

Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) e seu papel na fisiologia folicular ovariana

Structural Characterization of the Fibroblast Growth Factor-10 (FGF-10) and its Role in Ovarian Follicular Physiology

Roberta Nogueira Chaves¹, Isadora Machado Teixeira Lima¹, Ana Beatriz Graça Duarte¹, José Buratini Jr.² & José Ricardo de Figueiredo¹

ABSTRACT

Background: Interest in folliculogenesis has grown extensively in recent years. Nevertheless, several aspects of follicular activity are still poorly understood. Thus, *in vitro* culture of ovarian follicles using new substances has been established as a very viable model, enhancing the prospects for a better understanding of follicular activity. Among the family members of the fibroblast growth factor (FGFs), FGF-10 has received recent attention for its ability to regulate the development of ovarian follicles and oocyte maturation. Given the relevance of FGF-10 in the folliculogenesis process, this review aimed to describe the structural features, expression and the main biological effects of FGF-10 on the development of ovarian follicles in mammals.

Review: Along this work, it was shown aspects related to structural characterization of FGF-10 and its receptors, as well as FGF-10 expression in different cell types, emphasizing its importance to follicular development. FGF-10 is a paracrine member of the family of FGFs, and is characterized by promoting biological responses via cell surface receptors (FGFRs) of tyrosine kinase-type. Of these receptors, FGFR-1, FGFR-2 and FGFR-3 may undergo alternative transcriptional arrangements, enabling the formation of two isoforms (b and c) that have varying degrees of affinity for the various FGFs. Thus, seven FGFR proteins (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c and 4) with different binding specificities are generated from the four FGFR genes. The FGFRs transmit intracellular signals after binding with the ligand through the phosphorylation of tyrosine, which activates various transduction patterns in the cytoplasm. The signal transduction of FGF-10 may occur through three main pathways: protein of rat sarcoma (Ras)/MAPK, PLC γ /Ca²⁺ and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), which are involved in the transmission of biological signals, leading to cellular proliferation and differentiation. FGF-10 mRNA expression was detected in the ovarian stroma, oocyte and theca cells of preantral and antral follicles. On the other hand, the expression of mRNA for FGF-10 receptors was found in, granulosa cells, theca cells, cumulus cells and oocytes. Although FGFs are widely distributed in different tissues and cell types, the importance and function of FGFs in the ovary are still poorly documented. FGF-10 has been shown to be an important mediator of mesenchymal and epithelial cell interactions during follicle development, promoting follicular survival, activation and growth. Besides the action on folliculogenesis, FGF-10 was recently identified as a growth factor able to improve oocyte competence. However, in antral follicles, the presence of FGF-10 is associated with increased follicular atresia, which matches its anti-estrogenic action.

Discussion: From this review, we can conclude that FGF-10 is an important regulator of female reproduction. This growth factor acts in follicle survival, oocyte maturation, expansion of cumulus cells and proliferation of granulosa/theca cell-through direct and/or indirect actions in the control of folliculogenesis. Furthermore, FGF-10 seemed to have different effects throughout the follicular development. However, it is necessary to perform additional studies that may provide a better understanding about the importance of FGF-10 during folliculogenesis.

Keywords: FGF-10, follicles, ovary, signal transduction.

Descritores: FGF-10, folículos, ovário, transdução de sinal.

I. INTRODUÇÃO

II. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES

III. TRANSDUÇÃO DO SINAL DO FGF-10 NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE

3.1 VIA RAS/MAPK

3.2 VIA PLC γ /CA²⁺

3.3 VIA PI3K/AKT

IV. EXPRESSÃO DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO

V. PAPEL DO FGF-10 NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

VI. CONCLUSÃO

VII. REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

O interesse sobre a foliculogênese tem crescido amplamente nos últimos anos. Apesar disso, vários aspectos relativos à atividade folicular permanecem ainda pouco esclarecidos. Na pesquisa fundamental, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos se estabelece como um modelo bastante viável, ampliando enormemente as perspectivas de uma melhor compreensão da fisiologia folicular. Visando o adequado desenvolvimento folicular *in vitro*, novas substâncias têm sido testadas, permitindo um melhor esclarecimento sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento e crescimento folicular.

Dentre os vários fatores de crescimento envolvidos no controle do desenvolvimento folicular, incluem-se os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Os FGFs constituem uma grande família de fatores de crescimento (22 membros), cuja função envolve o estímulo a diversos processos celulares incluindo a quimiotaxia, a migração, a diferenciação, crescimento e sobrevivência celular e a angiogênese [37,55]. A característica comum a todos os FGFs é que eles são estruturalmente relacionados e geralmente induzem suas respostas biológicas se ligando e ativando receptores de alta afinidade para FGFs (FGFRs) [13].

Dentre os membros da família FGF, o fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) tem recebido recente atenção por sua habilidade em regular o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais e a maturação oocitária [16,22,72]. Tendo em vista a relevância do FGF-10 no processo de foliculogênese, aliada à limitada quantidade de informações disponíveis sobre a atuação deste fator em células foliculares,

a presente revisão tem como objetivo descrever a caracterização estrutural e a localização do FGF-10 e seus receptores no ovário, bem como os principais efeitos biológicos do FGF-10 sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos em mamíferos.

II. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES

Descrito como uma proteína (26 kDa) composta por 215 aminoácidos e expressa em embriões e no pulmão de ratos adultos, o FGF-10, também conhecido como fator de crescimento queratinócito-2 (KGF-2), foi o décimo peptídeo da família dos FGFs a ser identificado [71]. O FGF-10 é um membro do tipo parácrino da família dos FGFs, o qual se caracteriza por promover respostas biológicas sempre via receptores de superfície celular (FGFRs) [36].

