

ANDREY BORGES TEIXEIRA

**REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DOS
RECEPTORES DE FATORES
DE CRESCIMENTO
FIBROBLÁSTICOS 3c E 4
(FGFR-3c E FGFR-4) EM
FOLÍCULOS ANTRAIS
BOVINOS**



**Botucatu-SP
2004**

ANDREY BORGES TEIXEIRA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES
DE FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICOS
3c E 4 (FGFR-3c E FGFR-4) EM FOLÍCULOS
ANTRAIS BOVINOS**

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
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Teixeira, Andrey Borges.

Regulação da expressão dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos 3c e 4 (FGFR-3c e FGFR-4) em folículos antrais bovinos / Andrey Borges Teixeira. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientador: José Buratini Júnior

Assunto CAPES: 50504007

1. Bovino - Reprodução

CDD 636.208246

Palavras-chave: Bovinos; Expressão gênica; FGFR-3c; FGFR-4; Folículo; RT-PCR.

Pegadas na Areia

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia, com o Senhor, e através do céu passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era o meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso entristeceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

" - Senhor, Tu me dissestes que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo todo o caminho mas, notei que durante as maiores atribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixastes".

O Senhor me respondeu:

" - Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu, nos braços... te carreguei".

(Autor Desconhecido)

Aos meus pais Marlene e Nelson

Exemplos eternos de caráter e luta, que possuem como meta principal de suas vidas a formação de seus filhos, e em nossas conquistas, a principal recompensa.

“...Se um dia, já homem feito e respeitado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma:

Meu pai, minha mãe...”

(Rui Barbosa)

Amo vocês.

Aos meus irmãos Nelson e João Alberto

Fonte de inspiração, apoio, coragem e perseverança. Obrigado por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e vencer com ousadia,
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
E a vida é muito para ser insignificante.”*

(Charles Chaplin)

À minha namorada Veridiana Fernandes da Silveira

*Companheira de todas as horas, obrigado pelo amor,
compreensão e incentivo.*

*“Você é assim
Um sonho pra mim
E quando eu não te vejo
Eu penso em você
Desde o amanhecer
Até quando eu me deito
Eu gosto de você
Eu gosto de ficar com você
Meu riso é tão feliz contigo
O meu melhor amigo é o meu amor...”*

*(Arnaldo Antunes, Carlinhos Brown, Davi
Moraes, Marisa Monte e Pedro Baby)*

Te amo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. José Buratini Júnior

Amigo e orientador deste trabalho. Exemplo de profissionalismo e dedicação. Não apenas orientou, mas fez com que minhas dúvidas me levassem à busca das respostas, mostrando que eu era capaz. Com toda sabedoria soube orientar e questionar, avaliar e ponderar.

Obrigado.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Exemplo de profissionalismo e dedicação. Pelo fato de ter me ensinado de maneira tão prazerosa os primeiros passos da pesquisa, ressaltando sempre o lado positivo de todas as coisas, contornando de forma tão admirável as dificuldades. Estarmos juntos neste trabalho representou para mim muito mais do que um aprendizado. Você me ensinou a abrir caminhos e a lutar por aquilo que acreditamos.

Obrigado.

Esse 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. Em particular à Prof^a. Dr^a. Eunice Oba pelo apoio e confiança durante o desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio;

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, colaboração e confiança 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 Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal pela amizade, consideração, auxílio e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Aos Professores Dr. Mário Binelli e Dr. Flávio Vieira Meirelles Universidade de São Paulo - USP, pela amizade, apoio e sugestões transmitidos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UNESP - Araçatuba, pela amizade e auxílio nos seqüenciamentos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

À Profª. Drª. Maria Christina Werneck de Avellar do Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP – São Paulo, pela amizade, apoio e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

À Profª. Drª. Agumi Kohayagawa do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pela amizade, carinho e incentivo;

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, Cílene do Carmo F. Padilha, Murilo Stelzer e ao amigo Rogério de Moraes, pela amizade e apoio;

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

Aos funcionários do CEMEQ (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

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

Aos meus amigos (Anthony Castilho, César Pedrazzi, Christianne Barreto, Cláudia Bertan, Daniel Sousa, Danilas Melo, Edmar Freitas, Edmir Nicola, Evandro Sartorelli, Fábio Morato, Inês Giometi, Isabela Bazzo, José Dell’Aqua, Maicon Gaissler Pinto, Marcella Milazzotto, Marcelo Nogueira, Osni Pinheiro, Patrícia Mazzolim, Paula Baloni, Ricardo Figueiredo, Rubens Ribeiro, Valéria Covolan, Vanessa Glapinski e aos que aqui não foram mencionados), que me forneceram modelos de relacionamentos, me acompanhando e me deixando acompanhá-los em suas vidas, transformando o viver em algo muito valioso;

Aos proprietários e funcionários do Frigorífico Frigo[®] de Lençóis Paulista-SP, pelo apoio à pesquisa, pelo carinho e compreensão que sempre tiveram com os alunos do Prof. Dr. José Buratini Júnior;

Aos funcionários Braz Titon, Luciana Pizzani, Luzia de Brito B. Fernandes, Maria Luiza Deléu da Silva, Marluci Betini, Rosângela Aparecida Soares, Rosemary Cristina da Silva, Sulamita Selma Clemente Colnago e a toda equipe da biblioteca, pela amizade, assessoria e correção das referências bibliográficas e pelos serviços prestados;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro (processo 00/12549-7), sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

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.

RESUMO

Estudos recentes indicam o envolvimento do FGF-8 no controle do desenvolvimento folicular. O FGF-8 ativa preferencialmente o FGFR-3c e o FGFR-4, cuja expressão em folículos antrais ainda não foi determinada. No presente estudo, avaliou-se a expressão do FGFR-3c e -4 em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos e testou-se a hipótese de que a expressão destes genes é regulada durante o desenvolvimento folicular antral bovino. Ovários bovinos foram obtidos em matadouro local, folículos maiores que 5mm foram dissecados e medidos, células da teca e da granulosa foram separadas e o RNA total extraído. As concentrações de estradiol e de progesterona do fluido folicular foram determinadas por radioimunoensaio. Folículos com progesterona acima de 100ng/mL foram considerados atresicos e excluídos da análise. Os folículos restantes foram agrupados de acordo com a concentração de estradiol como se segue: (a) <5; (b) 5-20; (c) >20-100; e (d) >100ng/mL. Além disso, os folículos foram divididos em três grupos de acordo com o tamanho: (a) 5-7; (b) 8-10 e (c) >10mm. Folículos inteiros entre 2 e 4mm de diâmetro foram incluídos na análise da expressão do FGFR-4. A expressão do FGFR-3c e FGFR-4 foi examinada por RT-PCR semiquantitativo com iniciadores espécie-específicos. O RT-PCR semiquantitativo foi validado pela escolha de números de ciclos de PCR e quantidade de RNA dentro da fase linear da curva de amplificação. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria computadorizada. Em células da granulosa, houve correlação positiva entre a expressão do FGFR-3c e a concentração de estradiol no fluido folicular, em sintonia com níveis mais altos de RNAm em grupos com maiores concentrações de estradiol, e também aumentou com o diâmetro folicular. Em células da teca, a expressão do FGFR-3c também foi detectada, mas não variou com o tamanho ou concentração de estradiol. Para o FGFR-4, a

expressão gênica foi restrita às células da teca e diminuiu com o aumento do diâmetro folicular, mas não apresentou correlação com a concentração de estradiol. Em conclusão, estes dados indicam que a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 é regulada durante o desenvolvimento folicular antral bovino. A maior expressão do FGFR-3c em células da granulosa de folículos maiores e mais estrogênicos sugere sua participação, especialmente, na regulação destas células em folículos dominantes após o desvio, enquanto que a maior expressão do FGFR-4 em células da teca de folículos menores sugere um papel para este receptor na regulação das células da teca durante a fase inicial do desenvolvimento folicular antral.

Palavras-chave: bovinos; expressão gênica; FGFR-3c; FGFR-4; folículos antrais; RT-PCR.

TEIXEIRA, A.B. **Regulation of fibroblast growth factor receptors 3c and 4 (FGFR-3c and FGFR-4) gene expression in bovine antral follicles.** Botucatu, 2004. 85p. Thesis (PhD in Animal Reproduction) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

Recent studies indicate the involvement of FGF-8 in the control of follicular development. FGF-8 preferentially activates FGFR-3c and FGFR-4, although the expression of these receptors has not been investigated in bovine antral follicles yet. In the present work, FGFR-3c and -4 gene expression was assessed in theca and granulosa cells from bovine antral follicles and the hypothesis that FGFR-3c and -4 gene expression is regulated during antral follicle development in cattle was tested. Bovine ovaries were obtained at a local abattoir, follicles greater than 5mm in diameter were dissected and measured, granulosa and theca cells were separated, and total RNA extracted. Estradiol and progesterone concentrations were measured in the follicular fluid by RIA. Follicles with progesterone levels above 100ng/mL were considered atretic and excluded from the analysis. Remaining follicles were grouped according to estradiol concentration as follows: (a) <5; (b) 5-20; (c) >20-100; and (d) >100ng/mL. In addition, follicles were divided into three groups according to size: (a) 5-7; (b) 8-10 and (c) >10mm. Whole follicles at 2-4mm in diameter were included in the analysis of FGFR-4 gene expression. FGFR-3c and FGFR-4 gene expression was examined by semi-quantitative RT-PCR using bovine specific primers. Semi-quantitative RT-PCR was validated by choosing number of PCR cycles and amount of RNA within the linear range of the amplification curve. Band intensities were analyzed by computerized densitometry. In granulosa cells, FGFR-3c expression was positively correlated with estradiol concentration in the follicular fluid in agreement with higher mRNA levels in groups with higher estradiol concentrations, and also increased with follicle size. In theca cells, FGFR-3c gene expression was also detected but did not change with follicle size or estradiol concentration. For FGFR-4, gene expression was restrict to theca cells and decreased with follicle diameter, but was not correlated with estradiol concentration. In conclusion, present data

indicate that FGFR-3c and FGFR-4 gene expression is developmentally regulated in bovine antral follicles. Higher levels of FGFR-3c gene expression in granulosa cells of larger and more estrogenic follicles suggest its participation, specially, in the regulation of these cells in dominant follicles after deviation, whereas higher levels of FGFR-4 gene expression in theca cells from smaller follicles suggest a role for this receptor in the regulation of theca cells during early antral follicle development.

