células endoteliais, mas sem atividade proliferativa nesse sistema (ANTOINE et al., 2006).

3.2.2. O sistema FGF no desenvolvimento luteínico

O FGF2 foi o primeiro fator angiogênico identificado no ovário, o qual é produzido por células endoteliais e esteroideogênicas luteínicas de ratos, humanos e ruminantes (REYNOLDS & REDMER, 1999). O FGF2 participa do processo de proliferação e motilidade das células endoteliais luteínicas (REYNOLDS & REDMER, 1999; GRAZUL-BILSKA et al., 1995). STIRLING et al. (1990) observaram a expressão gênica do FGF2 em células luteínicas bovinas. A presença do FGF2 no CL bovino foi confirmada por WEZEL et al. (1995) através de imunohistoquímica, tanto no CL funcional quanto em regressão. Neste mesmo estudo a proteína do FGF2 mudou ao longo do desenvolvimento luteínico acompanhado da localização em maior quantidade nas ECs na fase inicial, e exclusivamente nas células luteínicas na fase intermediária de desenvolvimento (SCHAMS et al., 1994).

O FGF1 (FGF ácido) também foi imunolocalizado no CL, porém em menor quantidade que o FGF2 (SCHAMS et al., 1994). Sendo assim, o FGF1 não deve ser um importante fator angiogênico no CL como o FGF2. Além disso, a atividade angiogênica produzida no CL pode ser parcialmente neutralizada pelo anticorpo anti-FGF2, mas não pelo anti-FGF1 (DORAISWAMY et al., 1995a; GRAZUL-BILSKA et al., 1995; RICKE et al., 1995).

O envolvimento do FGF7, alternativamente conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos 1 (KGF1), no controle da fisiologia luteal também já foi evidenciado (SALLI et al., 1998). BERISHA et al. (2006) detectaram expressão gênica do FGF7 durante a

formação do CL. A expressão do RNAm do FGF7 foi significativamente aumentada durante o pico de LH. Sendo assim, relacionada com processos de maturação folicular e formação luteínica. O FGF7 apresenta alta afinidade pelo FGFR2B, que também é chamado de KGFR (IGARASHI et al., 1998, OHUCHI et al., 2000). A expressão gênica do FGFR2B foi detectada em células luteínicas (BERISHA et al., 2006) principalmente durante a luteólise estrutural (CASTILHO et al., 2008).

A expressão gênica do FGF10, também conhecido como KGF2 foi também detectada em todos os estádios do CL bovino (CASTILHO et al., 2008). Uma vez que os receptores para o FGF10 (FGFR2B) são expressos nas células do CL (BERISHA et al., 2004; CASTILHO et al., 2008), estes resultados sugerem o envolvimento do FGF10 na sinalização de mecanismos controladores do desenvolvimento luteínico.

NEUVIANS et al. (2004) relataram aumento da expressão dos FGFRs durante a luteólise de bovinos induzida pela aplicação de PGF2 α , sugerindo a participação dos FGFs no controle da luteólise e o possível envolvimento na modulação da reação inflamatória que se estabelece durante a regressão do CL. Porém, NEUVIANS et al. (2004) não fizeram distinção entre os diferentes tipos de FGFRs.

Até o presente momento, a literatura não dispõe de dados sobre a expressão dos membros da subfamília do FGF8 no CL bovino. Isto, somado às características funcionais desses FGFs descritas em outros tecidos, motivou a realização deste projeto.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABISOGUN, A.O., DAPHNA-IKEN, D., REICH, R., KRANZFELDER, D., TSAFRIRI, A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 756-62, 1988.
- ADAMS, G.P., JAISWAL, R., SINGH, J., MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**. v. 69, p. 72-80, 2008.
- AUGUSTIN, H.G., BRAUN, K., TELEMENAKIS, I., MODLICH, U., KUHN, W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression **An. J. Pathol.**, v. 147, p. 339-51, 1995.
- ASSELIN, E., DROLET, P., FORTIER, M. A. Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F2 alfa production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase 2. **Endocrinol.**, v. 138, p. 4798-4805, 1997.
- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv. Cancer Res.**, v.59, p. 115-65, 1992.
- BERISHA B, SCHAMS D, KOSMANN M, AMSELGRUBER W, EINSPANIER R.. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **J. Endocrinol.**, v. 167:371–382, 2000.
- 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., STEFFL, M., AMSELGRUBER, W., SCHAMS, D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. **Reprod.**, v. 131, p. 319–329, 2006.
- BEARD, A.P., LAMMING G.E. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF release in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 100, p. 469-475, 1994.
- BORNER, C.. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.** v. 39, p. 615-47, 2003.

- BURATINI J, JR., TEIXEIRA AB, COSTA IB, GLAPINSKI VF, PINTO MGL, GIOMETTI IC, BARROS CM, CAO M, NICOLA ES, PRICE CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction.** v. 130, p. 343-350. 2005
- BURATINI, J.JR, PINTO, M.G., CASTILHO, A.C., AMORIN, R.L., GIOMETTI, I.C., PORTELA,V. M., NICOLA, E.S., AND 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.
- CASTILHO, A. C., GIOMETTI, I. C., BERISHA, B., SCHAMS, D., PRICE, C. A., AMORIN, R. L., PAPA, P. C., AND BURATINI, J. JR.. Expression of fibroblast growth factor-10 and its receptor, 259 fibroblast growth factor-2B, in the corpus luteum. **Mol. Reprod. Dev.** v. 75, p. 940-945, 2008.
- DAVIS, J.S., RUEDA, B.R., SPANEL-BOROWSKI, K.. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 10, p. 1-89, 2003.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225-32, 1994.
- DANET-DESNOYERS, G., WETZELS, C., THATCHER, W.W. Natural and recombinant bovine interferon tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 alpha and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. **Reprod. Fertil.**, v. 6, 193-202, 1994.
- DIAZ, F.J., ANDERSON, L.E., WU, Y.L., RABOT, A., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 191, p. 65-80, 2002.
- ESWARAKUMAR, V.P., LAX, I., SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** v. 16, p. 139–149, 2005.
- FORD-PERRISS, M., ABUD, H., MURPHY, M., Fibroblast growth factor in the developing central nervous system, **Clin. Exp. Pharmacol.Physiol.**, v.28, p.493–503, 2001.

- FORTUNE, J.E. selection and maintenance of the dominant follicle: an introduction. *Biol. Reprod.* V. 65, p. 637, 2001.
- 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.
- GOSPODAROWICZ, D., ILL, C.R., BIRDWELL, C.R. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. **Endocrinol.**, v. 100, p. 1121–1128, 1977.
- GRAZUL-BILSKA, A.T., REDMER, D.A., JABLONKA-SHARIFF, A., BIONDINI, M.E., REYNOLDS, L.P.. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 73, p. 491-500, 1995.
- GROSS, T.S., PLANTE, C., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., HELMER, S.D., PUTNEY, D.J. Secretory proteins of the bovine conceptus alter endometrial prostaglandin and protein secretion in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 977-87, 1988.
- HEER, R., DOUGLAS, D., MATHERS, M.E., ROBSON, C.N., LEUNG, H.Y. Fibroblast growth factor 17 is over-expressed in human prostate cancer, **J. Pathol.** v.204, p.578–586, 2004.
- HOSHIKAWA M., OHBAYASHI N., YONAMINE A., KONISHI M., OZAKI K., FUKUI S., ITOH N., Structure and Expression of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-17, Preferentially Expressed in the Embryonic Brain. **Biochem Biophys Res Commun.** v.244, p.187–191, 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.J, MURPHEE, R.L, COULSON, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by cross appearance of corpus luteum, **J. Dairy Science.** v. 63, p. 155-160, 1980.

- ITOH, N., AND ORNITZ, D.M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends Genet.**, v. 20, p. 563-569, 2004.
- JUENGE, J.L, NISWENDER, G.D. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic animals. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 54, p. 193-205, 1999.
- KARSCH FJ, FOSTER DL, LEGAN SJ, RYAN KD, PETER GK. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone and luteinizing hormone. **Endocrinol.**, v.105,p. 421-426,1979.
- 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.
- KLIEM, H., BERISHA, B., MEYER, H.H.D., SCHAMS, D. Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis. **Mol. Reprod. Dev.**, In press, 2008.
- KOBAYASHI S, BERISHA B, AMSELGRUBER WM, SCHAMS D, MIYAMOTO A. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alfa. **J. Endocrinol.**, v. 170, p. 369-380, 2001.
- KNICKERBOCKER, J.J, WILTBANK, M.C, NISWENDER, G.P Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 5, p. 91-107, 1988.
- KOBAYASHI S, BERISHA B, AMSELGRUBER WM, SCHAMS D, MIYAMOTO A. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alfa. **J. Endocrinol.**, v. 170, p. 369-380, 2001.
- LIEBERMANN. J. SCHAMS, D., MYIAMOTO, A . Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during oestrous cycle and pregnancy in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 1003-1011, 1996.

- LUCK, M.R., ZHAO, Y.. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 647-52, 1993.
- MARUOKA, Y., OHBAYASHI, N., HOSHIKAWA, M., ITOH, N., HOGAN, B.L., FURUTA, Y. Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. **Mech Dev**, 74(1–2): p.175–177, 1998.
- MCGUIRE, W.J., JUENGEL, J.T., NISWENDER, G.D. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of PGF2 alfa in the ovine corpus luteum in vivo. **Endocrinol.**, v. 136, p. 4963-4972, 1994.
- MCCRACKEN. J. A., CUSTER. E.E., JUSTIN. C.L. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological reviews**. v. 79, 1999.
- 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.
- MOHAMMADI. M., SHAUN, K.O., IBRAHIMI, O.A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 16, p. 107–137, 2005.
- MURDOCH, W.J., PETERSON, T.A., VAN KIRK, E.A., VINCENT, D.L., INSKEEP, E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 1187-94, 1986.
- MIYAMOTO, A., OKUDA, K., SCHWEIGERT, F.J., SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **J. Endocrinol.**, v. 135, p. 103–114, 1992.
- NELSON, S.E., MCLEAN, M.P., JAYATILAK, P.G., GIBORI, G.. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. **Endocrinology**, v. 130, p. 954-66, 1992.

- NEUVIANS, T.P., BERISHA, B., SCHAMS, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 67, p. 389–395, 2004a.
- NEUVIANS, T.P., SCHAMS, D., BERISHA, B., PFAFFL, M.W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 473–480. 2004b.
- NEZU, M., TOMONAGA, T., SAKAI, C., ISHII, A., ITOGA, S., NISHIMURA, M., MATSUO, Y., TAGAWA, M., NOMURA, F. Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor-8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors, **Biochem Biophys Res Commun** v.335 p.843–849 2005.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTOSH, E.W. Mechanisms controlling the function and lifespan of the corpus luteum. **Physiol. Rev.**, v. 80, p.1-29, 2000.
- 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.
- O'SHEA, J.D., GRAN, D.G., HAY, M.F. Fate of theca interna following ovulation in the ewe. **Cell Tissue Res.**, v. 210, p. 305-319, 1980.
- REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A.. Growth and development of the corpus luteum. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 54, p. 181-91, 1999.
- RICHARDS, J.S., RUSSELL, D.L., OCHSNER, S., ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 64, p. 69–92, 2002.
- ROBINSON, L.T. Nicklin, R.S., HAMMOND, D. Schams, G.E., HUNTER, M.G, A.J., MANN. Fibroblast Growth Factor 2 Is More Dynamic than Vascular Endothelial Growth Factor A During the Follicle-to CL Transition in the Cow. **Biol. Reprod**, v. 77, p28-36, 2007.