Em humanos e camundongos, quatro genes de *Fgfr* (FGFR -1 a -4) já foram identificados [5,34,69]. Os FGFR-1 a 4 correspondem a receptores do tipo tirosina-quinase (aproximadamente 800 aminoácidos) localizados na membrana plasmática. Destes receptores, os FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 podem sofrer arranjos transcricionais alternativos (*alternative splicing*), possibilitando a formação de duas isoformas (b e c) que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (Figura 1) [34,56]. Assim, sete proteínas de FGFRs (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c e 4) com diferentes especificidades de ligação são geradas a partir dos quatro genes para *Fgfr* [36]. O FGFR-5, descoberto mais recentemente, apresenta dois transcritos alternativos: FGFR-5 γ e β [40, 65]. Este receptor não apresenta o domínio tirosina-quinase intracelular como os outros FGFRs [65], mas há relatos de ligação ao FGF-2 por conservar resíduos de domínios extracelulares importantes para o acoplamento com os ligantes dos FGFs. Sua função biológica não está plenamente esclarecida, embora estudos postulem o papel deste receptor no sequestro e modulação da sinalização dos FGFs [68].

Estruturalmente, os FGFRs (exceto o FGFR-5) são caracterizados por uma porção extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs. A porção extracelular, por sua vez, está dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (domínios *Ig-like*): D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. Entre os domínios D1 e D2 há

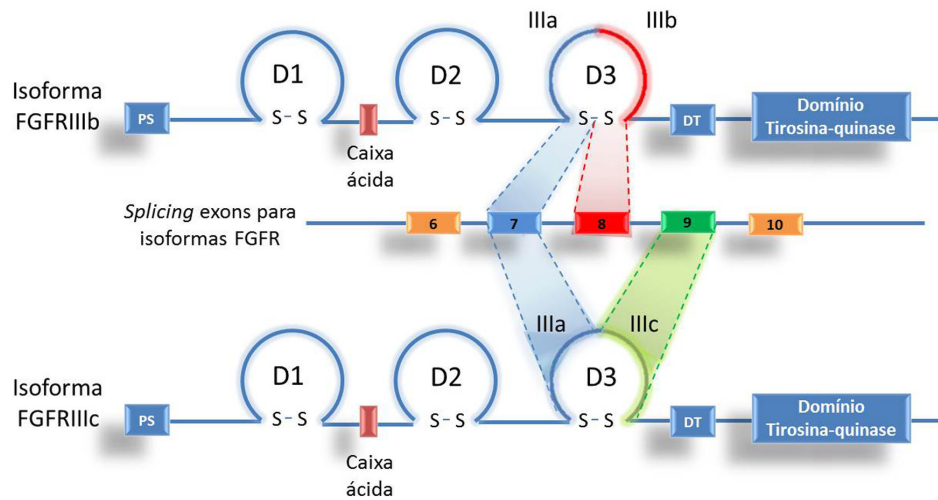


Figura 1. Estrutura do FGFR e isoformas (IIIb e IIIc) geradas por splicing alternativo dos transcritos do FGFR. A estrutura dos FGFRs é ilustrada e inclui um peptídeo sinal (PS), três domínios Ig (D1-D3), uma caixa ácida, domínio transmembranar (DT) e um domínio tirosina quinase. As duas formas são geradas por splicing alternativos dos exons 8 e 9. A porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 8 para gerar a isoforma FGFR IIIb, enquanto a porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 9 para gerar a isoforma FGFRIIIc. Adaptado de Cotton *et al.* [44].

uma região de 4-8 aminoácidos ácidos, denominada caixa ácida (a única característica comum dos receptores FGF com importância na função do receptor) [25,73]. Além disso, existe uma região carregada positivamente em D2, a qual funciona como sítio de ligação à heparina [64]. Após o domínio D3 encontra-se a região transmembranar. É no domínio D3 que o *splicing* alternativo dos genes FGFR-1, 2 e 3 gera as duas isoformas funcionais dos tipos b e c (FGFRIIIb

e FGFRIIIc) citadas previamente [25]. No lado intracelular há dois domínios de proteína tirosina-quinase que contêm ao todo 7 resíduos de tirosina que podem ser fosforilados (Figura 2) [50].

As proteínas FGFs apresentam uma similaridade superior a 90% em termos de sequência de aminoácidos idênticos [55]. Baseado na similaridade estrutural entre os FGFs e por análises filogenéticas dos genes da família FGF, em humanos e ratos, foi

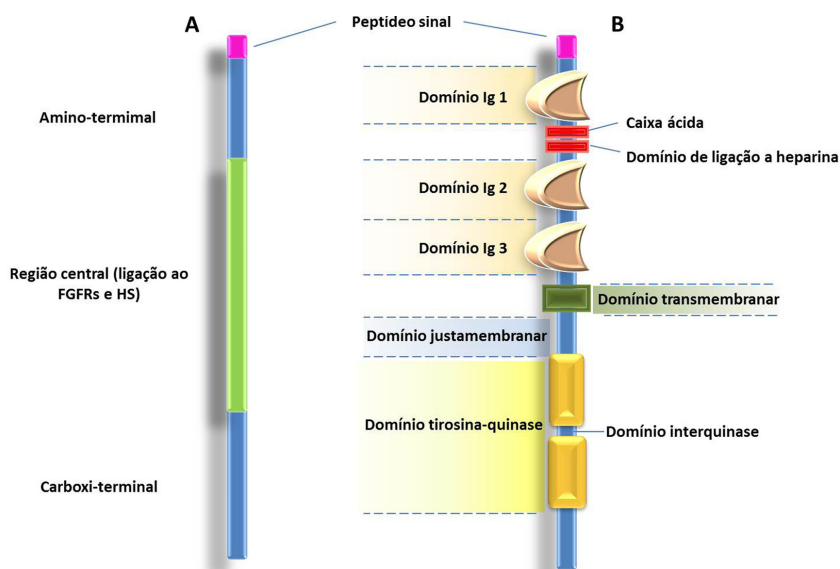


Figura 2. Estrutura esquemática do FGF-10 e FGFR. A: Estrutura da proteína FGF-10 contendo uma sequência sinal e uma região conservada que contém sítios de ligação ao receptor e aos proteoglicanos heparan sulfato (HS). B: Principais características estruturais dos FGFRs incluindo domínio Ig (1, 2, 3), caixa ácida, domínio de ligação a heparina, domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase.

