

**MAICON GAISSLER LORENA PINTO**

**EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE  
CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 7 E 10 (FGF-7 E  
FGF-10) AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO  
FOLICULAR OVARIANO BOVINO**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho", Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutor em  
Medicina Veterinária, Área de  
Reprodução Animal.

**Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior**

**Botucatu-SP  
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Pinto, Maicon Gaissler Lorena.

Expressão gênica dos fatores de crescimento fibroblásticos 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10) ao longo do desenvolvimento folicular ovariano bovino / Maicon Gaissler Lorena Pinto. – Botucatu. [s.n.], 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: José Buratini Júnior

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução Animal – 2. Bovino

CDD 636.0824

Palavras-chave: FGF-10, FGF-7, folículos ovarianos; expressão gênica; RT-PCR; bovinos.

*Aos meus pais Otávio e Odivete, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições, sempre repetindo palavras essenciais – como, por exemplo, amor, perseverança, honestidade e justiça – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos;*

*A meus queridos irmãos Melissa e Rufino, que sempre me fizeram levantar a cabeça e seguir adiante nos momentos difíceis e, como se não fosse suficiente, presentearam-me com uma flor chamada Maria Eduarda;*

*A meus tios Cleverson e Elizabeth e à querida Sandra, que, a todo momento, me fazem lembrar o verdadeiro tempero que a vida precisa;*

*Ao meu Orientador Prof. José Buratini Júnior, exemplo de homem e de pesquisador que muito me ajudou, permitiu-me ir em busca de meus sonhos, revelou-se humano e amigo. Fez-me crescer pessoal e intelectualmente, abriu espaço para a amizade, que será levada comigo, junto com a admiração, por onde eu estiver,*

*Ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, sinônimo de integridade e dedicação, acolheu-me como orientador no início deste trabalho e, ao longo desses anos, esteve sempre pronto para ajudar-me, levarei comigo sempre respeito e acima de tudo, admiração;*

*À Prof. Dr. Fernanda Da Cruz Landim Alvarenga, que criou todas as oportunidades que me trouxeram até Botucatu. Certamente, sem sua ajuda eu não teria conseguido;*

*Ao Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal pela amizade, paciência, pelo auxílio na realização deste trabalho e pelo compartilhamento de uma parcela do seu vasto conhecimento;*

*Ao Prof. Dr. Alceu Mezzalana, que guiou meus primeiros passos na pesquisa científica e tem sido um grande amigo ao longo dos anos, ensinando-me e incentivando-me cada vez mais e mais;*

*Ao grande amigo Prof. Dr. Andrey Borges Tixeira, que ensinou-me a base das técnicas utilizadas neste trabalho, sempre disposto a ajudar, até a finalização deste trabalho;*

*Aos meus amigos (Anthony Castilho, Bruno Giorno, César Pedrazzi, Danilas Melo, Evandro Sartorelli, Fábio Morato, Inês Giometi, Isabela Bazzo, José Dell'Aqua, Marcelo Nogueira, Márcio do Carmo, Paula Baloni, Rubens Ribeiro, Vanessa Glapinski e aos que aqui não foram mencionados), já que cada um contribuiu à sua maneira para essa tese. Sentirei saudades daqueles que por aqui ficarem, mas levarei comigo a lembrança dos bons momentos que compartilhamos.*

*Este trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:*

*Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos transmitidos durante o Curso de Pós-graduação.*

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

*Aos professores do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. Em particular ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento das análises gráficas;*

*Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;*

*Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UNESP - Araçatuba, pelo auxílio no seqüenciamento do FGF-7 durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Christina Werneck de Avellar do Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP – São Paulo, pelo auxílio no seqüenciamento do FGF-10 durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;*

*Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela paciência e dedicação;*

*Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu), Edilson de Souza Freira, Marco Antônio Fumes Pelicci, Maria Cristina P. L. Rosa, José Maria Pimentel e Valter Oswaldo Fabris, pela amizade e apoio;*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Luciana Ap. Spadotto Borgatto, Antônio Carlos de Barros Tardivo e Hildebrando Luiz da Silva, pela amizade e apoio;*

*Aos funcionários do Departamento de Física e Biofísica (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Sílvia Helena Ramos, Cilene do Carmo F. Padilha, Murilo Stelzer, Rogério de Moraes, pela amizade e apoio;*

*Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Cláudia Sueli S. Lopez, Luiz Antônio de Oliveira, Paulo Cesar Mioni, Ana Maria Serafim, Ana Cristina Murcia de Souza, pela amizade e apoio;*

*À funcionária da Empresa Lopes & Ribeiro, Janete Camargo Teixeira,  
pela amizade e carinho durante os anos em que convivemos;*

*Aos funcionários da biblioteca, pela presteza e boa vontade no  
atendimento, pelos serviços prestados, em especial à Rosemeire Aparecida  
Vicente pela elaboração da ficha catalográfica;*

*Aos proprietários e funcionários do Frigorífico Frigol<sup>®</sup> de Lençóis  
Paulista-SP, pelo apoio à pesquisa, pelo carinho e compreensão que sempre  
tiveram com os alunos do Prof. Dr. José Buratini Júnior;*

*À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que viabilizou meu  
envolvimento no desenvolvimento deste trabalho;*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),  
pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste  
trabalho.*

PINTO, M.G.L. **Expressão gênica dos fatores de crescimento fibroblástico 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10) ao longo do desenvolvimento folicular ovariano bovino**. Botucatu, 2006. 83f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

## RESUMO

Estudos recentes têm evidenciado o envolvimento de diferentes FGFs no controle do desenvolvimento folicular ovariano, entre eles o FGF-7. O FGF-10 apresenta alta similaridade ao FGF-7, expresso em células da teca, e ambos atuam através do mesmo receptor FGFR-2b, expresso em células da granulosa. O FGF-10 modula a atividade celular em uma série de tecidos, mas ainda não foi investigado no ovário. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação do FGF-10 no controle do desenvolvimento folicular mediante investigação da expressão do seu RNAm em folículos ovarianos bovinos. A expressão do FGF-7 também foi investigada paralelamente. Além disso, a expressão gênica do FGF-10 e FGF-7 foi investigada numa variedade de tecidos bovinos fetais e adultos. “Pools” de folículos pré-antrais e oócitos, folículos inteiros com diâmetro entre 2 e 4mm, células da teca e da granulosa de folículos maiores que 5mm e amostras de tecidos tiveram seu RNA total extraído. Dos folículos maiores que 5mm, o fluido folicular foi coletado e as concentrações de estradiol e de progesterona foram determinadas por radioimunoensaio. Folículos com progesterona acima de 100ng/mL foram considerados atresícos e excluídos da análise. Os folículos restantes foram agrupados de acordo com a concentração de estradiol (<5; 5-20; >20-100 e >100ng/mL) e de acordo com o diâmetro (5-7; 8-10 e >10mm). A expressão gênica do FGF-7 e do FGF-10 foi examinada por RT-PCR. Os efeitos da concentração intrafolicular de estradiol e do diâmetro foram investigados por RT-PCR semiquantitativo. A expressão do FGF-10 foi detectada em folículos pré-antrais primordiais, primários e secundários, oócitos e células da teca, mas não em células da granulosa. Adicionalmente, o RNAm do FGF-7 foi pela primeira vez detectado em folículos pré-antrais bovinos primordiais, primários e secundários e investigado em oócitos, onde mostrou-se ausente. A expressão

do FGF-10 em células da teca diminuiu com o aumento da concentração de estradiol, porém não variou em função do diâmetro folicular. A expressão do FGF-7 também foi detectada em células da teca, mas não variou com o diâmetro ou concentração de estradiol. Tanto o FGF-10 quanto o FGF-7 mostraram-se difusamente expressos nos tecidos bovinos, embora sinais aparentemente mais fortes da expressão do FGF-10 tenham sido encontrados nos tecidos fetais. Em conclusão, os dados indicam que a expressão gênica do FGF-10 é regulada durante o desenvolvimento folicular antral bovino. A maior expressão do FGF-10 em células da teca de folículos menos estrogênicos sugere sua participação na regulação da função das células da granulosa durante a fase inicial do desenvolvimento folicular antral. Os padrões de expressão gênica observados indicam o envolvimento do FGF-10 e FGF-7 no controle do desenvolvimento folicular pré-antral e antral em bovinos.

**Palavras-chave:** FGF-10, FGF-7, folículos ovarianos; expressão gênica; RT-PCR; bovinos.

PINTO, M.G.L. **Fibroblast growth factor 7 and 10 (FGF-7 and FGF-10) gene expression along bovine ovarian follicle development.** Botucatu, 2006. 83p. Thesis (PhD in Animal Reproduction) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

### **ABSTRACT**

Recent studies have evidenced the involvement of different FGF on ovarian follicular development control, among them FGF-7. FGF-10 exhibits high similarity to FGF-7, which is expressed in theca cells, and both act through the same receptor FGFR-2b, expressed in granulosa cells. FGF-10 modulates cellular activities in several tissues, but it has not been investigated in ovary yet. The main objective of this work was to evaluate FGF-10 participation in controlling follicular development, through the investigation of its mRNA expression in bovine ovarian follicles. In parallel, FGF-7 gene expression was also investigated. Furthermore, FGF-10 and FGF-7 gene expression was assessed in a variety of bovine adult and fetal tissues. Pools of preantral follicles and oocytes, whole follicles at 2-4mm in diameter, granulosa and theca cells from follicles larger than 5mm and tissue samples were submitted to total RNA extraction. Follicular fluid from follicles larger than 5 mm was collected and estradiol and progesterone concentrations were measured by RIA. Follicles with progesterone levels above 100ng/mL were considered atretic and excluded from the analysis. Remaining follicles were grouped according to intrafollicular estradiol concentration (<5; 5-20; >20-100; and >100ng/mL) and according to diameter (5-7; 8-10 and >10mm). FGF-7 and FGF-10 gene expression was examined by RT-PCR. Effects of intrafollicular estradiol concentration and diameter were assessed by semiquantitative RT-PCR. FGF-10 gene expression was detected in primordial, primary and secondary preantral follicles, oocytes and theca cells, but not in granulosa cells. In addition, FGF-7 mRNA was detected for the first time in bovine preantral follicles and investigated in oocytes, where it was absent. FGF-10 expression in theca cells decreased as intrafollicular estradiol concentration increased, but did not vary with follicular diameter. FGF-7 gene expression was also detected in theca cells, but did not change with follicular diameter or intrafollicular estradiol concentration. Both

FGF-10 and FGF-7 were diffusely expressed in bovine tissues, although apparently stronger FGF-10 expression was found in fetal tissues. In conclusion, present data indicate that FGF-10 gene expression is regulated along bovine antral follicle development. Higher FGF-10 gene expression in theca cells of less estrogenic follicles suggests a role in the regulation of granulosa cells during early antral follicular development. Gene expression patterns indicate the involvement of FGF-10 and FGF-7 in the control of preantral and antral follicular development in cattle.

**Key-words:** FGF-10; FGF-7; ovarian follicles; gene expression; RT-PCR; bovine.

## LISTA DE FIGURAS

- |                  |                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> | Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativo para o FGF-7(a) e para o FGF-10 (b) em duplex com o GAPDH; demonstrando que os sinais da expressão dos genes alvo e constitutivo são dependentes da concentração de RNA e do número de ciclos de PCR. | 53 |
| <b>Figura 2-</b> | Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGF-7 e FGF-10 em diferentes tecidos adultos e fetais. (NC = Controle negativo)                                                                                                                     | 56 |
| <b>Figura 3-</b> | Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH e FGF-10 e a ausência de expressão do FGF-7 em 4 “pools” de 50 oócitos. (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases).                                                     | 57 |
| <b>Figura 4-</b> | Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH, FGF-10 e do FGF-7 em 6 “pools” de folículos pré-antrais (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases).                                                                    | 57 |

- Figura 5-** Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH, FGF-10 e do FGF-7 em: (a) folículos inteiros de 2 a 4 mm de diâmetro; (b) células da teca; (c) células da granulosa (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases). 58
- Figura 6-** Efeito da concentração intrafolicular de estradiol e do diâmetro folicular na expressão do FGF-10 (a, b) e FGF-7 (c, d) em células da teca de folículos antrais bovinos. Valores relativos de RNAm (Média  $\pm$  EPM). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). 59

## LISTA DE TABELA

|                  |                                                                                                       |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> | Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados<br>para amplificação do GAPDH, FGF-7, FGF-10. | 49 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## ABREVIATURAS

|              |                                                                                |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>mg</b>    | - micrograma                                                                   |
| <b>mL</b>    | - microlitro                                                                   |
| <b>mm</b>    | - micrômetro                                                                   |
| <b>A</b>     | - “antisense”                                                                  |
| <b>ANOVA</b> | - Análise de variância                                                         |
| <b>aFGF</b>  | - fator de crescimento fibroblástico ácido                                     |
| <b>bFGF</b>  | - fator de crescimento fibroblástico básico                                    |
| <b>BMP</b>   | - proteína morfogenética óssea                                                 |
| <b>CCO</b>   | - Complexo cumulus-oócito                                                      |
| <b>cDNA</b>  | - ácido desoxirribonucléico complementar                                       |
| <b>CN</b>    | - Controle negativo                                                            |
| <b>CP</b>    | - Controle positivo                                                            |
| <b>CYP17</b> | - 17 $\alpha$ -Hidroxilase                                                     |
| <b>CYP19</b> | - citocromo P450 aromatase                                                     |
| <b>DEPC</b>  | - dietilpirocarbonato                                                          |
| <b>DNA</b>   | - ácido desoxirribonucléico                                                    |
| <b>DNase</b> | - enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico                               |
| <b>E2</b>    | - estradiol                                                                    |
| <b>EDTA</b>  | - ácido etilenodiaminotetracético                                              |
| <b>EGF</b>   | - fator de crescimento epidermal                                               |
| <b>EPM</b>   | - Erro padrão da média                                                         |
| <b>FGF</b>   | - fator de crescimento fibroblástico                                           |
| <b>FGFR</b>  | - receptor para fator de crescimento fibroblástico                             |
| <b>FSH</b>   | - hormônio folículo estimulante                                                |
| <b>FSHR</b>  | - receptor do hormônio folículo estimulante                                    |
| <b>g</b>     | - força G                                                                      |
| <b>GAPDH</b> | - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase                                        |
| <b>GDF-9</b> | - fator de crescimento de diferenciação 9                                      |
| <b>hCG</b>   | - Gonadotrofina coriônica humana                                               |
| <b>IGF</b>   | - fator de crescimento semelhante à insulina                                   |
| <b>IGFBP</b> | - proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina |
| <b>KDa</b>   | - Kilo-Dáltons                                                                 |

|                         |                                                                           |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>KGF</b>              | - fator de crescimento dos queratinócitos                                 |
| <b>Km</b>               | - quilômetro                                                              |
| <b>LH</b>               | - hormônio luteinizante                                                   |
| <b>LHR</b>              | - receptor do hormônio luteinizante                                       |
| <b>M</b>                | - molar                                                                   |
| <b>MAPK</b>             | - proteína quinase mitógeno ativada                                       |
| <b>mg</b>               | - miligrama                                                               |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | - cloreto de magnésio                                                     |
| <b>mL</b>               | - mililitro                                                               |
| <b>mM</b>               | - milimolar                                                               |
| <b>mm</b>               | - milímetro                                                               |
| <b>ng</b>               | - nanograma                                                               |
| <b>nm</b>               | - nanômetro                                                               |
| <b>°C</b>               | - grau Celsius                                                            |
| <b>P4</b>               | - progesterona                                                            |
| <b>PAPP-A</b>           | - Proteína plasmática associada à gestação A                              |
| <b>pb</b>               | - pares de base                                                           |
| <b>PBS</b>              | - tampão de fosfato e salina                                              |
| <b>PCR</b>              | - reação em cadeia da polimerase                                          |
| <b>pg</b>               | - picograma                                                               |
| <b>pH</b>               | - potencial hidrogeniônico                                                |
| <b>RNA</b>              | - ácido ribonucléico                                                      |
| <b>RNA<sub>m</sub></b>  | - ácido ribonucléico mensageiro                                           |
| <b>RNAse</b>            | - enzima que degrada o ácido ribonucléico                                 |
| <b>RT</b>               | - reação de transcrição reversa                                           |
| <b>RT-PCR</b>           | - reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase |
| <b>S</b>                | - "sense"                                                                 |
| <b>SCF</b>              | - Fator de células tronco                                                 |
| <b>TBE</b>              | - Tris, Ácido bórico e EDTA                                               |
| <b>TZP</b>              | - projeções transzonais                                                   |
| <b>U</b>                | - unidades                                                                |
| <b>UV</b>               | - ultravioleta                                                            |
| <b>V</b>                | - volts                                                                   |