- ROBINSON, R.S., HAMMOND, A.J., MANN, G.E., HUNTER, M.G. A novel physiological system that mimics luteal angiogenesis. **Reprod.**, v. 135, p. 405–413, 2008.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v.24, p.77-92, 1983.
- SALLI, U., BARTOL, F. F., WILEY, A. A., TARLETON, B. J., BRADEN, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.77-83, 1998.
- SANDERS, S.L., STOUFFER, R.L., BRANNIAN, J.D.. Androgen production by monkey luteal cell subpopulations at different stages of the menstrual cycle. **J Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 591-6, 1996.
- 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.
- SCHAMS, D., AND BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 39, p. 241–251, 2004.
- SHIMOKAWA, T., FURUKAWA, Y., SAKAI, M., LI, M., MIWA, N., LIN, Y.M., NAKAMURA, Y., Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. **Cancer Res** v.63, p.6116–6120, 2003.
- SPENCER, T.E., BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reprod. Biol. End.**, v. 2:49, p. 1-15, 2004.
- STOCCO, C., TELLERIA, C., GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine reviews**. v. 28, p. 117-149, 2007.
- 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, M.J., AND CLARK, C.L. Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. **Endocrinol.**, v. 130, p. 1951–1956, 1992.

- 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.
- XU, J., LAWSHE, A., MACARTHUR, C.A., ORNITZ, D.M., Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17, **Mech. Dev.** .v. 83, 165–178, 1999.
- YAMASHITA, H., KAMADA, D., SHIRASUNA, K., MATSUI, M., SHIMIZU, T., KIDA, K., BERISHA, B., SCHAMS, D., MIYAMOTO, A. Effect of Local Neutralization of Basic Fibroblast Growth Factor or Vascular Endothelial Growth Factor by a Specific Antibody on the Development of the Corpus Luteum in the Cow. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 75, p. 1449-1456, 2008.
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., PICKERING, B.T. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine ovary during the oestrous cycle and pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 71, p. 551-7, 1984.
- ZHANG, X., IBRAHIMI, O.A., OLSEN, S.K., UMEMORI, H., MOHAMMADI, M., ORNITZ, D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF family. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 15694–15700, 2006.
- ZHENG, J., REDMER, D.A., REYNOLDS, L.P. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1177–1189, 1993.

5. ARTIGO PUBLICADO

**EXPRESSION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTORS DURING
DEVELOPMENT AND REGRESSION OF THE BOVINE CORPUS LUTEUM**

Artigo publicado no periódico *Reproduction Fertility and Development*, v.20, p.659, 2008.

EXPRESSION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTORS DURING DEVELOPMENT AND REGRESSION OF THE BOVINE CORPUS LUTEUM

ABSTRACT

There is evidence that fibroblast growth factors (FGFs) are involved in the regulation of growth and regression of the corpus luteum (CL). However, the expression pattern of most FGF receptors (FGFRs) during CL lifespan is still unknown. The objective of the present study was to determine the pattern of expression of 'B' and 'C' splice variants of FGFRs in the bovine CL. Bovine CL were collected from an abattoir and classed as corpora hemorrhagica (stage I), developing (stage II), developed (stage III) and regressed (stage IV) CL. Expression of FGFR mRNA was measured by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and FGFR protein was localized by immunohistochemistry. Expression of mRNA encoding the 'B' and 'C' spliced forms of FGFR1 and FGFR2 was readily detectable in the bovine CL and was accompanied by protein localization. FGFR1C and FGFR2C mRNA expression did not vary throughout CL lifespan, whereas FGFR1B was upregulated in the developed (stage III) CL. FGFR3B, FGFR3C and FGFR4 expression was inconsistent in the bovine CL. The present data indicate that FGFR1 and FGFR2 splice variants are the main receptors for FGF action in the bovine CL.

INTRODUCTION

The cyclic development and regression of the corpus luteum (CL), a transient endocrine organ whose principal product is progesterone, requires paracrine signaling between several cell types (Niswender et al. 2000; Schams and Berisha 2004). Although the major luteotropic and luteolytic hormones in ruminants are LH and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) respectively, there is evidence that several ovarian peptides play important paracrine roles in the control of CL development, regression and function. These include the

insulin-like growth factor (IGF) family (Webb et al. 2002), and the vascular endothelial growth factor (VEGF) family (Schams and Berisha 2004).

The participation of fibroblast growth factors (FGF) in CL function has also been suggested by several studies. The FGF family consists of 22 peptides (Sleeman et al. 2001), of which FGF1, 2, 7 and 10 have been detected in the CL (van Wezel et al. 1995; Zheng et al. 1993, Castilho et al. 2008). FGF2 expression was stimulated by LH and inhibited by PGF2 α (Stirling et al. 1991), and the expression of FGF1 and 2 was transiently increased during functional luteolysis in cattle (Neuvians et al. 2004a; Neuvians et al. 2004b). FGF7 was detected in small luteal cells in the bovine CL and expression did not change with stage of CL development (Salli et al. 1998). Similarly, FGF10 mRNA abundance did not vary during the CL lifespan in contrast with the developmentally regulated expression reported for antral follicles (Castilho et al. 2008, Buratini et al. 2007). Unlike FGF7, FGF10 protein was localized to both large and small luteal cells (Castilho et al. 2008).

Functional studies also provide evidence that FGFs play important roles in the regulation of CL development and function. FGF2 stimulated luteal cell proliferation (Gospodarowicz et al. 1977; Grazul-Bilska et al. 1995) and progesterone secretion in ruminants (Liebermann et al. 1996; Miyamoto et al. 1992), and inhibited relaxin secretion from cultured porcine luteal cells (Taylor and Clark 1992).

Different FGFs induce different cellular events, which is a consequence of the activation of different receptors (FGFR; Itoh and Ornitz 2004). Five genes encode FGF receptors (FGFR) (Itoh and Ornitz 2004), of which FGFR1, 2 and 3 are known to undergo alternative splicing. The 'A' splice variants code for truncated secreted proteins that do not transduce extracellular signals, whereas the 'B' and 'C' splice forms are functional receptors expressed predominantly in epithelial and mesenchymal cells, respectively. Most FGFs activate several receptors. FGF1 activates all FGFRs, whereas FGF2 activates predominantly 'C' splice forms and FGFR4 (Ornitz et al. 1996).

Little is known about FGFR expression in the CL. FGFR1 and 2 (not variant specific) abundance was higher in late-cycle ovine CL compared to early and mid-cycle (Doraiswamy

et al. 1998), and FGFR1C and FGFR2C variants have been detected in early luteal phase bovine CL (Berisha et al. 2006a). Regulation of splice variants along distinct stages of CL lifespan has been assessed only for FGFR2B, the expression of which decreased during functional luteolysis and increased during structural luteolysis (Castilho et al. 2008). Therefore the objectives of the present study were to determine the pattern of expression of 'B' and 'C' splice forms of FGFR1-3 and of FGFR4 mRNA in the bovine CL.

MATERIALS AND METHODS

Tissues

Bovine ovaries and whole fetuses (predominantly Nelore - *Bos indicus*) were obtained from an abattoir local to the Sao Paulo State University campus in Botucatu and transported to the laboratory in saline on ice. Corpora lutea at different stages of development were dissected from the ovaries and lung, liver and brain samples from fetuses. Tissue samples weighing 50-100mg were homogenized in Trizol and total RNA was extracted (Invitrogen; Sao Paulo, Brazil). Corpora lutea were morphologically classified into four developmental stages as previously described (Ireland et al. 1980): stage I were corpora hemorrhagica with a dark red color, incomplete epithelial cover of the rupture point and measured from 0.5 to 1.5 cm diameter (corresponding to days 1 to 4 after ovulation; n=10); stage II CL featured complete epithelial cover of the rupture point and visible vasculature in its periphery, were red or brown at the apex and orange below it, and measured from 1.6 to 2.0 cm (corresponding to days 5 to 10 after ovulation; n=10); stage III mid-cycle CL showed well developed vasculature often visible at the apex, were completely orange or yellow and measured from 1.6 to 2.0 cm (corresponding to days 11 to 17 of CL after ovulation; n=9); and stage IV regressed CL showed no visible vasculature at the surface, were pale yellow to white in color and measured less than 1 cm diameter (corresponding to days 18 to 20 after ovulation; n=10).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Expression of FGFR1B, FGFR1C, FGFR2C, FGFR3B, FGFR3C and FGFR4 was surveyed in abattoir CL samples by RT-PCR. Total RNA (1µg) was incubated with DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brazil) then reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) and oligo-d(T) primer. PCR was performed on 1µl cDNA in a PCR mastermix containing 1.6 units Taq DNA polymerase (Invitrogen), 0.4µM primers, 0.2mM dNTPs and 1.5mM MgCl₂ in a total volume of 25µl. Samples were denatured for 3 min at 94°C, followed by cycles of denaturing at 94°C for 45 sec, annealing (at 61°C for FGFR1B, 59°C for FGFR1C, 60°C for FGFR2C, and 65°C for FGFR3B, FGFR3C and FGFR4) for 45 sec and extension at 70°C for 1 min. Primers for FGFR1C, FGFR2C, FGFR3C and FGFR4 were as published and validated for bovine follicles (Berisha et al. 2004, Berisha et al. 2006a, Buratini et al. 2005). Primers for FGFR1B and FGFR3B were designed according to the predicted bovine cDNA sequences. Forward primers were 5'acgtcctcgtgacggagg 3' and 5'ggagttccactgcaaggtgt 3', and reverse primers were 5' ccggtgccatccattga 3' and 5'gtgaacgctcagccaaaag 3' for FGFR1B and FGFR3B, respectively. Semiquantitative RT-PCR was validated to measure FGFR1B, FGFR1C and FGFR2C by choosing number of PCR cycles and amount of RNA within the linear range of the amplification curve. Numbers of PCR cycles were 32, 30 and 35 for FGFR1B, FGFR1C and FGFR2C, respectively. FGFR3B, FGFR3C and FGFR4 mRNA expression was not quantified and was investigated at 37 PCR cycles. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control gene, and was amplified as described above for 24 cycles (annealing at 60°C) using primers validated for bovine follicles (Buratini et al. 2005).