Key-words: bovine; gene expression; FGFR-3c; FGFR-4; antral follicles; RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura dos genes codificadores dos FGFR 1-4 (Ig I, II e III = domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, TM = domínio transmembrânico, K I e II = domínios quinase intracelulares). 50
- Figura 2-** Géis ilustrativos demonstrando ausência de contaminação entre os tipos de células foliculares. Observa-se a expressão gênica da CYP19 em células da granulosa (CG), mas não em células da teca (CT); e a expressão gênica da CYP17 em CT, mas não em CG. 53
- Figura 3-** Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativa para o FGFR-3c e para o FGFR-4, demonstrando que os sinais da expressão dos genes alvo e constitutivo são dependentes da concentração de RNA e do número de ciclos de PCR. 57
- Figura 4-** Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGFR-3c e do GAPDH em células da granulosa e da teca de folículos antrais bovinos com baixa (<5ng/mL) ou alta (>100ng/mL) concentração de estradiol no fluido folicular (Pos = cérebro fetal como controle positivo; Neg = água em substituição ao cDNA como controle negativo). 60

- Figura 5-** Níveis relativos de RNAm do FGFR-3c (Média \pm EPM) em células da granulosa (CG) e células da teca (CT) de folículos antrais agrupados de acordo com a concentração de estradiol no fluido folicular ou de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa. 61
- Figura 6-** Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGFR-4 e do GAPDH em células da teca de folículos com diâmetro entre 5 e 7mm e maiores que 10mm e ausência da expressão do FGFR-4 em células da granulosa (Pos = fígado fetal como controle positivo; Neg = água em substituição ao cDNA como controle negativo). 62
- Figura 7-** Níveis relativos de RNAm do FGFR-4 (Média \pm EPM) em células da teca (CT) de folículos antrais agrupados de acordo com a concentração de estradiol no fluido folicular ou de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa. 63
- Figura 8-** Níveis relativos de RNAm do FGFR-4 (Média \pm EPM) em células da teca (CT) de folículos antrais maiores que 2mm agrupados de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa. 64

LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, FGFR-3c, FGFR-4, CYP17 e CYP19.	51
------------------	---	----

ABREVIATURAS

mg	- micrograma
mL	- microlitro
mm	- micrômetro
A	- “antisense”
AIGF	- fator de crescimento indutor da produção de andrógenos
bFGF	- fator de crescimento fibroblástico básico
BMP	- proteína morfogenética óssea
cDNA	- ácido desoxirribonucléico complementar
c-Kit	- receptor para o “Kit-ligand”
CG	- célula da granulosa
CT	- célula da teca
CYP17	- 17 α -Hidroxilase
CYP19	- citocromo P450 aromatase
DEPC	- dietilpirocarbonato
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNase	- enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
E2	- estradiol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
FF	- fluido folicular
FGF	- fator de crescimento fibroblástico
FGFR	- receptor para fator de crescimento fibroblástico
FSH	- hormônio folículo estimulante
FSHR	- receptor do hormônio folículo estimulante
g	- força G
GAPDH	- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDF-9	- fator de crescimento de diferenciação 9
GnRH	- hormônio liberador das gonadotrofinas
IGF	- fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	- proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
KGF	- fator de crescimento dos queratinócitos
KL	- “Kit-ligand”
Km	- quilômetro

LH	- hormônio luteinizante
LHR	- receptor do hormônio luteinizante
M	- molar
MAPK	- proteína quinase mitógeno ativada
mg	- miligrama
MgCl₂	- cloreto de magnésio
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm	- milímetro
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
Neg	- negativo
°C	- grau Celsius
pb	- pares de base
P4	- progesterona
PBS	- tampão de fosfato e salina
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pg	- picograma
pH	- potencial hidrogeniônico
Pos	- positivo
RNA	- ácido ribonucléico
RNA_m	- ácido ribonucléico mensageiro
RNA_{se}	- enzima que degrada o ácido ribonucléico
RT	- reação de transcrição reversa
RT-PCR	- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	- "sense"
TBE	- Tris, Ácido bórico e EDTA
TGF-β	- fator de crescimento transformante β
TZP	- projeções transzonais
U	- unidades
UV	- ultravioleta
V	- volts
ZP	- zona pelúcida

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

ABREVIATURAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. O folículo ovariano	25
2.2. Desenvolvimento folicular	25
2.2.1. Fase pré-antral	25
2.2.2. Fase antral	27
2.3. Fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e seus receptores (FGFR)	31
2.4. Caracterização do sistema FGF-8 e evidências da sua participação no controle do desenvolvimento folicular bovino	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Obtenção dos folículos antrais e tecidos controles	42
3.2. Extração do RNA total	43
3.3. Radioimunoensaio	45
3.3.1. Estradiol	45
3.3.2. Progesterona	46
3.4. Classificação folicular	47

3.5. RT-PCR	48
3.5.1. Protocolo DNase I	48
3.5.2. Reação de transcrição reversa (RT)	49
3.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
3.5.3.1. Investigação da pureza das amostras de células da granulosa e da teca	52
3.5.3.2. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para FGFR-3c e FGFR-4	53
3.6. Eletroforese em gel de agarose	55
3.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR	56
3.8. Análise estatística	58
4. RESULTADOS	59
4.1. FGFR-3c	59
4.2. FGFR-4	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

Durante a última década, os fatores de crescimento associados aos eventos endócrinos ovarianos vêm sendo exaustivamente estudados no intuito de gerar mais informações para a compreensão da foliculogênese. Uma vez que apenas 0,1% dos folículos primordiais presentes no ovário chegam ao estágio ovulatório (YANG et al., 1998), a elucidação da fisiologia ovariana é necessária para o aperfeiçoamento de biotecnologias que proporcionam melhor aproveitamento dos folículos ovarianos de fêmeas geneticamente superiores e de espécies ameaçadas de extinção. Desta forma, tanto a produção de alimentos de origem animal, quanto à preservação da biodiversidade podem ser beneficiadas.

A regulação da atividade ovariana das fêmeas bovinas depende da integração de eventos intra e extra-ovarianos, mediados por hormônios e fatores de crescimento. Inicialmente, o desenvolvimento folicular requer comunicação entre as células germinativas (oócito) e as células somáticas (células da pré-granulosa) por meio de junções intermembranais (“gap junctions”) e fatores parácrinos e, posteriormente, ação endócrina das gonadotrofinas (WEBB et al., 2003). Este complexo processo fisiológico é conhecido como foliculogênese.

Dentre os fatores de crescimento que regulam a foliculogênese encontram-se os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF). Estes constituem uma família de proteínas composta de vinte e quatro membros identificados até o presente momento (FGF-1 a 24) (FISCHER et al., 2003), que participam dos

processos celulares de proliferação, diferenciação e angiogênese, mediante a ativação de receptores de alta afinidade codificados por cinco genes distintos (FGFR-1 a 5) (SLEEMAN et al., 2001).

A localização da expressão do FGF-8 exclusivamente em oócitos de folículos em crescimento constituiu o primeiro forte indício da participação deste FGF na regulação da foliculogênese (VALVE et al., 1997). Recentemente, a expressão do FGF-8 e de seus principais receptores (FGFR-3c e FGFR-4) foi detectada em folículos pré-antrais bovinos (BURATINI et al., 2004b). Além disso, o RNAm do FGF-8 também foi detectado em oócitos, células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos (COSTA, 2004).

Sendo assim, é importante determinar se os folículos antrais apresentam capacidade de resposta ao FGF-8. Contudo, a literatura consultada não dispõe de dados conclusivos a respeito da expressão do FGFR-3c e FGFR-4 no ovário, sendo que nenhum estudo investigou este sistema na espécie bovina até o presente momento. Por isso, a fim de investigar a participação do sistema FGF-8 durante a fase antral da foliculogênese, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 ocorre em células da teca e da granulosa. Para tanto, testou-se a hipótese de que a expressão destes receptores varia ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O folículo ovariano

O folículo é a unidade funcional ovariana dos mamíferos. Além de proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito até o processo de singamia (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1994), o folículo produz hormônios esteróides importantes para a regulação da ciclicidade reprodutiva e estabelecimento das características sexuais femininas (GORDON, 1994). Os folículos são classificados de acordo com o grau de desenvolvimento em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, que se subdividem em primordiais, primários e secundários; b) folículos antrais, cavitários, terciários ou ainda conhecidos como folículos *de Graaf*, quando em estágio pré-ovulatório (FIGUEIREDO et al., 1995). Vários fatores como a espécie, raça, genética, idade e estado reprodutivo do animal podem influenciar a quantidade de folículos encontrada nos ovários (ERICKSON et al., 1976; SMITH et al., 1994). Em bovinos, a população folicular pode chegar a 720.000 folículos por ovário (CAHILL et al., 1979).