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELA**

**ABREVIATURAS**

**SUMÁRIO**

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                | <b>18</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                     | <b>20</b> |
| 2.1. Desenvolvimento folicular                                                                      | 20        |
| 2.1.1. Fase pré-antral                                                                              | 20        |
| 2.1.2. Fase antral                                                                                  | 23        |
| 2.2. Fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e seus receptores (FGFR)                           | 27        |
| 2.2.1. O papel dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF) no desenvolvimento folicular ovariano | 30        |
| 2.2.2. Fator de crescimento fibroblástico – 7 (FGF-7)                                               | 32        |
| 2.2.3. Fator de crescimento fibroblástico – 10 (FGF-10)                                             | 35        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                                 | <b>38</b> |
| 3.1. Geral                                                                                          | 38        |
| 3.2. Específicos                                                                                    | 38        |
| 3.3. Hipóteses                                                                                      | 38        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                        | <b>39</b> |
| 4.1. Obtenção dos folículos antrais                                                                 | 39        |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. Obtenção dos folículos pré-antrais                                      | 40        |
| 4.3. Obtenção dos tecidos adultos e fetais                                   | 41        |
| 4.4. Obtenção dos oócitos                                                    | 42        |
| 4.5. Extração do RNA total                                                   | 43        |
| 4.5.1. Folículos antrais, pré-antrais e tecidos                              | 43        |
| 4.5.2. Extração de RNA total dos oócitos                                     | 44        |
| 4.6. Radioimunoensaio                                                        | 45        |
| 4.7. Classificação folicular                                                 | 46        |
| 4.8. RT-PCR                                                                  | 47        |
| 4.8.1. Protocolo DNase I                                                     | 47        |
| 4.8.2. Reação de transcrição reversa (RT)                                    | 47        |
| 4.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)                                  | 48        |
| 4.8.4. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para o FGF-7 e o FGF-10       | 50        |
| 4.8.5. Investigação da pureza das amostras de células da granulosa e da teca | 52        |
| 4.9. Eletroforese em gel de agarose                                          | 54        |
| 4.10. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR                  | 54        |
| 4.11. Análise estatística                                                    | 55        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                         | <b>56</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                                          | <b>60</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                                                         | <b>69</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                         | <b>71</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A principal função da gônada feminina é a diferenciação e ovulação de um oócito maturo para a fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário. O folículo ovariano é a unidade estrutural que fornece o microambiente necessário para a aquisição da competência de desenvolvimento pelo oócito.

A população folicular no ovário da fêmea bovina é estabelecida ainda na vida fetal e o animal já nasce com a reserva de gametas que será utilizada durante toda a sua vida reprodutiva. Ao longo da foliculogênese, a vasta maioria dos folículos sofre degeneração atrésica, enquanto apenas uma ínfima parcela atinge a ovulação.

Algumas biotécnicas de reprodução assistida têm sido empregadas com o objetivo de melhor aproveitar a população folicular de fêmeas geneticamente superiores. Entre elas, destacam-se a superovulação e a aspiração folicular aliada à produção *in vitro* de embriões, já em aplicação comercial, e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, ainda em desenvolvimento.

Entretanto, o processo *in vivo* de desenvolvimento folicular e embrionário é mais eficiente. Enquanto a manipulação farmacológica do ovário nem sempre proporciona os efeitos esperados, a reprodução *in vitro* das etapas do desenvolvimento folicular e embrionário não consegue mimetizar por completo os processos fisiológicos.

O êxito dessas técnicas na intensificação da exploração genética está intimamente ligado ao acúmulo de conhecimento sobre a fisiologia ovariana, incluindo os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular e oocitário.

O entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi alcançado. Trata-se de um tópico complexo que envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Estes fatores são orquestrados de maneira estágio-específica com a função de controlar diversos processos, entre eles a proliferação e diferenciação das células foliculares.

Diversas famílias de fatores de crescimento estão envolvidas na regulação da foliculogênese, entre elas a família dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF). Os FGF são necessários para muitos processos biológicos e induzem atividades mitogênicas, quimiotáticas e angiogênicas de uma grande variedade de células e tecidos. Alguns membros já foram identificados como potenciais reguladores da função ovariana, entre eles o FGF-7.

O FGF-10 é estrutural e funcionalmente semelhante ao FGF-7. Contudo, até o presente momento, não há relato do envolvimento do FGF-10 no controle do desenvolvimento folicular ovariano. Portanto, a fim de iniciar a investigação da participação do FGF-10 na regulação da foliculogênese, este trabalho objetivou examinar o padrão temporal e espacial da expressão gênica do FGF-10 nos folículos ovarianos bovinos. Devido à inexistência de informações sobre a expressão pré-antral e oocitária do FGF-7 em bovinos, seu padrão de expressão gênica foi paralelamente investigado.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Desenvolvimento folicular**

#### **2.1.1. Fase pré-antral**

A formação dos folículos primordiais no desenvolvimento do ovário é um processo crítico da biologia reprodutiva, visto que afeta diretamente o número de oócitos disponíveis para uma fêmea durante a sua vida reprodutiva. A formação dos folículos primordiais atravessa diferentes eventos que se iniciam com a formação das células germinativas primordiais até o estabelecimento da população folicular ovariana (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Após sua formação, as células germinativas primordiais migram até a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada. Estas células diferenciam-se e recebem o nome de oogônias. Após uma fase de proliferação mitótica das oogônias, dá-se início ao processo de divisão meiótica, que é interrompido no diplóteno da prófase I. Estas oogônias agora são denominadas oócitos primários, e recebem uma estreita camada de células da granulosa, constituindo os folículos primordiais (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK et al., 1997).

Uma vez estabelecida a população de folículos primordiais, de forma gradual e contínua, alguns destes folículos são ativados e deixam o grupo dos quiescentes, iniciando o seu desenvolvimento (FORTUNE et al., 1999). Estes folículos assumem, seqüencialmente, as condições de folículos primários, quando ocorre a diferenciação das células da granulosa que circundam o oócito, passando do formato achatado para o cubóide (MCNATTY et al., 1999);

e secundários, caracterizados pelo aumento no tamanho do oócito e proliferação das células da granulosa (VAN DEN HURK et al., 1997). Por sua vez, as células da teca são recrutadas do estroma ovariano e organizam-se ao redor do folículo secundário, não estando presentes nos estágios anteriores do desenvolvimento pré-antral (NILSSON et al., 2001).

A progressão de folículos ovarianos do estágio primordial quiescente até o estágio pré-ovulatório é um processo que requer considerável crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares (McGEE et al., 1999). Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral ainda não foram completamente elucidados. Enquanto no desenvolvimento antral as gonadotrofinas desempenham um papel fundamental, achados recentes indicam que o desenvolvimento folicular pré-antral independe de estímulo gonadotrófico agudo, mesmo estando expressos nestes folículos os receptores para FSH (FSHR; BAO & GARVERICK, 1998) e LH (LHR; WEBB et al., 2003).

Por outro lado, mecanismos parácrinos de controle parecem desempenhar um papel hegemônico nessa fase (GONG et al., 1996; MONNIAUX et al., 1997ab). O oócito desempenha um papel essencial para o adequado crescimento e desenvolvimento do folículo, através da sua comunicação com as células da granulosa (GILCHRIST et al., 2004). Ao longo do desenvolvimento folicular os oócitos experimentam diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, são responsáveis por tornar o oócito competente, ou seja, apto para a fertilização e subsequente

desenvolvimento embrionário (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). A aquisição da competência oocitária ocorre então de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares (BEVERS et al., 1997), visto que o desenvolvimento do folículo e seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (AGUILLAR et al., 2001).

A comunicação entre o oócito e as células da granulosa adjacentes ocorre por meio de processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram pela zona pelúcida e atingem a membrana plasmática do oócito, formando junções de membrana do tipo “gap” (ALBERTINI et al., 2001). Através destas junções ocorre o transporte de moléculas de baixo peso molecular como íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (GILCHRIST et al., 2004).

Além das TZPs, a comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre via sinalização parácrina intrafolicular, por meio da secreção de diversos fatores de crescimento e interação com seus receptores (MATZUK, et al., 2002). O fator de células tronco (SCF), também conhecido como kit-ligante é produzido por células da granulosa de folículos primordiais e primários, enquanto seu receptor está localizado em oócitos (PACKER et al., 1994). O kit-ligante produzido pelas células da granulosa estimula o desenvolvimento do oócito, e o crescimento e diferenciação das células da teca e suas precursoras no estroma ovariano (PARROTT & SKINNER, 1999).

Além do kit-ligante, o fator de crescimento diferencial - 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea - 15 (BMP-15) têm recebido atenção especial recentemente (BURATINI et al., 2005). Ambos são expressos pelo oócito

(JUENGEL et al., 2004; SHIMASAKI et al., 2003) e, embora seus papéis não tenham sido completamente esclarecidos, regulam a proliferação e diferenciação das células da granulosa e dos oócitos em estágios iniciais do desenvolvimento folicular (VITT et al., 2000 ab; OTSUKA et al., 2000; JUENGEL et al., 2002).

Vários outros peptídeos intraovarianos, têm sido apontados como fatores reguladores importantes do desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral, dentre os quais a ativina, inibina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), fatores de crescimento epidermais (EGF), fatores de crescimento transformantes (TGF) e os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) (FINDLAY, 1994; VAN DEN HURK et al., 1997; MONNIAUX et al., 1997ab).

### **2.1.2. Fase antral**

Distintamente do que ocorre no desenvolvimento folicular pré-antral, os mecanismos endócrinos envolvendo as gonadotrofinas e esteróides desempenham um papel chave na regulação do desenvolvimento folicular antral. Durante esta fase, ondas de crescimento folicular se sucedem sob o controle das gonadotrofinas (FSH e LH), hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona) e fatores ovarianos de ação endócrina e parácrina (FORTUNE, 1994; GONG et al., 1996).

Os folículos antrais são caracterizados pelo aparecimento de espaços preenchidos de secreção líquida entre as células da granulosa (CALLEJAS, 2001). Estes espaços confluem em uma cavidade denominada antro folicular,

cujo tamanho aumentará até o momento da ovulação no folículo pré-ovulatório (GREENWALD & ROY, 1994), podendo atingir cerca de 18mm de diâmetro (DRIANCOURT, 1991; FIGUEIREDO et al., 1995). À medida que o folículo se desenvolve, as células da granulosa dividem-se em dois sub-tipos morfológica e funcionalmente distintos: as células da granulosa do “*cumulus*”, aquelas envolvendo e em íntimo contato metabólico com o oócito, formando o complexo cumulus-oócito (CCO); e as células da granulosa murais, que estão alinhadas na parede folicular formando um epitélio estratificado com a membrana basal (GILCHRIST et al., 2004). Externamente ainda temos duas camadas de células da teca, a camada interna e a externa (FIGUEIREDO et al., 1995).

Uma elevação transitória da concentração plasmática de FSH é o estímulo responsável pelo crescimento sincronizado de folículos antrais jovens que origina as ondas foliculares (ADAMS et al., 1992; FORTUNE, 1994). Nos bovinos, até 24 folículos iniciam seu crescimento e, durante o declínio da concentração de FSH, a maioria interrompe o seu crescimento até que um único seja selecionado (MIHM et al., 2003). Este folículo passa a exercer dominância sobre os demais que compõem a onda folicular, chamados subordinados, os quais tornam-se estáticos e entram em atresia (AUSTIN et al., 2001). Esta atresia dos folículos subordinados é estimulada pela secreção de estradiol e inibina, o que leva à redução dos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento desses folículos (GINTHER et al., 1996). Esta fase é caracterizada como desvio folicular, a partir da qual o folículo dominante continua a crescer, enquanto que os

folículos subordinados iniciam o processo de atresia (FORTUNE et al., 1991; GINTHER et al., 2001).

O mecanismo que determina qual folículo será selecionado ainda não foi completamente elucidado. Possivelmente, durante o recrutamento, o futuro folículo dominante seja aquele cujo estágio de desenvolvimento encontra-se em melhor sincronia com o estímulo gonadotrófico, tornando-o mais responsivo e fazendo-o diferenciar-se precocemente em relação aos demais (FORTUNE, 1994). Esta diferenciação precoce origina a refratariedade do folículo dominante aos níveis decrescentes de FSH, o que acredita-se estar relacionado à aquisição de receptores para o LH nas células da granulosa, gonadotrofina responsável pelo desenvolvimento e maturação folicular terminal (GINTHER et al., 2001).