All PCR reactions were performed with positive (fetal brain, kidney and liver for FGFR2C, FGFR3C and FGFR4, respectively) and negative (water replacing cDNA) controls. PCR products were separated on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide, and specific bands quantified by densitometry (Image Gauge, Fuji Photo Film Co.).

Immunohistochemistry

Bovine ovaries were collected from an abattoir, bisected and fixed in paraformaldehyde. Fixed tissues were embedded in paraffin, and 5 µm sections were placed on silane-coated slides. Sections were deparaffinized in xylene, and hydrated in successive washes with decreasing concentrations of ethanol. Antigen retrieval was achieved by 3 consecutive incubations of 5 min in 10mM citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven (500 Watts). Endogenous peroxidase was quenched by incubation with 2% hydrogen peroxide in iced methanol for 30 min, followed by three 5 min rinses in PBS with Triton X-100 (0.3%, PH 7.2) and incubation for 30 min in 10% inactivated horse serum to reduce non-specific binding. Sections were then incubated with primary antibodies for 20 h at 4°C in a humidified chamber. A monoclonal mouse anti-human FGFR1 antibody (1:100, clone 19B2, Upstate, New York, USA) and a polyclonal rabbit anti-human FGFR2 antibody (1:200, Sigma, Saint Louis, USA) were used to localize FGFR1 and FGFR2. Negative controls were set up with PBS with Triton X-100 (0.3%, PH 7.2) replacing the primary antibody. After incubation with the primary antibody, sections were rinsed and incubated with biotinylated horse anti-mouse/anti-rabbit secondary antibody for 45 min in a humidified chamber. Sections were once again rinsed and incubated with an avidin/biotinylated horseradish-peroxidase complex (ABC Method; Vectastain Universal ELITE ABC Kit, Vector Laboratories, Burlington, Canada) for 45 min for signal amplification. Immunostaining was revealed with Vector NovaRed (Vector Laboratories, Burlington, Canada).

Statistics

Semiquantitative target gene mRNA abundance was expressed relative to GAPDH mRNA, and the data were transformed to logarithms where not normally distributed. ANOVA was used to test for main effects of CL stage on FGFR mRNA abundance. Differences between means were tested with the Tukey-Kramer HSD test.

RESULTS

Expression of mRNA encoding FGFR1B, FGFR1C and FGFR2C was readily detected in all stages of the bovine CL lifespan (Fig 1).

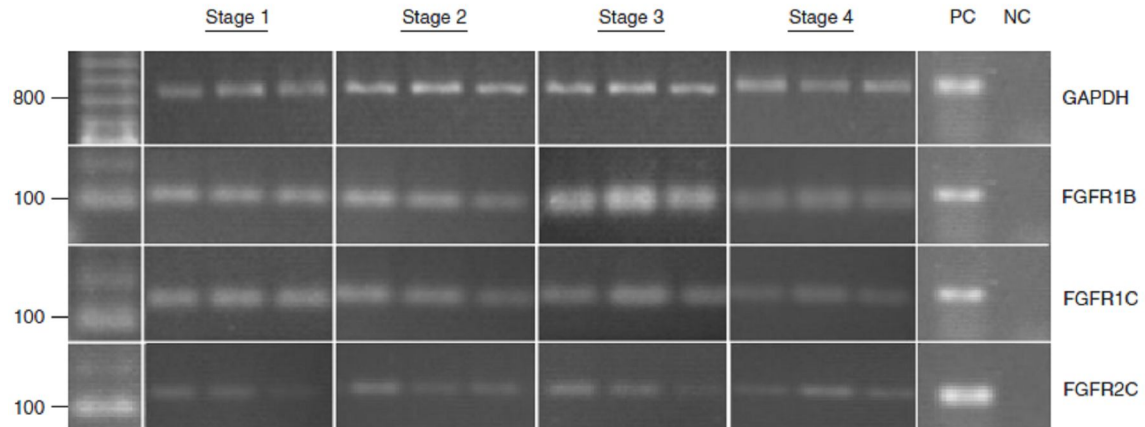


Fig 1. FGFR mRNA expression in bovine CL at different stages of development. Representative samples for each stage of CL development are shown in the composite gel. Numbers of PCR cycles were 32, 30 and 35 for FGFR1B, FGFR1C and FGFR2C, respectively. NC: negative PCR control (water replacing cDNA). PC: positive PCR control (fetal liver for FGFR1B and FGFR1C and fetal brain for FGFR2C). Amplicon sizes were 136, 125, 139 and 850 base pairs (bp) for FGFR1B, FGFR1C, FGFR2C and GAPDH, respectively.

Whilst FGFR1C and FGFR2C mRNA levels did not vary with stage of CL development, FGFR1B gene expression was higher in the stage 3 CL (developed) in comparison with stages 1 and 2 (Fig. 2).

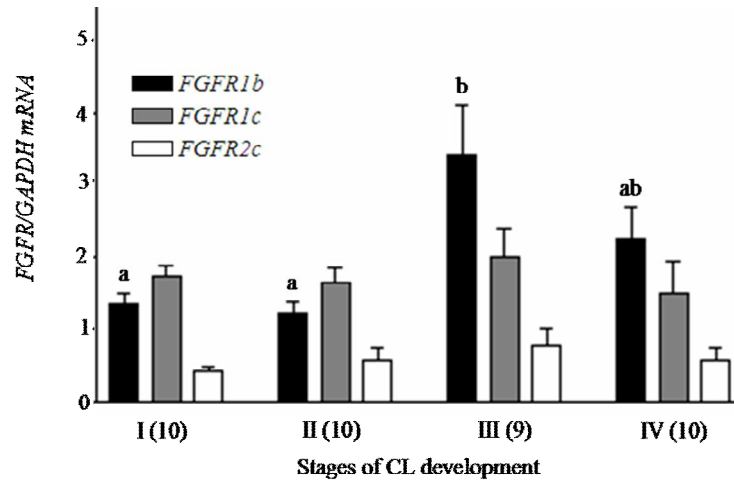


Fig 2. FGFR mRNA abundance in bovine CL at different stages of development. CL were collected from the abattoir and classified as corpora hemorrhagica (stage I), developing (stage II), developed (stage III) and regressed CL (stage IV). Gene expression was measured by semiquantitative PCR, and data expressed relative to the housekeeping gene, GAPDH. Number of CL analyzed in each group is given in parentheses. Data are means \pm SEM.

FGFR3C and FGFR4 gene expression was weakly detected in some but not all samples. FGFR1 and FGFR2 proteins (not isoform specific) were localized to small and large luteal cells in CL sections. FGFR1 was also detected in cells putatively identified as endothelial/stromal cells (Fig. 3).

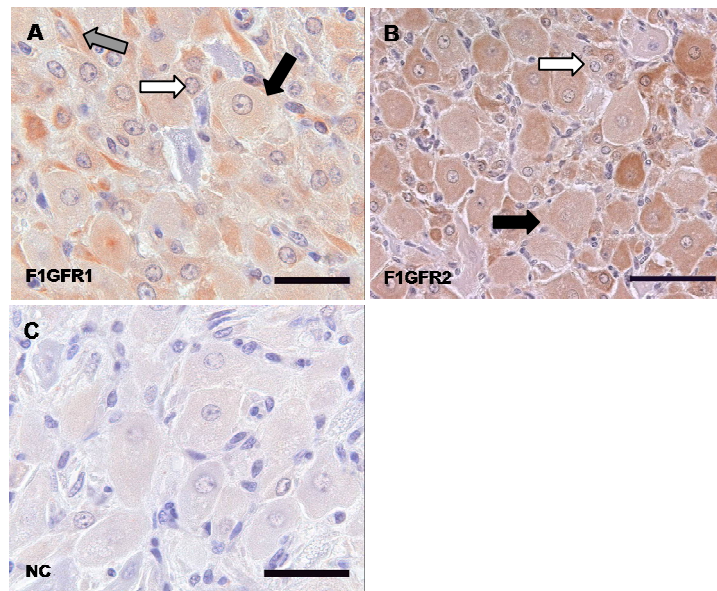


Fig 3. Immunohistochemical localization of FGFR1 and FGFR2 protein in bovine CL. Ovaries were obtained from an abattoir and fixed in paraformaldehyde for immunohistochemistry. FGFR1 (Panel A; bar=30 μ m) and FGFR2 (Panel B; bar=50 μ m) were localized to small (white arrows) and large (black arrows) luteal cells. FGFR1 was also detected in cells putatively identified as endothelial/stromal cells (gray arrow). No staining was observed in the absence of primary antibody (Panel C; bar=30 μ m).

DISCUSSION

This is the first report describing the pattern of expression of all major FGFR splice variants during the CL lifespan. Expression of the 'B' splice form of FGFR1 varied significantly during CL development, whereas the 'C' splice forms of FGFR1 and FGFR2 did not. Neither splice forms of FGFR3 and FGFR4 were consistently detected in the bovine CL. The expression of FGFR1B was upregulated in stage 3 in comparison with stages 1 and 2, and we have recently shown that FGFR2B expression is higher in stage 4 CL compared to stage 1 (Castilho et al. 2008). This is consistent with the data from sheep CL, in which variant non-specific FGFR1 and FGFR2 increased in late cycle CL (Doraiswamy et al. 1998). Therefore it is reasonable to propose that increased FGFR1 and 2 mRNA and protein in midcycle CL are the result of increased expression of the 'B' and not the 'C' variants. Also consistent with data from sheep (Doraiswamy et al. 1998) is the localization of FGFR proteins, although not variant-specific; FGFR1 was localized to endothelial/stromal cells and to some luteal cells, and FGFR2 was localized to large and small luteal cells.

Expression of FGFR3 and FGFR4 were not consistently detected at 37 PCR cycles. Using the same primers we have previously amplified FGFR3C and FGFR4 mRNA from bovine granulosa (FGFR3C) and theca (FGFR3C and 4) cells at 28 and 33 PCR cycles, respectively. Therefore, the lack of amplification of FGFR3C and 4 is due to weak expression rather than technical limitations.

FGFs have been grouped into subfamilies based on affinities for specific receptors. The 'B' splice variants are preferentially activated by the FGF7 subfamily, which also contains FGF10 and 22 (Zhang et al. 2006). These FGFs activate FGFR1B and 2B, but not 3B, and the CL expressed FGFR1B and 2B but not -3B (Castilho et al. 2008; present study). As FGF7 and 10 mRNA have also been localized in the CL (Berisha et al. 2006b, Castilho et al. 2008), these data support a role for FGF7/10 signaling within the CL.

There is limited information on the function of FGFs in the CL, the most studied being FGF2. It has been shown that FGF2 can stimulate luteal cell proliferation (Gospodarowicz et al. 1977; Grazul-Bilska et al. 1995) and progesterone secretion in ruminants (Liebermann et

al. 1996; Miyamoto et al. 1992), and inhibit relaxin secretion from cultured porcine luteal cells (Taylor and Clark 1992). Moreover, FGF2 induces luteal angiogenesis and is present at higher concentrations in early compared to mid and late bovine CL (Robinson et al. 2007; Robinson et al. 2008). FGF2 activates FGFR1C, 3C and 4, and to a lesser extent FGFR1B and 2C (Ornitz et al. 1996). As the CL expresses negligible mRNA encoding FGFR3C and FGFR4, the targets for FGF2 action in the CL are most likely to be FGFR1B, 1C and 2C.

