

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS
DURANTE A LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE EM ÉGUAS**

RUBIA ALVES SCHMITH

BOTUCATU - SÃO PAULO
JULHO 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS
DURANTE A LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE EM ÉGUAS**

RUBIA ALVES SCHMITH

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção ao título de Mestre em Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira

BOTUCATU - SÃO PAULO
JULHO 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schmith, Rubia Alves.

Expressão de fatores de crescimento fibroblásticos durante a luteogênese e luteólise em éguas / Rubia Alves Schmith. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira
Capes: 50504002

1. Equino. 2. Biotecnologia animal. 3. Luteólise. 4. Prostaglandinas. 5. Neovascularização.

Palavras-chave: Angiogênese; Biópsia luteínica; Equino; Prostaglandina.

Nome do autor: Rubia Alves Schmith

Título: EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS DURANTE A LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE EM ÉGUAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof.^a Dr.^a Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof.^a Dr.^a Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Membro

Universidade Presidente Antônio Carlos de Uberlândia - Uberlândia /MG

Data da Defesa: 22 de julho de 2016.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Subdivisão da família FGF de acordo com a atuação autócrina, parácrina ou endócrina	6
FIGURA 2. FGFR com os três domínios (D1, D2 e D3) de imunoglobulinas extracelular, a caixa ácida em vermelho e as proteínas quinase (PTK) no domínio intracelular.....	8
FIGURA 3. FGF-FGFR com a ligação de HSPG no domínio 2, a auto fosforilação das proteínas quinase (PTK) no domínio intracelular e ativação de proteínas de ancoragem FRS 2 e RAS.....	10
FIGURA 4. Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas po RT-qPCR para o gene FGF 2.....	41
FIGURA 5. Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas po RT-qPCR para o gene FGF 7.....	41
FIGURA 6. Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas po RT-qPCR para o gene FGF 10.....	42
FIGURA 7. Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas po RT-qPCR para o gene FGFR 2B.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CL	Corpo lúteo
ECD	Domínio extracelular
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGFs	Fatores de crescimento fibroblástico
FGF 1	Fator de crescimento fibroblástico 1
FGF 2	Fator de crescimento fibroblástico 2
FGF 7	Fator de crescimento fibroblástico 7
FGF 10	Fator de crescimento fibroblástico 10
FGFR 1	Receptor do fator de crescimento fibroblástico 1
FGFR 4	Receptor do fator de crescimento fibroblástico 4
FGFR 2B	Receptor do fator de crescimento fibroblástico 2B
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HSPG	Glicoproteína sulfato de heparina
FRS	Proteína de ancoragem
IFNG	Interferon gama
KDa	Quilo Dalton
KGf 1	Fator de crescimento fibroblástico / queratinócito 7
KGf 2	Fator de crescimento fibroblástico / queratinócito 10
LH	Hormônio Luteinizante
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
ng	Nano grama
P4	Progesterona
P450 ^{scc}	Proteína clivadora de cadeia lateral P450
PTK	Proteína quinase receptor
PGE	Prostaglandina E

PGF	Prostaglandina
PGFM	13,14-dihydro-15-keto-prostaglandina
PGF2 α	Prostaglandina 2 α
RNAm	RNA mensageiro
STAR	Proteína reguladora da esteroidogenese
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UI	Unidade Internacional
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
μ m	Micra
3 β HSD	3 β Hidroxiesteróide desidrogenase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1. Corpo Lúteo	32
2.2. Angiogênese	33
2.3. Sistema FGF	35
2.3.1. Fator de Crescimento Fibroblástico 2	40
2.3.2. Fator de Crescimento Fibroblástico 7	41
2.3.3. Fator de Crescimento Fibroblástico 10	41
2.3.4. Receptor do Fator de Crescimento Fibroblástico 2B	42
2.4. Luteólise	42
3. REFERÊNCIAS	456
HIPÓTESE	578
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	578
CAPÍTULO 2	30
ARTIGO	31
ANEXOS	41

RESUMO

S SCHMITH, R. A. EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS DURANTE A LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE EM ÉGUAS. Botucatu - SP. 2016, p.42. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) participam da diferenciação celular, da angiogênese e do desenvolvimento do corpo lúteo (CL). O FGF atua em conjunto com a glicoproteína sulfato de heparina (HSPG) para ativar seu receptor (FGFR) e induzir diversas respostas celulares. O presente estudo teve por objetivo descrever a expressão gênica de FGF 2 e 7 no tecido luteínico durante o diestro de éguas, e investigar o efeito do tratamento com diferentes doses de prostaglandina (PGF 2 α) sobre sua expressão. Para este estudo, foram utilizadas 18 éguas. O estudo foi dividido em dois grupos experimentais conforme a fase de desenvolvimento luteínica, D2 para a fase de luteogênese e D8 fase de manutenção do CL. As éguas foram distribuídas em três grupos tratamentos (n=3 éguas/grupo) de acordo com o tratamento a ser realizado: grupo controle (solução salina), grupo PGF 1 (aplicação de 1 mg de dinoprost trometamina) e grupo PGF 10 (aplicação de 10 mg de dinoprost trometamina). Seis horas após a aplicação de PGF 2 α , foram coletados fragmentos teciduais de CL por biópsia guiada por ultrassonografia transvaginal, para a quantificação gênica de FGF por RT-qPCR. Não foi encontrada diferença estatística na expressão dos fatores após o tratamento com PGF 2 α , contudo, os níveis de expressão de FGF 2 foi significativamente maior no grupo tratamento controle D2 em relação ao grupo controle do D8 (P=0,01), sugerindo que são ativados na angiogênese, mas que na fase de manutenção estes níveis diminuem para ação de outros fatores. Conclui-se que o RNAm de FGF 2 e 7 foram expressos no tecido luteínico na fase de luteogênese e de manutenção participando na sinalização celular e formação CL.

Palavras-chave: angiogênese, biópsia luteínica, equino, prostaglandina.

ABSTRACT

SCHMITH, R.A. EXPRESSION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR DURING LUTEOGENESIS AND LUTEOLISIS OF CORPUS LUTEUM IN MARES. Botucatu - SP. 2016, p.42. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The fibroblast growth factors (FGFs) has a participation on the cell differentiation, angiogenesis and corpus luteum (CL) development. The FGF acts in conjunction with the glycoprotein heparin sulfate (HSPG) to activate its receptor (FGFR) and induce various cellular responses. Thinking on it, this study aimed to describe the gene expression of FGF 2 and 7 in the luteal tissue during the mares diestrus, and investigate the effect of the treatment with different doses of prostaglandin (PGF 2a) on its expression. For this study, 18 mares were used. The study was divided into two stages according to the development of luteal phase: D2 to luteogenesis and D8 to CL maintenance phase. The mares were divided into three treatment groups (n= 3 mares/group) according to the treatment to be performed: control group (saline solution), group PGF 1 (1 mg of dinoprost tromethamine) and group PGF 10 (10 mg of dinoprost tromethamine). Six hours after PGF 2a injection, CL tissue samples were collected by biopsy guided by transvaginal ultrasound, for the quantitation of the FGF gene expression by RT-qPCR. There was no statistical difference in the expression of factors following the treatments with PGF 2a, however, FGF 2 expression levels was significantly higher in the control group at D2 when compared with the control group at D8 ($p=0.01$), suggesting that FGF 2 are activated in angiogenesis, but in the maintenance phase, decrease to other factors action. It was concluded that FGF 2 and 7 mRNA expressed on luteal tissue on luteogenesis phase and maintenance participate in cell signaling and CL formation.

Keywords: angiogenesis, luteal biopsy, equine, prostaglandin

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O CL é uma glândula transitória responsável pela síntese de progesterona (P4) e caracterizado pela rápida remodelação, diferenciação e morte celular (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989).

As células esteroidogênicas do CL são responsáveis pela síntese e liberação de P4 na circulação sistêmica (TAMADA et al., 2010). Sua regressão ocorre devido à secreção endometrial de PGF 2 α . Tanto o desenvolvimento como a regressão do CL são mediadas por hormônios com ação luteotrófica ou luteolítica.

O desenvolvimento, manutenção e regressão do CL estão estritamente relacionados com o extenso sistema vascular ovariano (GINTHER et al., 2007). Um adequado aporte sanguíneo é essencial para o desenvolvimento normal do CL e para a sua função secretora (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). A contínua formação e regressão de redes vasculares a partir de vasos pré-existentes do sistema reprodutivo é mediada por diversos fatores angiogênicos.

A ativação do FGF-FGFR na biologia celular desempenha um papel de regulador da homeostase e processos regenerativos, assim como no desenvolvimento embrionário (CARMELIET; JAIN, 2000). As suas ações são sinalizadas por receptores de superfície celular, juntamente com a dimerização com o HSPG. A ativação inadequada do sistema pode causar patologias esqueléticas, olfativas, distúrbios metabólicos, neoplasias e alteração do equilíbrio angiogênico (HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

A angiogênese inicia com a degradação da membrana basal e ativação das células endoteliais que deverão migrar e proliferar formando novos vasos sanguíneos (CARMELIET, 2000). Estudos em bovinos, sugerem que membros da família do FGF participam da diferenciação luteínica, principalmente no controle da angiogênese, durante o desenvolvimento e regressão do CL (SALLI et al., 1998; BERISHA; SINOWATZ; SCHAMS, 2004; CASTILHO et al., 2008).

Deste modo, o presente estudo visa descrever a expressão de membros do FGF 2 e 7 no CL de equinos. Além de, possíveis distúrbios no desenvolvimento da rede vascular luteínica e na função secretora do CL devido ao tratamento com fármacos de ação antiluteogênica em diferentes momentos

do ciclo estral, contribuindo para o entendimento dos fenômenos vasculares e hormonais durante a luteogênese e luteólise induzida em éguas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Corpo Lúteo

O CL é uma glândula endócrina transitória secretora de P4. A vida útil do CL pode ser dividida em três estágios: luteogênese, fase de manutenção e luteólise (GINTHER, 1992). Em equinos, a luteogênese tem início ainda durante o processo de maturação folicular (WUTTKE et al., 1998) e é concluída três dias após a ovulação (NISWENDER; NETT, 1993), quando a máxima proliferação de vasos sanguíneos no CL é detectada (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003).

Após a ovulação, a transformação estrutural das células das camadas foliculares em células luteínicas se torna um processo irreversível. O processo de divisão é interrompido e iniciam a diferenciação e expressão de novas moléculas, causando uma hipertrofia das células que de 10 μm podem chegar até 37 μm de diâmetro (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007; GINTHER, 1992).

Nas espécies domésticas os CLs são compostos por células grandes e pequenas sendo derivadas da camada folicular granulosa que secretam altas concentrações de P4 e a teca interna que respondem ao hormônio luteinizante (LH) e secretam baixos níveis de P4, respectivamente (KOOS; HANSEL, 1981; FITZ et al., 1982). Além disso, possui células não luteínicas como fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos (TOWNSON; LIPTAK, 2003).