Existem fortes evidências de que o sistema composto pelos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) desempenha papel importante na seleção do folículo dominante (BURATINI et al., 2005). Os membros deste sistema já caracterizados nos folículos bovinos incluem os dois tipos de peptídeos (IGF-I e IGF-II), dois receptores (tipo 1 e tipo 2), seis proteínas específicas de ligação ao IGF (IGFBP-1 a 6), além da proteína plasmática associada à gestação- A (PAPP-A) (SPICER & ECHTERNKAMP 1995; RIVERA et al., 2001; MAZERBOURG et al., 2001). Os IGF livres estimulam a proliferação das células da granulosa e aumentam a síntese de estradiol, inibina e activina *in vitro*, tendo seus efeitos potencializados pelo FSH (GLISTER et al., 2001; SILVA & PRICE, 2002). As IGFBPs impedem a ligação

dos IGF ao receptor, enquanto a PAPP-A é uma enzima específica de degradação da IGFBP-4 (FORTUNE et al., 2004; MAZERBOURG et al., 2001).

A seleção do folículo dominante está associada ao aumento da biodisponibilidade dos IGF, mediante aumento na síntese de IGF-II e liberação da IGF-I devido à degradação da IGFBP-4 (MIHM et al., 2002). Enquanto isso no folículo subordinado, as concentrações de IGFBP-4 e 5 aumentam, restringindo a biodisponibilidade dos IGF (FORTUNE et al., 2004). A redução da IGFBP4 e aumento nos níveis de IGF livre são considerados essenciais para o desvio e a continuidade do desenvolvimento do folículo dominante após a diminuição dos níveis de FSH (MIHM et al., 2002; FORTUNE et al., 2004).

Finalmente, se a regressão luteal ocorre ainda durante a fase de crescimento do folículo dominante, a queda dos níveis de progesterona permite o aumento da frequência dos pulsos de LH, culminando no pico de LH necessário à ovulação e à maturação oocitária com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular. Caso contrário, o folículo dominante regride e deixa de inibir a secreção de FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (MONNIAUX et al., 1997ab). Os folículos que não atingem o estágio final de desenvolvimento sofrem atresia (HIRSHFIELD, 1991), um processo fisiológico responsável pela perda da maioria (99,9%) dos folículos ovarianos (GORDON, 1994; IRELAND, 1987).

Conforme já indicado pelo envolvimento do sistema IGF abordado anteriormente, fatores de crescimento produzidos localmente constituem moléculas estimuladoras e/ou reguladoras fundamentais para o desenvolvimento de folículos antrais, atuando por meio de mecanismos

parácrinos e endócrinos (FORTUNE et al., 2004; GINTHER et al., 2001; WEBB et al., 2003). Estudos com ovelhas nocaute e imunização passiva, demonstraram que o GDF-9 e a BMP-15 participam não só do desenvolvimento folicular inicial, como também são importantes para a luteinização do folículo e subsequente função luteal (DONG et al., 1996; JUENGEL et al., 2002). Além disso, O GDF-9 e a BMP-15, derivadas dos oócitos, regulam a proliferação das células da granulosa, previnem a luteinização e produção de progesterona destas células antes do pico pré-ovulatório de LH (GILCHRIST et al., 2004). Da mesma forma, a identificação do RNAm e a proteína do receptor para GDF-9 e BMP-15 em células da teca indica que eles podem regular a função também destas células (SOUZA et al., 2002).

A expressão do GDF-9 e da BMP-15 pelos oócitos demonstra que a sua comunicação com as células da granulosa também desempenha um papel fundamental no controle do desenvolvimento folicular antral por meio de interações parácrinas (FORTUNE et al., 2004). Outros fatores secretados pelo oócito, ainda não elucidados, são responsáveis por manter o fenótipo das células do “*cumulus*” e facilitar a expansão do mesmo no período pré-ovulatório (EPPIG, 2001).

## **2.2. Fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e seus receptores (FGFR)**

Os FGF compõem uma família de pelo menos 25 membros (FGF 1-25) (KATOH & KATOH, 2005), e estão expressos em muitos tecidos, embora alguns sejam expressos preferencialmente durante o período embrionário (FGF-3, FGF-4, FGF-8, FGF-15, FGF-17 e FGF-19), enquanto os outros são

expressos em tecidos adultos e fetais (ORNITZ & ITOH, 2001). São proteínas com peso molecular entre 17 e 34 KDa, altamente conservadas entre as espécies de vertebrados e compartilham mais de 90% de homologia na seqüência de aminoácidos (ORNITZ & ITOH, 2001). Eles apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização e oncogênese (BASILICO & MOSCATELLI, 1992).

Além da habilidade de estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam potentes atividades neurotróficas e angiogênicas. Essas moléculas estão expressas em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento e também em tecidos adultos, o que indica que elas desempenham papel importante como fatores de crescimento e diferenciação durante toda a vida (IGARASHI et al., 1998).

Está bem caracterizado que o crescimento e diferenciação das células epiteliais são determinados em grande medida pela ação de células mesenquimais adjacentes, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto em tecidos adultos. A integridade desta sinalização parácrina requer uma regulação muito ajustada da atividade do FGF, bem como da especificidade de ligação ao receptor (ORNITZ & ITOH, 2001). Por outro lado, a habilidade das células epiteliais em influenciar a atividade das células mesenquimais é igualmente importante. Esta interação recíproca entre células mesenquimais e epiteliais adjacentes é mediada por fatores parácrinos reguladores das funções celulares (NILSSON & SKINNER, 2001). Dentre esses fatores incluem-se o FGF-7 e o FGF-10, ambos promotores de

proliferação e diferenciação de células epiteliais em diversos processos como oncogênese, morfogênese e proliferação glandular. (TAYLOR et al., 2001).

Cinco genes distintos codificam receptores de alta afinidade que interagem com os membros da família FGF (FGFR1-5) (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Os quatro primeiros genes codificam receptores do tipo tirosina-quinase localizados na membrana celular. Após interação entre o FGF e o FGFR, dimerização e trans-fosforilação do receptor devem ocorrer para que o sinal seja traduzido em uma resposta biológica (JOHNSON & WILLIAMS, 1993). CREUZET et al. (1995) demonstraram que além da fosforilação da tirosina, outros sinais de transdução, como o recrutamento da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK), estão envolvidos na geração do efeito proliferativo dos FGF. Arranjos transcricionais alternativos ("alternative splicing") possibilitam a formação de 3 isoformas (a, b e c) do FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3, que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGF (ORNITZ et al., 1996). O FGFR-5, descoberto mais recentemente, apresenta dois transcritos alternativos: FGFR-5 $\gamma$  e  $\beta$  (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Este receptor não apresenta o domínio tirosina quinase intracelular como os outros FGFR, porém os resíduos dos domínios extracelulares importantes para o acoplamento com os ligantes dos FGF são conservados (SLEEMAN et al., 2001).

Demonstrou-se que o FGF-7 e o FGF-10 interagem especificamente com o FGFR-2b, o qual é expresso exclusivamente por células epiteliais (ORNITZ & ITOH, 2001). Esta especificidade de ligação diferencia o FGF-7 e FGF-10 dos outros membros da família, e tornou o FGFR-2b conhecido como

receptor do fator de crescimento dos queratinócitos ou KGFR (ORNITZ et al., 1996; IGARASHI et al., 1998). Ainda há poucos dados sobre a capacidade de ligação dos diversos FGF ao FGFR-5. KIM et al. (2001) não observaram ligação significativa entre o FGF-1 e FGF-2 e o FGFR-5. Contrariamente, SLEEMAN et al. (2001) demonstraram ligação específica do FGF-2 ao FGFR-5, o que não ocorreu nos ensaios com o FGF-7. Portanto, a capacidade de ligação e ativação do FGF-7 e FGF-10 ao FGFR-5 ainda é desconhecida.

### **2.2.1. O papel dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF) no desenvolvimento folicular ovariano**

A foliculogênese está incluída dentre os processos fisiológicos dos quais participam os FGF, sendo o FGF-2, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o membro da família melhor estudado nesse contexto. Fortes evidências indicam a participação do FGF-2 como elemento mediador de interações químicas entre os tipos celulares que compõem os folículos pré-antrais (McNATTY et al., 1999). Além do FGF-2, há evidências de que outros FGF e seus receptores estejam envolvidos no controle do desenvolvimento folicular, tais como o FGF-1 (BERISHA, et al., 2004), FGF-8 (BURATINI et al., 2005ad) e o FGF-7 (PARROTT & SKINNER, 1998ab).

O FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da teca e granulosa de folículos pré-antrais (VAN WEZEL et al., 1995), enquanto seus receptores estão localizados principalmente na camada de células da granulosa (WANDJI et al., 1992), embora seu RNAm também

tenha sido detectado nas células da teca de folículos antrais (BERISHA et al., 2004), principal sítio de produção do FGF-2, indicando papel de controle parácrino e autócrino. Esta hipótese é reforçada por estudos de cultivo celular onde o FGF-2 induziu a proliferação celular e inibiu a esteroidogênese tanto em células da granulosa (LAVRANOS et al., 1994; VERNON & SPICER, 1994) como em células da teca (NILSSON et al., 2001). BERISHA et al. (2004) observaram expressão crescente do RNAm do FGF-2 em células da teca ao longo do desenvolvimento folicular, sugerindo seu envolvimento no controle do crescimento final de folículos pré-ovulatórios via estimulação da angiogênese e proliferação e sobrevivência das células da granulosa.

A expressão do FGF-1, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico ácido (aFGF), foi detectada em células da granulosa e predominantemente em células da teca, porém sem variação significativa ao longo do desenvolvimento folicular, e sua função reguladora não está bem caracterizada (BERISHA et al., 2004). Uma vez que o RNAm do FGF-1 expressou-se constantemente entre as classes foliculares, tanto nas células da granulosa como nas células da teca, este fator parece não ter efeitos diretos no recrutamento ou seleção folicular (BERISHA et al., 2004). Seu papel no ovário parece estar mais relacionado à sobrevivência celular, como ocorre nas células endoteliais e do músculo liso (CUEVAS et al., 2000).

A participação do FGF-8 no controle do desenvolvimento folicular pré-antral foi recentemente sugerida pela detecção da expressão gênica deste FGF e seus receptores FGFR-3c e FGFR-4 em “pools” de folículos primordiais, primários e secundários obtidos de ovários fetais bovinos (BURATINI et al.,

2005a). O padrão de expressão gênica sugere que a expressão do FGF-8 e seus receptores é regulada ao longo do desenvolvimento, e que o FGFR-3c é o receptor predominante para o FGF-8 em folículos pré-antrais bovinos (BURATINI et al., 2005a).

O RNAm do FGF-8 está expresso em oócitos, células da granulosa e da teca de folículos antrais bovinos. Quanto aos seus receptores, o FGFR-4 foi detectado exclusivamente em células da teca, enquanto que o FGFR-3c mostrou-se expresso tanto em células da teca como em células da granulosa (BURATINI et al., 2005d). Os valores de expressão do RNAm do FGFR-4 em células da teca diminuíram com o aumento do diâmetro folicular, diferentemente, da expressão do FGFR-3c que mostrou-se relativamente estável em células da teca, porém crescente em células da granulosa ao longo do desenvolvimento folicular (BURATINI et al., 2005d). A combinação destes resultados sugere um papel deste sistema no desenvolvimento e/ou diferenciação inicial das células da teca e no controle da proliferação das células da granulosa de folículos estrogênicos (BURATINI et al., 2005bd).

### **2.2.2. Fator de crescimento fibroblástico – 7 (FGF-7)**

O FGF-7 é uma proteína de 28 KDa, majoritariamente expressa por células derivadas do mesênquima, a fim de regular a atividade de células epiteliais adjacentes. Devido ao seu potente efeito mitogênico em queratinócitos epiteliais de camundongos, é também conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos ou KGF (WARE & MATTHAY, 2002). A expressão do FGF-7 foi detectada em vários tecidos como pele, folículos

capilares, pulmão, próstata, glândula mamária, útero e ovário, onde se sustenta que ele promova diferenciação e proliferação de células epiteliais (RUBIN et al., 1995). Evidências adicionais do papel do FGF-7 como mediador de interações nos diferentes órgãos foram obtidos numa série de estudos envolvendo hormônios sexuais esteróides. Muitos efeitos dos hormônios envolvem ação direta no estroma ou mesênquima, com uma resposta subsequente manifestada pelas células epiteliais adjacentes. (RUBIN et al., 1995). YAN et al., (1992) relataram que a testosterona estimulou a expressão do FGF-7 por células do estroma prostático de ratos, enquanto que células epiteliais proliferaram-se em resposta à adição de FGF-7 recombinante em células de cultura. Quando os dois tipos celulares foram cultivados juntos, na presença de testosterona, observou-se aumento na proliferação das células epiteliais. A expressão do FGF-7 no trato reprodutivo feminino também parece ser regulado por hormônios esteróides, visto que a transcrição do FGF-7 aumentou marcadamente no endométrio de primatas e ratos tratados pela combinação de estradiol e progesterona (KOJI et al., 1994).

No ovário bovino, a expressão do FGF-7 foi detectada no epitélio superficial normal (PARROTT et al., 2000), no corpo lúteo (SALLI et al., 1998) e nas células da teca (PARROTT et al., 1994; PARROTT & SKINNER, 1998ab; BERISHA et al., 2004). Já nas células da granulosa, o RNAm do FGF-7 não foi detectado (PARROTT et al., 1994; SALLI et al., 1998) ou proporcionou um sinal muito fraco, sem nenhum indício de regulação no desenvolvimento folicular (BERISHA et al., 2004).

PARROTT & SKINNER (1998a) relataram níveis de expressão do FGF-7 em células da teca diretamente proporcionais ao tamanho dos folículos antrais, o que motivou a sugestão de que as ações do FGF-7 seriam especialmente importantes para a rápida proliferação de células da granulosa em folículos grandes (diâmetro acima de 10 mm). Porém, em outro estudo, os níveis de expressão do RNAm do FGF-7 não apresentaram variação significativa ao longo do desenvolvimento folicular, embora a expressão gênica do FGFR-2b detectada em níveis crescentes em células da granulosa, sugerindo que as ações parácrinas do FGF-7 são moduladas por meio da expressão do receptor ao longo do desenvolvimento folicular antral (BERISHA et al., 2004).

O FGF-7 apresenta alta afinidade pelo FGFR-2b, que também é chamado de KGFR (IGARASHI et al., 1998, OHUCHI et al., 2000). A expressão do FGFR-2 (sem distinção entre as diferentes isoformas) foi inicialmente detectada nas células da teca de ratas (Asakai et al., 1994). Posteriormente, a expressão gênica do FGFR-2b foi relatada em células da granulosa bovinas (PARROTT et al., 1994; PARROTT & SKINNER, 1998ab). Foi demonstrado que o FGFR-2b tem maior expressão em folículos estrogênicos (BERISHA et al., 2004) e que o FSH é capaz de estimular sua expressão (BURATINI et al., 2005d).