The expression pattern of FGFR1 and FGFR2 is compatible with roles during CL formation and growth, and also during CL regression. They could mediate positive effects of FGF2 on cell proliferation, steroidogenesis and angiogenesis during CL growth (Gospodarowicz et al. 1977; Grazul-Bilska et al. 1995; Robinson et al. 2008) and, at later stages of CL lifespan, the increased expression of 'B' splice forms could be associated with mechanisms controlling apoptosis or tissue remodeling in the regressing CL. In fact, there are genes upregulated in the regressing CL that are believed to control apoptosis and tissue remodeling, such as the pro-apoptotic factor Fas antigen (Taniguchi et al. 2002), the pro-survival gene clusterin and genes for extracellular matrix components (Casey et al. 2005).

In conclusion, the present data indicate that FGFR1 and FGFR2 splice variants are the main receptors for FGF action in the bovine CL, and that the 'B' splice variant of FGFR1 is regulated during CL development.

REFERENCES

- Berisha, B., Sinowatz, F., and Schams, D. (2004). Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Develop.* **67**, 162-171.
- Berisha, B., Steffl M., Amselgruber, W., and Schams. D. (2006a). Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. (2006b). *Reproduction.* **131**, 319-329.
- Berisha, B., Welter, H., Shimizu, T., Miyamoto, A., Meyer, H., and Schams, D. (2006b). Expression of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) and FGF7 in Mature Follicles during the Periovulatory Period after GnRH in the Cow. *J. Reprod. Develop.* **52**, 307-313.
- Buratini, J. Jr., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S., and Price, C. A. (2005). Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction.* **130**, 343-350.
- Buratini, J. Jr., Pinto, M. G., Castilho, A. C., Amorin, R. L., Giometti, I. C., Portela, V. M., Nicola, E. S., Price, C. A. (2007). Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol. Reprod.* **77**, 743-750.
- Casey, O. M., Morris, D. G., Powell, R., Sreenan, J. M., and Fitzpatrick, R. (2005). Analysis of gene expression in non-regressed and regressed bovine corpus luteum tissue using a customized ovarian cDNA array. *Theriogenology.* **64**, 1963-1976.
- Castilho, A. C., Giometti, I. C., Berisha, B., Schams, D., Price, C. A., Amorin, R. L., Papa, P. C., and Buratini, J. Jr. (2008). Expression of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor-2B, in the corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 940-945.
- Doraiswamy, V., Knutson, D. L., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1998). Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 and -2 in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Growth Factors.* **16**, 125-135.

- Gospodarowicz, D., III, C. R., and Birdwell, C. R. (1977). Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. *Endocrinology*. **100**, 1121-1128.
- Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., Jablonka-Shariff, A., Biondini, M. E., and Reynolds L. P. (1995). Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 491-500.
- Ireland, J. J., Murphee, R. L., and Coulson, P. B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy. Sci.* **63**, 155-160.
- Itoh, N., and Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* **20**, 563-569.
- Liebermann, J., Schams, D., and Miyamoto, A. (1996). Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**, 1003-1011.
- Miyamoto, A., Okuda, K., Schweigert, F. J., and Schams, D. (1992). Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.* **135**, 103-114.
- Neuvians, T. P., Berisha, B., and Schams, D. (2004a). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 389-395.
- Neuvians, T. P., Schams, D., Berisha, B., and Pfaffl, M. W. (2004b). Involvement of Pro-Inflammatory Cytokines, Mediators of Inflammation, and Basic Fibroblast Growth Factor in Prostaglandin F₂α-Induced Luteolysis in Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.* **70**, 473-480.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., and McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* **80**, 1-29.

- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292-15297.
- Salli, U., Bartol, F. F., Wiley, A. A., Tarleton, B. J., and Braden, T. D. (1998). Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* **59**, 77-83.
- Robinson, R.S., Nicklin, L.T., Hammond, A.J., Schams, D., Hunter, M.G., and Mann, G.E. (2007). Fibroblast Growth Factor 2 Is More Dynamic than Vascular Endothelial Growth Factor A During the Follicle-Luteal Transition in the Cow. *Biol. Reprod.* **77**, 28-36.
- Robinson, R. S., Hammond, A. J., Mann, G. E., and Hunter, M. G. (2008). A novel physiological system that mimics luteal angiogenesis. *Reproduction.* **135**, 405-413.
- Schams, D., and Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. *Reprod. Domest. Anim.* **39**, 241-251.
- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D., and Murison, J.G. (2001). Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* **271**, 171-182.
- Stirling, D., Waterman, M. R., and Simpson, E. R. (1991). Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* **91**, 1-8.
- Taniguchi, H., Yokomizo, Y., and Okuda, K. (2002). Fas-Fas Ligand System Mediates Luteal Cell Death in Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.* **66**, 754-759.
- Taylor, M. J., and Clark, C. L. (1992). Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology.* **130**, 1951-1956.
- van Wezel, I. L., Umaphysivam, K., Tilley, W. D., and Rodgers, R. J. (1995). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* **115**, 133-140.
- Webb, R., Woad, K. J., and Armstrong, D. G. (2002). Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 277-285.

Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D. M. (2006). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: The Complete Mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* **281**, 15694-15700.

Zheng, J., Redmer, D. A., and Reynolds, L. P. (1993). Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **49**, 1177-1189.

6. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FGF8 (FGF8, FGF17 E FGF18) E DE SEUS RECEPTORES (FGFR3C E FGFR4) DURANTE O DESENVOLVIMENTO LUTEÍNICO E LUTEÓLISE INDUZIDA EM BOVINOS.

EXPRESSÃO DOS MEMBROS DA SUBFAMÍLIA DO FGF8 (FGF8, FGF17 E FGF18) E DE SEUS RECEPTORES (FGFR3C E FGF4) DURANTE O DESENVOLVIMENTO LUTEÍNICO E LUTEÓLISE INDUZIDA EM BOVINOS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão do FGF8, 17, 18, FGFR3C e FGFR4 durante o desenvolvimento luteínico seguido de luteólise induzida em bovinos. Em adição, nós investigamos a localização da proteína do FGF18, FGFR3C e FGFR4 no CL bovino. O CLs foram obtidos de ovários de abatedouro e classificados em quatro estádios (estádio 1= corpo hemorrágico, estágio 2= em desenvolvimento CL, estágio 3= maduro/início da luteólise funcional CL e estágio 4= luteólise estrutural). Para investigar a expressão do FGF18, FGFR3C e 4 durante a luteólise induzida, fêmeas bovinas adultas (*Bos Taurus* - Holstein Friesians) receberam injeção de um análogo de PGF2 α (cloprostenol-500 mg i.m.; Intervet, Unterschleissheim, Alemanha) entre os dias 8 - 12. CL foram coletados por ovariectomia transvaginal às 0, 0.5, 2, 4, 12, 24, 48 e 64 horas (n=5) após o tratamento. O RNAm FGF18, FGFR3C e FGFR4 foi detectado nos quatro estádios do desenvolvimento e o RNAm do FGF18 foi maior no estágio 3 comparado com estágio 1, 2 e 4. A expressão do FGF18 e FGFR4 não variou durante a luteólise induzida. O RNAm do FGFR3C alcançou valores máximos 4 horas após a injeção de PGF2 α , após que diminui à valores semelhantes ao controle (0 hora). Análise imunohistoquímica revelou a presença do FGF18, FGFR3 e 4 nas células luteínicas pequenas, grandes e em vasos sanguíneos. A proteína do receptor FGFR3 foi detectada no citoplasma e núcleo ao longo do desenvolvimento do CL. Em conclusão, o padrão de expressão do FGF18 e dos receptores sugere sua participação no controle do desenvolvimento luteínico. A localização da proteína do FGF18 e FGFR3 em vasos sanguíneos indica o envolvimento destes genes na angiogênese e na vascularização do CL.

INTRODUÇÃO

O CL é considerado uma glândula endócrina transiente localizada no ovário de mamíferos. O CL bovino desenvolve rapidamente após a ovulação, este período é caracterizado por intensa angiogênese (MYAMOTO et al., 2009). O CL é constituído por uma condensada rede de vasos sanguíneos que inclui grandes vasos e microcapilares (STOCCO et al., 2007). O tecido luteínico é composto por diferentes células, sendo que as endoteliais correspondem a cerca de 50% de todo o tecido. Células luteínicas esteroidogênicas grandes e pequenas constituem cerca de 30% do CL (FARIN et al., 1986). Além disso, o CL contém vários outros tipos celulares como células musculares, pericitos, fibroblastos e células do sistema imune, o que faz com que o CL seja um tecido altamente heterogêneo (CHANING et al., 1986). A principal função do CL é a produção de P4, que é requerida para o estabelecimento e manutenção da gestação (NISWENDER 2000). Na ausência de gestação esta glândula é ativa somente por cerca de 17 dias e, após este período, ocorrem alterações funcionais e estruturais denominadas de luteólise.

Em ruminantes, a luteólise é desencadeada pela PGF 2α que é secretada a partir do útero e chega no CL por mecanismo de contra corrente entre a veia uterina e artéria ovariana (MCCRACKEN 1999). A luteólise é caracterizada por um rápido declínio nas concentrações de P4, seguido por degeneração vascular e apoptose das células esteroidogênicas. O controle dos mecanismos responsáveis pela regressão luteínica é aparentemente complexo (SUGINOET et al., 2007). Sabe-se que fatores locais desempenham papel essencial no desenvolvimento luteínico. Dentre estes fatores incluem-se o óxido nítrico (NO), a EDN1, a AngII e os FGFs (MYAMOTO et al., 2009). Dos diversos membros da família dos FGFs, o FGF2, o FGF7 e o FGF10 mostraram-se expressos no CL (ZHENG et al., 1993; VAN WEZEL et al., 1995; CASTILHO et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão do RNAm do FGF2 é estimulada pelo LH e inibida pela PGF 2α (STIRLING et al., 1991), embora ela tenha sido aumentada durante a luteólise induzida em bovinos (NEUVIANS et al., 2004a, b). FGF7 foi detectado em pequenas células

luteínicas no CL bovino e a expressão não se alterou durante o desenvolvimento luteínico (SALLI et al., 1998).