A principal finalidade desta reorganização celular é a síntese de P4. A proteína reguladora da esteroidogênese STAR transporta o colesterol livre em forma de lipoproteínas para o interior da membrana mitocondrial interna. No interior da membrana ocorre o aumento da ação das enzimas P450 clivadora de cadeia lateral (P450scc) e a 3β -hidroxiesteroide desidrogenase (3β -HSD), que convertem o colesterol em P4 (FRASER et al., 2000; WATSON, 2000; BEG et al., 2005).

Uma intensa neovascularização é observada no CL em formação e este fenômeno é modulado por diferentes fatores angiogênicos de origem ovariana e uterina (BERISHA; MEYER; SCHAMS, 2010). Um adequado aporte sanguíneo tecidual é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células-alvo ovarianas. Para tanto, fatores inibitórios e estimuladores atuam simultaneamente para propiciar o contínuo desenvolvimento do sistema vascular do trato reprodutivo (ALLEN; GOWER; WILSHER, 2007).

2.2. Angiogênese

Os vasos sanguíneos podem ser originados por dois mecanismos distintos: vasculogênese e angiogênese. Vasculogênese é o processo de formação de vasos a partir de células precursoras denominadas angioblastos (RISAU, 1997), enquanto que angiogênese é a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes (FOLKMAN; SHING, 1992). Angiogênese é um processo complexo que requer interação espacial e temporal de múltiplos fatores regulatórios, seus receptores e vias de sinalização intracelular (EKLUND; OLSEN, 2006). Em éguas, a modulação deste fenômeno é fundamental tanto para a formação como para a manutenção do CL (FOLKMAN; SHING, 1992). A densidade microvascular aumenta durante a formação do CL e diminui na fase luteolítica (FERREIRA-DIAS et al., 2006)

O CL é altamente vascularizado e sua nutrição é essencial para a manutenção da atividade metabólica e secretória. Para tanto, a rápida formação de uma extensa rede de capilares é fundamental para a adequada funcionalidade luteínica. Sendo assim, a angiogênese proporcionada pela proliferação e migração ordenada de células endoteliais merece destaque na formação do CL (REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992). Além da produção de progesterona, há evidências da participação de fatores parácrinos na migração, proliferação e diferenciação celular, necessária à angiogênese e formação do CL. Dentre eles destacam-se os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o FGF-1, FGF-2, FGF-7 e FGF-10, (SALLI et al., 1998; ROBINSON et al., 2007; CASTILHO et al., 2008) e as angiopoietinas (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007) que são, aparentemente, estimulados pelo LH (FRASER et al., 2005).

O VEGF é composto por cinco membros distintos, dos quais se destaca o VEGF-A que é considerado um regulador da angiogênese (FERRARA, 2009). Contudo, estudos em equinos relatam que há uma maior proliferação das células no início da luteogênese e fase média da formação do CL, quando há maior expressão de RNAm que codifica a proteína VEGF nestas fases e, posteriormente, uma diminuição durante a luteólise natural e induzida. Indicando uma função parácrina do VEGF (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003).

Historicamente, nos anos 80 observou-se a identificação, purificação e sequenciamento dos fatores pró-angiogênicos FGF 1 e 2 (MACIAG; MEHLMAN; FRIESEL, 1984; ITOH; ORNITZ, 2004). O FGF é uma das primeiras moléculas da classe dos fatores angiogênicos a ser descrita na estimulação da proliferação, migração e diferenciação das células *in vivo* e *in vitro*. Entre outras funções, participam da reparação tecidual, cicatrização de feridas, sobrevivência das células neurais e no desenvolvimento do pulmão e cérebro (BIKFALVI et al., 1997). A sua capacidade de participar direta ou indiretamente em vários aspectos na morfogênese vascular tem dificultado as observações nos processos de formação de vasos alterados nos casos de neoplasias (JAVERZAT; AUGUSTE; BIKFALVI, 2002).

Os FGFs endógenos ou exógenos, mas principalmente o FGF 2 são capazes de induzir reguladores da angiogênese como o VEGF na neovascularização de tumores e na sinalização das células endoteliais (SEGHEZZI et al., 1998; AUGUSTE et al., 2001) Os fatores de crescimento FGF 2 e VEGF estão associados com uma excessiva angiogênese de micro vasos no câncer de próstata, melanoma, retinopatia diabética e artrite reumatoide (DOLL et al., 2001; STRAUME; AKSLEN, 2002). Estudos estão sendo desenvolvidos para a produção de inibidores de FGF e VEGF (ROSEN, 2000).

Os fatores angiogênicos estimulam as células endoteliais a secretar proteases e ativar o plasminogênio, resultando na degradação da membrana basal do vaso, permitindo que células possam invadir a sua matriz. As células migram, proliferam e se diferenciam para formar um novo vaso. Para a formação de uma nova membrana basal são secretados fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o qual vai atrair células de suporte tais como pericitos, que proporcionam estabilidade ao vaso (CARMELIET, 2000). Juntamente com a ação de outros fatores como as angiopoietina e efrinas que atuam na regulação

da estabilidade (YANCOPOULOS et al., 2000). Os FGFs envolvidos na formação luteínica de equinos são pouco conhecidos e estão sendo revelados. O FGF 2 foi descrito na formação do CL e sofre influência do LH (MAIA et al., 2016).

2.3. Sistema FGF

Os FGFs foram identificados por técnicas de purificação de proteínas a partir de fibroblastos ou com uma combinação de ferramentas de bioinformática e homologia baseada em PCR. Sendo uma das maiores famílias de fatores de crescimento constituído de 23 membros, com variação de massas moleculares de 17 a 34 kDa, compartilham uma homologia de sequência de 15-85% (Figura 1) (RUBIN et al., 1989; YAMASAKI et al., 1996; YAMASHITA; YOSHIOKA; ITOH, 2000; ITOH; ORNITZ, 2008). Foram descritos na classe dos mamíferos (YAMASHITA; YOSHIOKA; ITOH, 2000; ORNITZ; ITOH, 2001). Os FGFs estão subdivididos em seis subfamílias de acordo com a sua análise filogenética (ITOH; ORNITZ, 2004). As subfamílias FGF são agrupadas de acordo com a atuação autócrina, parácrina ou endócrina (GOETZ; MOHAMMADI, 2013).

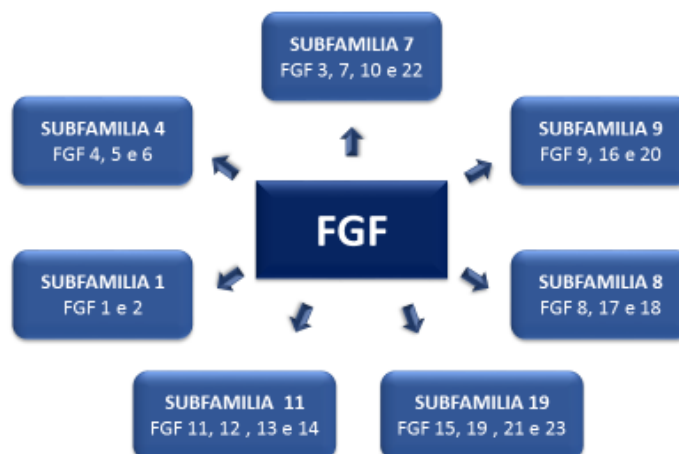


Figura 1: Subdivisão da família FGF de acordo com a atuação autócrina, parácrina ou endócrina.

A família FGF estimula diversas funções como proliferação e divisão celular, diferenciação embrionária e a morfogênese por ligação dos FGFRs.

Dentre outras características importantes destacam-se a regulação da homeostase, cicatrização de feridas, reparação de tecidos e angiogênese (FINCH; RUBIN, 2004). Desempenham funções versáteis durante o ciclo da vida, iniciando na maturação de células germinativas, no desenvolvimento embrionário até na fase adulta, quando se torna um regulador da homeostase, reparador tecidual e controlador das vias metabólicas do colesterol e fosfato sérico (GORIELY, 2003; GLASER et al., 2003; FELDMAN et al., 1995; MCINTOSH; BELLUS; JABS, 2000; YU et al., 2000; HOLT et al., 2003; WHITE et al., 2000; SHIMADA et al., 2004).

Os FGFs apresentam correlação de aproximadamente 90% na sequência de aminoácidos na sua região central homóloga com um tamanho variando entre 17 e 34 kDa. A partir destas características, os membros da FGF podem ser agrupados em subfamílias com base nas propriedades funcionais e nas suas similaridades (ITOH; ORNITZ, 2004; ZHANG et al., 2006). Quatro genes distintos (FGFR-1 a 4) codificam receptores de alta afinidade que interagem com os membros da família FGF (KIM et al., 2001; SLEEMAN et al., 2001).

Nos mamíferos, os FGFR são proteínas que possuem uma região extracelular com três domínios de imunoglobulinas (D1, D2 e D3), uma hélice na região transmembranar e um domínio citoplasmático com proteínas quinase (PTK) (Figura 2). Uma característica única de FGFR é a presença de uma extensão de resíduos de ácido no ligante entre D1 e D2, que é chamado de caixa de ácido (MOHAMMADI; OLSEN; IBRAHIMI, 2005). Região carregada positivamente em D2, que serve como um local de ligação para HSPG (SCHLESSINGER et al., 2000). Acredita-se que o primeiro domínio de tipo Ig, D1, desempenha um papel na inibição automática do receptor, enquanto que o segundo e terceiro domínios compreendem o local de ligação do ligante (OLSEN et al., 2004).

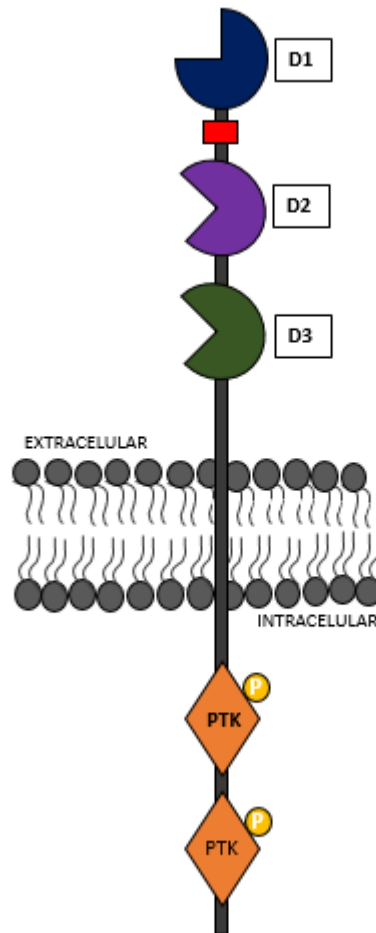


Figura 2: FGFR com os três domínios (D1, D2 e D3) de imunoglobulinas extracelular, a caixa ácida em vermelho e as proteínas quinase (PTK) no domínio intracelular.