O FGF-7 induz a proliferação de células da granulosa em cultura, sugerindo sua participação na mediação dos efeitos mitogênicos indiretos de hormônios endócrinos como o estradiol e o LH. De fato, os tratamentos com hCG ou estradiol aumentam a expressão e produção do FGF-7 em células da teca em cultura (PARROTT & SKINNER, 1998ab). Quanto aos efeitos sobre a

diferenciação esteroidogênica de células da granulosa em cultura, a administração de FGF-7 diminuiu a atividade de aromatização induzida pelo FSH e inibiu a capacidade do hCG de induzir a produção de progesterona em células da granulosa cultivadas *in vitro*. (PARROTT & SKINNER, 1998ab).

Embora não existam relatos da expressão do FGF-7 em folículos pré-antrais bovinos, recentemente, KEZELE et al. (2005) relataram a detecção da proteína do FGF-7 por imunohistoquímica nas células adjacentes aos folículos primordiais de ratos. Além disso, foram encontradas algumas evidências de que o FGF-7 pode participar do controle do desenvolvimento folicular pré-antral. O tratamento com FGF-7 de folículos pré-antrais em cultura inibiu a fragmentação apoptótica do DNA, incrementou o diâmetro destes folículos e a expressão da inibina-a, utilizada como marcador de diferenciação e desenvolvimento folicular (HSUEH et al., 2000). Embora os mecanismos não tenham sido esclarecidos, estes resultados indicam o FGF-7 como um fator de diferenciação e sobrevivência celular.

### **2.2.3. Fator de crescimento fibroblástico – 10 (FGF-10)**

O FGF-10 é uma proteína de aproximadamente 24 KDa que foi originalmente isolada do mesênquima pulmonar do rato (YAMASAKI et al., 1996) e identificada como um fator de crescimento de origem mesenquimal essencial para a ramificação precoce e a regulação de eventos morfogênicos na formação do pulmão (CHEN et al., 2000). O FGF-10 está expresso em diferentes órgãos humanos, murinos e ovinos, onde desempenha papel importante na organogênese (CHEN et al., 2000; EMOTO et al, 1997,

IGARASHI et al., 1998; OHUCHI et al., 2000). No pulmão, órgão onde o FGF-10 está melhor caracterizado, como um fator de diferenciação celular e quimiotaxia (WARE & MATTHAY, 2002). O FGF-10 também está expresso no mesênquima cório-alantóideo enquanto seu receptor expressa-se no trofotoderma, indicando sua participação no controle da proliferação e diferenciação da placenta (CHEN et al., 2000). Estudos de cultivo de células do estroma prostático na presença de testosterona demonstraram que o FGF-10 também pode desempenhar um papel de mediador dependente de andrógenos de interações celulares no tecido prostático (LU et al., 1999).

Além de seus efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular, estudos recentes sugerem que o FGF-10 atue como um fator de citoproteção e reparação tecidual no pulmão e na pele (BRAUN et al., 2004; WARE & MATTHAY, 2002). Estudos demonstraram que após uma injúria na pele, fibroblastos da derme secretam FGF-10, o qual ativa queratinócitos dos bordos da lesão, estimulando re-epitelização (BRAUN et al., 2004). O FGF-10 também pode apresentar um papel importante na prevenção do estresse oxidativo, atenuando os danos ao DNA das células do epitélio alveolar pulmonar através da ativação do sistema MAPK (proteína quinase mitógeno ativada) (UPADHYAY et al., 2004).

Os padrões temporal e espacial de expressão do FGF-10 parecem diferir da maioria dos outros membros da família FGF e o seu significado fisiológico ainda precisa ser melhor elucidado. Entretanto, o FGF-10 é bastante semelhante ao FGF-7, tanto no que se refere à estrutura e sequência do gene, quanto às propriedades funcionais, o que levou o FGF-10 a ser chamado

também de KGF-2 (EMOTO et al., 1997; OHUCHI et al., 2000). Ambos apresentam alta afinidade pelo FGFR-2b, o que também os diferencia dos demais FGF. Esta similaridade sugere que o FGF-7 e o FGF-10 possam atuar de forma sinérgica ou redundante (IGARASHI et al., 1998). Esta hipótese foi reforçada após a detecção da expressão gênica do FGF-10, juntamente com a do FGF-7, no útero neonatal ovino. Acredita-se que ambos participem da regulação da morfogênese endometrial, onde o FGF-10 atuaria como fator quimiotático direcionador do crescimento e ramificação glandular e o FGF-7 estimularia a proliferação de células epiteliais (TAYLOR et al., 2001).

Contudo, não há dados disponíveis sobre a expressão do FGF-10 no ovário. Até o presente momento, o envolvimento do FGF-10 no controle do desenvolvimento folicular não foi investigado. Portanto, a expressão do FGFR-2b em células da granulosa, combinada à expressão do FGF-7 em células da teca e sua similaridade estrutural e funcional em relação ao FGF-10, motiva a hipótese de que o FGF-10 também está envolvido no controle do desenvolvimento folicular ovariano bovino, atuando na regulação da atividade mitótica e esteroidogênica das células da granulosa.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar o envolvimento do FGF-10 no controle do desenvolvimento folicular mediante investigação da expressão do seu RNAm em folículos ovarianos bovinos.

#### **3.2. Específicos**

Investigar a expressão gênica do FGF-10 em oócitos, folículos pré-antrais e antrais, bem como, numa variedade de tecidos bovinos,

Investigar a expressão gênica do FGF-7 em oócitos, folículos pré-antrais e antrais, bem como, numa variedade de tecidos bovinos,

Comparar o padrão da expressão gênica desses FGFs em diferentes classes de folículos antrais através de RT-PCR semiquantitativo.

#### **3.3. Hipóteses**

- Os RNAm do FGF-10 e FGF-7 são expressos nas diferentes classes de folículos pré-antrais em bovinos.
- Os RNAm do FGF-10 e FGF-7 são expressos em oócitos, células da teca e/ou granulosa de folículos antrais bovinos.
- A expressão gênica do FGF-10 e FGF-7 é regulada ao longo do desenvolvimento folicular

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção dos folículos antrais**

Folículos antrais de 2 a 13mm de diâmetro foram dissecados a partir de ovários bovinos para posterior extração do RNA total. Os ovários foram coletados em abatedouro\* situado a 50Km de Botucatu-SP e transportados em solução fisiológica em gelo até o laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP, onde foram cuidadosamente dissecados para a separação dos folículos.

Após dissecação e retirada do estroma ovariano, procedeu-se a aferição do diâmetro de cada folículo recuperado intacto e aqueles folículos com 2 a 4mm de diâmetro foram imersos inteiramente em 1mL de solução Trizol® (Invitrogen®), homogeneizados em homogeneizador de tecidos por 1 minuto em gelo e congelados a -80°C para posterior extração de RNA total. Para os folículos com diâmetro igual ou superior a 5 mm foi realizada a aspiração do fluido folicular com agulha 26G (seringa de 1mL), que foi centrifugado (1200g por 1 minuto) para remoção das células da granulosa e congelado em freezer a -80°C para posterior análise das concentrações de esteróides por radioimunoensaio. Sem que a agulha fosse retirada do folículo, solução fisiológica estéril a 4°C foi injetada e retirada da cavidade folicular repetidamente (cerca de 8 vezes) para recuperação das células da granulosa. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada (1200g por 1

---

\* Frigorífico Frigol® de Lençóis Paulista-SP

minuto) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. Ao sedimento de células resultante foi adicionado o sedimento originado da centrifugação do fluido folicular e 1mL de solução Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>). As células da granulosa foram trituradas em homogeneizador de tecidos por 1 minuto em gelo e a solução resultante foi congelada a -80°C para posterior extração de RNA total.

Logo após a recuperação das células da granulosa, o folículo foi dividido ao meio em uma placa de Petri estéril com auxílio de uma lâmina de bisturi e a camada de células da teca foi destacada da face interna da parede folicular com a utilização de pinças oftálmicas. Cuidadosamente, essa camada foi raspada em sua face interna com uma cureta de vidro feita com uma pipeta Pasteur e lavada em solução fisiológica estéril mediante aspirações e ejeções sucessivas com seringa de 1mL, a fim de eliminar células da granulosa remanescentes. Em seguida, a camada da teca foi imersa em 1mL de solução Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>), triturada em homogeneizador de tecidos por 1 minuto em gelo e congelada à -80°C, até o momento da extração de RNA total.

#### **4.2. Obtenção dos Folículos Pré-Antrais**

As amostras de RNA total de folículos pré-antrais foram obtidas a partir de “pools” de folículos pré-antrais recuperados de fetos bovinos individualizados. A metodologia empregada para recuperação dos folículos pré-antrais foi descrita anteriormente (Glapiński, 2003). Resumidamente, ovários fetais bovinos foram obtidos em abatedouro e transportados em solução fisiológica gelada (cerca de 5°C) até o laboratório, onde os folículos pré-antrais

foram isolados seguindo o procedimento descrito por FIGUEIREDO et al. (1993). Os ovários fetais foram fragmentados em fatiador de tecidos e os fragmentos ovarianos foram transferidos para solução fisiológica gelada. Esta solução foi homogeneizada mediante aspirações e ejeções consecutivas, e a solução resultante foi filtrada em malhas de nylon. Após a filtração, os folículos foram resgatados ao microscópio invertido e agrupados conforme o estágio de desenvolvimento em três categorias: primordiais, primários e secundários. De cada par de ovários fetais, foram recuperados de 100 a 200 folículos, pertencentes a cada uma das três categorias, para extração do RNA total. Depois de isolados e agrupados, os folículos foram transferidos para 500 µl de Trizol (Invitrogen™), triturados em homogeneizador de tecidos e armazenados a - 80° C até a extração do RNA total.

#### **4.3. Obtenção dos tecidos adultos e fetais**

Amostras de órgãos bovinos adultos e fetais (ovários, testículos, bexiga, rim adrenal, intestino, estômago, fígado, coração, cérebro e pulmão) foram obtidas em abatedouro. Os fragmentos dos órgãos adultos foram retirados ainda no abatedouro e transportados em gelo até o laboratório. Os fetos bovinos foram transportados inteiros em gelo até o laboratório, onde os fragmentos dos órgãos foram retirados. Todos os fragmentos de órgãos, adultos e fetais foram pesados e aproximadamente 80mg de cada órgão foram transferidos para 1mL de solução Trizol® (Invitrogen™), homogeneizados e congelados à -80°C.

#### **4.4. Obtenção dos oócitos**

Ovários bovinos de fêmeas adultas foram coletados em abatedouro, lavados e transportados em solução fisiológica a 35°C até o laboratório, onde se procedeu a aspiração dos folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. A aspiração foi realizada com auxílio de seringa e agulha 18G e o líquido folicular obtido foi depositado em tubo de fundo cônico de 15ml para a sedimentação dos complexos cumulus-oócito (CCOs). Após 10 minutos, o sedimento foi transferido para placas de petri 100X20 mm para a busca e recuperação dos CCOs sob lupa estereomicroscópica com aumento de 25 vezes. Os CCOs recuperados foram lavados três vezes em solução fisiológica e distribuídos em grupos de 50. Em seguida, cada grupo sofreu desnudamento completo por meio de agitação mecânica em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL por 3 a 4 minutos. Os oócitos desnudos foram novamente recuperados e lavados em solução fisiológica até ficarem completamente livres de células do cumulus. Cada grupo de 50 oócitos desnudos foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 300 µL de solução RLT + 3 µL de β-Mercaptoetanol do “kit” RNeasy® (QIAGEN®). Este tubo sofreu agitação mecânica leve por 3 minutos e a amostra foi estocada a -80°C para posterior extração de RNA total.

## **4.5. Extração do RNA total**

### **4.5.1. Folículos antrais, pré-antrais e tecidos**

Depois de trituradas e homogeneizadas, as amostras de folículos antrais, pré-antrais e dos diferentes tecidos foram submetidas ao protocolo Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) para extração de RNA total. Este protocolo foi realizado em quatro etapas sequenciais descritas a seguir: separação, precipitação, lavagem e dissolução do RNA total.

Na etapa de separação do RNA total, as amostras armazenadas em freezer a -80°C foram primeiramente mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C). Após este período, as amostras foram acrescidas de 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol<sup>®</sup> utilizado na homogeneização e agitadas manual e vigorosamente durante 15 segundos. A agitação foi seguida de uma nova “incubação” à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos e centrifugação a 12.700g por 15 minutos à temperatura de 2 a 8°C. O clorofórmio foi responsável pela separação da amostra em duas fases, sendo uma orgânica e a outra inorgânica ou aquosa. O RNA total permaneceu solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa obtida anteriormente foi transferida para um novo tubo (polipropileno de 1,5mL – Eppendorf<sup>®</sup>) e acrescida de álcool isopropílico na proporção de 0,5mL de isopropanol para cada 1mL de Trizol<sup>®</sup> utilizado na homogeneização. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a

12.700g durante 10 minutos à temperatura de 2 a 8°C. O álcool isopropílico foi o responsável pela precipitação do RNA total.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e 1mL de etanol a 75% foi acrescido ao tubo para cada 1mL de Trizol<sup>®</sup> utilizado na homogeneização. A amostra foi lavada com auxílio de agitador (Vórtex<sup>®</sup>) e centrifugada a 5.900g durante 5 minutos à temperatura de 2 a 8°C.

Na etapa de dissolução do RNA total, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo com auxílio de uma ponteira de pipeta, o pellet foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em 20µL de água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma<sup>®</sup> - DEPC, a 0,1%) por meio de repetidas aspirações e ejeções com auxílio de uma pipeta (Gilson<sup>®</sup>), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600<sup>®</sup>) e, finalmente, armazenado a - 80°C.

A concentração de RNA total destas amostras foi determinada no espectrofotômetro em absorvância de 260nm, exceto pelas amostras de folículos pré-antrais, uma vez que a concentração obtida fica abaixo do limite de detecção do espectrofotômetro.