Os FGFs medeiam respostas celulares pela ativação de uma variedade de receptores tirosina kinase codificados por quatro genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4). “Splicing” alternativo dos genes FGFR1, 2 e 3 dá origem às isoformas ‘B’ e ‘C’. FGF1 e 2 ativam a maioria dos FGFRs. O RNAm do FGFR2B, ativado pelos FGF7 e 10, mostrou-se expresso durante todas as fases do desenvolvimento luteínico e luteólise induzida (CASTILHO et al., 2008). Enquanto a expressão dos ligantes não variou ao longo do desenvolvimento luteínico, a expressão do receptor diminuiu durante o início da luteólise funcional induzida, mas aumentou durante a luteólise estrutural, o que sugere o envolvimento do FGFR2B no controle da apoptose e do remodelamento tecidual do CL em regressão, conforme verificado em outros tecidos (SALLI et al., 1998; CASTILHO et al., 2008).

Os membros da subfamília do FGF8 (FGF8, 17 e 18) ativam preferencialmente os receptores FGFR3C e 4, também ativados pelo FGF2, cuja participação no controle da angiogênese e esteroidogênese luteal já foi demonstrada (ROBINSON et al., 2009 e YAMASHITA et al., 2009) É possível que outros FGFs se somem ao FGF2 no controle da diferenciação do CL pela ativação de receptores comuns. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão dos membros da subfamília do FGF8 (FGF8, 17 e 18) e de seus principais receptores (FGFR3C e 4) durante todo o desenvolvimento luteínico e na luteólise induzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 1: Expressão do RNAm do FGF8, 17, 18 e de seus receptores (FGFR3C e FGFR4) durante o desenvolvimento luteínico.

Obtenção de corpos lúteos

Ovários bovinos (predominantemente Nelore - *Bos indicus*) foram obtidos de abatedouro e transportados para o laboratório em solução salina gelada. CLs de diferentes estádios de desenvolvimento foram dissecados. Fragmentos (50-100mg) de CL bovino imersos em 1 ml de solução Trizol (Invitrogen[®], São Paulo, Brasil), foram triturados em homogenizador de tecidos (Polytron UltraTurrax T-25) e submetidos ao protocolo Trizol de extração de RNA total. CLs foram morfológicamente classificados em quatro estádios de desenvolvimento (IRELAND et al., 1980): estágio I apresenta-se externamente com coloração avermelhada, ponto de ruptura não recoberto por epitélio e sem vasculatura visível em sua superfície e internamente possui também cor avermelhada (corresponde aos dias 1-4 após a ovulação; n=10); estágio 2 apresenta-se externamente com o ápice de cor vermelha ou marrom, com o ponto de ruptura coberto por epitélio e vasculatura da superfície restrita a periferia do CL. Internamente possui o ápice de coloração avermelhada ou marrom, sendo o restante do CL caracterizado por coloração alaranjada (corresponde aos dias 5-10 após a ovulação; n=10); estágio 3 apresenta-se externamente com cor alaranjada e presença de alguns vasos. Internamente é caracterizado por possuir uma cor alaranjada de aspecto homogêneo em todo o CL (corresponde aos dias 11-17 após a ovulação; n=10) e estágio 4 apresenta-se externamente com coloração amarelada (amarelo claro) e sem vasculatura visível na superfície do CL. Internamente, é caracterizado por possuir uma cor alaranjada ou amarelada (corresponde aos dias 18-20 após a ovulação; n=10).

Extração de RNAm total e transcrição reversa

Os corpos lúteos foram 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 MILI-Q ultrapura. 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 (1 µg) foram tratadas com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa. 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).

Expressão gênica por PCR em tempo real

Para avaliação da expressão gênica dos FGFs e FGFRs (FGF8, FGF17, FGF18, FGFR3C e FGF4) ao longo do desenvolvimento do CL bovino, utilizou-se o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems®) com o protocolo de amplificação do “kit” Power Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems). Os genes GAPDH, Ciclofilina (CYC-A) e Histona (H2A) foram testados pelo programa geNorm (Microsoft®) para seleção do controle endógeno mais estável. O gene CYC-A foi o escolhido o melhor controle endógeno. Sendo assim, os valores de expressão gênica dos experimentos da PCR em tempo real foram normalizados pela expressão do gene constitutivo, CYC-A. As reações de amplificação para todos os genes acima, foram realizadas em placas de 96 poços, as quais continham 12,5 µl de Power Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems), 0,5 ul de cDNA para o FGF17 e FGF18, 1 ul cDNA para FGF8, FGFR3C e FGFR4, bem como oligonucleotídeos iniciadores bovino-específico completando o volume final de 25 µl. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse experimento são apresentados (Tab. 1).

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores.

GENE	SEQÜÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO	REFERÊNCIA
CYC-A	For 5' – GCC ATG GAG CGC TTT GG - 3' Rev 5' – CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T - 3'	65	BC105173
FGF 8	For 5' – TGA GAC AGG CCT CTA CAT CTG CAT - 3' Rev 5' – ATT GTT CTC CAG CAC GAT CTC CGT - 3'	106	AY183660
FGF 17	For 5' - AGA TCC GTG AGT ACC AGC TCT ACA - 3' Rev 5' - TTC CGA ACG TGT CTG TCT CCA CTA - 3'	132	XM_582304
FGF 18	For 5' - TTT ACA CTT CCT GCT GCT GTG C -3' Rev 5' - TGC TTG CGG CTC ACA TCG T -3'	117	NM_001076007
FGFR3C	For 5' - TGG CTT TGA TCG TGT TCC TGCT - 3' Rev 5' - ACA AGC TTG ACT TGG CTG AGG A - 3'	159	AY_029187.1
FGFR4	For 5' - TGGCTTTGATCGTGTTTCCTGCT - 3' Rev 5' - AAAGCGAGACAACTTCTGCACG - 3'	104	AF_170490.1

As condições para amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturação) e 59°C (FGFR3C), 60°C (FGF18 e FGFR4), 61°C (FGF17 e FGF8) por 1 minutos (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. A eficiência de amplificação de cada gene analisado foi estimada utilizando-se o programa “*LinRegPCR*”. 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.

Imunohistoquímica

Ovários bovinos (predominantemente Nelore - *Bos indicus*) foram obtidos de abatedouro. CLs de diferentes estádios de desenvolvimento foram dissecados e classificados (estádio 1/n =1; estágio 2/n=3; estágio 3/n=3; estágio 4/n=3). A expressão protéica foi investigada por imunohistoquímica nos ovários bovinos fixados em paraformaldeído. Para tanto, o tecido fixado foi mergulhado em parafina e cortado em micrótomo. Os cortes obtidos (5 µm) foram desparafinizados em xilol, (2 x 20 minutos) e hidratados com sucessivas lavagens de 3 minutos em 95% e 85% de etanol. Para a recuperação de antígenos foi utilizada incubação de 0,5 M Tris-EDTA pH 9,0 a 96C por 30 minutos para o FGF18 e citrato pH 6,0 para o FGR3 e 4. A peroxidase endógena foi bloqueada, durante 10 minutos, com 5% de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol e em seguida lavadas dez vezes em água destilada e duas vezes por 5 minutos em 0,5 M Tris pH 7,4. Os anticorpos policlonais de cabra anti-FGF18 (1:50, SC-16830, Santa Cruz Biotechnology, Campinas, Brasil), foram biotinilados (EZ-Link, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), incubados por 2 horas em temperatura ambiente seguido por lavagem e

incubação com avidina-peroxidase por 30 minutos (Vecstain ABC, Vector Laboratories, São Paulo, Brasil). Para o FGFR3 e FGFR4 os anticorpos policlonais obtidos de coelho (1:500-FGFR3, AB_41948; 1:300-FGFR4, AB_64190, ABCAM, Califórnia, EUA) foram incubados em câmara úmida por 18 horas (“over-night”) à temperatura de 4°C. Após este período, as lâminas foram lavadas com TRIS (dois banhos de cinco minutos) para dar-se então início a incubação com o anticorpo secundário por 1 hora (EnVision Dual Link System, Dako, Carpinteria, CA, USA). Para visualização da reação, utilizou-se a solução cromógena de DAB líquido por cinco minutos (Dako, Carpinteria, CA). Finalmente, as secções foram lavadas em água destilada e contra-coradas com hematoxilina e eosina. Para a confecção dos controles negativos as secções foram incubadas com peptídeos bloqueadores (SC-16830P, Santa Cruz Biotechnology, Campinas, Brasil).

Experimento 2: Expressão do RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 durante a luteólise induzida.

Obtenção de corpos lúteos

Este experimento foi desenvolvido em colaboração com o grupo do Dr. Dieter Schams e Dr. Bajram Berisha. Para investigar a expressão do RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 durante a luteólise induzida, foi administrado nas fêmeas bovinas (*Bos taurus*-Vacas Holandesas) o análogo da PGF2 α (cloprostenol-500 mg i.m; Intervet, Unterschleissheim, Alemanha) entre os dias dias 8–12. CLs foram coletados por ovariectomia transvaginal à 0, 0,5, 2, 4, 12, 24, 48, e 64 horas (n=5/time point) após o tratamento. Os CLs foram congelados em nitrogênio líquido e mantido em -80°C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído de acordo com Chomczynski e Sacchi (1987) com o reagente TriPure1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) segundo BERISHA et al. (2000).

Extração de RNAm total e transcrição reversa

O RNA total foi purificado usando Nucleospin® RNA II (Macherey & Nagel, Duren, Germany). A concentração e grau de pureza foram determinados na absorbância de 260 nm usando Biofotômetro (Eppendorf, Hamburg, Germany). Alíquotas (1 mg) foram submetidas a uma desnaturação em eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio para verificar a quantidade e a qualidade do RNA total. O RNA total foi submetido à reação de RT para transcrição de cDNA em um volume de 60 µl contendo 1 mg de RNA, 2,5 mmol/L oligonucleotídeos hexâmeros (Gibco BRL, Grand Island, NY) e transcriptase reversa M-MLV (200 U / ml, Promega, Madison, WI) de acordo com BERISHA et al. (2006a). A reação de RT negativa (transcriptase reversa foi substituído por água) foi realizada para detectar a contaminação de DNA residual.

Expressão gênica por PCR em tempo real

As condições para a reação de RT-PCR foram avaliadas em um termociclador (Eppendorf). Análise quantitativa em tempo real de RT-PCR foi realizada com o sistema Rotor-Gene 3000TM (BERISHA et al., 2006b). Após a incubação inicial a 95°C por 10 minutos para ativar Taq DNA polimerase, as amostras foram amplificadas em 40 ciclos de 95°C por 15 seg (desnaturação) e 60°C (FGF18 e FGFR4), 59°C (FGFR3C) por 1 minutos (anelamento e Extensão), seguido de curva de dissociação. Dados de fluorescência foram obtidas após cada etapa de alongamento de SYBR Green ligação ao dsDNA ampliado a 72°C por 5 seg. A especificidade de cada produto da PCR foi determinada pela análise da curva de dissociação. Os dados foram analisados através do Rotor-Gene 30001 (versão 5.03).

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão relativa do FGF8, FGF17, FGF18, FGFR3C e FGFR4 dos experimentos 1 e 2 foi quantificada pela seguinte equação (PFAFFL et al., 2001; Figura 7 – fórmula de Pfaffl).