2.2. Desenvolvimento folicular

2.2.1. Fase pré-antral

No início da vida fetal das fêmeas bovinas, as células germinativas primordiais, originárias do saco vitelínico, migram para a crista genital e povoam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a se multiplicar por divisões mitóticas. Concluída a

proliferação mitótica, as oogônias iniciam o processo de divisão meiótica que é interrompido no diplóteno da prófase I. As células germinativas, agora denominadas oócitos, são rodeadas por uma estreita camada de células da granulosa achatadas, constituindo os folículos primordiais (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK et al., 1997).

O mecanismo de ativação do crescimento dos folículos primordiais ainda não está totalmente esclarecido. Porém, após sua ativação, o folículo passa por estágios distintos de desenvolvimento (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). No primeiro estágio ocorre a diferenciação das células da granulosa que circundam o oócito, passando do formato achatado para o cubóide, o que origina o folículo primário. O segundo estágio é caracterizado pelo aumento no tamanho do oócito e proliferação das células da granulosa, gerando o folículo secundário (MCNATTY et al., 1999).

Nessa fase de desenvolvimento folicular, os folículos dependem principalmente da comunicação ou interações químicas entre o oócito e as células da granulosa que o circundam, o que também será importante na fase de desenvolvimento antral (GILCHRIST et al., 2004). Estas interações ocorrem por meio de projeções tranzonais (TZP) (HERTING & ADAMS, 1967; ALBERTINI et al., 2001), junções intermembranais (“gap junctions”) (SIMON et al., 1997), e de vários fatores de crescimento secretados e seus respectivos receptores, dentre os quais se destacam o “Kit-ligant” (KL) e seu receptor c-KIT (PACKER et al., 1994), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) (MCGRATH et al., 1995) e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) (ELVIN

et al., 2000). Há evidências de que os FGF também estejam envolvidos neste processo (NILSSON et al., 2001; BURATINI et al., 2004b).

As gonadotrofinas não são indispensáveis para essa fase inicial do desenvolvimento folicular uma vez que folículos de até 4mm desenvolvem-se em vacas com concentrações plasmáticas basais de FSH (hormônio folículo estimulante) induzidas pela infusão contínua de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) (GONG et al., 1996). Contudo, a expressão do receptor do FSH (FSHR) foi detectada em folículos pré-antrais com uma ou duas camadas de células da granulosa (BAO & GARVERICK, 1998) e o FSH acelerou o desenvolvimento em folículos pré-antrais, tanto *in vivo* (CAMPBELL et al., 2000), quanto *in vitro* (GUTIERREZ et al., 2000). Além disso, a expressão gênica do receptor para o hormônio luteinizante (LHR) foi detectada na fase pré-antral do desenvolvimento folicular durante a formação da teca interna (WEBB et al., 2003).

2.2.2. Fase antral

Os folículos antrais são constituídos por um oócito circundado pela zona pelúcida e pelas células do cúmulo, uma cavidade que contém fluido folicular designada antro, células da granulosa, uma membrana basal e duas camadas de células da teca, sendo uma interna e outra externa (FIGUEIREDO et al., 1995). O folículo *de Graaf* ou folículo pré-ovulatório representa o estágio máximo do desenvolvimento folicular e pode atingir diâmetros variáveis de acordo com a espécie: 1mm em ratas (FORTUNE, 1994), 6mm em cabras (GINTHER & KOT, 1994), 8mm em ovelhas (DRIANCOURT, 1991), 18mm em

vacas (DRIANCOURT, 1991; FIGUEIREDO et al., 1995) e 20mm em mulheres (FORTUNE, 1994). O desenvolvimento da cavidade antral nas fêmeas bovinas ocorre em folículos com diâmetro entre 0,14mm e 0,28mm (LUSSIER et al., 1987; FIGUEIREDO et al., 1995). Em fetos bovinos, os folículos antrais são observados a partir de 150 dias de idade, ainda durante o período fetal (TANAKA et al., 2001).

Em fêmeas bovinas, o desenvolvimento folicular antral pode ser dividido em dois estágios. O primeiro, caracterizado por um período de crescimento lento (aproximadamente 30 dias), em que ocorre a diferenciação do folículo e aquisição do antro (transição da fase pré-antral para fase antral). Os folículos que possuíam tamanho aproximado de 300µm atingem de 3 a 5mm de diâmetro (LUSSIER et al., 1987). Esta fase é crítica para o desenvolvimento e competência oocitária, pois há alta atividade transcricional no oócito, o que será importante para a transição materno-zigótica caso este oócito seja fecundado (FAIR et al., 1997; SIRARD et al., 2003). O segundo período é mais rápido, podendo levar de 5 a 7 dias. Nesta fase, o acompanhamento ultrasonográfico do crescimento e atresia folicular permite caracterizar as ondas de crescimento folicular (SUNDERLAND et al., 1994).

Durante a fase antral do desenvolvimento folicular, as gonadotrofinas (FSH e LH) desempenham um papel chave nos processos de recrutamento, desvio e dominância folicular. A elevação das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento folicular, entendido como o crescimento sincronizado de um grupo de folículos antrais jovens que origina as ondas foliculares (ADAMS et al., 1992; FORTUNE, 1994). Os

bovinos apresentam geralmente de duas a três ondas foliculares, podendo raramente ocorrer uma ou quatro ondas (LUCY et al., 1992).

Após o recrutamento, inicia-se a fase de desvio folicular, na qual somente um folículo, em espécies monovulatórias, emerge do grupo dos recrutados e continua a crescer, enquanto os demais que compõem a onda folicular regridem (FORTUNE et al., 1991; GINTHER et al., 2001). O folículo dominante causa redução dos níveis circulantes de FSH por meio da secreção de inibina e estradiol, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (PRICE, 1991; GINTHER et al., 1996). O mecanismo que determina qual folículo será selecionado ainda não foi identificado. Possivelmente, durante o recrutamento, o futuro folículo dominante seja aquele cujo estágio de desenvolvimento encontra-se em melhor estado de sincronização com o estímulo gonadotrófico, tornando-o mais responsivo e fazendo-o diferenciar-se precocemente em relação aos demais. Esta diferenciação do folículo dominante em relação aos demais folículos confere a ele refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados por ele próprio e que irão suprimir o desenvolvimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994).

O sistema, mediado pelos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), desempenha papel importante na seleção do folículo dominante. Este sistema é composto por 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) que previnem a ligação dos IGF com seu receptor, além de uma enzima específica de degradação da IGFBP-4 (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).

Quando o folículo dominante é selecionado, os níveis de IGFBP diminuem e a biodisponibilidade de IGF no folículo dominante aumenta, pois há aumento na síntese de IGF-II e degradação enzimática da IGFBP-4. Enquanto isso no folículo subordinado, as concentrações de IGFBP-4 e 5 aumentam e a biodisponibilidade dos IGF diminui. A redução da IGFBP4 e aumento nos níveis de IGF, 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).

Após o desvio, o folículo dominante apresenta alteração da dependência gonadotrófica. A aquisição de receptores para o LH, observada nas células da granulosa deste folículo, indica que o LH tem papel destacado no controle do desenvolvimento folicular terminal (GINTHER et al., 1996). Por fim, se ocorrer regressão lútea 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 pré-ovulatório de LH indispensável à maturação oocitária, com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular, e à ovulação. Caso contrário, ocorre regressão do folículo dominante e aumento da secreção de FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (MONNIAUX et al., 1997). 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; FIGUEIREDO et al., 1995).

Assim como nos folículos pré-antrais, os oócitos dos folículos antrais participam do controle do microambiente folicular mediante interação parácrina com as células somáticas, que regula a diferenciação celular necessária para o desenvolvimento folicular (FORTUNE et al., 2004). A interação entre as células do cúmulo e o oócito, previne a luteinização das células do cúmulo e promove o seu crescimento, regulando a esteroidogênese, a síntese de inibina e suprimindo a expressão do receptor de LH. No folículo ovulatório, há evidências de que os oócitos secretem fatores que permitam a expansão das células do cúmulo e regulem a estabilidade da matrix extracelular, facilitando o processo da ovulação. Porém, os fatores e seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente caracterizados. Acredita-se que o GDF-9 e a BMP-6 sejam alguns dos fatores envolvidos neste processo, provavelmente formando um complexo de interações parácrinas com outros membros da superfamília do fator de crescimento transformante β (TGF- β) (GILCHRIST et al., 2004).

2.3. Fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e seus receptores (FGFR)

Os FGF constituem uma família de proteínas formada por vinte e quatro membros (FGF-1 a 24) identificados até o presente momento (FISCHER et al., 2003). Os FGF apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, oncogênese e cicatrização (BASILICO & MOSCATELLI, 1992). Além da habilidade de

estimular a proliferação de uma grande variedade de células, os FGF apresentam atividade angiogênica. Estes fatores estão expressos em estágios iniciais e finais do desenvolvimento e também em tecidos adultos, indicando que eles desempenham papel importante como fatores de crescimento e diferenciação durante toda a vida (IGARASHI, 1998).