#### **4.5.2. Extração de RNA total dos oócitos**

A extração do RNA total dos oócitos foi realizada por meio do kit RNeasy<sup>®</sup> (Qiagen). As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas com auxílio de um pipetador. Após centrifugação de 3 minutos a 14000g, o sobrenadante (300 µL) contendo o RNA foi transferido

para outro tubo de 1,5 mL e desprezou-se o tubo contendo o sedimento com resíduos da lise celular. Àquele tubo adicionou-se álcool etílico 70%, sendo homogeneizado com pipetador de 1000 µL. Este líquido foi transferido para a coluna do kit e centrifugado a 8000g por 15 segundos. O líquido remanescente no tubo coletor foi desprezado, e o tubo novamente acoplado à coluna, quando também adicionou-se 700 µL do líquido RW1 do Kit na superfície da coluna para nova centrifugação a 8000g por 15 segundos. Em seguida, substituiu-se o tubo coletor e adicionou-se 500 µL do líquido RPE do kit à superfície da coluna, repetindo o procedimento de centrifugação e descarte do líquido. Outros 500 µL de RPE foram adicionados à coluna, sendo submetidos agora a uma centrifugação de 1 minuto a 8000g. Após nova substituição do tubo coletor, 30 µL de água RNase free foi depositada na superfície da coluna, que, após 5 minutos de espera, foi finalmente centrifugada por 2 minutos a 14000g para a eluição do RNA total. Este tubo foi identificado e estocado a - 80°C, ou submetido imediatamente ao protocolo de transcrição reversa. As amostras de RNA total de oócitos não foram quantificadas, uma vez que a concentração obtida fica abaixo do limite de detecção do espectrofotômetro.

#### **4.6. Radioimunoensaio**

A técnica de radioimunoensaio empregada para mensuração das concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular foi descrita anteriormente por Teixeira (2004). Resumidamente, nos ensaios para dosagem de estradiol utilizou-se o Kit 3ª Geração DSL-39100 (Diagnostic Systems

Laboratories<sup>®</sup>, Inc., Webster, Texas), além de curva padrão construída a partir de estradiol liofilizado (Sigma<sup>®</sup>).

Nos ensaios para dosagem de progesterona utilizou-se o Kit DSL-3400 (Diagnostic Systems Laboratories<sup>®</sup>, Inc., Webster, Texas), além de curva padrão construída a partir de progesterona liofilizada (Sigma<sup>®</sup>).

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 7,4 e 13,5% para estradiol e 6,8 e 7,0% para a progesterona, respectivamente. A sensibilidade do ensaio foi de 0,3ng/mL para o estradiol e 0,2ng/mL para progesterona.

#### **4.7. Classificação folicular**

Os folículos foram classificados de acordo com a concentração de estradiol (E2) e diâmetro. Os folículos com progesterona (P4) >100ng/mL foram considerados atresicos e excluídos da análise. Com relação à concentração de E2, os folículos foram agrupados em 4 classes (<5, 5-20, >20-100 e >100ng/mL) baseando-se na classificação de BERISHA et al. (2000). Na classe de E2 <5 ng/mL, apenas os folículos com diâmetros menores ou iguais a 6 mm foram utilizados, enquanto que nas demais classes os folículos tinham diâmetros maiores ou iguais a 7 mm.

Além disso, os folículos foram agrupados em classes baseadas no diâmetro: folículos de 5 a 7, 8 a 10 e 10 a 13 mm de diâmetro.

Devido à impossibilidade técnica para separar os tipos celulares em folículos menores que 5mm, os folículos com 2 a 4mm de diâmetro foram utilizados inteiros e apenas na investigação da expressão gênica dos FGF-7 e FGF-10.

#### **4.8. RT-PCR**

Após a extração do RNA total dos folículos pré-antrais, células da teca, células da granulosa, oócitos e tecidos, a expressão gênica dos FGF-7 e FGF-10 foi investigada por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA total interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR.

##### **4.8.1. Protocolo DNase I**

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen®), o RNA total destinado a reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde acrescentou-se 1µL de tampão DNase, 1µL de DNase I (1U/µL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µL de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram transferidas para gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

##### **4.8.2. Reação de transcrição reversa (RT)**

Para a reação de transcrição reversa, utilizou-se o kit SuperScript II (Invitrogen®), cujo protocolo iniciou-se pela adição em microtubo estéril de 8µL da solução de RNA total resultante do tratamento com DNase I, contendo 1µg

de RNA total de folículos inteiros, células da teca e granulosa, 2 µg dos tecidos adultos e fetais, e o RNA total contido em 8 µL do pool de oócitos e folículos pré-antrais. Ao RNA total, adicionou-se 1µL de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt) (500µg/mL) e 1µL de dNTP Mix (10mM). Esta solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, incubada em gelo por 1 minuto e meio. Após a última incubação, adicionou-se à solução 2µL de tampão “First Strand” 5X, 4µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2µL de DTT (0,1M) e 1µL de “RNaseOUT Inhibitor” (40U/µL). Na sequência, a solução foi incubada a 42°C por 2 minutos e acrescida de 1µL (200U) de Superscript II (transcriptase reversa). Seguiram-se então três incubações sucessivas. Primeiramente, a solução permaneceu a 42°C por 50 minutos, depois, a 70°C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1µL de RNase H (2U/µL) e incubadas a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas a -20°C.

#### **4.8.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do FGF-7 foram obtidos da literatura (PARROT & SKINNER, 1998a). Para amplificação do FGF-10, utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores delineados para ovinos (CHEN et al., 2000). O gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno das reações, conforme descrito anteriormente (BURATINI et al., 2005d). As seqüências dos oligonucleotídeos

iniciadores para a amplificação do FGF-7, FGF-10 e GAPDH são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, FGF-7, FGF-10.

| Gene-alvo | Seqüência                                                                | Fragmento |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| GAPDH     | S 5' TGT TCC AGT ATG ATT CCA CC 3'<br>A 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG 3'    | 850pb     |
| FGF-7     | S 5' GCT TGC AAT GAC ATG ACT CC 3'<br>A 5' TGC CAT AGG AAG AAA GTG GG 3' | 486pb     |
| FGF-10    | S 5' CTT CTT GGT GTC TTC CGT CC 3'<br>A 5' CTC CTT TTC CAT TCA ATG CC 3' | 491pb     |

S = "sense"; A = "antisense"; pb = pares de bases

Para a amplificação desses genes utilizou-se o protocolo do Kit Taq DNA polimerase II (Invitrogen®), de reação em cadeia da polimerase (PCR) que iniciou-se pela adição dos reagentes descritos a seguir.

Ao produto (cDNA) foi acrescido: 2,5µL de tampão PCR 10X (fornecido no Kit); 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); 0,5µL de dNTP Mix (0,2mM); oligonucleotídeos iniciadores "sense" e "antisense" (concentrações específicas para cada gene são descritas adiante); 1,6U de Taq DNA polimerase; água destilada autoclavada para completar 25µL. Na seqüência, as amostras foram incubadas a 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial) no termociclador (MJ Research PTC 200®), seguidas por incubações termo-cíclicas correspondentes às fases de desnaturação (94°C por 45 segundos), anelamento (60°C por 45 segundos para FGF-10 e GAPDH; 65°C por 45 segundos para o FGF-7) e extensão (70°C por 1minuto). Como controle positivo da amplificação do FGF-10 e FGF-

7 foi usado pulmão feta,l e água em substituição ao cDNA como controle negativo.

Na análise qualitativa da expressão do GAPDH, FGF-7 e FGF-10 em tecidos utilizou-se 0,5 µL de cDNA, o que equivale a 100 ng de RNA da reação de transcrição reversa. Nas reações com amostras de oócitos e folículos pré-antrais utilizou-se 1µL de cDNA. A concentração utilizada de oligonucleotídeos iniciadores do gene GAPDH foi 0,16µM para tecidos e oócitos e 0,4µM para os folículos pré-antrais. Já para os genes FGF-7 e FGF-10, a concentração de oligonucleotídeos iniciadores utilizada foi 0,4 µM para todos os tipos celulares.

Trinta ciclos de PCR foram empregados para amplificação do gene GAPDH a partir de tecidos bovinos, oócitos e folículos pré-antrais. As reações dos genes FGF-7 e FGF-10 foram realizadas com 32 e 30 ciclos para os tecidos fetais e adultos, respectivamente; e 40 ciclos nas amostras de oócitos e folículos pré-antrais para ambos os genes.

As reações para verificar a expressão gênica do FGF-7 e FGF-10 em folículos inteiros, células da granulosa e células da teca foram executadas nas condições padronizadas para a análise semiquantitativa, cuja descrição vem a seguir.

#### **4.8.4. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para o FGF-7 e o FGF-10**

Amostras de RNA total provenientes de células da teca positivas para os genes FGF-7 e FGF-10 foram utilizadas, a fim de que o RT-PCR

semiquantitativo fosse validado para um grau de expressão semelhante ao das amostras a serem posteriormente quantificadas.

Para validação do RT-PCR semiquantitativo, elegeu-se um número de ciclos de PCR dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica com o número de ciclos. Além disso, diferentes quantidades ( $\mu\text{g}$ ) de RNA total foram testadas a fim de selecionar-se a quantidade dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica (Figura 1).

O RT-PCR semiquantitativo para o FGF-7 foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo GAPDH separadamente, uma vez que a combinação dos respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores mostrou-se incompatível com a amplificação simultânea, a despeito das várias tentativas de padronização variando a concentração dos oligonucleotídeos e a temperatura de anelamento. As 34 amostras de tecas empregadas na análise do FGF-7 foram testadas em um único ensaio devido à alta variação inter-ensaio observada. Já o RT-PCR semiquantitativo para o FGF-10 foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo GAPDH simultaneamente e as 42 amostras foram divididas em quatro ensaios, sendo que o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 10,2%.

Para a amplificação de fragmentos destes genes utilizou-se o protocolo Invitrogen® de reação em cadeia da polimerase (PCR), descrito anteriormente. Condições padronizadas:

**a) GAPDH:**

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa:  $1\mu\text{g}$ ;

- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5  $\mu\text{L}$  \*;
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,16  $\mu\text{M}$ ;
- Número de ciclos: 24;

**b) FGF-7:**

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1  $\mu\text{g}$ ;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5  $\mu\text{L}$  \*;
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,4  $\mu\text{M}$ ;
- Número de ciclos: 32;

**c) FGF-10 / GAPDH:**

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1  $\mu\text{g}$ ;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5  $\mu\text{L}$  \*;
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: FGF-10 (0,4  $\mu\text{M}$ ) e GAPDH (0,06  $\mu\text{M}$ );
- Número de ciclos: 30;

**4.8.5. Investigação da pureza das amostras de células da granulosa e da teca**

A fim de detectar a contaminação das amostras de cDNA de células da teca com células da granulosa e vice e versa, investigou-se a expressão da CYP17, característica de células da teca, nas amostras de células da granulosa e da CYP19, característica de células da granulosa, nas amostras de células da teca (resultados não apresentados) conforme descrito anteriormente

---

\* Equivalente a 50ng de RNA da reação de transcrição reversa

(Teixeira, 2004). As amostras que apresentaram contaminação foram descartadas.

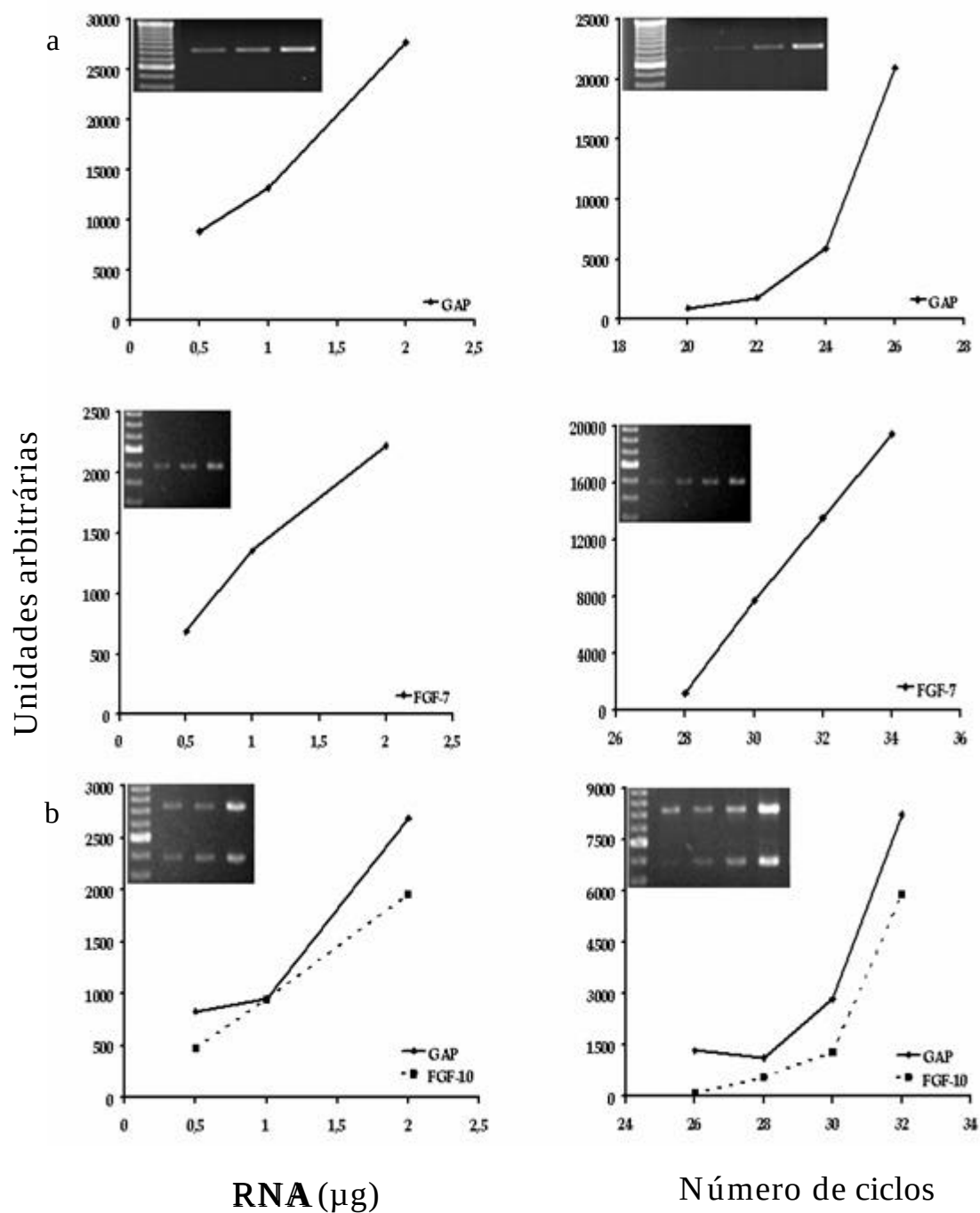


Figura 1 – Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativo para o FGF-7(a) e para o FGF-10 (b) em duplex com o GAPDH; demonstrando que os sinais da expressão dos genes alvo e constitutivo são dependentes da concentração de RNA e do número de ciclos de PCR.