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

Fig. 1 - Modelo matemático da expressão relativa por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em uma amostra em relação à amostra controle e à expressão do gene endógeno. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito do gene referência; $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é a diferença de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ é a diferença de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.

Análise estatística

A quantificação da abundância do RNAm dos genes alvos foi normalizada pela expressão de CYC-A. Afim de testar os efeitos do estágio de desenvolvimento luteínico e da injeção de PGF2 α em diferentes momentos após o tratamento sobre a expressão gênica, utilizou-se ANOVA, seguido pelo teste de Tukey-Kramer HSD. Antes da ANOVA, realizou-se teste de normalidade dos dados com transformação para logaritmos diante de ausência de normalidade. Quando mesmo após transformações logarítmicas, os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se Análise Não Paramétrica com o Teste de Wilcoxon. Os dados referentes à expressão do FGR3C apresentaram distribuição normal após transformação, enquanto que para os dados do FGF18 e FGFR4 utilizou-se Análise Não Paramétrica.

RESULTADOS

Experimento 1.

A expressão do RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 foi detectada na maioria das amostras investigadas do desenvolvimento luteínico, no entanto a expressão dos RNAm do FGF8 e FGF17 foi fracamente detectada no CL bovino (Tabela 2). A expressão do FGF18 variou ao longo do desenvolvimento, mostrando valor superior no estágio 3 (2.89 ± 0.05 ; FGF18/CYC-A: média \pm EPM) em comparação com os estádios 1 (0.3 ± 0.27), 2 (0.56 ± 1.27) e 4 (0.99 ± 0.32) (Fig. 2).

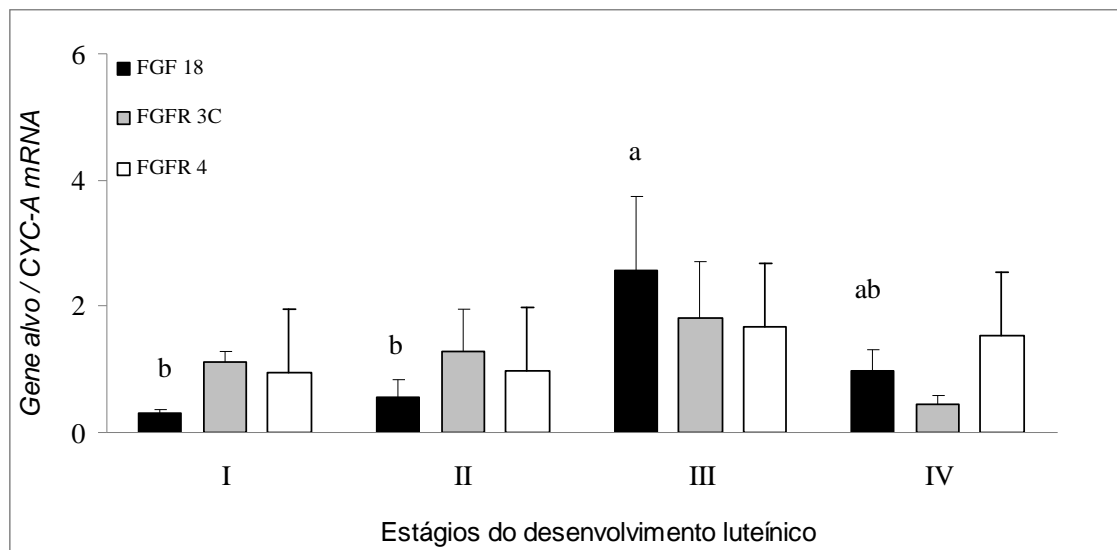


Fig. 2 Expressão dos RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 quantificada por PCR em tempo real em corpos lúteos bovinos ao longo do desenvolvimento.

Tabela 2. Média de Cts (ciclos threshold) e amostras positivas para cada gene nos diferentes estádios do desenvolvimento luteínico.

Genes	Estádio do desenvolvimento luteínico	Médias de Ct	Amostras Positivas / Amostras Totais
FGF8	I	38	4/10
	II	38	7/10
	III	37	6/9
	IV	37	4/10
FGF17	I	37	7/10
	II	37	5/10
	III	36	7/9
	IV	37	7/10
FGF18	I	35	9/10
	II	35	10/10
	III	34	9/9
	IV	35	10/10
FGFR3C	I	31	10/10
	II	32	9/10
	III	33	9/9
	IV	34	10/10
FGFR4	I	32	10/10
	II	33	10/10
	III	33	9/9
	IV	33	9/10
CYC-A	I	19	10/10
	II	19	10/10
	III	20	9/9
	IV	19	10/10

Experimento 2.

Durante a luteólise induzida a expressão do RNAm do FGF18 e FGFR4 não variou. Em contraste, a expressão do FGFR3C alcançou valores máximos nas 4 horas e após 20 horas a expressão voltou a valores semelhantes ao controle (0 hora) (Fig.3).

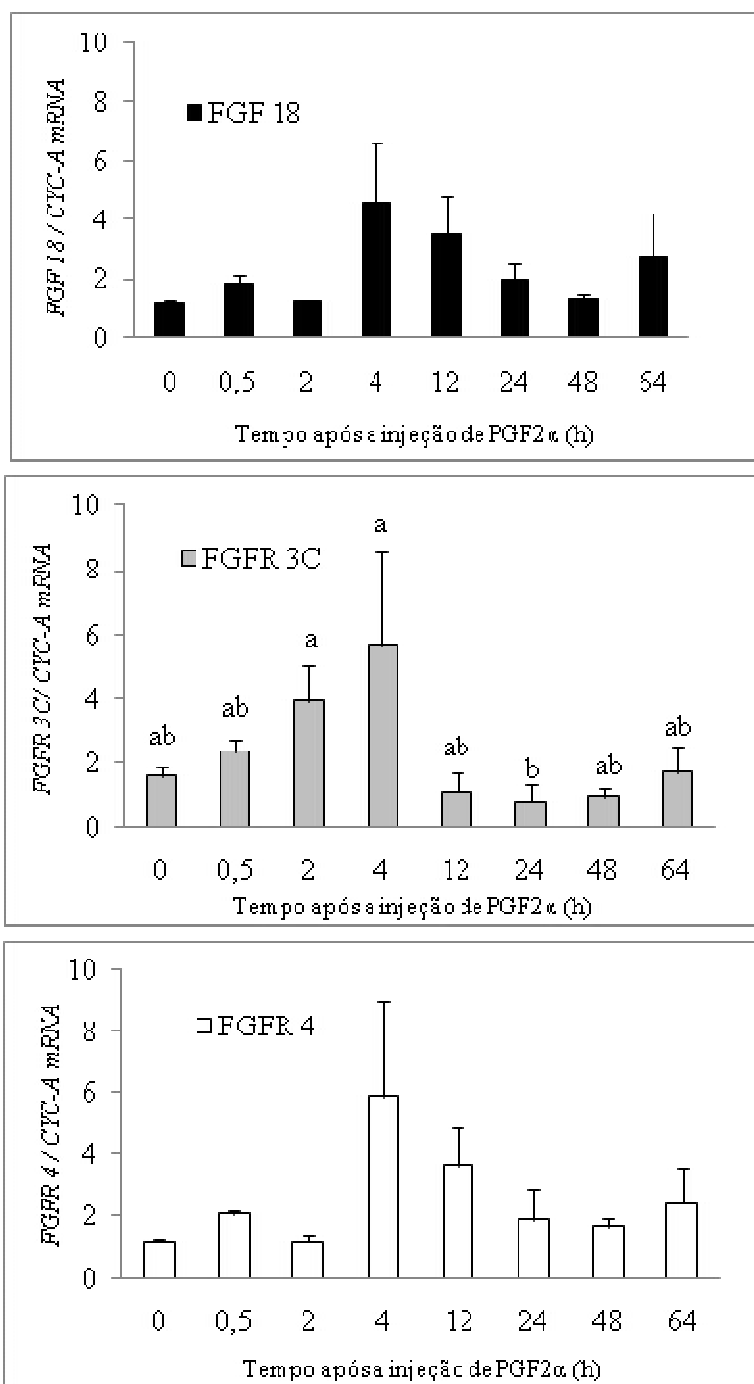


Fig. 3 Abundância relativa do RNAm durante a luteólise induzida em bovinos. A luteólise foi induzida no CL maduro pela injeção de PGF2 α e CLs foram coletados por ovariectomia em tempos determinados. O RNAm do FGF18, FGFR3C e FGFR4 foi mensurado por RT-PCR em tempo real e média \pm EPM são expressão em relação ao gene endógeno CYC-A ($P < 0.05$).

A análise imunohistoquímica revelou a presença da proteína do FGF18 no citoplasma das células luteínicas pequenas e grandes e vasos sanguíneos no CL maduro (Fig. 4).

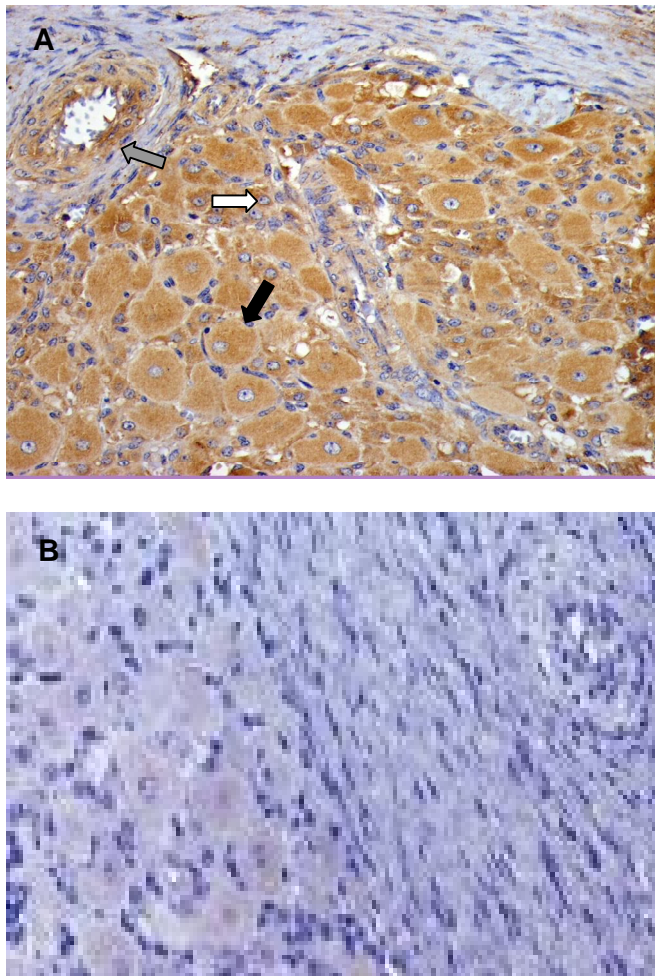


Fig. 4 Imunolocalização do FGF18 no CL bovino (A) e controle negativo (B). FGF18 foi detectado nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) e em vasos sanguíneos (seta cinza).

