

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/07/2018.

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
μm	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.

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.