#### **4.9. Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese (100V/1h) em gel de agarose 1,5% em tampão constituído de Tris, ácido bórico e EDTA (TBE) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) contendo brometo de etídio (5µg/mL). O “DNA Ladder 100bp” (Invitrogen®) foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados. As imagens dos géis foram visualizadas mediante exposição do gel à luz UV em transiluminador (EAW-20 UltraLum®). Após a visualização, os géis foram digitalizados no Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP (Campus de Botucatu), utilizando-se o sistema de captura e análise de imagem, Image Master VDS® (Pharmacia Biotech®) para posterior realização da densitometria das bandas.

#### **4.10. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR**

Fragmentos do gene FGF-10 amplificados por RT-PCR a partir de pulmão fetal e de pool de oócitos foram seqüenciados, comprovando tratar-se do gene alvo e descartando uma eventual amplificação inespecífica de produtos com tamanhos coincidentemente iguais aos dos fragmentos esperados. A seqüência do gene bovino do FGF-10 (Nº de acesso Genbank AY183659) foi 98% idêntica a seqüência previamente publicada para ovinos (NM\_001009230). Similarmente, a identidade do fragmento amplificado do gene FGF-7 também foi confirmada pelo seqüenciamento do produto de RT-PCR, a partir de células da teca.

O seqüenciamento do FGF-10 foi realizado no Departamento de Endocrinologia Experimental do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) -

UNIFESP em São Paulo, enquanto que o seqüenciamento do FGF-7 foi realizado no Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista - UNESP (Campus de Araçatuba).

#### **4.11. Análise estatística**

Os valores relativos da expressão dos genes alvo foram transformados em logaritmos quando a variabilidade diferiu entre os grupos. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar o efeito do tamanho do folículo e da concentração de estradiol sobre a expressão gênica. A comparação das médias foi realizada por meio de contrastes ortogonais. Os dados são apresentados na forma de médias e a variabilidade na forma de erro padrão médio (EPM). Foram consideradas significativas as diferenças com valor de  $P < 0,05$ . A análise foi realizada utilizando-se o programa GraphPad InStat<sup>®</sup>, versão 3.02 (San Diego, Califórnia - USA, 1998) e o programa JMP<sup>®</sup> (SAS Institute, Cary, NC).

## 5. RESULTADOS

A expressão do RNAm do FGF-7 e FGF-10 foi detectada na grande maioria dos tecidos adultos e fetais (Figura 2), com exceção do fígado, que não expressou o RNAm do FGF-10 em nenhum dos indivíduos analisados, sendo dois indivíduos adultos e dois fetais. Sinais aparentemente mais fortes de expressão foram observados nos tecidos fetais em relação aos adultos, especialmente para o FGF-10.

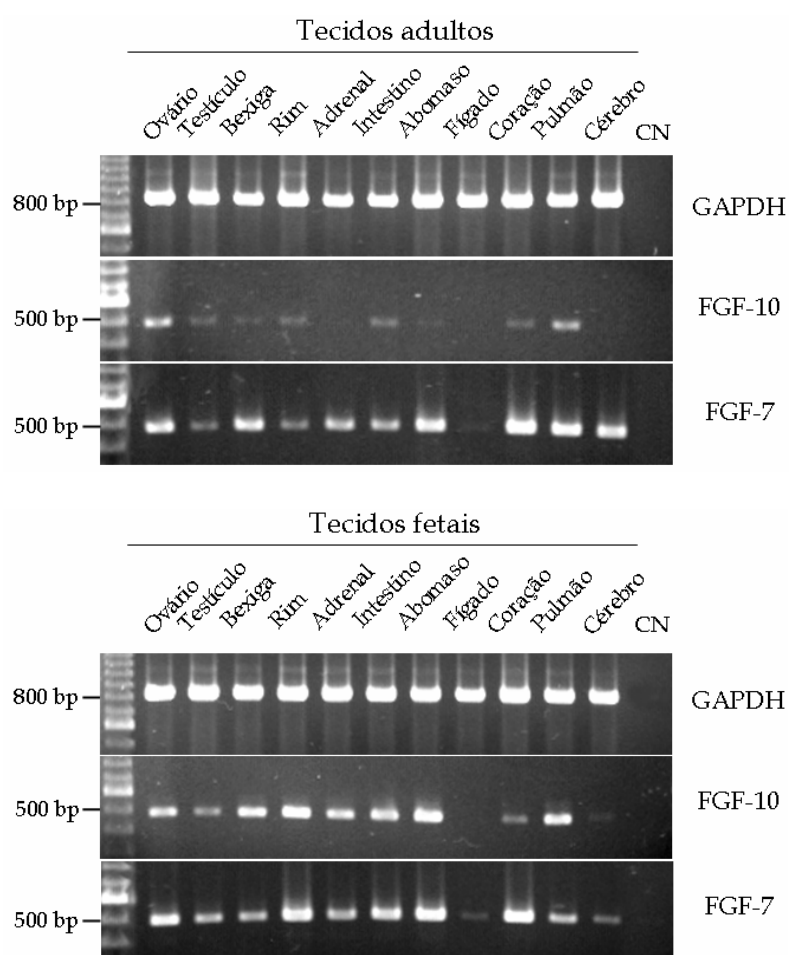


Figura 2. Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGF-7 e FGF-10 em diferentes tecidos adultos e fetais. (CN = controle negativo; bp = pares de bases).

Em oócitos, detectou-se a expressão gênica do RNAm do FGF-10 nos 10 “pools” testados. Porém, a expressão do FGF-7 não foi detectada, como demonstrado pela Figura 3:

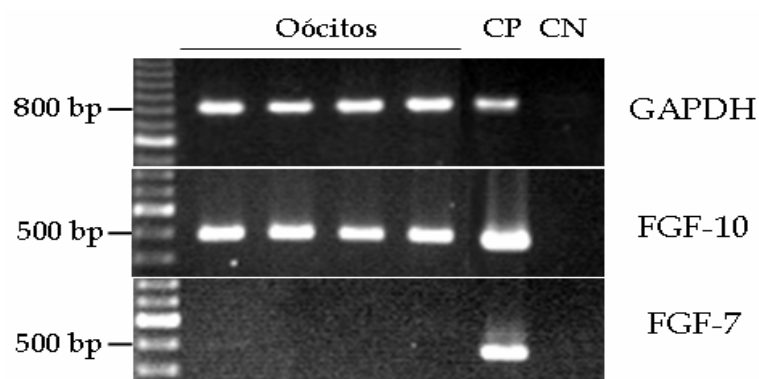


Figura 3 Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH e FGF-10 e a ausência de expressão do FGF-7 em 4 “pools” de 50 oócitos. (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases).

Dentre 21 “pools” de folículos pré-antrais testados, a expressão gênica do FGF-10 e do FGF-7 foi detectada em todos os estágios do desenvolvimento folicular pré-antral, em todas as amostras com sinal robusto para o GAPDH, conforme ilustra a Figura 4:

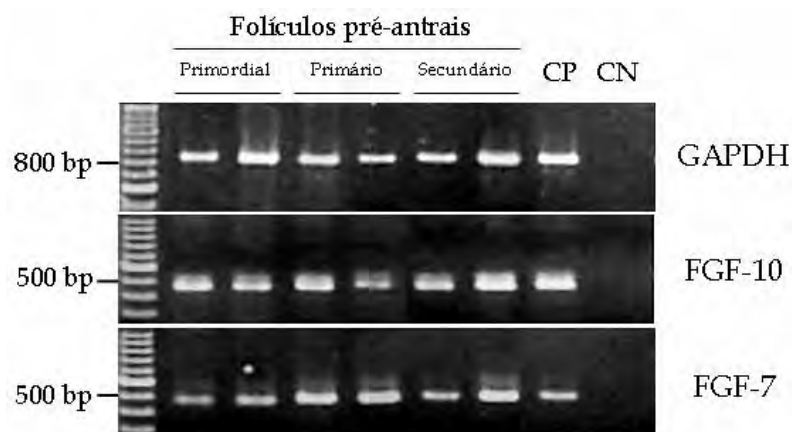


Figura 4. Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH, FGF-10 e do FGF-7 em 6 “pools” de folículos pré-antrais (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases).

Durante a fase antral do desenvolvimento folicular, a expressão gênica do FGF-10 e FGF-7 foi detectada em folículos inteiros de 2 a 4 mm de diâmetro (Figura 5a) e em células da teca (Figura 5b) de folículos maiores ou iguais a 5 mm de diâmetro, porém mostrou-se ausente nas células da granulosa destes folículos com diâmetro maior ou igual a 5 mm. (Figura 5c):

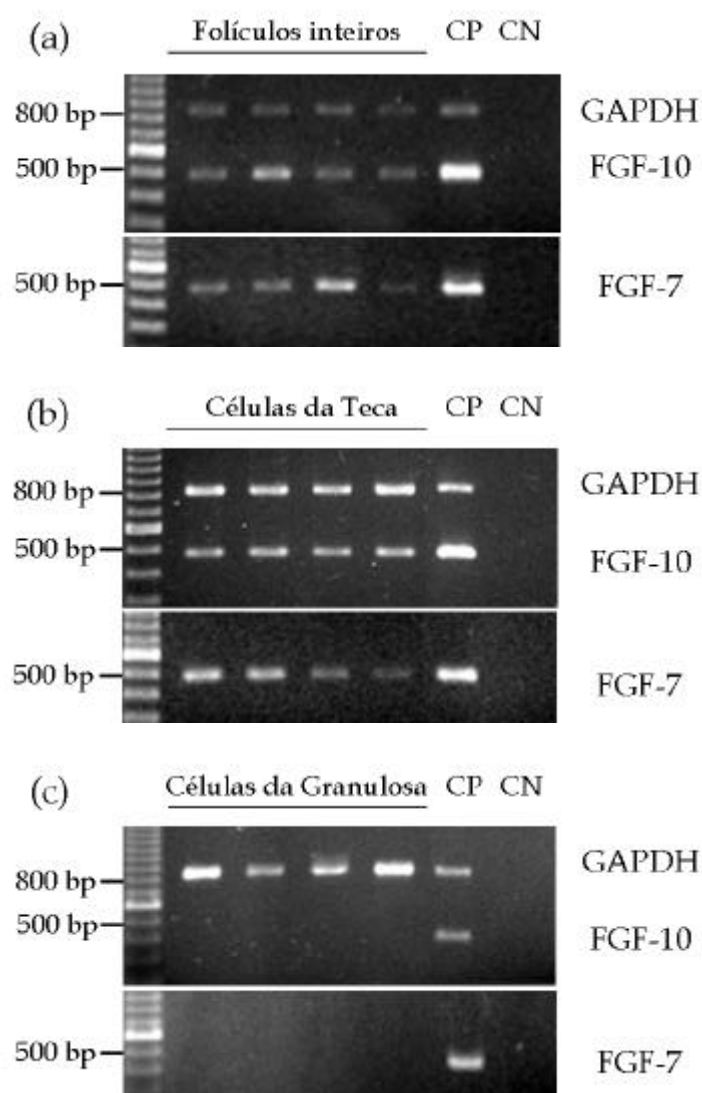


Figura 5. Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do GAPDH, FGF-10 e do FGF-7 em: (a) folículos inteiros de 2 a 4 mm de diâmetro; (b) células da teca; (c) células da granulosa (CP = pulmão fetal; CN = controle negativo; bp = pares de bases).

A expressão do FGF-10 diminuiu significativamente com o aumento da concentração intrafolicular de estradiol (Figura 6a), porém não foi afetada pela variação do diâmetro folicular (Figura 6b). A expressão do FGF-7 foi bastante variável e não foi afetada pela concentração intrafolicular de estradiol (Figura 6c), nem pela variação do diâmetro folicular (Figura 6d).

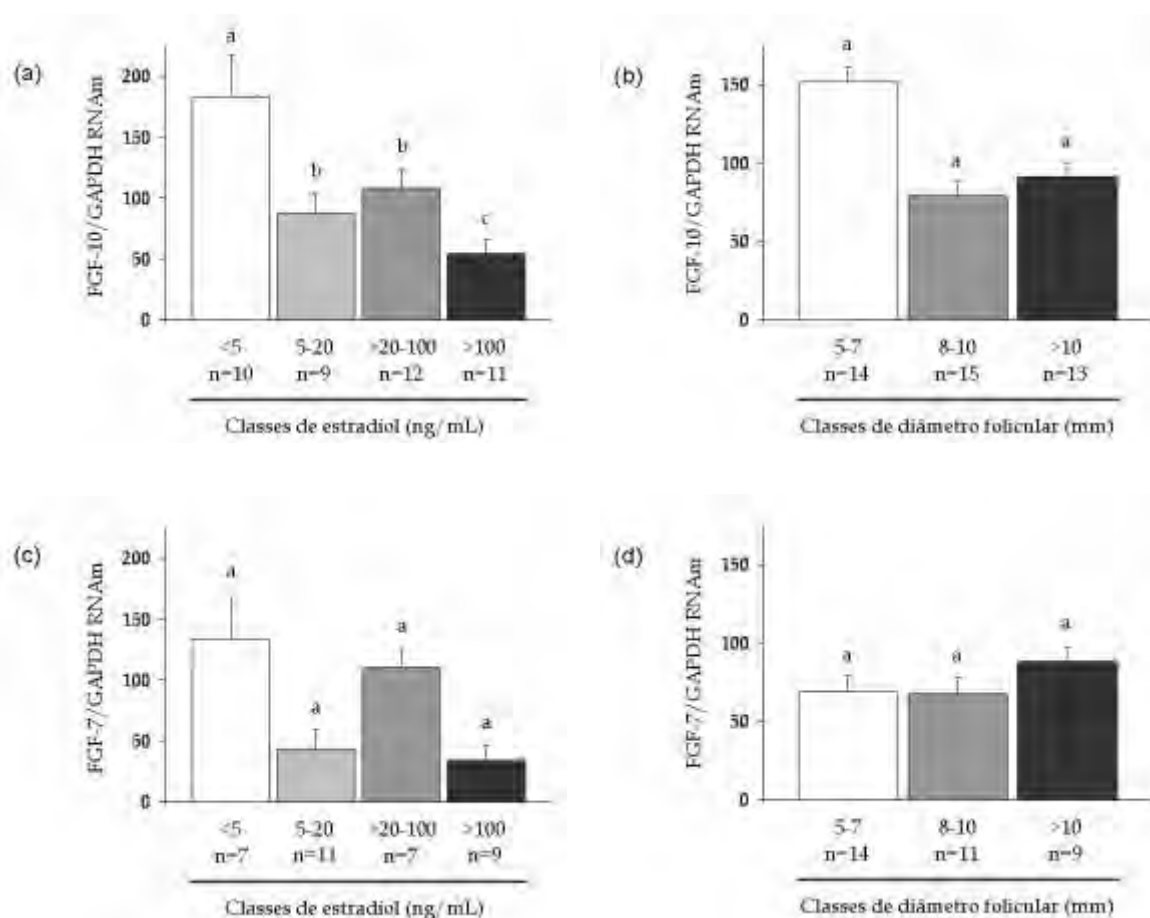


Figura 6 – Efeito da concentração intrafolicular de estradiol e do diâmetro folicular na expressão do FGF-10 (a, b) e FGF-7 (c, d) em células da teca de folículos antrais bovinos. Valores relativos de RNAm (Média ± EPM. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )).