demonstrado que essa família de peptídeos encontra-se dividida em sete subfamílias: FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, iFGF e hFGF [35]. O FGF-10 está agrupado com o FGF-3, FGF-7 e FGF-22 [36]. Desta forma, o FGF-10 é bastante semelhante ao FGF-7 (ou KGF), tanto no que se refere à estrutura e sequência do gene, quanto às propriedades funcionais. Ambos apresentam alta afinidade pelo FGFR2b (ou KGFR), o qual é altamente expresso no epitélio pulmonar de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento [33,53,58]. Esta similaridade sugere que o FGF-7 e o FGF-10 atuam de forma sinérgica [33]. Contudo, o FGF-10 não atua somente via ativação do FGFR2b, mas também por intermédio do FGFR1b, que se mostrou capaz de ativar a via da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK) em implantes de pele e cérebro de ratos após tratamento com FGF-10 [6,34].

A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com a heparina ou proteoglicanos heparan sulfato (HS), os quais conferem maior estabilidade à ligação e dimerização dos FGFRs [28]. A heparina é um polímero de dissacarídeo que contém três grupos sulfato conferindo-lhe carga negativa, enquanto os proteoglicanos HS, que são estruturalmente relacionadas à heparina, contêm um resíduo não totalmente sulfatado, resultando em uma menor carga negativa à molécula [61]. Desta forma, a sinalização do FGF-10 é regulada em parte por sua afinidade com a matriz extracelular por meio dos proteoglicanos heparan sulfato ou heparina [39] e em parte pela dimerização de alguns FGFs [32]. A transdução do sinal é feita pela ativação do FGFR, após ligação do FGF-10 a este, por diversas vias citoplasmáticas [69].

III. TRANSDUÇÃO DO SINAL DO FGF-10 NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE

Os FGFRs, como os demais receptores do tipo tirosina-quinase, transmitem sinais intracelulares após união com o ligante através da fosforilação da tirosina, o que gera vários padrões de transdução sinalizados citoplasmaticamente [65]. O FGF-10 se liga ao seu receptor entre os domínios D2 e D3, formando um complexo ternário estável (FGF-FGFR-HS/heparina). A ligação do FGF-10 causa a dimerização do receptor e estimula a ativação da tirosina-quinase levando a uma autofosforilação do domínio intracelular [48]. A autofosforilação da proteína tirosina controla a atividade do receptor, mas também serve como um mecanismo para montagem e recrutamento de complexos de si-

nalização [64]. Essas tirosinas fosforiladas funcionam como sítios de ligação para proteínas tirosina-quinase citoplasmáticas (Src), as quais possuem fosfolipase C- (PLC γ), com uma atividade catalítica intrínseca [26]. A transdução de sinal do FGF-10 pode ocorrer através de três vias principais: proteína do sarcoma de ratos (Ras)/MAPK, PLC γ /Ca²⁺ e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt) (Figura 3) [13].

Via Ras/ MAPK

A via mais comumente empregada pelos FGFs é a via MAPK. Essa via envolve o acoplamento de lipídios ancorados a uma proteína intracelular, FRS2, que tem uma relação de grande afinidade com o FGFR1 [54]. Vários grupos têm demonstrado a importância da FRS2 na transdução do sinal mediado por FGFR1 durante o desenvolvimento embrionário [1,30,42]. Após a ativação do FGFR, ocorre a fosforilação da FRS2 pela atividade dos domínios de tirosina-quinase. Fosforilada, esta proteína atuará como recrutadora citoplasmática de um complexo multiproteico que ativa e controla a via de sinalização Ras/MAPK e a via PI3K/Akt [13].

Os sítios FRS2 de fosforilação da tirosina são reconhecidos e ligados pela proteína adaptadora Grb2 e a proteína tirosina fosfatase (PTP) Shp2 [31]. A Grb2 forma um complexo com o nucleotídeo guanina modificando o fator de troca do nucleotídeo guanina *Son of sevenless* (SOS), através do seu domínio SH3. A translocação deste complexo para a membrana plasmática, através da ligação a FRS2 fosforilada, permite que o SOS ative o gene Ras através da mudança da guanosina trifosfato (GTP) devido à sua proximidade com a membrana. Uma vez no estado GTP ativada, a proteína Ras interage com várias proteínas efetoras, incluindo Raf (quinase específica para Ser/Thr), levando à ativação da cascata de sinalização MAPK. No núcleo, esta cascata leva à fosforilação de fatores de transcrição específicos, tais como *c-myc*, API1, e os membros da família de fatores de transcrição Etscom influência na regulação gênica [44]. A via de ativação da proteína Ras é crucial para a proliferação e diferenciação celular induzida pelo FGF-10 [12].

Via PLC γ /Ca²⁺

Em alguns receptores do tipo tirosina-quinase, a dimerização envolve alterações conformacionais nos domínios intracelulares [10], o que contribui para a ativação da quinase. No FGFR1, dos cinco resíduos