Os FGFR são codificados por quatro genes FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3, FGFR 4. A ligação alternativa no domínio D3 dá origem as isoformas b e c, produzindo um total de sete receptores (MOHAMMADI; OLSEN; IBRAHIMI, 2005; ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005). Além disso, demonstrou-se que a isoforma FGFR 2b é exclusivamente expressa em células epiteliais (também designados como KGFR), e que o FGFR 2c é expresso exclusivamente em células mesenquimais (ORR-URTREGER et al., 1993). (Tabela 1). Cada tipo celular pode expressar receptores de alta e baixa afinidade. Os sítios de ligações de FGFR quando expostos ao FGF e ao tratamento com heparinases observaram que HSPG se ligava no domínio de baixa afinidade (MOSCATELLI, 1987). O HSPG é um glicosaminoglicano altamente sulfatado que potencializa a atividade mitogênica do FGF 1 e 2 nas células endoteliais (SHING et al., 1984; MACIAG; MEHLMAN; FRIESEL, 1984). Estão presentes na

matriz extracelular das células e servem como co-receptores para o FGF (ORNITZ, 2000). HSPG se liga ao domínio D2 de baixa afinidade de FGFR que não transmite um sinal biológico, mas funciona como uma molécula acessória que regula a ligação de FGF. A ligação de FGF ao HSPG no domínio extracelular do FGFR induz a dimerização, a ativação e a auto fosforilação dos múltiplos resíduos de tirosina no domínio citoplasmático (SCHLESSINGER et al., 2000).

TABELA 1: FGFRs e seus ligantes específicos. Adaptado de Eswarakumar e Schlessinger, 2005.

Ligação específica das isoformas de FGFR	
Isoforma de FGFR	Ligante Específico
FGFR 1B	FGF 1, 3 e 10
FGFR 1C	FGF 2, 4, 5 e 6
FGFR 2B	FGF 3, 7, 10 e 22
FGFR 2C	FGF 2, 4, 6, 9, 17 e 18
FGFR 3B	FGF 1 e 9
FGFR 3C	FGF 2, 4, 8, 9, 17, 18 e 23
FGFR 4	FGF 2, 4, 6, 8, 9, 16, 17, 18 e 19

Na interação entre o FGF e o FGFR, ocorre dimerização e fosforilação do receptor para que um sinal seja traduzido em uma resposta biológica (Figura 3) (JOHNSON; WILLIAMS, 1993). A ativação da tirosina quinase é mediada por transdução de sinal de fosforilação direta ou por fosforilação de proteínas adaptadoras (KLINT; CLAEISSON-WELSH, 1999). A sinalização é por recrutamento de proteínas que se ligam em locais de auto fosforilação do receptor ou por ligações na região transmembranar dos domínios da proteína de ancoragem (FRS 2) (ONG et al., 2000; DHALLUIN et al., 2000). Proteínas como RAS, GAB, FRS2 e MAKP são fosforiladas e estimulam as vias de sinalização intracelular a controlar a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (KOUHARA et al., 1997).

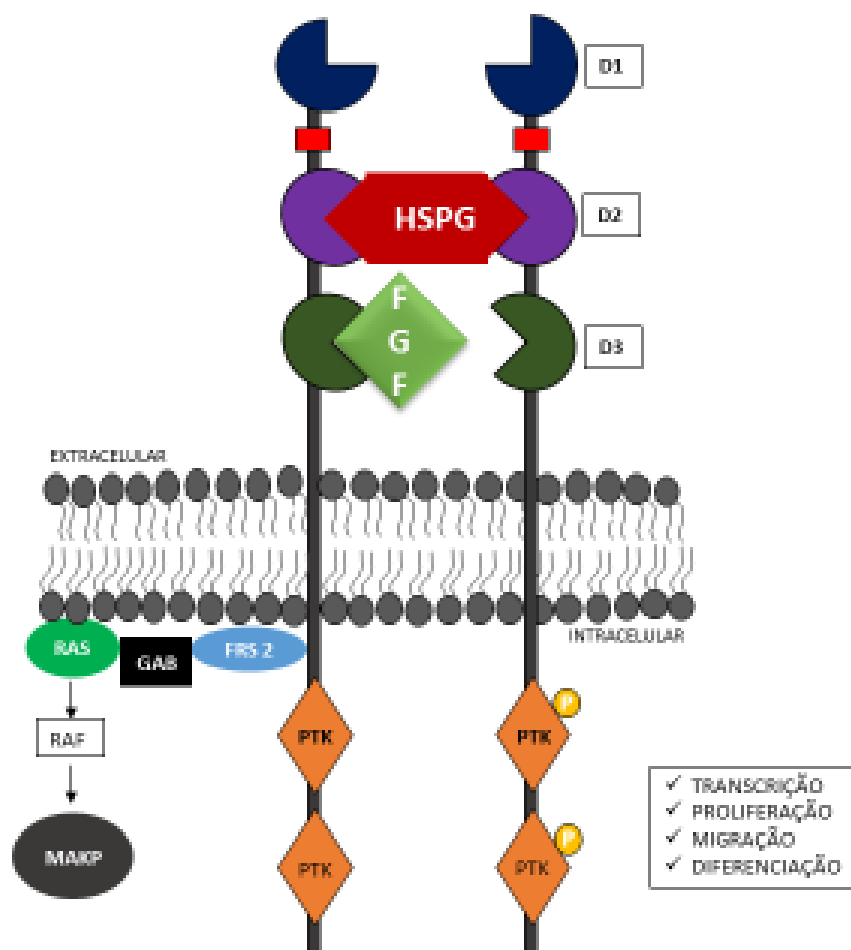


Figura 3: FGF-FGFR com a ligação de HSPG no domínio 2, a auto fosforilação das proteínas quinase (PTK) no domínio intracelular e ativação de proteínas de ancoragem FRS 2 e RAS.

Na espécie bovina a expressão gênica de FGFs no tecido luteínico foi descrita, sugerindo a sua participação no controle e desenvolvimento luteínico (SALLI et al., 1998; BERISHA; SINOWATZ; SCHAMS, 2004; CASTILHO et al., 2008). Dentre eles destacam-se os FGFs 2, 7 e 10, sendo que o FGF 2 e 7 tem alta expressão do RNAm durante a luteogênese, caracterizando o seu envolvimento na angiogênese (BERISHA et al., 2006b; BERISHA et al., 2006a). Castilho et al. (2008) relataram a expressão do FGF 10 e do seu receptor FGFR 2B durante a luteogênese. Adicionalmente, a expressão do receptor aumentou durante a luteólise sugerindo uma função do FGFR 2B no remodelamento tecidual e apoptose durante a fase de regressão do CL.

2.3.1. Fator de Crescimento Fibroblástico 2

A sinalização do FGF pode ser de forma parácrina ou autócrina. O FGF 2 normalmente é produzido como uma isoforma citoplasmática de 18 kDa. Mas pode formar outras quatro isoformas com alta massa molecular, que tem uma sequência adicional de N-terminal e funciona como um direcionador nuclear (BIKFALVI et al., 1995; ARESE et al., 1999). Além disso, os monócitos sinalizam e induzem o FGF 2 para o local da formação de novos vasos (ARRAS et al., 1998). Após uma isquemia, são capazes de promover a formação de uma circulação colateral (RINSCH et al., 2001).

O FGF 2 faz a ativação da PTK ativada pelo mitógeno (MAK) para sinalizar o mecanismo de ação da morfogênese tubular e diminuir a apoptose (MATSUMOTO et al., 2002). FGF 2 promove a proliferação e migração de células endoteliais diretamente por da sinalização de FGFR 1 ou FGFR 2 (OLADIPUPO et al., 2014; XIAO et al., 2015).

Na espécie bovina há participação de FGF 2 e 7 no desenvolvimento e regressão do CL (SALLI et al., 1998; NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004; CASTILHO et al., 2008). A subfamília do FGF 2 é representada pelos membros FGF 1 e 2. O FGF 2 foi um dos primeiros a ser identificado no CL de bovinos (SCHAMS et al., 1994; VAN WEZEL et al., 1995) e há alto grau de expressão gênica deste membro no tecido luteínico (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). O FGF 2 participa do processo de proliferação das células endoteliais luteínicas (JOHNSON et al., 2002). Robinson et al. (2007) detectaram este fator em altas concentrações no desenvolvimento luteínico, confirmando a função angiogênica no CL. No cultivo *in vitro* de células luteínicas bovinas o FGF 2 está presente na fase de manutenção e final do desenvolvimento (WOAD et al., 2012). Este também estimula a secreção de prostaglandinas nas células luteínicas bovina (KOBAYASHI et al., 2001).

2.3.2. Fator de Crescimento Fibroblástico 7

O fator de crescimento dos queratinócitos (KGF I), também conhecido como FGF 7, foi identificado na parte superficial do epitélio ovariano (PARROTT et al., 2000) e nas células da teca (PARROTT et al., 1994; PARROTT; SKINNER, 1998; BERISHA; SINOWATZ; SCHAMS, 2004).

O FGF 7 e o FGF 10 regulam a proliferação e diferenciação de queratinócitos. Ambos são produzidos por células de origem mesenquimal e agem por ativação do FGFR 2b expresso predominantemente nas células epiteliais. Está presente na reparação da lesão tecidual e na cicatrização de feridas (FINCH et al., 1996; WERNER, 1998)

Este membro possui maior afinidade ao receptor FGFR 2B que está situado nas células epiteliais (ORNITZ; ITOH, 2001). O FGF1 e 2 ativam a maioria dos FGFRs, enquanto que o FGF 7 ativa predominantemente um FGFR, o " b " forma de união de FGFR 2. A regulação da especificidade do FGF-FGFR na ligação alternativa do D3 foi demonstrada com FGF 7, utilizando um "loop" autócrino. Descobriu-se que este era variante FGFR 2 e splicing alternativo "b" (MIKI et al., 1991). A expressão de FGF 7 está presente desde o processo maturação folicular e formação do CL em bovinos. Uma das suas funções é a angiogênese desde a maturação folicular, ovulação e formação do CL em bovinos (BERISHA et al., 2006b; SALLI et al., 1998).

2.3.3. Fator de Crescimento Fibroblástico 10

Outro importante membro da subfamília 7 é o fator de crescimento dos queratinócitos (KGF II ou FGF 10). Tanto sua função quanto sequência gênica e estrutural são muito similares ao FGF 7 (EMOTO et al., 1997; OHUCHI et al., 2000), sendo considerado um fator de crescimento de origem mesenquimal e regulador de eventos morfogênicos (CHEN; SPENCER; BAZER, 2000). A regulação da expressão dos KGFs I e II em ovinos não foi observada por (CHEN; SPENCER; BAZER, 2000). Porém, o mesmo foi expresso durante o desenvolvimento do CL de bovinos, assim como a expressão do seu receptor FGFR 2B aumentou no início da luteólise. Estes achados sugerem um papel

específico na apoptose e remodelamento tecidual do CL em regressão (SALLI et al., 1998).