Outros trabalhos sugerem que os FGF estão envolvidos na foliculogênese, sendo o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF ou FGF-2) um dos fatores mais estudados neste processo. Inicialmente, a expressão gênica do FGF-2 foi detectada em células da granulosa de bovinos em cultivo (NEUFELD et al., 1987; VAN WEZEL et al., 1995). Yamamoto et al. (1997) também localizaram o peptídeo FGF-2 por meio de imunohistoquímica em células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais e antrais humanos. Além disso, ensaios de ligação permitiram a localização de receptores para o FGF-2 em células da granulosa de folículos ovarianos em roedores e bovinos (SHIKONE et al., 1992; WANDJI et al., 1992). Recentemente, em bovinos, a expressão gênica do FGF-2 foi detectada predominantemente em células da teca em níveis crescentes durante a fase final do crescimento folicular (BERISHA et al., 2004).

Além do FGF-2, há evidências de que outros FGF e seus receptores estejam envolvidos no controle do desenvolvimento folicular. São eles: o FGF-1, FGF-7, FGF-8 (abordado separadamente), FGF-9 e o FGF-10.

Em bovinos, o FGF-1 foi detectado em células da granulosa e, predominantemente, em células da teca, porém sua expressão não apresentou

a mesma variação em função dos níveis de estradiol como o FGF-2 (BERISHA et al., 2004).

A expressão gênica e protéica do FGF-7, também conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos-1 (KGF-1), foi detectada em células da teca. Além disso, foi verificado que esse fator induz proliferação de células da granulosa de folículos bovinos em cultivo (PARROT et al. 1994).

Estudos recentes comprovaram a expressão do FGF-7 relativamente alta em células da teca e baixa em células da granulosa, além de detectarem a proteína em células da teca e camada basal da granulosa em folículos *de Graaf*, indicando que o FGF-7 é produzido pelas células da teca e desempenha um papel parácrino importante no controle do desenvolvimento folicular bovino (BERISHA et al., 2004).

O FGF-9 foi recentemente detectado por RT-PCR e confirmado por imunohistoquímica em células da teca de ovários imaturos de ratas (DRUMMOND et al., 2003). Posteriormente, células da granulosa de ovários imaturos de ratas cultivadas foram desafiadas em cultivo com FGF-9 e o aumento da expressão da enzima citocromo P450_{scc}, associado ao aumento de progesterona, sugeriu a participação deste fator durante a esteroidogênese (DRUMMOND et al., 2004).

A expressão gênica do FGF-10, também conhecido como KGF-2, foi recentemente detectada em oócitos e em células da teca de folículos antrais em níveis decrescentes com o aumento da concentração intrafolicular de estradiol (BURATINI et al., 2004a), sugerindo para o FGF-10 o papel de

mediador de sinalização parácrina oriunda do oócito ou da camada da teca alvejando a camada da granulosa.

Os receptores dos FGF (FGFR) são codificados por cinco genes distintos (FGFR-1 a 5) (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Os quatro primeiros receptores descobertos (FGFR-1 a 4) apresentam um domínio quinase intracelular e devem sofrer dimerização e fosforilação 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 geram duas isoformas (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 foi recentemente identificado por dois grupos independentes (SLEEMAN et al., 2001; KIM et al., 2001). Sleeman et al. (2001), além de isolarem o quinto gene codificador dos receptores para os FGF, identificaram dois transcritos alternativos: FGFR-5 γ e β . Curiosamente, este receptor difere dos demais anteriormente descritos por não apresentar o domínio tirosina quinase intracelular. Contudo, em seus domínios extracelulares, todos os resíduos importantes para o acoplamento com ligantes do sistema FGF são conservados. Ensaios biológicos demonstraram que o FGF-2 apresenta afinidade por esse novo receptor. Distintamente, Kim et al. (2001) não observaram ligação significativa entre o FGF-2 e o FGFR-5 em ensaios de ligação.

Em bovinos, a expressão gênica do FGFR-2b foi detectada em níveis crescentes em células da granulosa ao longo do desenvolvimento folicular antral (PARROT et al., 1994; BERISHA et al., 2004). Já o RNAm do FGFR-2c foi detectado tanto em células da granulosa quanto da teca, porém sem sinal de regulação ao longo do desenvolvimento (BERISHA et al., 2004).

A expressão gênica do FGFR-2b e FGFR-2c reforça a participação dos FGF capazes de ativá-los no controle da foliculogênese e já detectados em folículos antrais. São eles: o FGF-1 e o FGF-2 (capazes de ativar o FGFR-2b e FGFR-2c), FGF-7 e FGF-10 (capazes de ativar o FGFR-2b) (ORNITZ et al., 1996).

2.4. Caracterização do sistema FGF-8 e evidências da sua participação no controle do desenvolvimento folicular bovino

O FGF-8 foi inicialmente identificado como um fator de crescimento indutor da produção de andrógenos (AIGF), que induz o crescimento andrógeno-dependente de células tumorais mamárias (TANAKA et al., 1992). Posteriormente, detectou-se a expressão do FGF-8 em sítios que sinalizam e direcionam o crescimento do embrião murino, indicando que este fator de crescimento desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento embrionário em camundongos (CROSSLEY & MARTIN, 1995; GOLDFARB, 1996). Em fetos humanos, a expressão do FGF-8 foi detectada no pulmão e cérebro, mas não no fígado e intestino (WU et al., 1997).

O gene que codifica o FGF-8 apresenta uma estrutura das mais complexas da família dos FGF. Pelo menos quatro éxons substituem o primeiro

éxon, comum à estrutura dos genes que codificam os demais FGF. Em camundongos, arranjos transcricionais alternativos destes quatro éxons levam à formação de oito isoformas da proteína (FGF-8 a-h), que diferem na amina terminal e compartilham a mesma carboxila terminal (CROSSLEY & MARTIN, 1995; MACARTHUR et al., 1995a). Contudo, não há indícios de um controle diferencial da expressão destas diferentes isoformas, já que seus padrões temporal e espacial de expressão mostram-se bastante semelhantes ao longo do desenvolvimento embrionário murino (MACARTHUR et al., 1995a).

A expressão do RNAm do FGF-8 foi detectada inicialmente por “Northern Blotting” no testículo e ovário de camundongos, o que não se repetiu nos demais tecidos adultos não tumorais investigados (MACARTHUR et al., 1995b). Posteriormente, o RT-PCR, por ser uma técnica de maior sensibilidade, permitiu a detecção da expressão do FGF-8 não apenas no testículo e ovário, como também em outros órgãos (coração, cérebro, pulmão, rim e próstata) de ratos adultos (SCHMITT et al., 1996). Contudo, Valve et al. (2000) não observaram a expressão do FGF-8 no ovário humano adulto, apesar de somente três pacientes com idade superior a 40 anos terem sido avaliadas neste estudo.

Para identificar os tipos celulares que expressam o FGF-8 a técnica de hibridização *in situ* foi utilizada no ovário e no testículo. Em cortes histológicos de ovários de camundongos adultos, o RNAm que codifica o FGF-8 foi detectado, exclusivamente, nos oócitos dos folículos pré-antrais e antrais em crescimento. A expressão do FGF-8 não foi detectada em oócitos de folículos primordiais e atrésicos, o que pode estar relacionado com a baixa atividade

metabólica desses folículos em relação àquela dos folículos em crescimento. No que se refere à expressão do FGF-8 no testículo, um sinal intenso de hibridização foi detectado na pré-espermatogônia do décimo quinto ao décimo sétimo dia da vida fetal dos camundongos, coincidindo com a fase de proliferação mitótica das células de Sertoli. No entanto, nenhum sinal de hibridização foi observado no testículo de camundongos adultos (VALVE et al., 1997).

Foi demonstrado que a expressão do FGF-8 em células da linhagem germinativa coincide com a fase de proliferação intensa das células somáticas adjacentes. Nos folículos pré-antrais murinos, enquanto as células da granulosa estão em franca proliferação, os oócitos expressam intensamente o RNAm do FGF-8. Ao contrário, nos folículos primordiais e atrésicos, as células da granulosa apresentam baixa atividade metabólica e proliferativa e os oócitos não expressam RNAm do FGF-8. Analogamente, as células de Sertoli, correspondentes masculinas das células da granulosa, apresentam atividade proliferativa intensa na fase da vida fetal em que é possível detectar-se a expressão gênica do FGF-8 nas pré-espermatogônias (VALVE et al., 1997).

A hipótese de que o FGF-8 participa do controle da foliculogênese e da formação do epitélio seminífero estimulando a proliferação das células da granulosa e das células de Sertoli, respectivamente, é compatível com relatos anteriores que sugeriram que o FGF-8 atua como um fator parácrino mitogênico em tecidos tumorais (TANAKA et al., 1992; LEUNG et al., 1996; SONG et al., 2000) e durante o desenvolvimento embrionário (CROSSLEY & MARTIN, 1995; GOLDFARB, 1996). Além de exercer um efeito mitogênico

sobre as células adjacentes, é possível que o FGF-8 também atue suprimindo a apoptose, como fazem outros membros da família dos FGF (ARAKI et al., 1990; VALVE et al., 1997).

Recentemente, a expressão gênica do FGF-8 foi demonstrada em tecidos fetais bovinos. Graus aparentemente maiores da expressão do FGF-8 foram observados no testículo, ovário e rim, enquanto que graus menores foram detectados na bexiga, glândula adrenal, intestino, fígado e coração. Já em bovinos adultos, a expressão só foi constatada no testículo e ovário. No ovário fetal, a expressão gênica foi detectada nas três classes de folículos pré-antrais. A análise de grupos de folículos pré-antrais obtidos de fetos individualizados revelou maior frequência de expressão em folículos primários e secundários em comparação aos folículos primordiais (BURATINI et al., 2004b).