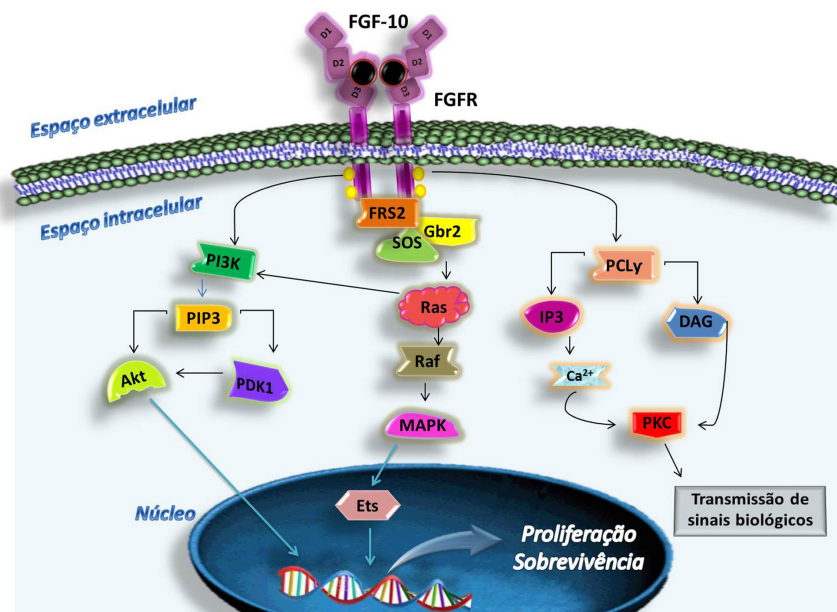


Figura 3. Esquema do FGFR e suas vias de sinalização. Formação do complexo FGF-FGFR-heparina/HS leva à autofosforilação do receptor e à ativação de cascatas de sinalização intracelular das vias Ras/MAPK, PI3K/Akt (esquerda) e PLC γ /Ca $^{2+}$ /PKC (direita). Os receptores EphA induzem a fosforilação da tirosina dos FGFRs e FRS2 através da formação de um complexo com o FGFR. A cascata de sinalização Ras/MAPK é ativada pela ligação da Grb2 ao FRS2 fosforilado. A subsequente formação do complexo Grb2/SOS resulta na ativação da Ras. Existem duas rotas pelas quais os FGFRs são capazes de ativar a via PI3K/Akt: a PI3K pode se ligar diretamente ao resíduo de tirosina fosforilada do FGFR; ou a Ras ativada pode induzir a ativação da subunidade catalítica PI3K. A via PLC γ /Ca $^{2+}$ é ativada quando a autofosforilação de um resíduo de tirosina na extremidade carboxi-terminal do FGFR cria um sítio de ligação específico para o domínio SH2 da PLC. Os últimos componentes ativados das cascatas de transdução de sinais mencionadas acima se translocam para o núcleo e fosforilam os fatores de transcrição específicos da família Ets, os quais, por sua vez, ativam a expressão de genes-alvo dos FGFs.

de tirosina localizados na região citoplasmática do receptor, Y776 não é fosforilado, enquanto Y463, Y583, Y585 e Y766 são sítios potencialmente fosforiláveis [49].

A via PLC γ /Ca $^{2+}$ envolve a ligação da fosfolipase C- γ (PLC γ) com a tirosina Y766 não fosforilada de FGFR1 [59]. Após a ativação, a PLC γ hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-difosfato para formar dois segundos mensageiros, inositol-3 fosfato (IP3) e diacilglicerol-fosfato (DAG). O diacilglicerol é um ativador da proteína quinase C (PKC), enquanto que o inositol-3 fosfato estimula a liberação de cálcio intracelular. Essa cascata tem sido implicada na entrada das células na fase S do ciclo celular [13]. A ativação da PLC γ tem um papel importante na transmissão de sinais biológicos dos diversos FGFs.

Via PI3K/Akt

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é um padrão de sinalização fundamental para a regulação da

proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular, além de ter um importante papel na regulação da ativação de folículos primordiais [17,38]. A proteína quinase B (Akt), por sua vez, é uma molécula sinalizadora conhecida por aumentar a proliferação e a sobrevivência celular, bem como a síntese de glicogênio e proteína [11]. A via PI3K/Akt pode ser ativada por três mecanismos após ativação do FGFR, e os fosfolipídios assim gerados regulam, direta ou indiretamente, a atividade das proteínas-alvo, tais como o Akt[13].

A enzima PI3K é uma quinase de lipídio altamente conservada que fosforila o grupamento 3-hidroxila do anel inositol para gerar lipídios PtdIns (3,4,5)P $_3$. Os lipídios formados servem como sítio de ancoragem para proteínas intracelulares, permitindo sua interação em complexos sinalizadores que transmitem sinais da membrana plasmática para o citosol [70]. O protótipo dessas moléculas é a Akt. Tal proteína tem um domínio PH que a direciona para a membrana

plasmática quando a PI3K é ativada. Essa reação leva à ativação de várias vias de sinalização intracelulares que regulam funções celulares diversas como crescimento, sobrevivência e proliferação celular [24].

IV. EXPRESSÃO DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO

Os FGFs são expressos no ovário e estão envolvidos em diferentes eventos fisiológicos locais, incluindo a ativação de folículos primordiais [52], o crescimento inicial do oócito [23] e a seleção de folículos dominantes [7]. Especificamente em relação ao FGF-10, estudos detectaram a expressão do seu RNAm nas células da teca e no estroma ovariano em humanos [67]. Já em bovinos foi verificada a presença do RNAm para este fator de crescimento em oócitos e células da teca de folículos antrais e células luteais, bem como em folículos primordiais, primários e secundários [16,19]. Além disso, observou-se que a expressão do FGF-10 nas células da teca pode variar de acordo com a viabilidade folicular, diminuindo com o crescimento e aumento da capacidade esteroidogênica [16]. A expressão do FGF-10 em células da granulosa também foi confirmada pela localização da sua proteína nesse compartimento, embora o RNAm não tenha sido localizado. Essa discrepância pode ser explicada pela internalização do FGF-10 após ligação ao seu receptor, que é expresso nas células da granulosa [16].