2.3.4. Receptor do Fator de Crescimento Fibroblástico 2B

Os receptores FGFR 1 e 2 do tipo tirosina quinase estão presentes no epitélio, podendo, interagir e estimular a proliferação, migração, produção de protease, morfogênese tubular e a motilidade celular (NAKAMURA et al., 2001). Após a interação do HSPG com FGF a molécula estabiliza, facilita a ligação de FGF com FGFR e serve como reservatório (GOSPODAROWICZ; CHEN, 1986; SAKSELA et al., 1988; SCHLESSINGER; LAX; LEMMON, 1995), mas a sua principal função é promover a conexão de um FGF com um receptor (CUNNINGHAM et al., 1991; DE VOS; ULTSCH; KOSSIAKOFF, 1992).

Receptores de dimerização como os (RTK) tem seus domínios citoplasmáticos muito próximos, proporcionando a auto fosforilação e conseqüentemente, ativação das vias de sinalização (YARDEN; ULLRICH, 1988). Quando há uma desregulação na transdução de sinal dos RTK pode ocorrer as mutações (BREGMAN; SIPES, 1986). A maioria das mutações resultam em formas mais ativadas do receptor, por causa de uma melhor ligação ao ligante devido a uma mudança do domínio extracelular (ECD) (AHMAD; IWATA; LEUNG, 2012).

Sleeman et al. (2001) estudaram alguns receptores FGFR 1 e FGFR 2 com a expressão das isoformas “b” e “c” nos diferentes estágios de desenvolvimento do CL bovino. A expressão do RNAm do FGFR 2b foi detectada por RT-qPCR, sugerindo importantes funções deste receptor no CL bovino (CASTILHO et al., 2008). Neuvians, Berisha e Schams (2004) relataram aumento da expressão dos FGFRs durante a luteólise induzida pela aplicação de PGF 2 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 luteínica.

2.4. Luteólise

Em éguas, a fase luteínica encerra-se espontaneamente entre os dias 13 e 16 pós-ovulação devido à secreção endometrial de PGF 2 α (GINTHER, 1992).

Este é considerado um fenômeno rápido, já que a concentração plasmática de P4 é menor que 2ng/mL com aproximadamente 23 horas após o início da luteólise (GINTHER; HANNAN; BEG, 2011).

A regressão funcional é caracterizada pela queda na produção de progesterona e a regressão estrutural é a morte celular do tecido, causada pela secreção de PGF 2 α uterina (DOUGLAS; GINTHER, 1975). Fisiologicamente, a regressão funcional ocorre após o 10° dia pós-ovulação, sendo que no 16° dia as células diminuem de tamanho e no 20° dia inicia a degeneração celular (VAN NIEKERK; MORGENTHAL; GERNEKE, 1975).

Os primeiros estudos sobre a relação entre a PGF e a luteólise foram em bovinos, suínos, equinos, ovinos e foi observado que nessas espécies a histerectomia prolongava a vida útil do CL, indicando que a PGF é de origem uterina (WILTBANK; CASIDA, 1956; ANDERSON; BUTCHER; MELAMPY, 1961; MOOR; ROWSON, 1966; GINTHER; FIRST, 1971). Nos anos 70 descobriu-se que as éguas eram responsivas a fatores luteolíticos e que a PGF 2 α poderia ser administrada com doses entre 1 a 25 mg (GINTHER; FIRST, 1971; DOUGLAS; GINTHER, 1972).

O cultivo de células luteínicas equina *in vitro* demonstrou que estas secretam PGF, PGE e 6-keto-PGF (WATSON; SERTICH, 1990). Foi demonstrado que as células luteínicas exercem uma modulação e uma retroalimentação autócrina intraluteal, aumentando a produção e o efeito luteolítico da PGF 2 α (TSAI; WILTBANK, 1997; BEG et al., 2005; GALVAO et al., 2010; GALVÃO; FERREIRA-DIAS; SKARZYNSKI, 2013; GALVÃO et al., 2013).

De acordo com Ginther (1992) o CL equino é refratário à PGF 2 α durante os quatro primeiros dias do ciclo estral. Entretanto, o tratamento com PGF2 α durante os primeiros dias pós-ovulação pode resultar na regressão parcial do CL acompanhada pela diminuição transitória da concentração plasmática de P4 (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003). Estes achados sugerem que o CL de éguas pode sofrer uma regressão parcial, de forma semelhante ao descrito em bovinos (CUERVO-ARANGO; NEWCOMBE, 2012), seguida pela ressurgência do CL com a retomada da síntese de P4. Porém, Coffman et al. (2014) ao realizarem os tratamentos em éguas com PGF 2 α durante os primeiros 4 dias após a ovulação, sendo que em D0, D1 e D2 o tratamento foi realizado 2 vezes ao dia e em D3 e D4 uma vez ao dia, descreveram o efeito antiluteogênico

das células luteínicas, e afirmaram que são responsivas a PGF 2 α logo após a ovulação. Desta forma, diminuindo o intervalo interovulatório e sem efeitos adversos sobre a ovulação posterior, função luteínica e prenhez.

Diversas citocinas foram investigadas e testadas no cultivo de células luteínicas equina, dentre estas fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (IFNG), fator pró-apoptótico fas ligante (FASL) e óxido nítrico (NO). (BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002 ; FERREIRA-DIAS et al., 2011; GALVÃO et al., 2012b; GALVÃO; FERREIRA-DIAS; SKARZYNSKI, 2013; GALVÃO et al., 2013). Estas citocinas são expressas na luteólise e atuam como agentes luteolíticos diminuindo a atividade angiogênica (GALVÃO et al., 2012a). As citocinas são ativadas por vias de sinalizações associadas a apoptose, possuem potente propriedade vasodilatadora, além de inibir a adesão plaquetária e regular a morte celular (ROSSELLI; KELLER; DUBEY, 1998; BOLDIN et al., 1995; HSU; XIONG; GOEDEL, 1995; BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002). A interação entre elas, ocasiona a luteólise funcional que é caracterizado pela diminuição de P4 e PGE, juntamente com liberação de PGF 2 α e causando a apoptose das células (GALVAO et al., 2010; GALVÃO et al., 2012a; GALVÃO et al., 2012b; GALVÃO; FERREIRA-DIAS; SKARZYNSKI, 2013; GALVÃO et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 127–140, 2004.

AHMAD, I.; IWATA, T.; LEUNG, H. Y. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 4, p. 850–860, 2012.

ALLEN, W. R.; GOWER, S.; WILSHER, S. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 516–526, 2007.

AL-ZI'ABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 259–270, 2003.

ANDERSON, L. L.; BUTCHER, R. L.; MELAMPY, R. M. Subtotal hysterectomy and ovarian function in gilts. **Endocrinology**, v. 69, n. 1325, p. 571–580, 1961.

ARESE, M.; CHEN, Y.; FLORKIEWICZ, R. Z.; GUALANDRIS, A.; SHEN, B.; RIFKIN, D. B. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 5, p. 1429–1444, 1999.

ARRAS, M.; ITO, W. D.; SCHOLZ, D.; WINKLER, B.; SCHAPER, J.; SCHAPER, W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 1, p. 40–50, 1998.

AUGUSTE, P.; GURSEL, D. B.; LEMIÈRE, S.; REIMERS, D.; CUEVAS, P.; CARCELLER, F.; DI SANTO, J. P.; BIKFALVI, A. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and independent mechanisms. **Cancer Research**, v. 61, n. 4, p. 1717–1726, 2001.

BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; JI, S.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Changes in steady-state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F_{2α} induced luteolysis in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 90, n. 3-4, p. 273–285, 2005.

BERISHA, B.; MEYER, H. H. D.; SCHAMS, D. Effect of prostaglandin F₂ alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 5, p. 940–947, 2010.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and Localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) Family Members during the Final Growth of Bovine Ovarian Follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n.

2, 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. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 319–329, 2006a.

BERISHA, B.; WELTER, H.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A.; MEYER, H. H. D.; SCHAMS, D. Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 307–313, 2006b.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; QUARTO, N.; MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. **The Journal of cell biology**, v. 129, n. 1, p. 233–243, 1995.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 26–45, 1997.

BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2002.

BOLDIN, M. P.; VARFOLOMEEV, E. E.; PANCER, Z.; METT, I. L.; CAMONIS, J. H.; WALLACH, D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 14, p. 7795–7798, 1995.

BREGMAN, M. D.; SIPES, N. J. transformation-Related growth factors and their receptors. **Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer**, v. 4, p. 224–236, 1986.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature**, v. 6, n. 3, p. 389–395, 2000.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249–257, 2000.

CASTILHO, A. C.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; PRICE, C. A.; AMORIM, R. L.; PAPA, P. C.; BURATINI, J. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in the bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 940–945, 2008.

CHEN, C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 959–966, 2000.

COFFMAN, E. A.; PINTO, C. R. F.; SNYDER, H. K.; LEISINGER, C. A.; COLE,

K.; WHISNANT, C. S. Antiluteogenic effects of serial prostaglandin F₂ α administration in cycling mares. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1241–1245, 2014.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J. R. Relationship Between Dose of Cloprostenol and Age of Corpus Luteum on the Luteolytic Response of Early Dioestrous Mares: A Field Study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 660–665, 2012.

CUEVAS, P.; BARRIOS, V.; GIMÉNEZ-GALLEGU, G.; MARTINEZ-COSO, V.; CUEVAS, B.; BENAVIDES, J.; GARCIA-SEGOVIA, J.; ASIN-CARDIEL, E. Serum levels of basic fibroblast growth factor in acute myocardial infarction. **European Journal of Medical Research**, v. 2, n. 7, p. 282–284, 1997.

CUNNINGHAM, B. C.; ULTSCH, M.; DE VOS, A. M.; MULKERRIN, M. G.; CLAUSER, K. R.; WELLS, J. A. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. **Science**, v. 254, n. 5033, p. 821–825, 1991.

DE VOS, a M.; ULTSCH, M.; KOSSIAKOFF, a a. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. **Science**, v. 255, n. 5042, p. 306–312, 1992.

DHALLUIN, C.; YAN, K. S.; PLOTNIKOVA, O.; LEE, K. W.; ZENG, L.; KUTI, M.; MUJTABA, S.; GOLDFARB, M. P.; ZHOU, M. M. Structural basis of SNT PTB domain interactions with distinct neurotrophic receptors. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 921–929, 2000.