Costa (2004) verificou a expressão gênica do FGF-8 em parte das amostras de oócitos, células da teca e da granulosa analisadas de folículos antrais bovinos. Em células da granulosa, a frequência da expressão variou com a concentração de estradiol e foi maior em folículos com concentrações entre 5 e 100ng/mL, sugerindo que a expressão do FGF-8 aumenta com o estradiol intrafolicular. Em relação aos tipos celulares, a frequência de expressão do FGF-8 foi maior em células da granulosa do que em células da teca, sugerindo que os mecanismos ativadores da expressão do FGF-8 são mais intensos em células da granulosa do que em células da teca. Os padrões da expressão gênica do FGF-8 sugerem regulação de sua transcrição ao longo do desenvolvimento folicular.

Demonstrou-se que, excetuando o FGF-8a, que parece interagir muito fracamente com os subtipos de receptores dos FGF de 1 a 4, todas as demais isoformas ativam preferencialmente o FGFR-4 e o FGFR-3c e, em menor grau, o FGFR-2c (ORNITZ et al., 1996). Sendo assim, constata-se que além da semelhança quanto aos padrões temporal e espacial de expressão, as isoformas do FGF-8 também apresentam características muito próximas no que se refere à afinidade pelos diferentes subtipos de FGFR.

Os conhecimentos a respeito da localização e ontogenia da expressão gênica dos vários subtipos de FGFR ainda são bastante limitados. Hughes (1997) detectaram por imunohistoquímica o FGFR-4 em tecidos humanos adultos como fígado, pulmão e rim. Mais recentemente, Cancilla et al. (2000) detectaram por RT-PCR a expressão gênica do FGFR-4 e FGFR-3c no testículo de ratos adultos.

Com relação à expressão ovariana, inicialmente, apenas os genes do FGFR-1 e FGFR-2 foram detectados por hibridização *in situ* em células da teca e da granulosa de ratos, enquanto que sinais extremamente fracos foram observados para o FGFR-3 (sem distinção entre as isoformas b e c) e FGFR-4 (ASAKAI et al., 1994). Contudo, posteriormente, o RNAm do FGFR-4 foi detectado por hibridização *in situ* e RT-PCR no ovário de camundongos. A hibridização *in situ* revelou que o FGFR-4 é expresso por células da granulosa de folículos primários e secundários, o que não se repetiu em oócitos, células da teca, células do estroma ovariano e células da granulosa de folículos primordiais. Além disso, sinais residuais da expressão do FGFR-4 foram observados no corpo lúteo jovem, indicando que a expressão deste receptor

deve ser desativada em algum momento posterior à formação dos folículos secundários (PUSCHECK et al., 1997).

Nesse mesmo estudo, a expressão do FGFR-3 (sem distinção entre as isoformas b e c) foi investigada por hibridização *in situ* no ovário de camundongos, porém nenhum sinal foi encontrado. Esses achados são compatíveis com os de Valve et al. (2000) que detectaram o RNAm do FGFR-4, mas não do FGFR-3c em ovários humanos adultos por RT-PCR. Por outro lado, Drummond et al. (2004) detectaram por imunohistoquímica a presença do FGFR-3 em células da granulosa de ovários imaturos de ratas.

Buratini et al. (2004b) verificaram a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 em todos os tecidos fetais bovinos investigados (testículo, ovário, rim, bexiga, glândula adrenal, intestino, estômago, fígado, coração e pulmão) excetuando-se a bexiga. Já em tecidos adultos a expressão do FGFR-3c e FGFR-4 foi detectada no testículo, rim e fígado. Sinais aparentemente muito fracos da expressão do FGFR-3c foram detectados no coração e pulmão, enquanto que para o FGFR-4 o mesmo foi observado somente no pulmão.

Em ovários fetais bovinos, a expressão gênica do FGFR-3c e do FGFR-4 foi detectada em parte das amostras de folículos primordiais, primários e secundários recuperados de fetos individualizados. A frequência de expressão do FGFR-3c foi maior em folículos secundários em relação às outras categorias. Além disso, a frequência de expressão do FGFR-3c foi maior do que a do FGFR-4 em folículos secundários, sendo que a expressão do FGFR-4 só foi observada em fetos positivos para o FGFR-3c e FGF-8. A distribuição das frequências de expressão gênica entre as categorias foliculares pré-antrais

e os padrões distintos de expressão gênica observados em fetos individualizados indicam que a expressão do sistema FGF-8 é regulada ao longo do desenvolvimento folicular pré-antral bovino (BURATINI et al., 2004b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos folículos antrais e tecidos controles

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 matadouro* situado a 50Km de Botucatu-SP e transportados em solução fisiológica a 4°C até o laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP, onde foram cuidadosamente dissecados para a separação dos folículos de 2 a 13mm de diâmetro.

Após dissecação e retirada do estroma ovariano, os folículos de 2 a 4mm de diâmetro foram imersos inteiramente em 1mL de solução Trizol[®] (Invitrogen[®]), homogeneizados (homogeneizador de tecidos Polytron – UltraTurrax/T-25) por 1 minuto em gelo e congelados a -80°C para posterior extração de RNA total. Nos folículos maiores que 5mm de diâmetro, foi realizada a aspiração do fluido folicular com agulha 26G (seringa de 1mL) e congelação do aspirado em freezer (Forma Scientific[®]) 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 minuto, em centrífuga Eppendorf[®]) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. Ao

* Frigorífico Frigol[®] de Lençóis Paulista-SP

pellet de células resultante foi adicionado 1mL de solução Trizol[®] e o procedimento de homogeneização e congelação foi repetido conforme descrito anteriormente.

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[®], homogeneizada e congelada à -80°C.

Como controles positivos da amplificação de fragmentos do FGFR-3c e FGFR-4 por RT-PCR, utilizou-se cérebro e fígado fetais bovinos, respectivamente. Para tanto, fetos bovinos foram obtidos no mesmo matadouro e transportados em gelo até o laboratório, onde fragmentos desses órgãos foram retirados e pesados (Balança Mettler[®]). Aproximadamente 80mg de cada órgão foram transferidos para 1mL de solução Trizol[®], homogeneizados e congelados à -80°C.

3.2. Extração do RNA total

Depois de trituradas e homogeneizadas, as amostras de folículos antrais e tecidos controles foram submetidas ao protocolo Trizol[®] para extração de

RNA total. Este protocolo foi realizado em quatro etapas seqüenciais 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 $200\mu\text{L}$ de clorofórmio para cada 1mL de Trizol[®] 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 $1,5\text{mL}$ – Eppendorf[®]) e acrescida de álcool isopropílico na proporção de $0,5\text{mL}$ de isopropanol para cada 1mL de Trizol[®] 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. Desta forma, dependendo da quantidade de RNA total contido na amostra, pôde-se observar um pellet no fundo do tubo após a centrifugação.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e pelo menos 1mL de etanol a 75% foi acrescido ao tubo para cada 1mL de Trizol[®]

utilizado na homogeneização. A amostra foi lavada com auxílio de agitador (Vórtex®) 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 água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,1%) por meio de repetidas aspirações e ejeções com auxílio de uma pipeta (Gilson®), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600®) e, finalmente, armazenado a - 80°C.

As amostras de RNA total provenientes das células da granulosa, células da teca, folículos de 2 a 4mm e tecidos controle foram dissolvidas em 10, 20, 20 e 30µL de água destilada, respectivamente. A concentração de RNA total destas amostras foi determinada no espectrofotômetro em absorvância de 260nm (BioPhotometer - Eppendorf®).

3.3. Radioimunoensaio

3.3.1. Estradiol

Nos ensaios para dosagem de estradiol utilizou-se o Kit 3ª Geração DSL-39100 (Diagnostic Systems Laboratories®, Inc., Webster, Texas), além de uma curva padrão construída a partir de estradiol liofilizado (Sigma®) e reagentes descritos a seguir:

- PBSg: Tampão a base de salina, fosfato e gelatina (0,02M fosfato de sódio; 0,15M cloreto de sódio; 0,1% de gelatina; 0,01% de azida de

sódio e pH 7,5);

- Estradiol (marcado com I¹²⁵) do Kit (diluído a 50% em PBSg);
- Anticorpo 3^a geração contra estradiol do Kit (produzido em coelho, diluído a 50% em PBSg);
- Líquido de precipitação do Kit – anticorpo (produzido em cabra) contra anticorpo para estradiol (produzido em coelho);
- Estradiol liofilizado Sigma[®] (E-8875) utilizado para construção da curva padrão (o intervalo das concentrações de estradiol utilizado na curva padrão foi de 0,06 a 32pg/tubo).

A concentração de estradiol no fluido folicular variou de acordo com o grau do seu desenvolvimento, assim as diluições das amostras em PBSg variaram entre 1:100 e 1:200.000. Foi necessária uma dosagem prévia para estimar a concentração de cada amostra e, posteriormente, definir a diluição adequada para verificação da concentração de estradiol na fase linear da curva padrão.

3.3.2. Progesterona

Nos ensaios para dosagem de progesterona utilizou-se o Kit DSL-3400 (Diagnostic Systems Laboratories[®], Inc., Webster, Texas), além de uma curva padrão construída a partir de progesterona liofilizada (Sigma[®]) e reagentes descritos a seguir:

- Progesterona (marcada com I¹²⁵) do Kit (diluída a 70% em PBSg);
- Anticorpo contra progesterona (produzido em coelho, diluído a 60% em PBSg);

- Líquido de precipitação – anticorpo (produzido em cabra) contra anticorpo para progesterona (produzido em coelho);
- Progesterona liofilizada Sigma[®] (P-3972) utilizada para construção da curva padrão (o intervalo das concentrações de progesterona utilizado na curva padrão foi de 3,9 a 1000pg/tubo).