Segundo Buratini *et al.* [16], os níveis de RNAm para FGF-10 nas células da teca diminuem conforme aumentam as concentrações intrafoliculares de estradiol, indicando uma regulação deste fator durante a foliculogênese. Tal fato associado à observação de que o FSH estimula a expressão do principal receptor do FGF-10 (FGFR2b) em células da granulosa sugere que o FGF-10 de origem tecal regula as células da granulosa de folículos antrais, denotando uma atuação parácrina desse fator [15]. Berisha *et al.* [9] identificaram o receptor FGFR2b nas células da granulosa e teca interna de folículos antrais bovinos, sendo sua expressão nas células da granulosa diretamente correlacionada com os níveis de estradiol no fluido folicular. Entretanto, em um estudo posterior desta mesma equipe, a expressão do receptor FGFR2b não demonstrou sofrer regulação pelo pico ovulatório de LH [8]. Um estudo recente em bovinos revelou que os transcritos para cada um dos quatro genes de receptores para FGFs estão presentes nas células do cumulus e oócitos [72]. Usando *primers* específicos para amplificar

as variantes FGFR1 e R2 [29], os transcritos de R1b e R2b foram detectados em ambos os tecidos e pareceu que o RNAm para R1b foi o receptor predominante nas células da granulosa, enquanto o receptor R2b foi mais prevalente em oócitos [72]. De acordo com Cho *et al.* [23], as células do cumulus também expressam o receptor FGFR2b e a ativação deste pelo FGF-7 promove o crescimento inicial de oócitos bovinos. Apesar da similaridade entre os fatores, estudos indicam a ocorrência de alta expressão do RNAm para FGF-10 associada a uma ausência do FGF-7 em oócitos desta mesma espécie [14].

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FGF-10 em cultivo de células da granulosa bovinas promove uma diminuição dose-dependente da produção de estradiol e da expressão de receptores tipo 2 de angiotensina II [16,60]. Aliado a isto, Buratini *et al.* [16] sugerem um modelo no qual o FGF-10, na fase antral inicial, atuaria como um estimulante da proliferação e inibidor da diferenciação celular. À medida que ocorre o desenvolvimento folicular, a diminuição progressiva na expressão do gene do FGF-10 nas células da teca possibilitaria a diferenciação celular e o aumento na síntese de estradiol. De fato, tem sido demonstrado que folículos subordinados expressam mais FGF-10 em comparação aos folículos dominantes que se mantêm em crescimento [18].

V. PAPEL DO FGF-10 NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Embora os FGFs estejam amplamente distribuídos em diferentes tecidos e tipos celulares, a importância e a função dos FGFs no ovário ainda são pouco documentadas. Dentro do ovário, o membro mais estudado da família dos FGFs é o FGF-2 ou FGF básico (bFGF), o qual tem sido identificado como potencial regulador da função ovariana [3,63]. Sua produção tem sido demonstrada em células da granulosa de bovinos [51] e seu papel tem sido observado na estimulação da proliferação de células da teca bovinas [66] bem como na ativação de folículos primordiais de ratas [27] e cabras [46]. Contudo, conforme discutido previamente, a família FGF é composta de 22 membros que ativam 7 receptores diferentes [34], o que sugere a participação de outros FGFs no controle da foliculogênese. Dentre os membros conhecidos da família FGF, o FGF-10 possui a maior sequência de similaridades ao FGF-7 (KGF), o que leva a crer que o FGF-10 tem propriedades de ligação ao receptor

do KGF de forma similar ao KGF, mas são regulados de forma diferente pela matriz extracelular [33]. De fato, Ohuchi *et al.* [53] verificaram que o FGF-10 atua como maior ligante do receptor FGFR2b e atua no desenvolvimento de vários órgãos. Assim, alguns estudos sobre o efeito do FGF-10 na função ovariana têm sido realizados no intuito de relatar a função do FGF-10 no desenvolvimento folicular.

Buratini *et al.* [16] descreveram pela primeira vez a expressão do FGF-10, por imunohistoquímica, em oócitos de folículos pré-antrais e antrais e na teca de folículos antrais bovinos. O cultivo de células da gra-

nulosa demonstrou que a adição de FGF-10 diminuiu a produção de estradiol destas células, mas não alterou a proliferação celular, exercendo importante função na sinalização das células da teca para granulosa e oócito.

Desta forma, o FGF-10 tem sido descrito como um fator essencial para manter interações entre células mesenquimais e epiteliais, necessárias para o desenvolvimento normal dos componentes epiteliais de inúmeros órgãos [4,36], assim como tem sido considerado um importante mediador das interações celulares mesenquimais e epiteliais durante o desenvolvimento folicular (Figura 4) [57].

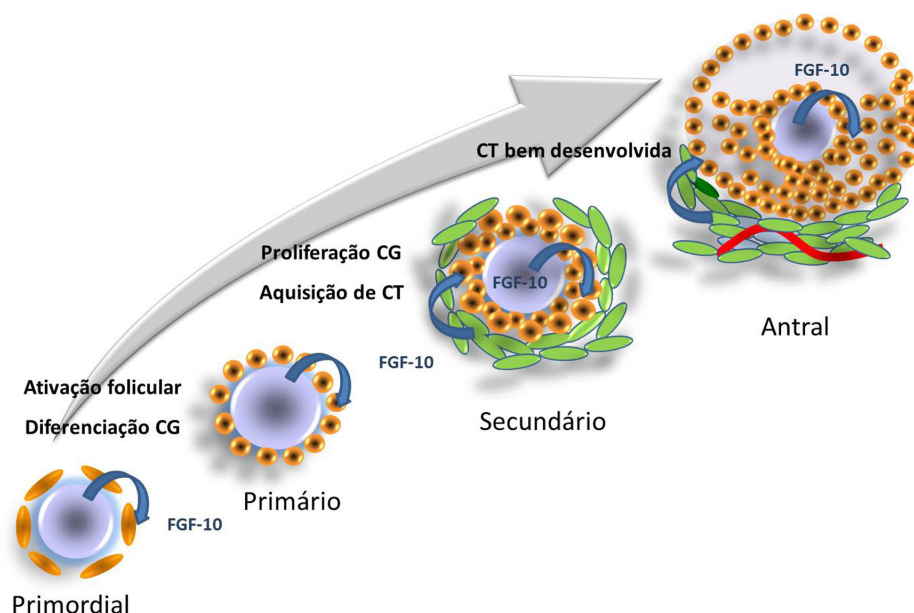


Figura 4. Modelo hipotético das ações mediadas pelo FGF-10 entre os diferentes tipos celulares dos folículos pré-antrais e antrais. A expressão folicular de FGF-10 seria inicialmente proveniente do oócito de folículos primordiais e primários e teria como alvo o seu receptor, o FGFR2b, presente nas células da granulosa (CG). Posteriormente, nos folículos secundários e antrais jovens, as células da teca (CT) também assumiriam a produção de FGF-10, e atuariam conjuntamente com o oócito na indução da diferenciação das células da granulosa. Adaptado de Castilho [21].