DOLL, J. A.; REIHER, F. K.; CRAWFORD, S. E.; PINS, M. R.; CAMPBELL, S. C.; BOUCK, N. P. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. **Prostate**, v. 49, n. 4, p. 293–305, 2001.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F₂ α on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, v. 2, n. 4, p. 265–268, 1972.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effects of prostaglandin F₂ α on the oestrous cycle and pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 1, n. 23, p. 257–261, 1975.

EKLUND, L.; OLSEN, B. R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 5, p. 630–641, 2006.

EMOTO, H.; TAGASHIRA, S.; MATTEI, M. G.; YAMASAKI, M.; HASHIMOTO, G.; KATSUMATA, T.; NEGORO, T.; NAKATSUKA, M.; BIRNBAUM, D.; COULIER, F.; ITOH, N. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23191–23194, 1997.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2 SPEC. ISS., p. 139–149, 2005.

FELDMAN, B.; POUYMIROU, W.; PAPAIOANNOU, V. E.; DECHIARA, T. M.; GOLDFARB, M. Requirement of FGF-4 for Postimplantation Mouse Development. **Science**, v. 267, n. 5195, p. 246–249, 1995.

FERRARA, N. History of discovery: vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 29, p. 789–791, 2009.

FERREIRA-DIAS, G.; BRAVO, P. P.; MATEUS, L.; REDMER, D. A.; MEDEIROS, J. A. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, n. 4, p. 247–259, 2006.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A. S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A. J.; GALVÃO, A.; REDMER, D. A.; LUKASIK, K.; SZSTEK, A. Z.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; SKARZYNSKI, D. J. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E2 secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2011.

FINCH, P. W.; PRICOLO, V.; WU, A.; FINKELSTEIN, S. D. Increased expression of keratinocyte growth factor messenger RNA associated with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 110, n. 2, p. 441–451, 1996.

FINCH, P. W.; RUBIN, J. S. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. **Advances in Cancer Research**, v. 91, p. 69–136, 2004.

FITZ, T.; MAYAN, M.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 703–711, 1982.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10931–10934, 1992.

FRASER, H. M.; DICKSON, S. E.; LUNN, S. F.; WULFF, C.; MORRIS, K. D.; CARROLL, V. A.; BICKNELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, n. 3, p. 995–1000, 2000.

FRASER, H. M.; WILSON, H.; MORRIS, K. D.; SWANSTON, I.; WIEGAND, S. J. Vascular endothelial growth factor trap suppresses ovarian function at all stages of the luteal phase in the macaque. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 10, p. 5811–5818, 2005.

GALVÃO, A.; FERREIRA-DIAS, G.; SKARZYNSKI, D. J. Cytokines and Angiogenesis in the Corpus Luteum. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

GALVÃO, A.; HENRIQUES, S.; PESTKA, D.; LUKASIK, K.; SKARZYNSKI, D.; MATEUS, L. M.; FERREIRA-DIAS, G. M. L. Equine Luteal Function Regulation May Depend on the Interaction Between Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor: An In Vitro Study. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 187–187, 2012a.

GALVAO, A. M.; RAMILO, D. W.; SKARZYNSKI, D. J.; LUKASIK, K.; TRAMONTANO, A.; MOLLO, A.; MATEUS, L. M.; FERREIRA-DIAS, G. M. L. Is FAS/Fas ligand system involved in equine corpus luteum functional regression? **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 6, p. 901–908, 2010.

GALVÃO, A. M.; SZÓSTEK, A. Z.; SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G. M. Role of tumor necrosis factor- α , interferon- γ and Fas-ligand on in vitro nitric oxide activity in the corpus luteum. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 18–21, 2013.

GALVÃO, A.; SKARZYNSKI, D. J.; SZÓSTEK, A.; SILVA, E.; TRAMONTANO, A.; MOLLO, A.; MATEUS, L.; FERREIRA-DIAS, G. Cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 93, n. 1, p. 28–37, 2012b.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. [s.l: s.n.]v. 1

GINTHER, O. J.; FIRST, N. L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, n. 11, p. 1687, 1971.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; UTT, M. D.; BEG, M. A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 213–220, 2007.

GINTHER, O. J.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF 2α , progesterone, LH, and estradiol in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, n. 4, p. 174–184, 2011.

GLASER, R. L.; BROMAN, K. W.; SCHULMAN, R. L.; ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. J.; JABS, E. W. The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 4, p. 939–947, 2003.

GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 166–180, 2013.

GORIELY, A. Evidence for Selective Advantage of Pathogenic FGFR2 Mutations in the Male Germ Line. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 643–646, 2003.

GOSPODAROWICZ, D.; CHEN, J. Heparin protects acidic and basic FGF from inactivation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 128, p. 475–484, 1986.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353–364, 1996.

HOLT, J. A.; LUO, G.; BILLIN, A. N.; BISI, J.; MCNEILL, Y. Y.; KOZARSKY, K. F.; DONAHEE, M.; WANG, D. Y.; MANSFIELD, T. A.; KLIEWER, S. A.; GOODWIN, B.; JONES, S. A. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. **Genes and Development**, v. 17, n. 13, p. 1581–1591, 2003.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 495–504, 1995.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 563–569, 2004.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 1, p. 18–27, 2008.

JAVERZAT, S.; AUGUSTE, P.; BIKFALVI, A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 10, p. 483–489, 2002.

JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Advances in Cancer Research**, v. 60, n. 1, p. 1–41, 1993.

JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P.; BILSKI, J. J.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. **Endocrine**, v. 18, n. 3, p. 261–270, 2002.

KIM, I.; MOON, S.; YU, K.; KIM, U.; KOH, G. Y. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1518, n. 1-2, p. 152–156, 2001.

KLINT, P.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. **Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library**, v. 4, n. 7, p. D165–177, 1999.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: A possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F $_{2\alpha}$. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 369–380, 2001.

KOOS, R. D.; HANSEL, W. The large and small cells of the bovine corpus luteum: ultrastructural and functional differences. **Dynamics of Ovarian Function**, p. 1981, 1981.

KOUHARA, H.; HADARI, Y. R.; SPIVAK-KROIZMAN, T.; SCHILLING, J.; BAR-SAGI, D.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 693–702, 1997.

MACIAG, T.; MEHLMAN, T.; FRIESEL, R. Heparin Binds Endothelial Cell Growth Factor, the Principal Endothelial Cell Mitogen in Bovine Brain. **Science**, v. 225, p. 932–935, 1984.

MAIA, V. N.; BATISTA, A. M.; CUNHA NETO, S.; SILVA, D. M. F.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Expression of angiogenic factors and luteinizing hormone receptors in the corpus luteum of mares induced to ovulate with deslorelin acetate. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 461–465, 2016.

MATSUMOTO, T.; TURESSON, I.; BOOK, M.; GERWINS, P.; CLAESSION-WELSH, L. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2–stimulated angiogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 1, p. 149–160, 2002.

MCINTOSH, I.; BELLUS, G. A.; JABS, E. W. The Pleiotropic Effects of Fibroblast Growth Factor Receptors in Mammalian Development. **Cell Structure and Function**, v. 25, n. 2, p. 85–96, 2000.

MIKI, T.; FLEMING, T. P.; BOTTARO, D. P.; RUBIN, J. S.; RON, D.; AARONSON, S. A. Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4989, p. 72–75, 1991.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 107–137, 2005.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. Local uterine mechanisms affecting luteal function in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 1961, p. 307–310, 1966.

MOSCATELLI, D. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 131, n. 1, p. 123–130, 1987.

NAKAMURA, T.; MOCHIZUKI, Y.; KANETAKE, H.; KANDA, S. Signals via FGF receptor 2 regulate migration of endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 4, p. 801–806, 2001.

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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 4, p. 389–395, 2004.

NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Effect of administering oxytocin or cloprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1111–1118, 2003.

NISWENDER, D.; NETT, T. M. Luteal Phase. **Equine Reproduction**, p. 172–175, 1993.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, and M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, n. 1984, p. 483–487, 1989.

OHUCHI, H.; HORI, Y.; YAMASAKI, M.; HARADA, H.; SEKINE, K.; KATO, S.; ITOH, N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, n. 3, p. 643–649, 2000.

OLADIPUPO, S. S.; SMITH, C.; SANTEFORD, A.; PARK, C.; SENE, A.; WILEY, L. A.; OSEI-OWUSU, P.; HSU, J.; ZAPATA, N.; LIU, F.; NAKAMURA, R.; LAVINE, K. J.; BLUMER, K. J.; CHOI, K.; APTE, R. S.; ORNITZ, D. M. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 37, p. 13379–13384, 2014.

OLSEN, S. K.; IBRAHIMI, O. a; RAUCCI, A.; ZHANG, F.; ELISEENKOVA, A. V; YAYON, A.; BASILICO, C.; LINHARDT, R. J.; SCHLESSINGER, J.; MOHAMMADI, M. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 4, p. 935–940, 2004.

ONG, S. H.; GUY, G. R.; HADARI, Y. R.; LAKS, S.; GOTOH, N.; SCHLESSINGER, J.; LAX, I. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 3, p. 979–989, 2000.

ORNITZ, D. M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. **BioEssays**, v. 22, n. 2, p. 108–112, 2000.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Protein family review Fibroblast growth factors Gene organization and evolutionary history. **Genome Biology**, v. 2, n. reviews, p. 1–12, 2001.

ORR-URTREGER, A.; BEDFORD, M. T.; BURAKOVA, T.; ARMAN, E.; ZIMMER, Y.; YAYON, A.; GIVOL, D.; LONAI, P. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). **Developmental Biology**, v. 158, p. 475–486, 1993.

PARROTT, J. A.; MOSHER, R.; GRACE, K. I. M.; SKINNER, M. K. Autocrine interactions of keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit-ligand

in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2532–2539, 2000.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 3, p. 553–660, 1998.

PARROTT, J. A.; VIGNE, J. L.; CHU, B. Z.; SKINNER, M. K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 569–575, 1994.

REYNOLDS, L. P.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **Federation of American Society Experimental Biology Journal**, v. 6, n. 3, p. 886–892, 1992.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671–674, 1997.

ROBINSON, R. S.; NICKLIN, L. T.; HAMMOND, a J.; SCHAMS, D.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor A during the follicle-luteal transition in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 28–36, 2007.

ROSEN, L. Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. **The Oncologist**, v. 5 Suppl 1, n. suppl 1, p. 20–27, 2000.

ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 1, p. 3–24, 1998.

RUBIN, J. S.; OSADA, H.; FINCH, P. W.; TAYLOR, W. G.; RUDIKOFF, S.; AARONSON, S. a. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 3, p. 802–806, 1989.

SAKSELA, O.; MOSCATELLI, D.; SOMMER, A.; RIFKIN, D. B. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. **The Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 2, p. 743–751, 1988.

SALLI, U.; BARTOL, F. F.; WILEY, a a; TARLETON, B. J.; BRADEN, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 1, p. 77–83, 1998.