A proteína do FGFR3 mostrou-se presente no citoplasma e núcleo de células luteínicas pequenas e grandes e vasos sanguíneos em todos os estádios de desenvolvimento do CL. Sendo que a marcação nuclear variou em intensidade em células distintas do mesmo CL (Fig.5).

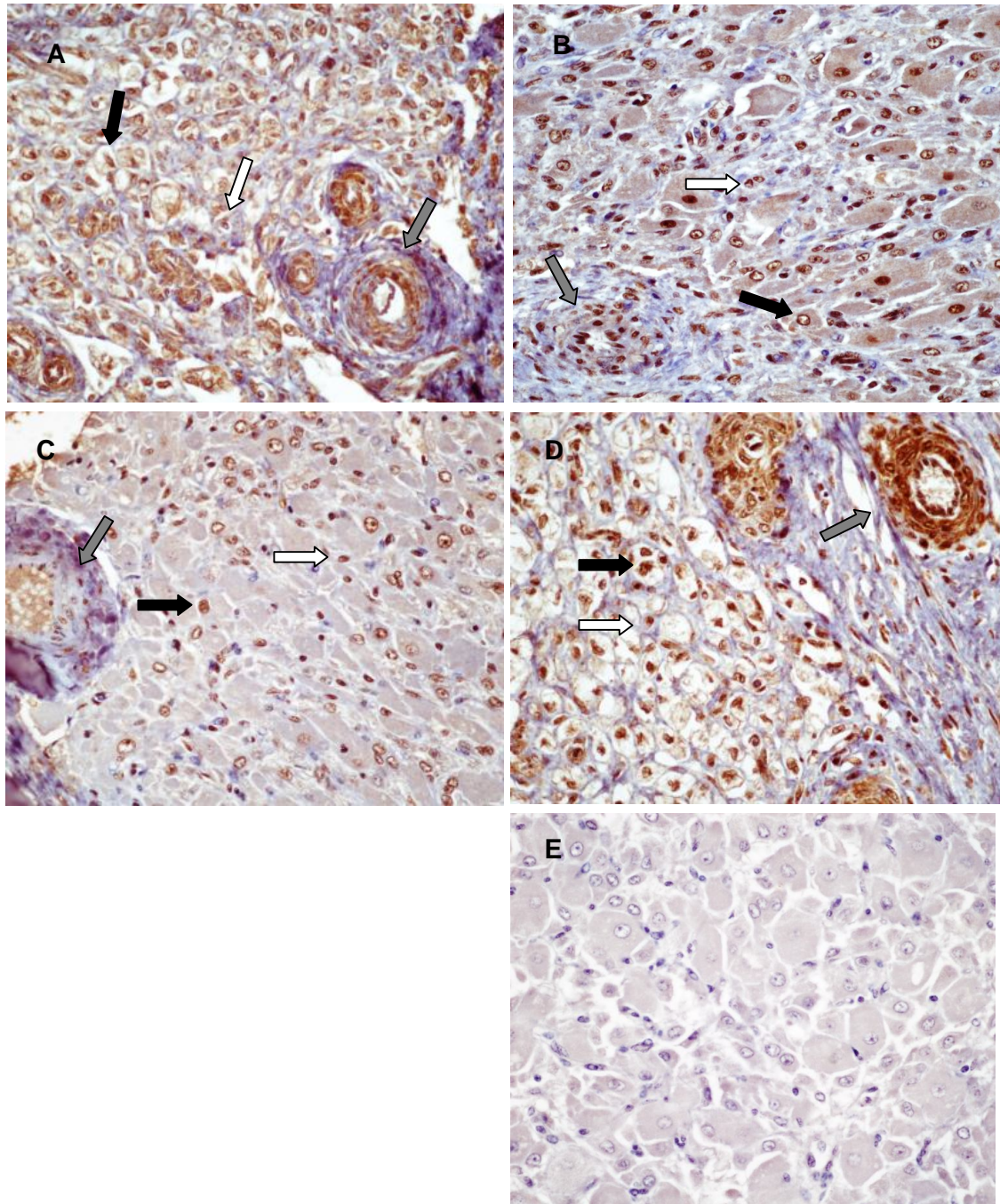


Fig. 5 Imunolocalização do FGFR3 no CL bovino. O FGFR3 foi detectado nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) nos estádios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4

(D),e em vasos sanguíneos (seta cinza). Controle negativo para imunolocalização do FGFR3 (E).

Interessantemente, em um único CL de estágio 2, observou-se um acúmulo da proteína do FGFR3 na região perinuclear (Fig.6)

Estágio 2

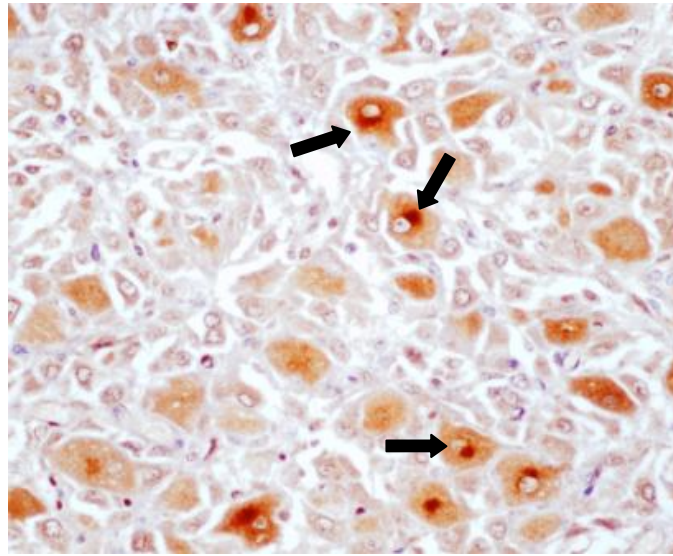


Fig. 6 Imunolocalização do FGFR3 no CL bovino. Foto ilustrativa da marcação perinuclear do FGFR3 (setas pretas).

A proteína do FGFR4 foi localizada fracamente no citoplasma em todos os estádios do desenvolvimento luteínico, além disso, um único CL de estágio 1 mostrou-se negativo (Fig. 7).

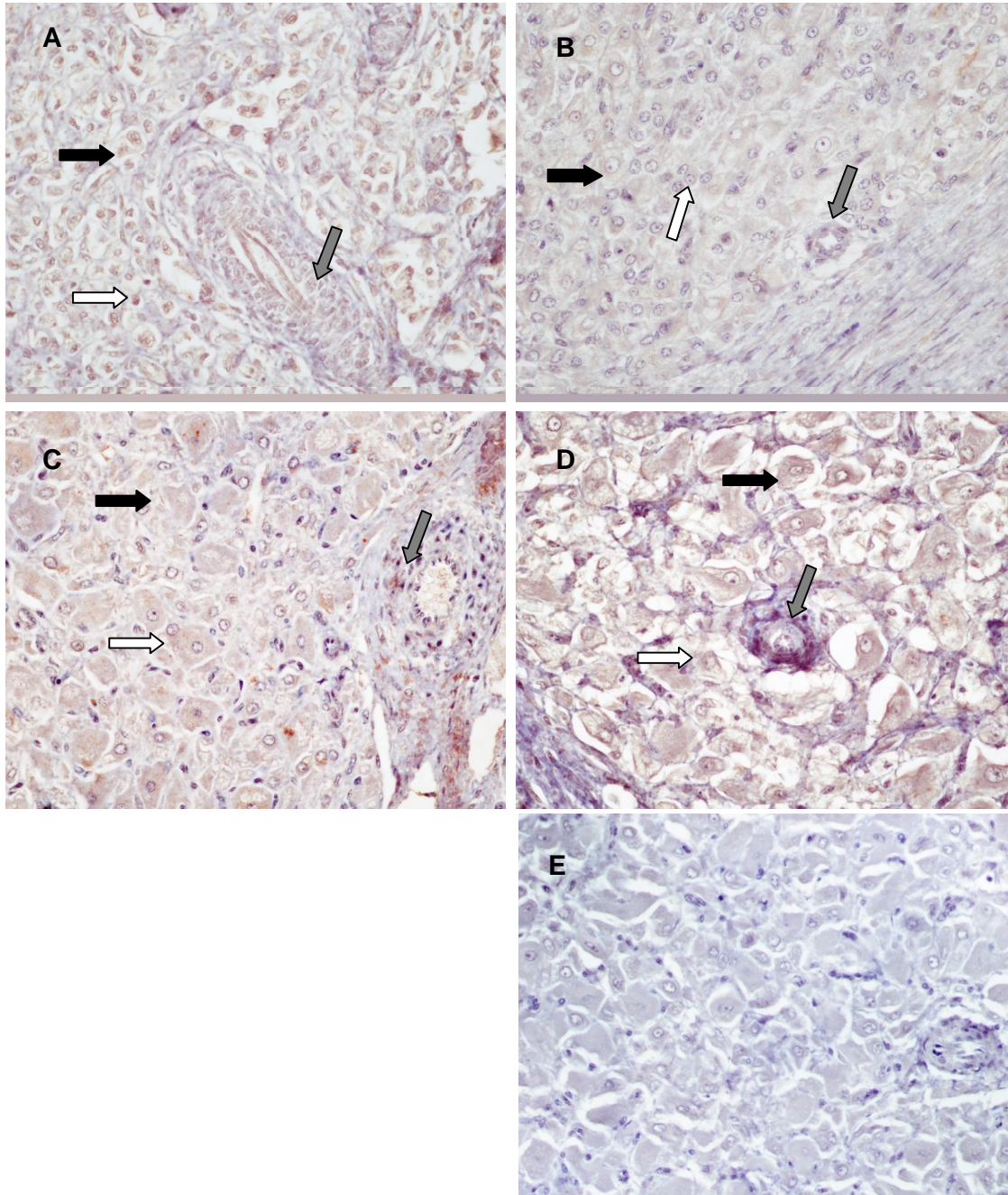


Fig. 7 Imunolocalização do FGFR4 no CL bovino. O FGFR4 foi detectado fracamente nas células luteínicas pequenas (seta branca), grandes (seta preta) nos estádios 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D). Controle negativo para imunolocalização do FGFR4 (E).

DISCUSSÃO

Este estudo mostra pela primeira vez o perfil de expressão dos membros da subfamília do FGF8 (FGF8, 17 e 18) e de seus principais receptores FGFR3C e FGFR4 em diferentes estádios do desenvolvimento luteínico e durante a luteólise induzida.