Estudos relativos ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos verificaram pela primeira vez o efeito da adição do FGF-10 na sobrevivência e no crescimento folicular quando adicionado na concentração 50 ng/mL [22]. Esse aumento no diâmetro folicular ao longo do cultivo *in vitro* condiz com um estudo prévio que considera o FGF-10 um potente indutor de proliferação em diversos tipos celulares, como células uroteliais, queratinócitos, epitélio intestinal e hepatócitos [41]. Alguns fatores desta família são descritos como atuantes na prevenção da apoptose, agindo ainda na estimulação de outros fatores que promovem a sobre-

vivência folicular. O FGF-2 e o FGF-7, por exemplo, atuam estimulando o Kit ligand que, por sua vez, tem papel fundamental na ativação de folículos primordiais [45] e na sobrevivência folicular [21]. Entretanto, no estudo em folículos pré-antrais caprinos, Chaves *et al.* [22] verificaram ainda, que altas concentrações (100 ng/mL) de FGF-10 exerceram efeito negativo no cultivo folicular *in vitro*, provavelmente aumentando a apoptose folicular através da ativação da via das proteínas quinases (MAPK), a qual é envolvida tanto na sobrevivência como na apoptose, com resposta celular específica, a depender do contexto celular.

A associação entre o FSH e o FGF-10 ilustra bem a interação entre mecanismos endócrinos e parácrinos no controle do desenvolvimento folicular. Em um estudo realizado por nossa equipe foi mostrado que o cultivo de fragmentos ovarianos caprinos por 16 dias, iniciando com FSH (50 ng/mL; Dia 0 ao Dia 8) e finalizando com FGF-10 (50 ng/mL; Dia 8 ao Dia 16) isoladamente, foi capaz de promover a manutenção da viabilidade folicular e a transição de folículos primordiais para o estágio de folículo primário (Almeida *et al.*, dados não publicados). O resultado favorável obtido no estudo acima pode estar ligado ao fato do FSH estimular a expressão do FGFR2b em células da granulosa [15]. Segundo Castilho *et al.* [20] a associação temporal entre a intensificação da expressão do FGF-10 e o aparecimento de folículos primordiais e primários, bem como aumento no número desses últimos entre os 75 e 120 dias de gestação, condiz com a participação desse fator de crescimento como modulador da ativação de folículos primordiais e formação de folículos primários, conforme descrito para o FGF-7 [47].

O FGF-10 parece estar envolvido no controle do remodelamento da matriz extracelular, uma vez que este fator promoveu a ativação de indutores de plasminogênio e de metaloproteinases na placenta humana no primeiro trimestre de gestação [2,62]. Entretanto, ainda são necessários estudos para definir quais as funções exatas da matriz extracelular no controle da atividade dos FGFs durante a foliculogênese e qual o papel dos FGFs na regulação do crescimento folicular.

Além da atuação na foliculogênese, o FGF-10 foi recentemente apontado como um fator capaz de melhorar a competência oocitária. Zhang *et al.* [72] mostraram que a adição de FGF-10 ao meio de cultivo de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos durante a maturação *in vitro* melhorou a maturação oocitária, a

expansão das células do cumulus e o desenvolvimento embrionário subsequente até o estágio de blastocisto. Contudo, os mecanismos pelos quais o FGF-10 controla esse processo ainda não foram elucidados. No entanto, sugere-se uma ação do FGF-10 nas células do cumulus regulando a meiose através do fornecimento de um ooplasma com componentes importantes para uma sobrevivência embrionária precoce.

VI. CONCLUSÃO

A partir desta revisão foi possível constatar como a família dos FGFs, e em especial o FGF-10, é importante para a regulação da fisiologia folicular. Este fator de crescimento atua na sobrevivência folicular, bem como estimulando a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e a proliferação das células da granulosa/teca através de ações diretas e/ou indiretas no controle da foliculogênese. Além disso, o FGF-10 parece atuar de forma diferenciada ao longo do desenvolvimento folicular, exercendo efeitos proliferativos na fase inicial com os folículos pré-antrais e efeitos de diferenciação na fase final, com os folículos antrais. Apesar de seu potencial, o FGF-10 ainda é um fator de crescimento pouco estudado, sendo necessária uma elucidação mais aprofundada dos seus efeitos sobre a foliculogênese e a maturação oocitária durante o cultivo *in vitro* a fim de melhor compreender a fisiologia folicular e, assim, contribuir para a obtenção de números mais expressivos de oócitos fertilizáveis que poderão ser destinados, futuramente, às diferentes biotécnicas de reprodução animal.

NOTA INFORMATIVA

¹Dados não publicados: Almeida, A.P. (anderson_almeida@click21.com.br).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Akagi K., Kyun P.E., Mood K. & Daar I.O. 2002. Docking protein SNT1 is a critical mediator of fibroblast growth factor signaling during *Xenopus* embryonic development. *Developmental Dynamics*. 223(2): 216-228.
- 2 Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Hamani Y., Sciaki Y., Goldman-Wohl D., Greenfield C., Ariel I. & Yagel S. 2005. Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 119(1): 27-35.
- 3 Armstrong D.G. & Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*. 2(3):139-146.