Tanto para a dosagem de estradiol, quanto para a de progesterona, os cálculos dos resultados foram feitos por meio do programa Riasmart do contador Cobra-II Gamma da Packard[®]. Todas as dosagens foram feitas em duplicatas. 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 0,05ng/mL para o estradiol e 0,2ng/mL para progesterona.

3.4. 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 atrésicos 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) baseado na classificação de Berisha et al. (2000). Além disso, os folículos foram agrupados em classes baseadas no diâmetro: folículos de 5 a 7, 8 a 10 e >10mm de diâmetro.

Devido à dificuldade técnica para separar os tipos celulares em folículos menores que 5mm, folículos inteiros de 2 a 4mm de diâmetro foram utilizados apenas na análise da expressão gênica do FGFR-4, supondo-se que esta

restringa-se à camada da teca conforme indicaram os resultados em folículos de 5 a 13mm de diâmetro.

Como o FGFR-3c mostrou-se expresso tanto em células da teca quanto da granulosa, sua expressão não foi quantificada em folículos inteiros de 2 a 4mm, já que não seria possível determinar a participação relativa do RNAm presente em cada um dos tipos celulares.

3.5. RT-PCR

Após a extração do RNA total dos tecidos controles e dos folículos antrais, a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 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.

3.5.1. 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 1 μ L de tampão DNase, 1 μ L de DNase I (1U/ μ L) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 μ L de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 μ L 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.

3.5.2. 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 tratada com DNase I (contendo 1µg de RNA total proveniente dos folículos de 2 a 4mm, células da teca, células da granulosa e 2 µg dos tecidos controle), 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 MgCl₂ (25mM), 2µL de DTT (0,1M) e 1µL de “RNaseOUT Inhibitor” (40U/µL). Na seqüência, 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.

3.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do FGFR-3c e FGFR-4 foram delineados com base na seqüência de fragmentos dos genes bovinos, obtidos a partir de amostras de cérebro e fígado fetais, respectivamente, no Centro de Pesquisas em Reprodução Animal (CRRA) da Universidade de Montreal. Em ambos os casos, o oligonucleotídeo iniciador “sense” foi posicionado no terceiro domínio extracelular semelhante à imunoglobulina, região de pouca similaridade entre as isoformas, a fim de que o PCR amplificasse apenas fragmentos das isoformas pretendidas. O oligonucleotídeo iniciador “anti-sense”, por sua vez, foi posicionado no segundo domínio quinase intracelular (Figura 1). As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do FGFR-3c, FGFR-4, GAPDH (gene constitutivo, utilizado como controle interno das reações semiquantitativas), 17 α -Hidroxilase (CYP17) e citocromo P450 aromatase (CYP19) (utilizados nas reações para determinação de contaminação cruzada) são descritas na Tabela 1.

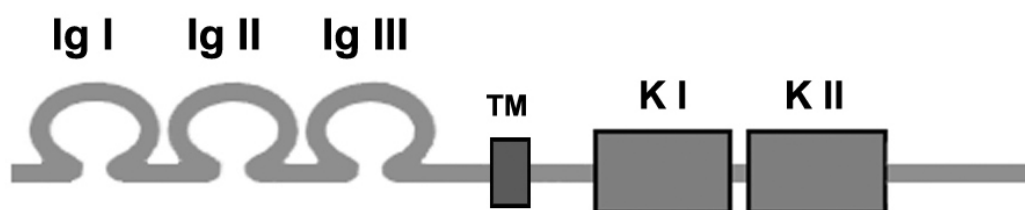


Figura 1 - Estrutura dos genes codificadores dos FGFR 1-4 (Ig I, II e III = domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, TM = domínio transmembrânico, K I e II = domínios quinase intracelulares).

Para a amplificação desses genes utilizou-se o protocolo Invitrogen[®] de reação em cadeia da polimerase (PCR) que iniciou-se pela adição dos reagentes em microtubos estéreis (polipropileno de 200µL - Axygen[®]) descritos a seguir:

Ao produto (cDNA) foi acrescentado: 2,5µL de tampão PCR 10X (fornecido no Kit - Invitrogen[®]); 0,75µL de MgCl₂ (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, anelamento e extensão, específicas para cada gene e descritas a seguir.

Tabela 1- Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, FGFR-3c, FGFR-4, CYP17 e CYP19.

Gene-alvo	Seqüência	Fragmento
GAPDH	S 5' TGT TCC AGT ATG ATT CCA CC 3' A 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG 3'	850pb
FGFR-3c	S 5' GGT GGT GCT GCC AGC T 3' A 5' TAA GTC CTT ATC CGT GGC GT 3'	496pb
FGFR-4	S 5' AAG GCA GGT ACA CGG ACA TC 3' A 5' TAA GCA TCT TGA CAG CCA CG 3'	426pb
CYP17	S 5' GAA TGC CTT TGC CCT GTT CA 3' A 5' CGC GTT TGA ACA CAA CCC TT 3'	330pb
CYP19	S 5' TGC ATG GCA AGC TCT CC 3' A 5' TCC TTA TGT CTC TTT CAC C 3'	370pb

S = “sense”; A = “antisense”; pb = pares de bases

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

a) CYP17

- Quantidade de RNA na transcrição reversa: 1 µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5 µL^{*};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,4 µM;
- Número de ciclos: 30;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1min (extensão).

b) CYP19:

- Quantidade de RNA na transcrição reversa: 1 µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5 µL^{*};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,4 µM;
- Número de ciclos: 30;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 58°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1min (extensão).

^{*} Equivalente a 50ng de RNA da reação de transcrição reversa

As amostras que apresentaram contaminação foram descartadas dos experimentos de quantificação da expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4. Exemplos de amostras não contaminadas são mostradas na Figura 2.



Figura 2 – Géis ilustrativos demonstrando ausência de contaminação entre os tipos de células foliculares. Observa-se a expressão gênica da CYP19 em células da granulosa (CG), mas não em células da teca (CT); e a expressão gênica da CYP17 em CT, mas não em CG.

3.5.3.2. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para FGFR-3c e FGFR-4

Amostras de RNA total provenientes de células da teca e da granulosa positivas para os genes FGFR-3c e FGFR-4 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 (μg) de RNA total foram testadas a fim de selecionar-se quantidade dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica (Figura 3).

O RT-PCR semiquantitativo para o FGFR-3c 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. Já o RT-PCR semiquantitativo para o FGFR-4 foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo GAPDH simultaneamente. 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 µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5 µL^{*};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,16 µM;
- Número de ciclos: 24;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1 min (extensão).

b) FGFR-3c:

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1 µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 1 µL^{**};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,4 µM;
- Número de ciclos: 33;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 65°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1 min (extensão).

^{*} Equivalente a 50ng de RNA da reação de transcrição reversa

^{**} Equivalente a 100ng de RNA da reação de transcrição reversa

c) FGFR-4 / GAPDH:

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1 µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5 µL*;
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: FGFR-4 (0,4 µM) e GAPDH (0,06 µM);
- Número de ciclos: 28;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1min (extensão).

3.6. 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 fotografados com câmera Polaroid® (modelo DS-34) e 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®, by D&R Israel) para posterior realização da densitometria das bandas.

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

3.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR

Fragmentos dos genes FGFR-3c e FGFR-4 amplificados por RT-PCR a partir de células da teca (FGFR-3c e FGFR-4), da granulosa (FGFR-3c) e de tecidos controles (cérebro fetal para o FGFR-3c e fígado fetal para o FGFR-4) foram seqüenciados, comprovando tratar-se dos genes-alvos e descartando uma eventual amplificação inespecífica de produtos com tamanhos coincidentemente iguais aos dos fragmentos esperados. A seqüência do FGFR-4 apresentou 100% de similaridade em relação àquela originalmente obtida a partir de fígado fetal bovino na Universidade de Montreal (Quebec, Canadá; AF170490) e 85% de similaridade em relação a humanos e ratos. Da mesma forma, a seqüência do FGFR-3c foi 100% idêntica àquela produzida na Universidade de Montreal a partir de cérebro fetal, demonstrando 91% e 85% de similaridade em relação a humanos e ratos, respectivamente (AY029187).

Os seqüenciamentos foram realizados no Departamento de Endocrinologia Experimental do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) - UNIFESP em São Paulo e Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista - UNESP (Campus de Araçatuba). Os procedimentos para o seqüenciamento foram os mesmos utilizados por Glapinski (2003).