SCHAMS, D.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R.; SINOWATZ, F.; GOSPODAROWICZ, D. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. **Endocrine**, v. 2, p. 907–912, 1994.

SCHLESSINGER, J.; LAX, I.; LEMMON, M. Regulation of growth factor activation

by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? **Cell**, v. 83, n. 3, p. 357–360, 1995.

SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; IBRAHIMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J.; MOHAMMADI, M. Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization. **Molecular Cell**, v. 6, n. 3, p. 743–750, 2000.

SEGHEZZI, G.; PATEL, S.; REN, C. J.; GUALANDRIS, A.; PINTUCCI, G.; ROBBINS, E. S.; SHAPIRO, R. L.; GALLOWAY, A. C.; RIFKIN, D. B.; MIGNATTI, P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 7, p. 1659–1673, 1998.

SHIMADA, T.; HASEGAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; MUTO, T.; HINO, R.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; NAKAHARA, K.; FUKUMOTO, S.; YAMASHITA, T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 429–435, 2004.

SHING, Y.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; BUTTERFIELD, C.; MURRAY, J.; KLAGSBRUN, M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. **Science**, v. 223, n. 4642, p. 1296–1299, 1984.

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, FGFR5. **Gene**, v. 271, n. 2, p. 171–182, 2001.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.

STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 1009–1019, 2002.

TAMADA, H.; KAWATE, N.; KAWATA, N.; INABA, T.; KIDA, K.; HATOYA, S.; AKUNE, A.; NAKAMA, K.; KOHSAKA, T.; SAWADA, T. Detection of relaxin mRNA in the corpus luteum, uterus, and uterine cervix in the bitch. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 10, p. 1383–1386, 2010.

TOWNSON, D. H.; LIPTAK, A. R. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**,

v. 1, n. X, p. 94, 2003.

TROEDSSON, M. H. T.; ABABNEH, M. M.; OHLGREN, A. F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin F₂ α on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1891–1899, 2001.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ α induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1016–1022, 1997.

VAN NIEKERK, C. H.; MORGENTHAL, J. C.; GERNEKE, W. H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 1975, n. 23, p. 171–175, 1975.

VAN WEZEL, I. L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W. D.; RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 133–140, 1995.

WATSON, E. D. Compartmentalization of steroidogenesis by the equine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 53, n. 7, p. 1459–1466, 2000.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 223–229, 1990.

WERNER, S. Keratinocyte growth factor: A unique player in epithelial repair processes. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 2, p. 153–165, 1998.

WHITE, K. E.; EVANS, W. E.; JEFFERY L H O'RIORDAN; SPEER, M. C.; ECONS, M. J.; LORENZ-DEPIEREUX, B.; GRABOWSKI, M.; MEITINGER, T.; STROM, T. M. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 345–348, 2000.

WILTBANK, J. N.; CASIDA, L. E. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. **Journal of Animal Science**, v. 15, n. 1, p. 134–140, 1956.

WOAD, K. J.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E.; LAIRD, M.; HAMMOND, A. J.; ROBINSON, R. S. Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. **Reproduction**, v. 143, n. 1, p. 35–43, 2012.

WUTTKE, W.; THEILING, K.; HINNEY, B.; PITZEL, L. Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. **Steroids**, v. 63, n. 5-6, p. 299–305, 1998.

XIAO, L.; YANG, S.; HAO, J.; YUAN, X.; LUO, W.; JIANG, L.; HU, Y.; FU, Z.;

ZHANG, Y.; ZOU, C. Endostar attenuates melanoma tumor growth via its interruption of b-FGF mediated angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 359, n. 1, p. 148–154, 2015.

YAMASAKI, M.; MIYAKE, A.; TAGASHIRA, S.; ITOH, N. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 15918–15921, 1996.

YAMASHITA, T.; YOSHIOKA, M.; ITOH, N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, n. 2, p. 494–498, 2000.

YANCOPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, p. 242–248, 2000.

YARDEN, Y.; ULLRICH, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 443–478, 1988.

YU, C.; WANG, F.; KAN, M.; JIN, C.; JONES, R. B.; WEINSTEIN, M.; DENG, C. X.; MCKEEHAN, W. L. Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15482–15489, 2000.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15694–15700, 2006.

HIPÓTESE

Os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) atuam em diferentes fases do desenvolvimento do corpo lúteo equino. A regressão induzida com PGF 2 α altera a expressão dos FGFs em éguas?

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a expressão gênica dos FGFs no corpo lúteo de éguas;
- Verificar a expressão gênica de fatores de crescimento fibroblástico (FGFs 2, 7 e 10) e do receptor (FGFR2B) no tecido luteínico durante as fases iniciais e metade do diestro;
- Investigar se o tratamento com diferentes doses de prostaglandina durante as fases de formação e manutenção do CL exerce efeito sobre a expressão gênica dos FGFs.

CAPÍTULO 2

Expressão de fatores de crescimento fibroblásticos no desenvolvimento e regressão induzida do corpo lúteo de éguas

Rubia Schmith^a, Jair Camargo^a, Yatta Boakari^a, Fabiana Ferreira de Souza^a, Cezinande de Meira^a

^a *Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil*

Resumo

O desenvolvimento e regressão do corpo lúteo (CL) é um processo fundamental para a eficiência do ciclo estral e manutenção da gestação das espécies domésticas. Com o intuito de entender os mecanismos fisiológicos desta glândula transitória e diminuir o intervalo interovulatório, estudos têm demonstrado que fatores de crescimento, citocinas e aplicação de agentes luteolíticos estão diretamente relacionados neste processo. Assim, o objetivo do estudo foi descrever a expressão do fator de crescimento fibroblástico (FGF) 2 e 7 e o efeito do tratamento na expressão gênica destes fatores durante a luteogênese e luteólise induzida em éguas. Foram utilizadas 18 éguas, distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (solução salina, n=3), grupo PGF 1 (aplicação de 1 mg de dinoprost trometamina, n=3) e grupo PGF 10 (aplicação de 10 mg de dinoprost trometamina, n=3). Os tratamentos foram realizados por administração de dose única, por via intramuscular nos momentos D2 e D8, considerando como D0 o dia da ovulação da égua. Após, seis horas da aplicação do tratamento foram coletados fragmentos teciduais do CL para a quantificação gênica de FGF por RT-PCR. Os FGF 2 e 7 são expressos no tecido luteínico de éguas. Não observamos diferença estatística na expressão dos fatores após o tratamento com as diferentes doses PGF 2 α . Contudo, os níveis de expressão de FGF 2 foi significativamente maior no grupo controle D2 em relação ao grupo controle de D8 (P=0,01), sugerindo que são ativados na angiogênese, mas que na fase de manutenção estes níveis diminuem para ação de outros fatores. Conclui-se que o RNAm de FGF 2 e 7 foram expressos no tecido luteínico de equinos na fase de luteogênese e de manutenção, sugerindo a sua participação na sinalização celular e formação CL.

Palavras chave: angiogênese, prostaglandina, biópsia luteínica, equino, RNAm

1. Introdução

O CL é uma glândula transitória, formada após a ovulação do folículo, responsável pela síntese de progesterona (P4) e caracterizada pela rápida remodelação, diferenciação e morte celular [1]. Logo, a completa compreensão dos mecanismos moleculares regulatórios de seu desenvolvimento e regressão são importantes para aumentar a eficiência da sincronização do ciclo estral assim como da manutenção da gestação.

Uma intensa neovascularização é observada no CL em formação e este fenômeno é modulado por diferentes fatores angiogênicos de origem ovariana e uterina [2]. Um adequado aporte sanguíneo tecidual é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células-alvo ovarianas. Para tanto, fatores inibitórios e estimuladores atuam simultaneamente para propiciar o contínuo desenvolvimento do sistema vascular do trato reprodutivo [3]. A angiogênese inicia com a degradação da membrana basal e ativação das células endoteliais que deverão migrar e proliferar formando novos vasos sanguíneos [4].

A família FGF estimula diversas funções como proliferação e divisão celular, diferenciação embrionária e morfogênese por ligação do FGF a superfície do receptor FGFRs. Dentre outras características importantes destacam-se a regulação da homeostase, cicatrização de feridas e reparação de tecidos [5]. Os membros da família FGF apresentam correlação de aproximadamente 90% na sequência de aminoácidos na sua região central homóloga com tamanho variando entre 17 e 34 kDa. A partir destas características, os membros da FGF são agrupados em subfamílias com base nas propriedades funcionais e nas suas similaridades [6-7]. Quatro genes distintos (FGFR-1 a 4) codificam receptores de alta afinidade que interagem com os membros da família FGF [8-9]. Na interação entre o FGF e o FGFR, ocorre dimerização e fosforilação do receptor para que um sinal seja traduzido em uma resposta biológica [10].

O desenvolvimento e a regressão do CL são mediados por hormônios com ação luteotrófica ou luteolítica. Na espécie equina, a regressão estrutural é causada pela apoptose celular, já a luteólise funcional é desencadeada por um aumento na pulsatilidade de 13,14-dihydro-15-keto-PGF (PGFM) e é concluída em menos de 24 horas após o início da redução abrupta na concentração plasmática de P4 [11]. Na ausência da prenhez o CL regredi com a liberação pulsátil de prostaglandina 2 α (PG F2 α) pelo útero [12]. Portanto, os objetivos do presente estudo foram descrever a expressão dos FGF 2 e 7 durante a luteogênese e luteólise induzida.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu, número 34/2015. Foram utilizadas 18 éguas com escore corporal (6,0 a 8,0) [13] e idade entre 6 a 15 anos, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP, Botucatu - SP, Brasil. Os animais foram alimentados com feno *Coast-Cross (Cynodon Dactylon)*, ração concentrada, suplementação mineral e água *ad libidum*. Somente éguas com temperamento dócil, ausência de anormalidades uterinas e ovarianas foram utilizadas.

2.2. Delineamento Experimental

O acompanhamento do desenvolvimento folicular foi realizado uma vez ao dia até a detecção de um folículo pré-ovulatório >35mm de diâmetro associado ao edema uterino. Em seguida, realizou o tratamento com o indutor de ovulação, (2.500 UI de hCG; CalBiochem, La Jolla, CA). Posteriormente, os exames ultrassonográficos foram realizados a cada seis horas para determinar o momento da ovulação.

Para este estudo, foram utilizadas 18 éguas. O estudo foi dividido em dois grupos experimentais conforme a fase de desenvolvimento luteínica, D2 para a fase de luteogênese e D8 fase de manutenção do CL, considerando D0 como dia da ovulação. As éguas foram distribuídas em três grupos tratamentos (n=3 éguas/grupo) de acordo com o tratamento a ser realizado: grupo controle (solução salina), grupo PGF 1 (aplicação de 1 mg de dinoprost trometamina) e grupo PGF 10 (aplicação de 10 mg de dinoprost trometamina). Seis horas após a aplicação de PGF 2 α . Foram coletados fragmentos teciduais do CL e armazenados a -80°C para posterior análise.