- 4 Bazer F.W., Spencer T.E., Johnson G.A., Burghardt R.C. & Wu G. 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*. 138(2):195-209.
- 5 Beenken A. & Mohammadi M. 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8(3): 235-253.
- 6 Beer H.D., Vindevoghe L., Gait M.J., Revestd J.R.M., Mason I., Dickson C. & Werner S. 2000. Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 1-IIIb is a naturally occurring functional receptor for fgfs that is preferentially expressed in the skin and the brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(21): 16091-16097.
- 7 Berisha B., Schams D., Kosmann M., Amselgruber W. & Einspanier R. 2000. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*. 167(3): 371-382.
- 8 Berisha B., Welter H., Shimizu T., Miyamoto A., Meyer H.H.M. & Schams D. 2006. Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *The Journal of Reproduction and Development*. 52(2): 307-313.
- 9 Berisha B., Sinowatz F. & Schams D. 2004. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 67(2): 162-171.
- 10 Bishayee S., Majumdar S., Scher C.D. & Kahn S. 1998. Characterization of a novel anti-peptide antibody that recognizes a specific conformation of the platelet-derived growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 8(9): 3696-3702.
- 11 Blume-Jensen P. & Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411(6835): 355-365.
- 12 Boilly B., Vercoutter-Edouart A.S., Hondermarck H., Nurcombe V. & Le Bourhis X. 2000. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 11(4): 295-302.
- 13 Böttcher R.T. & Niehrs C. 2005. Fibroblast Growth Factor signaling during early vertebrate development. *Endocrinology Reviews*. 26(1): 63-77.
- 14 Buratini Jr. J., Pinto M.G.L., Giometti I.C., Costa I.B., Teixeira A.B., Barros C.M. & Price C.A. 2004. Fibroblast growth factor 10 gene expression in bovine antral follicles. *Biology of Reproduction. Special Issue (April)*: 269-270.
- 15 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. 2005. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*. 130(3): 343-350.
- 16 Buratini Jr. J., Pinto M.G.L., Castilho A.C., Amorim R.L., Giometti I.C., Portela V.M., Nicola E.S. & Price C.A. 2007. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biology of Reproduction*. 77(4): 743-750.
- 17 Cantley L.C. 2002. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 296(5573): 1655-1657.
- 18 Castilho A.C. 2008. Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) mRNA expression around follicular deviation in Bos indicus heifers. In: *International Symposium on Animal Biology of Reproduction, v. 2. (São Paulo, Brasil)*. p.218.
- 19 Castilho A.C., Giometti I.C., Berisha B., Schams D., Price C.A., Amorim R.L., Papa P.C. & Buratini Jr. J. 2008. Expression of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in the Bovine Corpus Luteum. *Molecular Reproduction and Development*. 75(5): 940-945.
- 20 Castilho A.C.S. 2008. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. 80f. Botucatu, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- 21 Celestino J.J.H., Chaves R.N., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A., Bruno J.B., Maia Júnior J.E., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2009. Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction*. 6(4): 495-508.
- 22 Chaves R.N., Lima-Verde I.B., Celestino J.J.H., Duarte A.B.G., Alves A.M.C.V., Matos M.H.T., Campello C.C., Name K.P.O., Bão S.N., Buratini Jr. J. & Figueiredo J.R. 2010. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*. 39(4): 249-258.
- 23 Cho J., Itoh T., Sendai Y. & Hoshi H. 2008. Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 75(12): 1736-1743.
- 24 Engelman J.A., Luo J. & Cantley L.C. 2006. The evolution of PI3K as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 7(8): 606-619.

- 25 Eswarakumar V.P., Lax I. & Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Review*. 16(2): 139-149.
- 26 Forman-Kay J.D. & Pawson T. 1999. Diversity in protein recognition by PTB domains. *Current Opinion in Structural Biology*. 9(6): 690-695.
- 27 Fortune J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78(3-4): 135-163.
- 28 Goetz R., Beenken A., Ibrahim O.A., Kalinina J., Olsen S.K., Eliseenkova A.V., Xu C., Neubert T.A., Zhang F., Linhardt R.J., Yu X., White K.E., Inagaki T., Kliewer S.A., Yamamoto M., Kurosu H., Ogawa Y., Kuroo M., Lanske B., Razzaque M.S. & Mohammadi M. 2007. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*. 27(9): 3417-3428.
- 29 Guerra D.M., Giometti I.C., Price C.A., Andrade P.B., Castilho A.C., Machado M.F., Ripamonte P., Papa P.C. & Buratini Jr. J. 2008. Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(6): 659-664.
- 30 Hadari Y.R., Gotoh N., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J. 2001. Critical role for the docking-protein FRS2 in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(15): 8578-8583.
- 31 Hadari Y.R., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J. 1998. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 18(7): 3966-3973.
- 32 Harada M., Murakami H., Okawa A., Okimoto N., Hiraoka S., Nakahara T., Akasaka R., Shiraishi Y., Futatsugi N., Mizutani-Koseki Y., Kuroiwa A., Shirouzu M., Yokoyama S., Taiji M., Iseki S., Ornitz D.M. & Koseki H. 2009. FGF9 monomer/ dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nature Genetics*. 41(3): 289-298.
- 33 Igarashi M., Finch P.W. & Aaronson S.A. 1998. Characterization of recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF)-10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7). *The Journal of Biological Chemistry*. 273(21): 13230-13235.
- 34 Itoh N. & Ornitz D. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*. 20(11): 563-569.
- 35 Itoh N. & Ornitz D.M. 2008. Functional Evolutionary History of the Mouse Fgf Gene Family. *Developmental Dynamics*. 237(1): 18-27.
- 36 Itoh N. & Ornitz D.M. 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *The Journal of Biochemistry*. 149(2): 121-130.
- 37 Itoh N. 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebra fish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30(10): 1819-1825.
- 38 John G.B., Shidler M.J., Besmer P. & Castrillon D.H. 2009. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology*. 331(2): 292-299.
- 39 Kalinina J., Byron S.A., Makarenkova H.P., Olsen S.K., Eliseenkova A.V., Larochelle W.J., Dhanabal M., Blais S., Ornitz D.M., Day L.A., Neubert T.A., Pollock P.M. & Mohammadi M. 2009. Homodimerization controls the fibroblast growth factor 9 subfamily's receptor binding and heparan sulfate-dependent diffusion in the extracellular matrix. *Molecular and Cellular Biology*. 29(17): 4663-4678.
- 40 Kim I., Moon S., Yu K., Kim U. & Koh G.Y. 2001. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1518(1-2): 152-156.
- 41 Kosman J., Carmean N., Leaf E.M., Dyamenahalli K. & Bassuk J.A. 2007. Translocation of fibroblast growth factor-10 and its receptor into nuclei of human urothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 102(3): 769-785.
- 42 Kusakabe M., Masuyama N., Hanafusa H. & Nishida E. 2001. Xenopus FRS2 is involved in early embryogenesis in cooperation with the Src family kinase Lalloo. *EMBO Reports*. 2(8): 727-735.
- 43 Leanne M., Cotton M., O'Bryan K. & Hinton B.T. 2008. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrinology Review*. 29(2): 193-216.
- 44 Lee Jr. J.T. & McCubrey J.A. 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*. 16(4): 486-507.
- 45 Lima I.M.T., Celestino J.J.H., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P.R. 2011. Papel da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 34(1): 3-20.