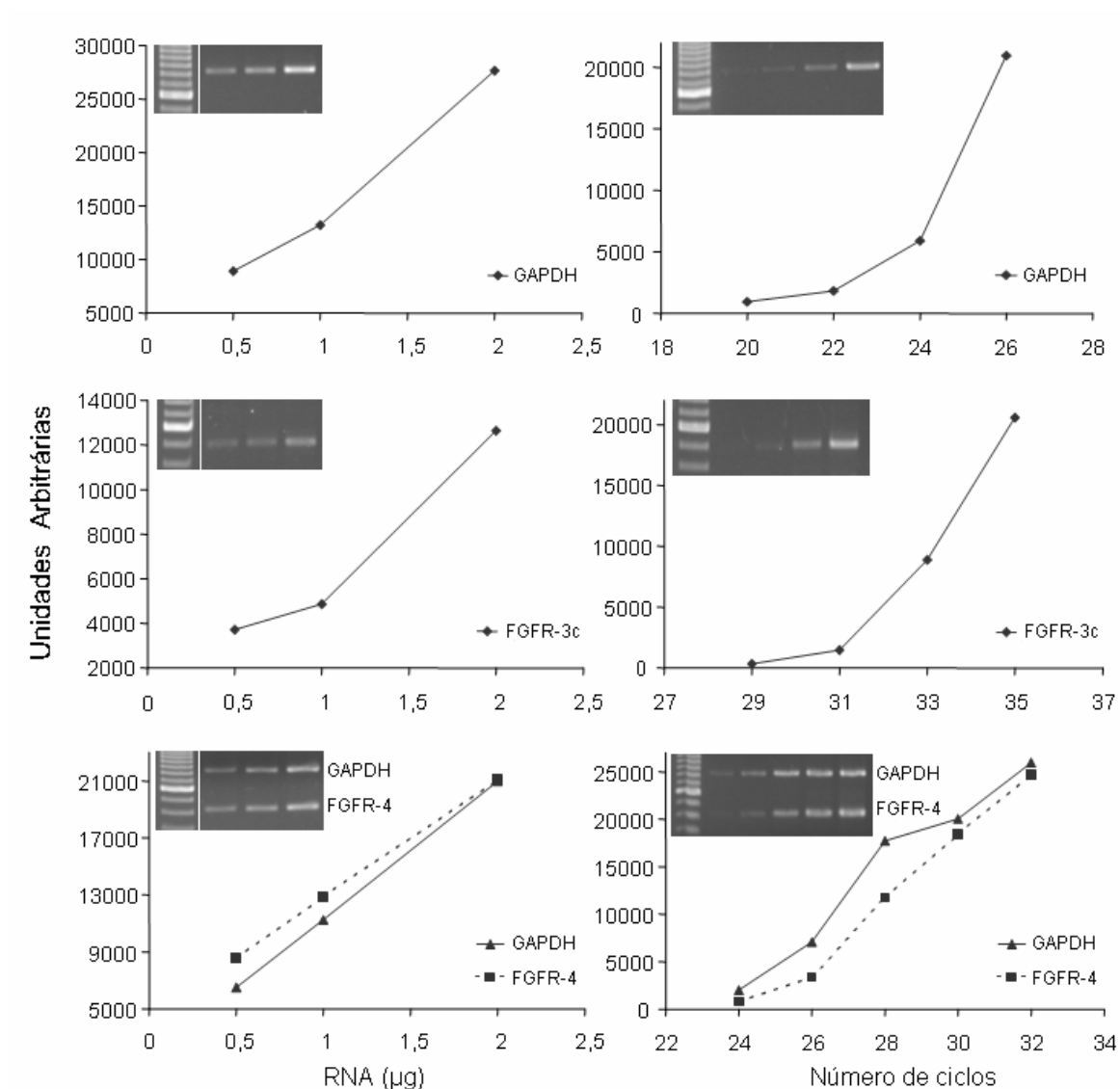


Figura 3 – Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativa para o FGFR-3c e para o FGFR-4, demonstrando que os sinais da expressão dos genes alvo e constitutivo são dependentes da concentração de RNA e do número de ciclos de PCR.

3.8. 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. A correlação linear entre a expressão gênica e o tamanho do folículo ou a concentração de estradiol foi avaliada em dados não transformados utilizando-se o coeficiente r de Spearman. 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[®], versão 3.02 (San Diego, Califórnia - USA, 1998) e o programa JMP[®] (SAS Institute, Cary, NC).

4. RESULTADOS

4.1. FGFR-3c

O RNAm do FGFR-3c foi detectado tanto nas amostras de células da teca como nas de granulosa em folículos de 5 a 13mm de diâmetro (Figura 4).

Em células da granulosa, os níveis de RNAm do FGFR-3c aumentaram significativamente ($P < 0,05$) com o aumento das concentrações intrafoliculares de estradiol (Figuras 4 e 5). Além disso, houve correlação significativa entre os níveis de RNAm do FGFR-3c e as concentrações intrafoliculares de estradiol ($r = 0,66$; $n = 42$; $P < 0,001$).

Quando os folículos foram classificados por diâmetro (mm), observou-se maior expressão ($P < 0,05$) do FGFR-3c em células da granulosa de folículos de 8-10mm em relação a folículos de 5-7mm (Figura 5).

Os níveis de RNAm do FGFR-3c em células da teca não variaram em relação à concentração de estradiol ou diâmetro folicular (Figuras 4 e 5).

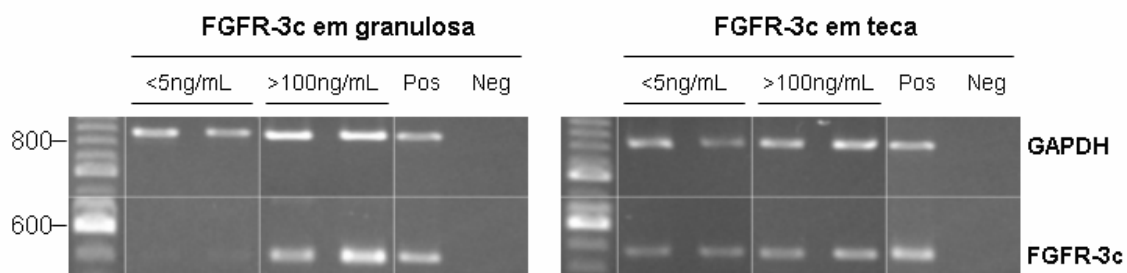


Figura 4 – Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGFR-3c e do GAPDH em células da granulosa e da teca de folículos antrais bovinos com baixa (<5ng/mL) ou alta (>100ng/mL) concentração de estradiol no fluido folicular (Pos = cérebro fetal como controle positivo; Neg = água em substituição ao cDNA como controle negativo).

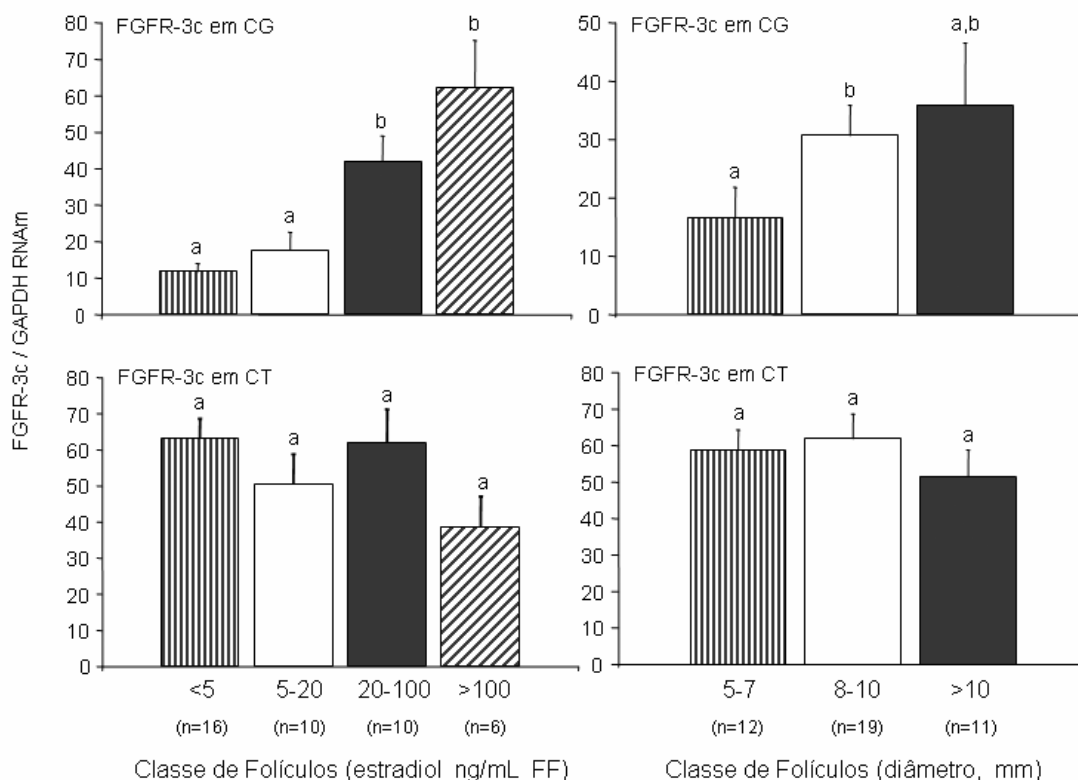


Figura 5 – Níveis relativos de RNAm do FGFR-3c (Média ± EPM) em células da granulosa (CG) e células da teca (CT) de folículos antrais agrupados de acordo com a concentração de estradiol no fluido folicular ou de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa.

4.2. FGFR-4

O RNAm do FGFR-4 foi detectado apenas em células da teca (Figura 6) e seus níveis não variaram com a concentração de estradiol no fluido folicular (Figura 7). Por outro lado, os níveis de RNAm do FGFR-4 diminuíram com o aumento do tamanho dos folículos (Figura 7), sendo que houve correlação negativa entre os valores dos níveis de RNAm e o diâmetro folicular ($r=-0,56$; $n=42$; $P<0,001$).

Quando os folículos inteiros de 2 a 4mm foram incluídos na análise, observou-se que estes expressavam o FGFR-4 em níveis maiores que as demais classes, confirmando a diminuição da expressão com o aumento do tamanho dos folículos (Figura 8).