2.3. Coleta de fragmentos teciduais de CL

A coleta de tecido luteínico foi realizada como descrita por Beg et al.[14] e Slough et al. [15] pela técnica de biópsia guiada por ultrassonografia transvaginal. Todas as éguas foram sedadas com 20 μ g/kg de detomidina (Dormiun V – Agener União, São Paulo, BR) e o relaxamento retal induzido com 0,2mg/kg de butilbrometo de escopolamina (Butylscopolamina - Sigma Pharma, São Paulo, BR). Os procedimentos foram realizados utilizando agulha de biópsia modelo Trucut acoplada a um guia com transdutor convexo endocavitário. O fragmento luteínico foi coletado 6 horas após o tratamento e armazenado a -80°C.

2.4. PCR em tempo real

A extração de RNA das amostras de tecido luteínico foi realizada utilizando o protocolo Trizol (Trizol® Reagent, Invitrogen Corp, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram mensuradas por nanoespectrofotômetro (Nanodrop® 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, 238 Wilmington, EUA). O extrato total de RNA foi armazenado a -80°C até a transcrição reversa.

Para de evitar uma eventual contaminação por DNA genômico, que poderia interferir nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-qPCR. De acordo com as instruções do protocolo DNase I – *Amplification Grade* (Invitrogen, Califórnia, EUA), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foram adicionados 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu em temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, acrescentou 1µl de EDTA (25mM). A amostra foi incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima e então as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa. Para este processo, utilizou-se kit comercial (Ominiscript, Qiagen Incorporation, Valencia, CA) com oligonucleotídeo poli T (12 a 18 nucleotídeos). Após sua síntese, o cDNA foi estocado a -20°C.

Para amplificação dos genes foi realizado ensaio de RT-qPCR utilizando o sistema Fast 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) com Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes a cada gene. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram delineados a partir de sequências disponíveis no banco de dados GenBank (Tabela 1). O programa de amplificação foi de ciclos térmicos comuns (3 minutos de desnaturação a 95°C, 40 ciclos de 15” a 95°C, 30” a 60°C e 30” a 72°C). Diferenças na taxa de expressão dos genes alvos foram normalizadas pela abundância de expressão do controle endógeno (GAPDH). A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$ e corrigida pela eficiência de amplificação das reações.

Tabela 1: Primers utilizados para RT-qPCR para os genes alvo e o endógeno nos corpos lúteos equino.

Gene	Sequence	Gene bank accession number
FGF 2	F: 5' GAACCGTTATCTTGCTATGAAGG 3'	NM_001195221.1
	R: 5' CCAACTGGAGTATTCCTTGAC 3'	
FGF 7	F: 5' CCGAGCGACATACAAGAAGGTTA 3'	NC_009144.2
	R: 5' CCTTTGACTTTGCCTCGTTTATC 3'	
GAPDH	F: 5' AGGCCATCACCATCTTCCAG 3'	NM_001163856.1
	R: 5' CCAGCCTTCTCCAAGGTAGT 3'	

F, primer forward; R, primer reverse; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase

2.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando programa R versão 3.2.2. Para verificação da normalidade da amostra, foi aplicado o teste Shapiro - Wilk. A comparação dos valores de expressão gênica do FGF 2 e 7 entre os tratamentos, foi realizada com o teste ANOVA e para comparação de cada tratamento nos diferentes momentos, foi realizado Teste T pareado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados:

O RNAm de FGF 2 e 7 foi detectado no CL de equino e os níveis de expressão não foram diferentes entre os tratamentos. Não foram observadas diferenças estatísticas na expressão dos fatores após os dois tratamentos com PGF 2 α (Figura 1).

Os níveis de expressão de FGF 2 foi significativamente maior no grupo controle D2 em relação ao grupo controle de D8 ($P=0,01$) (Figura 2). Contudo FGF 7 não se alterou.

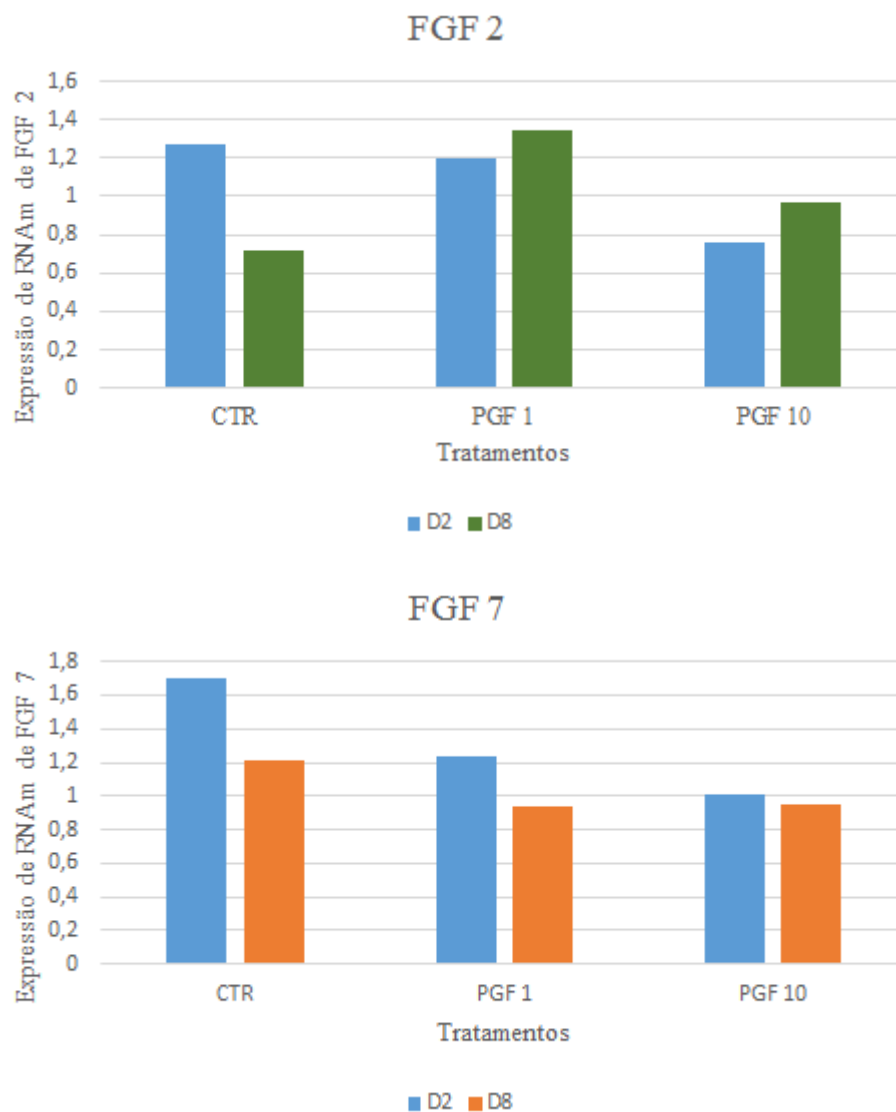


Figura 1: Expressão relativa do fator de crescimento fibroblástico (FGF) 2 e 7 no CL de éguas após diferentes tratamentos com PGF 2 α .

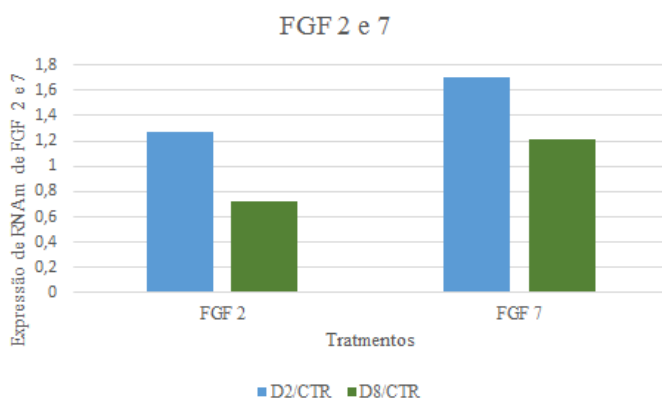


FIGURA 2: Expressão de FGF 2 e 7 no CL de égua em dois momentos distintos D2 e D8, considerando D0 como o dia da ovulação.

4. Discussão:

Estes dados demonstram a expressão gênica de FGF 2 e 7 no CL equino. O FGF 2 pode ter efeitos específicos para cada espécie, em bovinos e ratos é capaz de inibir a produção de estradiol pelas células da granulosa [16-17]. Em ovinos, tornou-se um marcador da fase de transição da produção para esteroides, porque sua expressão diminui com o crescimento folicular [18]. Já no processo de luteinização está presente na diferenciação das células da granulosa de bovinos influenciando as células endoteliais vasculares e as células luteínicas [19-20- 21]. Além de estar diretamente relacionado com a proliferação de capilares que acompanham a seleção do folículo dominante, e ter efeitos sinérgicos na angiogênese [22]. O FGF 2 é determinante para o surgimento vascular e fundamental para o desenvolvimento luteínico [23].

No presente estudo RNAm de FGF 2 e 7 foram detectados nas fases de luteogênese e manutenção do CL, mas não diferiu significativamente entre os grupos tratados, sugerindo a participação destes fatores na formação do CL. Estudos em bovinos demonstraram que FGF 2 estimula a proliferação celular e a secreção de P4 em células luteínicas [24-25]. Em murinos demonstrou-se o efeito de FGF 2 na produção de P4, pois regula a expressão da proteína *star* que é responsável por fazer a transferência de colesterol para a mitocôndria onde ocorrerá a conversão de colesterol em pregnenolona [26]. No nosso estudo a expressão do ligante FGF 2 diminuiu significativamente no D8 em relação ao D2 no grupo controle ($P=0,01$), mas não diminuiu na regressão induzida do CL, sugerindo que são ativados na angiogênese luteínica e que na fase de manutenção estes níveis diminuem para ação de outros fatores.

O FGF 7, que foi identificado pela primeira vez em células fibroblásticas de pulmão é um potente fator mitogênico, derivado de células mesenquimais [27-28]. A sua alta expressão está presente na cicatrização de feridas e estimula a epitelização por fazer a diferenciação e proliferação de células progenitoras do tecido [29-30]. No folículo ovariano de bovinos são produzidos pelas células da teca e granulosa fazendo uma interação mediada de forma parácrina por células mesenquimais e epiteliais [31]. No presente estudo verificamos a expressão de FGF 7, mas a sua expressão não se alterou com o desenvolvimento do CL, corroborando com o estudos em bovinos [32], o qual identificou o RNAm e a proteína de FGF 7 nas células luteínicas pequenas e grandes e a sua expressão não se alterou durante o diestro, contribuindo para o desenvolvimento do CL.