## **6. DISCUSSÃO**

Diversos fatores de crescimento produzidos no ovário têm sido apontados como mediadores parácrinos da interação entre os diferentes tipos celulares no desenvolvimento folicular. O envolvimento de diferentes membros da família dos FGF no desenvolvimento folicular tem sido evidenciado, incluindo o FGF-2 (NILSSON et al., 2001; BERISHA et al., 2000), o FGF-7 (PARROTT & SKINNER, 1998ab; BERISHA, et al., 2004) e o FGF-8 (BURATINI et al., 2005ad). O presente trabalho apresenta diversas evidências inéditas do envolvimento do FGF-10 no controle do desenvolvimento folicular. Demonstrou-se a expressão gênica do FGF-10 nas três categorias de folículos pré-antrais, oócitos e células da teca de folículos antrais, além da regulação da sua expressão em células da teca ao longo do desenvolvimento folicular. Adicionalmente, demonstrou-se ineditamente que o RNAm do FGF-7 está expresso em folículos pré-antrais, mas não em oócitos de folículos antrais da espécie bovina. Além disso, confirmou-se a sua expressão em células da teca conforme descrito anteriormente (PARROTT & SKINNER, 1994; BERISHA et al., 2004).

A investigação do RNAm do FGF-7 e do FGF-10 demonstrou que estes fatores estão amplamente expressos em órgãos bovinos adultos e fetais, com exceção do fígado. Ensaio de proteção à ribonuclease em ratos também indicaram a ausência da expressão do FGF-10 no fígado (THOMSON et al., 1999). A expressão gênica do FGF-10 em tecidos bovinos foi aparentemente mais pronunciada nos tecidos fetais, sendo que foram observados sinais

relativamente fracos nas amostras de tecido adulto. Similarmente, em tecidos de ratos, a expressão do FGF-10 é mais evidente em tecidos fetais (OHUCHI et al., 2000), enquanto que no adulto sua expressão ocorre predominantemente no pulmão (YAMASAKI et al., 1996). Contudo, nesta espécie, o FGF-10 parece não ser tão amplamente expresso como na espécie bovina, o que evidencia a existência de diferenças espécie-específicas no padrão espaço-temporal de expressão desse fator.

Por outro lado, no presente estudo a expressão gênica do FGF-7 mostrou-se similar tanto em tecidos adultos como fetais. De fato, o FGF-7 tem um padrão de expressão mais amplo em diferentes tecidos em ratos (RUBIN et al., 1995). Os resultados do presente estudo sugerem um padrão similar de expressão para o FGF-7 nos bovinos. As diferenças aparentes quanto aos padrões de expressão do FGF-7 e do FGF-10 sugerem que estes fatores desempenham papéis diferentes, sendo que o FGF-7 atuaria tanto no desenvolvimento fetal como na vida adulta, enquanto o FGF-10 participaria especialmente na organogênese fetal nos bovinos.

Durante o desenvolvimento folicular pré-antral, o RNAm do FGF-10 e do FGF-7 mostraram-se expressos em todas as amostras de folículos primordiais, primários e secundários com sinal forte de expressão do GAPDH. Entretanto, a camada da teca, que é o principal sítio de expressão destes fatores no ovário, não está presente em folículos primordiais. As células da teca são recrutadas mais tardiamente, durante a transição para o estágio secundário do desenvolvimento pré-antral (SKINNER, 2005). KEZELE et al. (2005) relataram a presença da proteína do FGF-7 nas células somáticas adjacentes de folículos

primordiais de ratos. Sendo assim, embora a abordagem utilizada não permita localizar o sítio de expressão do FGF-7, os achados de KEZELE et al. (2005) sugerem que ela se concentre na camada de células adjacentes.

Estudos utilizando cultivo de folículos pré-antrais condizem com o envolvimento do FGF-7 no desenvolvimento folicular pré-antral, visto que esse fator estimulou a transição *in vitro* de folículos primordiais para primários, juntamente com outros fatores como o kit-ligante, FGF-2 e o BMP-4 (KEZELE et al., 2005). Além disso, o cultivo de folículos ovarianos pré-antrais desafiados com o FGF-7 indicou que ele pode atuar como um fator de diferenciação e sobrevivência, capaz de prevenir a apoptose e estimular a síntese protéica (HSUEH et al., 2000). Embora, os mecanismos de ação não tenham sido esclarecidos, esses efeitos são potencializados pela adição de FSH (HSUEH et al., 2000). De fato, BURATINI et al. (2005d) demonstraram que o FSH aumenta a expressão do FGFR-2b em células da granulosa em cultivo, o que condiz com a potencialização dos efeitos do FGF-7 pelo FSH. Não há relatos da investigação do FGFR-2b em folículos pré-antrais, porém a presença do FGF-7 nesta fase da foliculogênese sugere que ele esteja atuando através do seu receptor, regulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa.

Por outro lado, a detecção do RNAm do FGF-10 em folículos pré-antrais amplia a perspectiva de complexidade dos mecanismos de controle desta fase de desenvolvimento folicular. O FGF-10 difere do FGF-7 por sua baixa atividade mitogênica, sendo mais conhecido como um fator de diferenciação e quimiotaxia na formação do pulmão (WARE & MATTHAY, 2002). Recentemente, o FGF-10 foi descrito como um fator de sobrevivência e

conservação celular, prevenindo a quebra do DNA e, ao mesmo tempo, estimulando a regeneração do mesmo após estresse oxidativo (UPADHYAY et al., 2004). Baseando-se nestes mecanismos de atuação nos tecidos respiratórios, supõe-se que o FGF-10 esteja envolvido tanto na diferenciação das células da granulosa, como também possa atuar como um fator de sobrevivência celular.

A abordagem utilizada neste trabalho para folículos pré-antrais não permite definir se o RNAm do FGF-10 é originário dos oócitos ou das células somáticas adjacentes. Embora este estudo tenha demonstrado que as células da teca oriundas de folículos antrais constituem um sítio importante de expressão gênica do FGF-10, demonstrou-se também que oócitos de folículos antrais expressam o FGF-10. Além disso, a camada da teca não está ainda constituída em folículos primordiais. Estudos adicionais são necessários para revelar se o FGF-10 é expresso pelo oócito, pelas células somáticas adjacentes ou pelos dois tipos celulares nesta fase do desenvolvimento folicular.

A comunicação bidirecional entre o oócito e as células adjacentes desempenha um papel crucial para o adequado desenvolvimento folicular desde a formação do folículo primordial à ovulação. A expressão do FGF-10 em oócitos potencialmente o caracteriza como uma molécula de sinalização parácrina derivada do oócito. Isto é reforçado pela expressão do seu receptor FGFR-2b em células da granulosa (PARROTT et al., 1994; PARROTT & SKINNER, 1998a; BERISHA et al., 2004), embora nestes estudos tenham sido utilizadas células murais da granulosa, as quais são morfológica e

funcionalmente distintas das células da granulosa que constituem o “*cumulus*” (GILCHRIST et al., 2004). As moléculas de sinalização parácrina derivadas dos oócitos atuam na regulação da proliferação e diferenciação das células da granulosa, na expansão pré-ovulatória das células do “*cumulus*” e no desligamento do oócito de seu “*cumulus*” após a ovulação (EPPIG, 2001). A totalidade destas moléculas ainda não foi identificada, porém há indícios do envolvimento de vários fatores de crescimento, tais como o FGF-2 (VAN WEZEL et al., 1995), o GDF-9 (DONG et al., 1996), a BMP-15 (YAN et al., 2001) e o FGF-8 (VALVE et al., 1997; BURATINI, 2005a).

Sendo assim, a expressão gênica do FGF-10 em oócitos aliada à expressão do FGFR-2b (PARROTT & SKINNER, 1994; BERISHA et al., 2004) em células da granulosa sugerem que seu envolvimento na sinalização parácrina oriunda do oócito modulando a diferenciação das células do “*cumulus*”, embora a expressão do FGFR-2b ainda não tenha sido investigada no “*cumulus*”. Por outro lado, estudos funcionais testando eventuais efeitos do FGF-10 em células da granulosa murais e do “*cumulus*” seriam muito importantes para uma melhor compreensão das ações do FGF-10.

A ausência de expressão do FGF-7 por parte do oócito bovino condiz com relatos anteriores em ratos (KEZELE et al., 2005) e demonstra uma diferença importante nos padrões de expressão do FGF-7 e FGF-10, indicando que a transcrição destes genes é controlada distintamente. Este achado também reforça a hipótese de que, apesar da similaridade estrutural e de ativarem o mesmo receptor, o FGF-7 e o FGF-10 podem desempenhar funções diferentes e/ou complementares durante a foliculogênese.

No desenvolvimento folicular antral, a detecção dos RNAm do FGF-7 e FGF-10 em folículos inteiros com (2 a 4 mm de diâmetro) sugere continuidade da expressão gênica desses fatores desde a fase pré-antral, embora a identificação do tipo celular que os expressa não tenha sido realizada.

Além das evidências da mediação parácrina pelo FGF-10 entre o oócito e as células do “*cumulus*”, o presente estudo demonstra que a camada da teca, mas não a da granulosa, também é um sítio importante da expressão do FGF-10. Além disso, observou-se para o FGF-10 um grau de expressão em células da camada da teca inversamente proporcional ao conteúdo de estradiol no líquido folicular. Embora o diâmetro folicular não tenha influenciado estatisticamente a expressão gênica do FGF-10, valores numericamente superiores desta expressão em folículos de 5 a 7 mm condizem com expressão predominante no início da onda de crescimento folicular.

A maior expressão do FGF-10 coincide com o momento de crescimento dos folículos recém-recrutados, sob forte influência do FSH e baixas concentrações de estradiol (GINTHER et al., 2003). A expressão do FGFR-2b caracteriza a camada da granulosa como o alvo da sinalização pelo FGF-10, visto que o FGFR-2b é o seu receptor. Durante o período inicial do crescimento folicular antral, o FSH é responsável por estimular a proliferação das células da granulosa (RICHARDS et al., 2002). Além disso, já foi demonstrado que o FSH estimula a expressão do FGFR-2b em células da granulosa bovinas em cultivo (BURATINI et al., 2005d). Em conjunto com a expressão do FGFR-2b em células da granulosa, os dados do presente estudo sugerem que o FGF-10 atue como mediador parácrino entre as células da teca e da granulosa,

modulando a proliferação, diferenciação e/ou a sobrevivência destas células, especificamente em folículos antrais jovens.

Os mecanismos que levam à redução da expressão do FGF-10 precisam ser investigados em estudos futuros. Entretanto, a sua relação com o aumento na concentração intrafolicular de estradiol sugere que as mudanças na esteroidogênese folicular que ocorrem ao redor do desvio folicular interfiram na modulação da expressão do FGF-10. De fato, o FGF-10 já foi relatado como mediador andrógeno-dependente de interações celulares do tecido prostático (LU et al., 1999). Porém, outros estudos são necessários para melhor caracterizar a existência de uma relação entre o FGF-10 e os hormônios esteróides.

A camada da teca também mostrou-se como um sítio da expressão gênica do FGF-7. No entanto, no presente estudo, a expressão do FGF-7 não foi significativamente influenciada nem pela concentração de estradiol, nem pelo diâmetro folicular. Esses resultados corroboram os achados de BERISHA et al. (2004), os quais também não observaram variações na expressão gênica do FGF-7 em função da concentração intrafolicular de estradiol e do diâmetro folicular. Porém, um estudo anterior detectou aumento da expressão gênica do FGF-7 com o aumento do diâmetro folicular (PARROTT & SKINNER, 1998a). É difícil precisar a natureza desta discrepância, mas ela podem ser de ordem técnica, por diferenças na acurácia do RT-PCR semi-quantitativo, ou decorrente de delineamentos distintos, já que PARROTT & SKINNER (1998) realizaram a investigação em “pools” de folículos. Enquanto que, no presente estudo a análise foi realizada em folículos individualizados.

Observou-se alta variabilidade individual na expressão gênica do FGF-7 sugerindo que pode haver regulação da expressão do FGF-7 durante a foliculogênese que o delineamento do presente estudo não pôde detectar. Portanto, a hipótese de que o FGF-7 é regulado ao longo do desenvolvimento folicular, bem como os mecanismos reguladores, permanecem para ser elucidados.

No presente estudo, a expressão do FGF-7 não foi detectada em células da granulosa utilizando as condições validadas para o RT-PCR semiquantitativo, confirmando os achados de PARROTT et al. (1994), mas contrastando com os de BERISHA et al. (2004). Esta discrepância pode ser decorrente da sensibilidade do RT-PCR, uma vez que BERISHA et al. (2004) usaram 38 ciclos para detecção do RNAm do FGF-7 em células da granulosa, enquanto que no presente estudo foram utilizados 32 ciclos de PCR. Contudo, em conjunto os achados indicam que a camada da teca é o principal sítio de expressão do FGF-7 em folículos antrais.

A expressão gênica dos receptores dos FGF também é regulada ao longo do desenvolvimento folicular. A expressão do FGFR-2b em células da granulosa foi maior naqueles folículos com maiores concentrações de estradiol (BERISHA et al., 2004), e a sua expressão em células da granulosa em cultivo foi estimulada pelo FSH (BURATINI et al., 2005d). As evidências de regulação do FGFR-2b sugerem que as ações do FGF-7 possam ser moduladas pelo seu receptor. Dessa forma, o FGF-7 atuaria no desenvolvimento antral desde o recrutamento da onda folicular, mas especialmente durante o crescimento do folículo pré-ovulatório. Neste período do desenvolvimento folicular, a rápida e

intensa proliferação de células da granulosa pode estar associada, pelo menos em parte, à atividade mitogênica do FGF-7 (PARROTT & SKINNER, 1998b). Além disso, conforme sugerido por BERISHA et al. (2004), a interação FGF-7/FGFR-2b poderia estimular a neovascularização durante o crescimento folicular pré-ovulatório.

Em conjunto, os resultados deste estudo indicam a participação do FGF-10 e do FGF-7 na regulação parácrina do desenvolvimento folicular pré-antral e antral. Em folículos antrais, demonstrou-se que a sinalização via FGF-10 é originada tanto no oócito quanto em células da camada da teca. O padrão de regulação da expressão do FGF-10 sugere que suas ações são mais importantes nos estágios iniciais do crescimento folicular antral.