Os RNAm do FGFR3C e 4 mostraram-se expressos em todos os estádios do CL sem variação. Sendo assim, o padrão de expressão do FGFR3C é semelhante ao padrão dos demais subtipos C de FGFR (FGFR1C e FGFR2C) já investigados no CL bovino, e difere daquele observado para o FGFR1B e FGFR2B que mostraram-se aumentados no CL maduro e durante a luteólise estrutural, respectivamente (GUERRA et al., 2008; CASTILHO et al., 2008). Por outro lado, a expressão do RNAm do FGFR3C foi alterada pela PGF2 α durante a luteólise induzida. No presente trabalho a detecção da expressão do FGFR3C e FGFR4 difere de dados publicados anteriormente (GUERRA et al., 2008) em que a expressão do RNAm foi inconsistente durante o desenvolvimento do CL bovino. Esta divergência de dados é muito provavelmente decorrente das distintas técnicas de PCR utilizadas nos dois estudos. Enquanto que no primeiro estudo utilizou-se PCR seguido de eletroforese em gel de agarose, no presente estudo, os RNAm foram detectados por PCR em tempo real, técnica com maior sensibilidade em relação à anterior. Além disso, diferentes primers com eficiência possivelmente aumentada foram associados ao PCR em tempo real.

A expressão do RNAm do FGF18 mostrou-se aumentada no período correspondente ao CL maduro e início da luteólise funcional (estádio 3) em comparação aos outros estádios do desenvolvimento luteínico. No entanto, a expressão do FGF18 não variou durante a luteólise induzida. Estes dados sugerem a participação do FGF18 e de seus receptores no controle da diferenciação do CL. O padrão de expressão do FGF18 difere de outros FGFs previamente detectado no CL bovino como o FGF10 e o FGF7, cujos níveis de RNAm não variaram ao longo do desenvolvimento e regressão do CL (CASTILHO et al., 2008; SALLI et al., 1998).

O FGF18 é considerado um fator envolvido no desenvolvimento de vários sistemas (CORMIER et al., 2005). Estudos *in vitro* indicaram atividade proliferativa do FGF18 em osteoblastos e condrócitos de camundongos (SHIMOAKA et al., 2002). Em bovinos, o FGF18 está envolvido no controle da diferenciação das células da granulosa, onde ele modula a esteroidogênese folicular. O FGF18 diminuiu a expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas CYP11A1, HSD3B1 e STAR em células da granulosa *in vitro* e, conseqüentemente, determinou a diminuição da produção de P4 e estradiol (PORTELA et al., 2010).

O aumento significativo da expressão do RNAm do FGF18 no período correspondente ao início da luteólise funcional, em conjunto com os dados supracitados, sugere o envolvimento do FGF18 na queda da produção de P4 no CL bovino, possivelmente associada à diminuição da transcrição de STAR, como promovida pelo FGF18 em folículos. Além disso, a queda da produção de P4 no CL bovino também está associada à alteração da vascularização local (MYAMOTO 2009). Como o FGF18 e seu principal receptor (FGFR3) foram detectados em vasos sanguíneos do CL bovino, é possível que este complexo também altere a função do CL via regulação da vascularização.

A formação de novos vasos sanguíneos é um processo importante para o estabelecimento da produção de P4. Até o momento não foi determinado o envolvimento do FGF18 na vascularização do CL. No entanto, o FGF18 está associado à angiogênese em outros tecidos, como tecidos cardiovasculares, onde atua como um fator quimioatrativo para a migração de células endoteliais, mas sem atividade proliferativa nesse sistema (ANTOINE et al., 2006).

Em contraste com a fraca e inconsistente presença do FGFR4 no CL bovino, a proteína do FGFR3 mostrou-se presente no citoplasma e núcleo das células luteínicas grandes e pequenas. Interessantemente, em um único CL do segundo estágio luteínico, observou-se marcação perinuclear do FGFR3. Essa marcação pode representar fase de migração da proteína do citoplasma para o núcleo, conforme relatado em osteoblastos (SABIETTI et al., 2005).

A translocação nuclear do FGFR2 e do FGF2 foi observada em osteoblastos, onde esta localização foi induzida pela PGF2 α e mostrou-se associada à redução da abundância do RNA mensageiro do FGFR2 (SABIETTI et al., 2005). Sendo assim, a imunomarcação nuclear do FGFR3 e os valores inferiores da expressão do RNAm do FGFR3C durante a luteólise induzida, sugerem que a PGF2 α possa determinar queda da produção do RNAm do FGFR3C via estímulo à translocação nuclear como observado em osteoblastos, embora a translocação nuclear não tenha sido medida durante a luteólise induzida.

A localização nuclear dos FGFRs foi relatada por inúmeros autores e está relacionada com a regulação da diferenciação e proliferação celular (MAHER et al., 1996). BERISHA et al., (2006) relataram a localização nuclear do FGF2 em células luteínicas bovinas, associada a aumento do respectivo RNAm após o pico de LH, indicando possível participação do FGF2 na diferenciação das células da granulosa em células luteínicas estimulado pelo LH (BERISHA et al., 2006). O FGF2 possui alta afinidade pela isoforma “C” dos FGFRs e pelo FGFR4 (ZHANG 2006). Como o FGFR3C mostrou-se expresso e a proteína foi localizada no núcleo das células luteínicas no CL em formação (estádio 1), é possível que o FGFR3C medie ações nucleares do FGF18 e também do FGF2, que podem se somar no controle da diferenciação das células luteínicas durante a formação do CL (SHIMOAKA et al., 2002).

Em suma, o presente trabalho indica a participação do FGF18 do FGFR3C na regulação do desenvolvimento e regressão do CL bovino. No entanto, estudos funcionais são necessários para o melhor entendimento das funções desempenhadas pelo FGF18 nos mecanismos reguladores da função do CL.

REFERÊNCIA

- ANTOINE, M., WIRZ, W., TAG, CG., GRESSNER, A.M., WYCISLO, M., MÜLLER, R., KIEFER, P., Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 346, p. 224-33, 2006.
- BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPANIER, R., Expression and localisation 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.
- BERISHA, B., STEFFL, M., AMSELGRUBER, W., SCHAMS, D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. **Reprod.**, v. 131, p. 319–329, 2006.
- CASTILHO, A. C., GIOMETTI, I. C., BERISHA, B., SCHAMS, D., PRICE, C. A., AMORIN, R. L., PAPA, P. C., AND BURATINI, J. JR.. Expression of fibroblast growth factor-10 and its receptor, 259 fibroblast growth factor-2B, in the corpus luteum. **Mol. Reprod. Dev.** v. 75, p. 940-945, 2008.
- CHANING, C.P., Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology. **J. Endocrinol.** v.43, p. 381-390, 1969.
- CORMIER, S., LEROY, C., DELEZOIDE, A.L., SILVE, C., Expression of fibroblast growth factors 18 and 23 during human embryonic and fetal development. **Gene Expr Patterns.** v. 5, p. 569-73. 2005.
- FARIN, C.E., MOELLER, C.L., SAWYER, H.R., GAMBONI, F., NISWENDER, G.D., Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biol Reprod.** v. 35, p. 1299-308, 1986.
- GUERRA, D.M., GIOMETTI I. C., PRICE C.A., ANDRADE P.B., CASTILHO A.C., MACHADO M.F., RIPAMONTE P., PAPA P.C., BURATINI. J. JR. Expression of

- fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum **Reprod. Fert. Dev.**, v. 20, p. 659-664, 2008.
- IRELAND. J.J, MURPHEE, R.L, COULSON, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by cross appearance of corpus luteum, **J. Dairy Science.** v. 63, p. 155-160, 1980.
- MAHER P. A. Nuclear Translocation of Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptors in Response to FGF-2. **The Journal of Cell Biology** v. 134, p. 529-536, 1996.
- MCCRACKEN. J. A., CUSTER. E.E., JUSTIN. C.L. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological reviews.** v. 79, 1999.
- MIYAMOTO A., SHIRASUNA K., SASAHARA K.. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology.** v., p., 2009.
- NEUVIANS, T.P., BERISHA, B., SCHAMS, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 67, p. 389–395, 2004a.
- NEUVIANS, T.P., SCHAMS, D., BERISHA, B., PFAFFL, M.W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F₂α-induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 473–480. 2004b.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTOSH, E.W. Mechanisms controlling the function and lifespan of the corpus luteum. **Physiol. Rev.** v. 80, p.1-29, 2000.
- PORTELA V M, MACHADO M F, BURATINI, J JR.3 ZAMBERLAM G, AMORIM R L, GONCALVES P BD, PRICE C A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Bio. Reprod.** in press.
- SABBIETI M.G., MARCHETTI L, GABRIELLI MG. MENGHI M. MATERAZZI S. MENGHI G. RAISZ L G HURLEY M M. Prostaglandins differently regulate FGF-2 and FGF receptor

- expression and induce nuclear translocation in osteoblasts via MAPK kinase. **Cell Tissue Res**, v. 319, p. 267–278, 2005.
- SALLI, U., BARTOL, F. F., WILEY, A. A., TARLETON, B. J., BRADEN, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.77-83, 1998.
- SHIMOAKA T, OGASAWARA T, YONAMINE A, CHIKAZU D, KAWANO H, NAKAMURA K, ITOH N, KAWAGUCHI H. Regulation of Osteoblast, Chondrocyte, and Osteoclast Functions by Fibroblast Growth Factor (FGF)-18 in Comparison with FGF-2 and FGF-10. **The Journal Biology Chemistry**. vol. 277, pp. 7493–7500, 2002.
- SUGINO, N., OKUDA K.. Species-Related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. **J. Reprod. Dev.** v. 53, p. 977-986, 2007.
- 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.
- STOCCO, C., TELLERIA, C., GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine reviews**. v. 28, p. 117-149, 2007.
- YAMASHITA, H, KAMADA, D, SHIRASUNA, K, MATSUI M, SHIMIZU, T, KIDA, K , BERISHA, B, SCHAMS, D, MIYAMOTO, A. Effect of Local Neutralization of Basic Fibroblast Growth Factor or Vascular Endothelial Growth Factor by a Specific Antibody on the Development of the Corpus Luteum in the Cow. **Mol. Reprod. Dev.** v. 75, p. 1449-56, 2008.
- ZHANG, X., IBRAHIMI, O.A., OLSEN, S.K., UMEMORI, H., MOHAMMADI, M., ORNITZ, D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF family. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 15694–15700, 2006.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- Os RNAm do FGF18, FGFR1B, FGFR1C, FGFR2C, FGFR3C e FGFR4 estão presentes ao longo do desenvolvimento e regressão do CL bovino, enquanto que os RNAm do FGF8, FGF17 e FGFR3B são expressos fraca e de forma inconsistente no CL bovino.
- A expressão do FGFR3C diminuiu durante a luteólise induzida, indicando possível controle da expressão do RNAm do FGFR3C pela PGF2 α .
- As proteínas FGF18, FGFR1, FGFR2, FGFR3 estão presentes nas células luteínicas grandes e pequenas do CL bovino.
- O FGF18 e FGFR3 foram localizados em vasos sanguíneos, sugerindo envolvimento no controle da vascularização do CL.
- Os padrões de expressão do FGF18 e dos receptores FGFR1B, FGFR1C, FGFR2C, FGFR3C, sugerem seu envolvimento no controle da função do CL em bovinos.