- 46 Matos M.H.T., Lima-Verde I.B., Luque M.C.A., Maia Jr. J.E., Silva J.R.V., Celestino J.J.H., Martins F.S., Bão S.N., Lucci C.M. & Figueiredo J.R. 2007. Essential role of follicle stimulating hormone in the main-tenance of caprinepreantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. 15(2): 173-82.
- 47 Mcgee E.A., Chun S.Y., Lai S., He Y. & Hsueh A.J.W. 1999. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth and differentiation of preantral follicles. *Fertility and Sterility*. 71(4): 732-738.
- 48 McKeehan W.L., Wang F. & Kan M. 1998. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*. 59: 135-176.
- 49 Mohammadi M., Dikic I., Sorokin A., Burgess W.H., Jaye M. & Schlessinger J. 1996. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular Cell Biology*. 16(3): 977-989.
- 50 Mohammadi M., Schlessinger J. & Hubbard S.R. 1996. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*. 86(4): 577-787.
- 51 Neufield G., Ferrara N., Schweigerer L., Mitchell R. & Gospodarowicz D. 1987. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 121(2): 597-603.
- 52 Nilsson E., Parrott J.A. & Skinner M.K. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 175(1-2): 123-130.
- 53 Ohuchi H., Ohchi H., Hori Y., Yamasaki M., Harada H., Sekine K., Kato S. & Itoh N. 2000. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277(3): 643-649.
- 54 Ong S.H., Guy G.R., Hadari Y.R., Laks S., Gotoh N., Schlessinger J. & Lax I. 2000. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular Cell Biology*. 20(3): 979-989.
- 55 Ornitz D.M. & Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. 2(3): Reviews3005.
- 56 Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S., Mcewen D.G., Macarthur G.A., Coullir F., Gao G. & Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(25): 15292-15297.
- 57 Parrott J.A. & Skinner M.K. 1998. 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*. 139(5): 2240-2245.
- 58 Peter K.G., Chen W.G. & Williams L.T. 1992. Two FGF receptors are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis. *Development*. 114(1): 233-243.
- 59 Peters K.G., Marie J., Wilson E., Ives H.E., Escobedo J., Del Rosario M., Mirda D. & Williams L.T. 1992. Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca² flux but not mitogenesis. *Nature*. 358(6388): 678-681.
- 60 Portela V.M., Gonçalves P.B.D., Veiga A.M., Nicola E., Buratini Jr. J. & Price C.A. 2008. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*. 149(10): 5004-5011.
- 61 Powers C.J., McLeskey S.W. & Wellstein A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*. 7(3): 165-197.
- 62 Robinson L.L., Sznajder N.A., Riley S.C. & Anderson R.A. 2001. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Molecular Human Reproduction*. 7(7): 641-648.
- 63 Schams D., Steinberg V., Steffl M., Meyer H.H.D. & Berisha B. 2009. Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. *Reproduction*. 138(1): 141-149.
- 64 Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahimi O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J. & Mohammadi M. 2000. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell*. 6(3): 743-750.
- 65 Sleeman M., Fraser J., Mcdonald M., Yuan S., White D., Grandison P., Kumble K., Watson J.D. & Murison J.G. 2001. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. *Gene*. 271(2): 171-82.
- 66 Spicer L.J. & Stewart R.E. 1996. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biology of Reproduction*. 54(1): 255-263.
- 67 Taniguchi F., Harada T., Iwabe T., Ohama Y., Takenaka Y. & Terakawa N. 2008. Aberrant expression of keratinocyte growth factor receptor in ovarian surface epithelial cells of endometrioma. *Fertility and Sterility*. 89(2): 478-80.

- 68 Trueb B. & Taeschler S. 2006.** Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. *Molecular Endocrinology*. 17(4): 617-620.
- 69 Turner N. & Grose R. 2010.** Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 10(2): 116-129.
- 70 Wymann M.P., Zvelebil M. & Laffargue M. 2003.** PI3K signaling - which way to target? *Trends in Pharmacological Sciences*. 24(7): 366-376.
- 71 Yamasaki M., Miyake A., Tagashira S. & Itoh N. 1996.** Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(27): 15918-15921.
- 72 Zhang K., Hansen P.J. & Ealy A.D. 2010.** Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*. 140(6): 815-826.
- 73 Zhang X., Ibrahim O.A., Olsen S.K., Umemori H., Mohammadi M. & Ornitz D.M. 2006.** Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(23): 15694-15700.