Diferenças nos padrões de expressão do FGF-10 e FGF-7 sugerem que estes fatores são controlados por mecanismos distintos e têm ações diferentes no controle do desenvolvimento folicular, apesar da similaridade.

## **7. CONCLUSÕES**

- A intensidade da expressão gênica do FGF-10 diminuiu com a concentração de estradiol no fluido folicular, confirmando a hipótese de regulação da expressão deste gene ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos.
- A intensidade da expressão gênica do FGF-7 não variou com a concentração de estradiol ou o diâmetro folicular, não possibilitando a detecção de um padrão claro de regulação ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos.
- O padrão da expressão gênica do FGF-10 indica sua participação como mediador parácrino, no controle da camada da granulosa a partir do oócito ou da camada da teca em folículos antrais. Além disso, os resultados indicam ação especificamente durante o crescimento antral inicial para o FGF-10 de origem tecal.
- O padrão da expressão gênica do FGFR-7 indica sua participação como mediador parácrino das ações das células da teca sobre as células da granulosa.

- O padrão de expressão gênica do FGF-10 nos diferentes tecidos adultos e fetais, sugere participação específica na organogênese fetal dos bovinos.
- O padrão de expressão gênica do FGF-7 nos diferentes tecidos adultos e fetais, reforça as diferenças no padrão espacial e temporal de expressão deste fator em relação ao FGF-10.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J.  
Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.177-88, 1992.
- AGUILAR J.J., WOODS G.L., MIRAGAYA M.H. **et al.** Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 56, p. 745-758, 2001.
- ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M.H., BENECCCHI, E., CARABATSOS, M.J.  
Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-53, 2001.
- ASAKAI, R., SONG, S., ITOH, N., YAMAKUNI, T., TAMURA, K., OKAMOTO, R.  
Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.104, p.75-80, 1994.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.C.O., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.** v. 64, p. 839-848, 2001.
- BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1903-21, 1998.

---

\* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv. Cancer Res.**, v.59, p.115-65, 1992.
- BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPANIER, R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **J. Endocrinol.**, v.167, p.371-382, 2000.
- BERISHA, B., SINOWATZ, F., SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.67, p.162-71, 2004.
- BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J., van der HURK, R., et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L., GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.
- BURATINI JR., J, GLAPINSKI, V.F., GIOMETTI, I.C., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., AVELLAR, M.C.W., BARROS, C.M., PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.70, p.255-261, 2005a.
- BURATINI JR., J., CASTILHO, A.C.S., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., PINTO, M.G.L., GIOMETTI, I.C., GLAPINSKI, V.F., NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M., PRICE, C.A. Avanços no entendimento da fisiologia do desenvolvimento follicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(Supl 1), p.s55-s68, 2005b.

- BURATINI JR., J., CASTILHO, CAO, M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Regulation of fibroblast growth factor receptor - 2b.(FGFR-2b) gene expression in cultured bovine granulosa cells. **Biol. Reprod.**, (especial issue), p. , 2005c.
- BURATINI JR., J., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., GLAPINSKI, V.F., PINTO, M.G.L., GIOMETTI, I.C., BARROS, C.M., CAO, M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v.130, p.343-350, 2005d.
- BRAUN, S., KELLER, U.A.D., STEILING, H., WERNER, S. Fibroblast growth factors in epithelial repair and cytoprotection. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.359, p.753-757, 2004.
- CALLEJAS, S.S. Fisiología del ciclo estral. In: PALMA, G. (Ed.). **Biotecnología de la reproducción**. Buenos Aires: INTA, 2001. p.37-59.
- CHEN, C., SPENCER, T.E., BAZER, F.W. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 959-966, 2000.
- CREUZET, C., LOEB, J., BARBIN, G. Fibroblast growth factors stimulate protein tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase activity in primary cultures of hippocampal neurons. **J. Neurochem.**, v.64, p.1541-7, 1995.
- CUEVAS, P., CARCELLER, F., REIMERS, D., GIMENEZ-GALLEGU, G. Fibroblast growth factor-1 inhibits medial smooth muscle cell apoptosis after balloon injury. **Neurol. Res.**, v.22, p.185-188, 2000.
- DONG, J., ALBERTINI, D.F., NISHIMORI, K., RAJENDRAKUMAR, T., LU, N., MATZUK, M.M. Growth differentiation factor- 9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.

- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.
- EMOTO, H., TAGASHIRA, S., MATTEI, M. G., YAMASAKI, M., HASHIMOTO, G., KATSUMATA, M., BIRNBAUM, D., COULIER, F., ITOH, N. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23191-23194, 1997.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. V. 122, p. 829-838, 2001.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., BECKERS, J.F. Nova biotecnologia: isolamento, caracterização e cultura de folículos ovarianos pré-antrais em bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995. v.1, p.1-11.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES, R.S., NUSGENS, B., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.
- FINDLAY, J.K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.127-39, 1994.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225-32, 1994.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.109-26, 2004.

- FORTUNE, J.E., SIROIS, J., TURZILLO, A.M., LAVOIR, M. Follicle selection in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, suppl., p.187-98, 1991.
- FORTUNE, J.E., KITO, S., BYRD, D.D. Activation of primordial follicles in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.439-448, 1999.
- GILCHRIST, R.B., RITTER, L.J., ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.431-46, 2004.
- GINTHER O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.**, v.65, p.638-47, 2001.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., DONADEU, F.X., BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci.**, v.78(3-4), p.239-57, 2003.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.
- GLAPINSKI, V.F. **Expressão gênica do fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF-8) e de seus principais receptores (FGFR-3c e FGFR-4) em folículos pré-antrais bovinos.** Botucatu, 2003. 65p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- GLISTER, C., TANNETTA, D.S., GROOME, N.P., KNIGHT, P.G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1020-8, 2001.
- GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously

- infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol. Reprod.**, v.55, p.68-74, 1996.
- GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: \_\_\_\_\_. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford: Cab International, 1994. p.30-142.
- GREENWALD, G.S., ROY, S.K. Follicular DEVELOPMENT and its control. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.629-724.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Rev. Citol.**, v.124, p.43-101, 1991.
- HSUEH, A. J. W., MCGEE, E. A., HAYASHI, M., HSU, S. Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.163, p.95-100, 2000.
- IGARASHI, M., FINCH, P.W., AARONSON, S.A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor-10 (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **J. Biol. Chem.**, v.273, p.13239-5, 1998.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl.34, p. 39-54, 1987.
- JOHNSON, D.E., WILLIAMS, L.T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Adv. Cancer Res.**, v.60, p.1-41, 1993.
- JUENGEL, J.L., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., MACNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biol. Reprod.**, v.67, p.1777-89, 2002.
- JUENGEL, J.L., BODENSTEINER, D.A., HEATH, D.A., HUDSON, N.L., MOELLER, C.L., SMITH, P., GALLOWAY, S.M., DAVIS, G.H., SAWYER, H.R., MACNATTY,

- K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82, p.447-460, 2004.
- KATOH, Y., KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification of FGF-25. **Int. J. Mol. Med.** V.16(4), p.767-770, 2005.
- KEZELE, P., NILSSON, E.E., SKINNER, M.K. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. **Biol Reprod.**, v.73(5), p.967-73, 2005.
- KIM, I., MOON, S., YU, K., KIM, U., KOH, G.Y. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1518, p.152-6, 2001.
- KOJI, T., CHEDID, M., RUBIN, J.S., SLAYDEN, O.D., CSAKY, K.G., AARONSON, S.A., BRENNER, R.M. Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: keratinocyte as a progestomedin. **J. Cell. Biol.**, v.125, p.393-401, 1994.
- LAVRANOS, T.C., RODGERS, H.F., BERTONCELLO, I., RODGERS, R.J. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. **Exp. Cell. Res.**, v.211, p.245-251, 1994.
- LU, W., LUO, Y., KAN, M., MCKEEHAN, W. L. Fibroblast growth factor-10: A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 10222-10230, 1999.
- MATZUK, M.M., BURNS, K.H., VIVEIROS, M.M., EPPIG, J.J. Intercellular communications in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, p. 2178-80, 2002.

- MAZERBOURG, S., OVERGAARD, M.T., OXVIG, C., CHRISTIANSEN, M., CONOVER, C.A., LAURENDEAU, I., VIDAUD, M., TOSSER-KLOPP, G., ZAPF, J., MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, v.142, p.5243-53, 2001.
- MCGEE, E. A., CHUN, S. Y., LAI, S., HE, Y., HSUEH, A. J. W. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth and differentiation of preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 732-738, 1999.
- MCNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., QUIRKE, L., O'CONNELL, A., SMITH, P., GROOME, N., TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, suppl., p.3-16, 1999.
- MIHM, M., BLEACH, E.C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78(3-4), p.217-37, 2003.
- MIHM, M., CROWE, M.A., KNIGHT, P.G., AUSTIN, E.J. Follicle Wave Growth in Cattle. **Reprod. Domestic Anim.**, v.37, p.191–200, 2002.
- MONNIAUX, D., HUET, C., BESNARD, N., CLÉMENT, F., BOSC, M., PISSELET, C., MONGET, P., MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.51, suppl., p.3-23, 1997a.
- MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v.47, p.3-12, 1997b.
- NILSSON, E., PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.175, p.123-30, 2001.

- NILSSON, E., SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 8, p. s17-s20, 2001.
- OHUCHI, H., HORI, Y., YAMASAKI, M., HARADA, H., SEKINE, K., KATO, S., ITOH, N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 277, p. 643-649, 2000.
- ORNITZ, D.M., XU, ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome biology**, v.2(3), p.3005.1-12, 2001.
- ORNITZ, D.M., XU, J., COLVIN, J.S., McEWEN, D.G., MACARTHUR, G.A., COULIER, F., GAO, G., GOLDFARB, M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.15292-7, 1996.
- OTSUKA, F., YAO, Z., LEE, T., YAMAMOTO, S., ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein – 15: identification of target cells and biological functions. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.39523-8, 2000.
- PACKER, A.I., HSU, Y.C., BESMER, P., BACHVAROVA, R.F. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. **Dev. Biol.**, v.161, p.194-205, 1994.
- PARROTT, J.A., VIGNE, J.L., CHU, B.Z., SKINNER, M.K. Mesenchyma-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their actions on granulosa cells. **Endocrinology**, v.135, p.569-75, 1994.
- PARROTT, J.A., MOSHER, R., KIM, G. 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, p.2532-2539, 2000.

- PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v.139, p.228-35, 1998a.
- PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor and kit-ligand during ovarian follicular development. **Endocrinology**, v.139, p.2240-2245, 1998b.
- PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, p.4262-71, 1999.
- RICHARDS, J.S., RUSSELL, D.L., OCHSNER, S., HSIEH, M., DOYLE, K.H., FALENDER, A.E., LO, Y.K., SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Prog Horm Res.**; v.57, p.195-220, 2002.
- RIVERA, G.M., CHANDRASEKHER, Y.A., EVANS, A.C., GIUDICE, L.C., FORTUNE, J.E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.102-11, 2001.
- RUBIN, J.S., BOTTARO, D.P., CHEDID, M., MIKI, T., RON, D., CHEON, H.G., TAYLOR, W.G., FORTNEY, E., SAKATA, H., FINCH, P.W., LAROCHELLE, W.J. Keratinocyte growth factor. **Cell Biol. Int.**, v.19, p.399-411, 1995.
- SALLI, U., BARTOL, F. F., WILEY, A. A., TARLETON, B. J., BRADEN, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.77-83, 1998.

- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3v.
- SHIMASAKI, S., MOORE, R.K., ERICKSON, G.F., OTSUKA, F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. **Reproduction**, v. 61, p. 323-337, 2003.
- SILVA, J.M., PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. **J. Endocrinol.**, v.174, p.499-507, 2002.
- SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum. Reprod. Upd.**, v.11(5), p.461-471, 2005.
- SLEEMAN, M., FRASER, J., McDONALD, M., YUAN, S., WHITE, D., GRANDISON, P., KUMBLE, K., WATSON, J.D., MURISON, J.G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. **Gene**, v.271, p.171-82, 2001.
- SOUZA, C. J., CAMPBELL, B.K., McNEILLY, A.S., BAIRD, D.T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. **Reproduction**, v.123, p.363-369, 2002.
- SPICER, L.J., ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.12, p.223-45, 1995.
- TAYLOR, K.M., CHEN, C., GRAY, C.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Expression of messenger ribonucleic acids for fibroblast growth factors 7 and 10, and insulin-like growth factors and their receptors in the neonatal ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1236-46, 2001.

- TEIXEIRA, A.B. **Regulação da expressão dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos 3c e 4 (FGFR-3c e FGFR-4) em folículos antrais bovinos**. Botucatu, 2004. 85f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- THOMSON, A.A., CUNHA, G.R. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. **Development.**, v.126(16), p.3693-701, 1999.
- UPADHYAY, D., BUNDESMANN, M., VIJAYALAKSHMI, P., CORREA-MEYER, E., KAMP, W. Fibroblast growth factor-10 attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced alveolar epithelial cell DNA damage. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.31, p. 107-113, 2004.
- VALVE, E., PENTTILÄ, T., PARANKO, J., HÄRKÖNEN, P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.232, p.173-7, 1997.
- VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.
- VAN DEN HURK, R. ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- VAN WEZEL, I.L., UMAPATHYSIVAM, K., TILLEY, W.D., RODGERS, R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.115, p.133-40, 1995.
- VERNON, R.K., SPICER, L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

- VITT, U. A., HAYASHI, M., KLEIN, C., HSUEH, A.J.W. Growth differentiation factor – 9 stimulates proliferation but suppresses the follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 370-377, 2000a
- VITT, U. A., MCGEE, E.A., HAYASHI, M., HSUEH, A.J.W. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 3814-3820, 2000b
- WANDJI, S.A., PELLETIER, G., SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of <sup>125</sup>I-labeled basic fibroblast growth factor and <sup>125</sup>I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v.47, p.807-13, 1992.
- WARE, L., MATTHAY, M.A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v.282, p. 924-940, 2002.
- WEBB, R., NICHOLAS, B., GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., GUTIERREZ, C.G., GARVERICK, H.A., ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction**, v.61, suppl., p.71-90, 2003.
- 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. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 15918-15921, 1996.
- YAN, G., FUKABORI, Y., NIKOLAROPOULOS, S., WANG, F., MCKEEHAN, W.L. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate on estromal-to-epithelial-cell andromedin. **Mol. Endocrinol.**, v.6, p.2123-2128, 1992.