Conclui-se que este estudo identificou a presença de FGF 2 e 7 no CL de éguas durante a fase de diestro, sugerindo a sua participação na sinalização celular e formação do CL. Ademais, mais estudos são necessários para o melhor entendimento sobre a luteogênese e luteólise do CL de éguas.

Referências:

1. O'Shea JD, Rodgers RJ, D'Occhio and MJ. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J Reprod Fertil.* 1989;85(1984):483–7.
2. Berisha B, Meyer HHD, Schams D. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 2010;82(5):940–7.
3. Allen WR, Gower S, Wilsher S. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-I and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(5):516–26.
4. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature.* 2000;6(3):389–95.
5. Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res.* 2004;91:69–136.
6. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* 2004;20(11):563–9.
7. Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15694–700.
8. Kim I, Moon SO, Yu KH, Kim UH, Koh GY. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 2001;1518(1-2):152–6.
9. Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, et al. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* 2001;271(2):171–82.
10. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor

- multigene family. *Adv Cancer Res.* 1993;60(1):1–41.
11. Ginther OJ, Hannan MA, Beg MA. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF 2α , progesterone, LH, and estradiol in mares. *Domest Anim Endocrinol.* Elsevier Inc.; 2011;41(4):174–84.
 12. Douglas RH, Ginther OJ. Effects of prostaglandin F 2α on the oestrous cycle and pregnancy in mares. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;1(23):257–61.
 13. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J.* 1983;15(4):371.
 14. Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Ji S, Wiltbank MC, Ginther OJ. Changes in steady-state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F 2α induced luteolysis in mares. *Anim Reprod Sci.* 2005;90(3-4):273–85.
 15. Slough TL, Rispoli LA, Carnevale EM, Niswender GD, Bruemmer JE. Temporal gene expression in equine corpora lutea based on serial biopsies in vivo. *J Anim Sci.* 2011;89(2):389–96.
 16. Vernon RK, Spicer LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cell. *J Anim Sci.* 1994;72:2696–702.
 17. Schteingart HF, Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur J Endocrinol.* 1999;141(5):539–45.
 18. Garcia RA, Sanchez MA, Letelier C, Palencia PG, Sanchez B, Vilar MP, et al. Changes in Fibroblast Growth Factor-2 in Ovine Follicle Development. *Reprod Domest Anim.* 2006;41:105.
 19. Stirling D, Waterman MR, Simpson ER. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J Reprod Fertil.* 1991;91(1):1–8.
 20. Lavranos TC, Rodgers HF, Bertoncillo I, Rodgers RJ. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp Cell Res.* 1994;211(2):245–51.
 21. Neuvians TP, 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.* 2004;67(4):389–95.
22. Hennig T, Mogensen C, Kirsch J, Pohl U, Gloe T. Shear stress induces the release of an endothelial elastase: Role in integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 3-mediated FGF-2 release. *J Vasc Res.* 2011;48(6):453–64.
 23. Woad KJ, Hunter MG, Mann GE, Laird M, Hammond AJ, Robinson RS. Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction.* 2012;143(1):35–43.
 24. Gospodarowicz D, Plouet J, Fujii DK. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: Implications for early folliculogenesis. *Endocrinology.* 1989;125(3):1266–76.
 25. Grazul AT, Redmer DA, Killilea DS, Raft, Reynolds LP. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the oestrous cycle. *Endocrinology.* 1992;130:3625–32.
 26. Aharoni D, Meiri I, Atzmon R, Vlodaysky I, Amsterdam A. Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Curr Biol.* 1997;7(1):43–51.
 27. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science (80-).* 1989;245(4919):752–5.
 28. Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, et al. Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int.* 1995;19:399–411.
 29. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science.* 1994;266(5186):819–22.
 30. Pierce GF, Yanagihara D, Klopchin K, Danilenko DM, Hsu E, Kenney WC, et al. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *J Exp Med.* 1994;179(3):831–40.
 31. Parrott JA, Vigne JL, Chu BZ, Skinner MK. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology.* 1994;135(2):569–75.
 32. Salli U, Bartol FF, Wiley a a, Tarleton BJ, Braden TD. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 1998;59(1):77–83.

ANEXOS

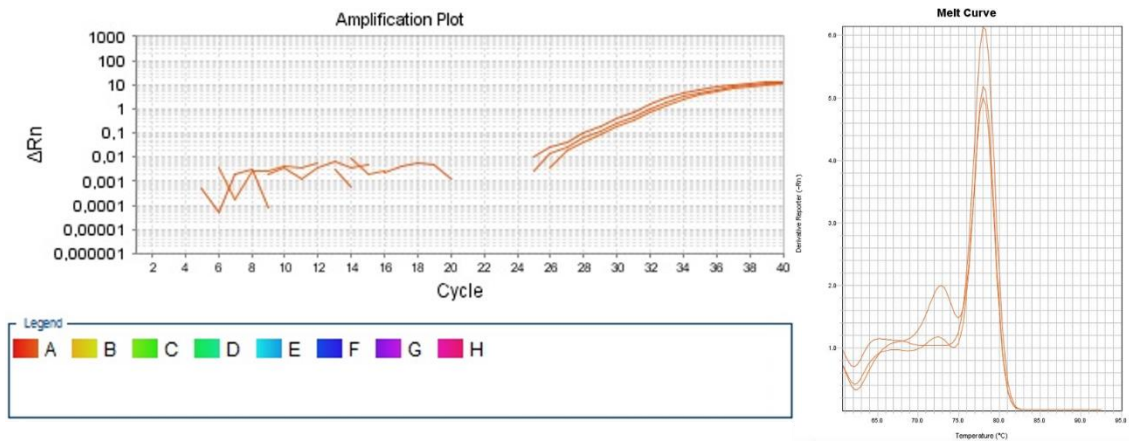


FIGURA 4: Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas por RT-PCR para o gene FGF 2.

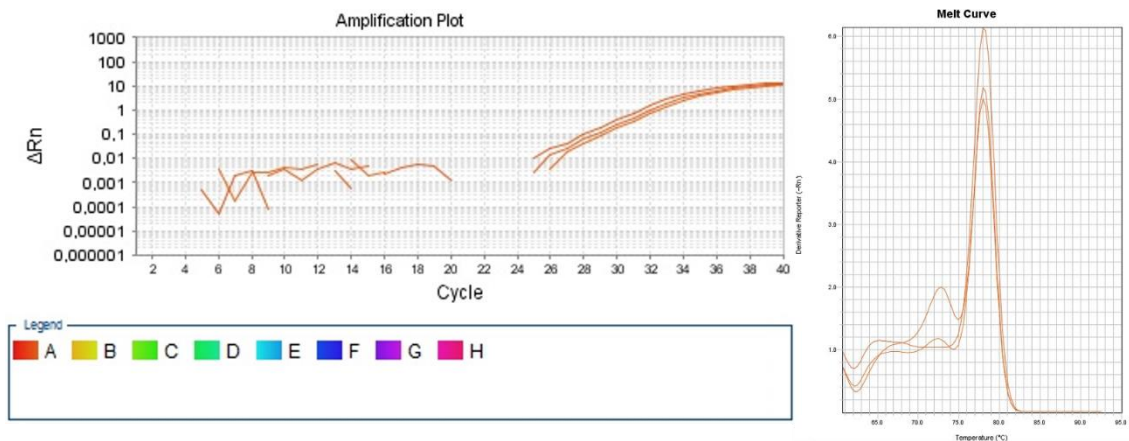


FIGURA 5: Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas por RT-PCR para o gene FGF 7.

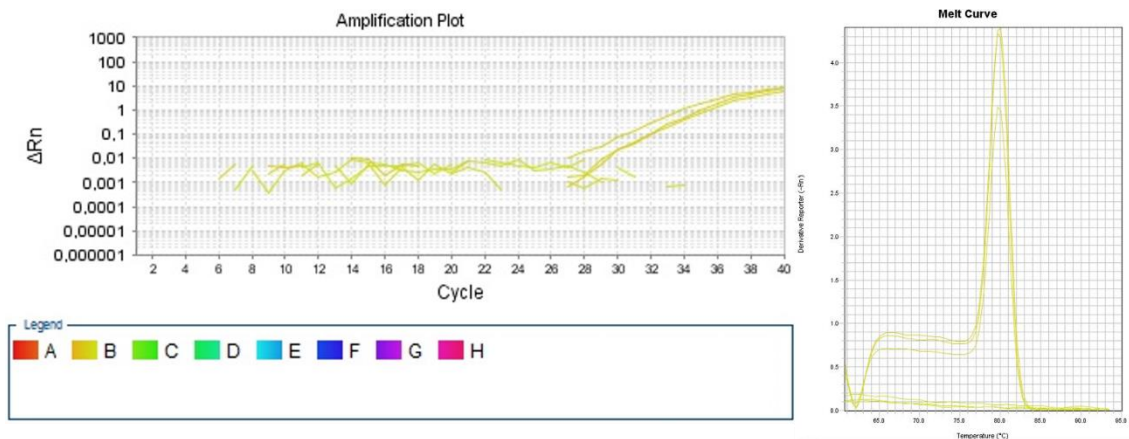


FIGURA 6: Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas por RT-PCR para o gene FGF 10.

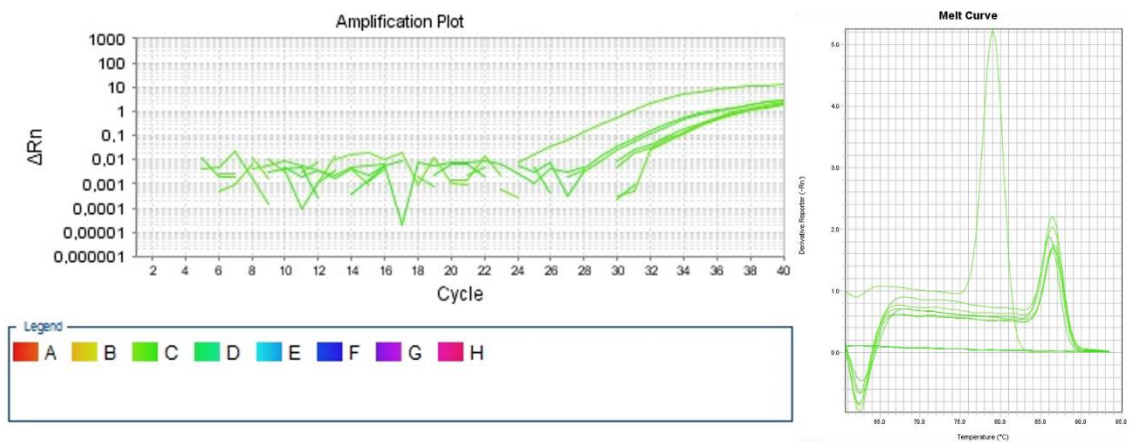


FIGURA 7: Amplificação das amostras de corpo lúteo de éguas por RT-PCR para o gene FGFR 2B.