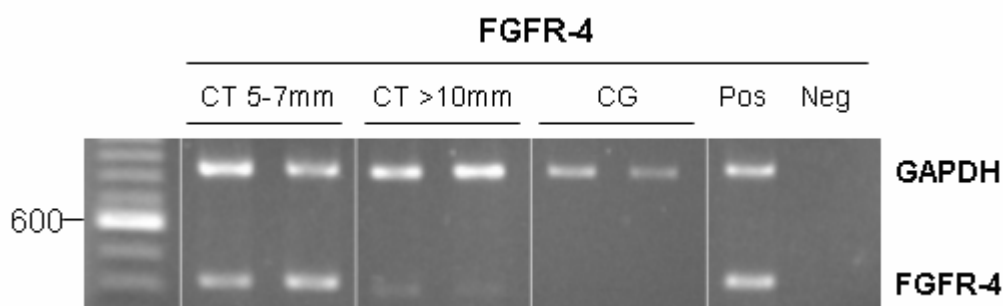


Figura 6 - Géis ilustrativos mostrando a expressão gênica do FGFR-4 e do GAPDH em células da teca de folículos com diâmetro entre 5 e 7mm e maiores que 10mm e ausência da expressão do FGFR-4 em células da granulosa (Pos = fígado fetal como controle positivo; Neg = água em substituição ao cDNA como controle negativo).

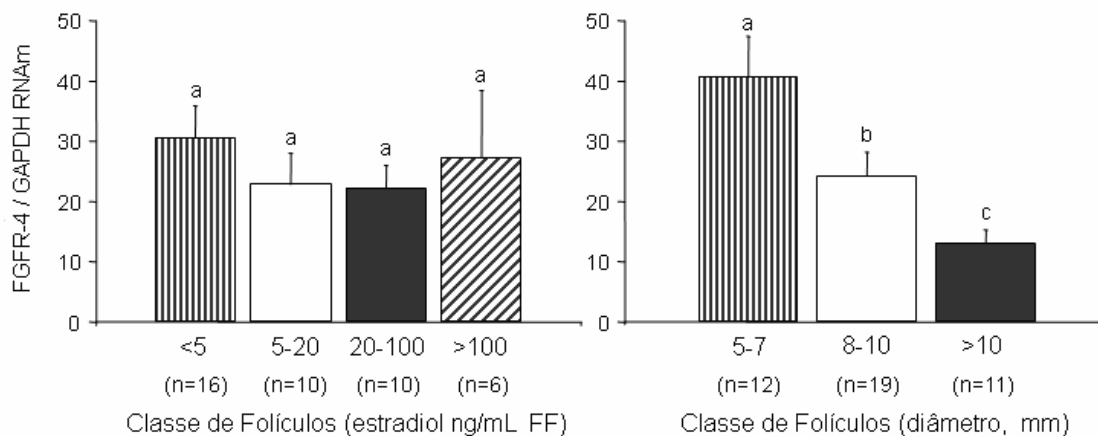


Figura 7 – Níveis relativos de RNAm do FGFR-4 (Média \pm EPM) em células da teca (CT) de folículos antrais agrupados de acordo com a concentração de estradiol no fluido folicular ou de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa.

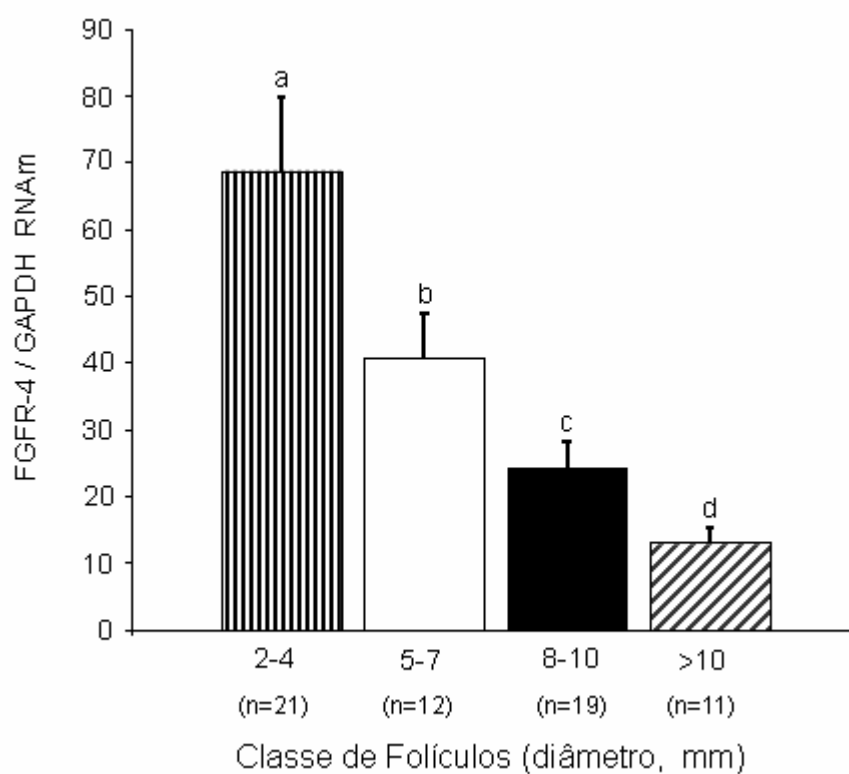


Figura 8 - Níveis relativos de RNAm do FGFR-4 (Média \pm EPM) em células da teca (CT) de foliculos antrais maiores que 2mm agrupados de acordo com o diâmetro folicular. Letras diferentes indicam diferença significativa.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra pela primeira vez a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 em folículos antrais bovinos. Os padrões locais e temporais da expressão de ambos os receptores, determinados por meio da análise de células da teca e da granulosa de folículos antrais com diferentes tamanhos e competência esteroidogênica, indicam regulação da expressão dos respectivos genes ao longo da fase antral do desenvolvimento folicular bovino.

A expressão gênica do FGFR-3c foi detectada tanto nas amostras de células da teca quanto nas de células da granulosa de folículos de 5 a 13mm de diâmetro. A expressão do FGFR-3c em células da teca foi relativamente constante durante o desenvolvimento folicular (baseado no tamanho e na concentração de estradiol do folículo), ao contrário do observado nas células da granulosa, onde a expressão do FGFR-3c aumentou com o tamanho do folículo e com a concentração de estradiol no fluido folicular, evidenciando a regulação da transcrição deste gene durante o crescimento folicular.

Os dados sobre a expressão do FGFR-3c em ovários bovinos obtidos no presente trabalho diferem daqueles obtidos anteriormente em roedores e humanos. Puscheck et al. (1997), utilizando sondas incapazes de distinguir as isoformas b e c, investigaram por hibridização *in situ* a expressão do FGFR-3 em ovários de camundongos, mas não a detectaram. Com a mesma abordagem técnica, Asakai et al. (1994) não observaram sinais claros da expressão gênica do FGFR-3 em ovários de ratas. Além disso, a ausência da expressão do FGFR-3c também foi constatada por RT-PCR em ovários

humanos (VALVE et al., 2000). Por outro lado, o FGFR-3 foi localizado por imunohistoquímica sem distinção entre as isoformas b e c em células da granulosa, mas não em células da teca e oócitos, de camundongos (AMSTERDAM et al., 2001) e em ovários imaturos de ratas (DRUMMOND et al., 2004).

Entretanto, os resultados presentes são compatíveis com a detecção do RNAm do FGFR-3c por RT-PCR em folículos pré-antrais bovinos. A maior frequência da expressão do FGFR-3c em folículos secundários, comparados a primários e primordiais (BURATINI et al., 2004b), sugere ativação da expressão deste gene em estágios avançados da fase pré-antral e, em conjunto com os resultados do presente estudo, um papel preponderante para este receptor durante a fase antral.

Como os dados presentes indicam que a expressão do FGFR-3c é regulada em células da granulosa ao longo do desenvolvimento folicular antral, é de interesse determinar os fatores reguladores deste gene. Estudos funcionais demonstraram que a expressão gênica do FGFR-3c em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro* foi dependente de FSH, mas não de IGF-I (BURATINI et al., 2004c). Nesse sistema de cultivo, níveis máximos da expressão gênica do FGFR-3c foram observados com doses fisiológicas de FSH, enquanto que baixos níveis de expressão foram encontrados com dose supra-fisiológicas do análogo de IGF-I. Estes dados demonstram a importância do FSH no controle da expressão do FGFR-3c, que parece ser regulada de maneira similar a de outros genes FSH-dependentes como o CYP19 e a 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (SAHMI et al., 2004). Portanto é possível que o

FSH sensibilize as células da granulosa à ação dos FGF durante a fase inicial do crescimento antral mediante ativação do FGFR-3c, contribuindo para sustentação do crescimento num ambiente com baixas concentrações de FSH que se segue ao desvio folicular.

Frente a esses dados, o estradiol não parece ser um importante fator regulador da expressão gênica do FGFR-3c em células da granulosa, pois a produção deste esteróide é induzida tanto pelo FSH quanto pelo IGF, ou ainda por ambos simultaneamente em células da granulosa cultivadas *in vitro* (GLISTER et al., 2001). Caso contrário, o tratamento com IGF-I e os decorrentes maiores níveis de estradiol deveriam ter levado a um aumento da expressão gênica do FGFR-3c em células da granulosa cultivadas *in vitro*, o que não foi verificado.

Por outro lado, em células endometriais humanas cultivadas *in vitro* e desafiadas com estradiol, houve um aumento da expressão do FGFR-3c (WING et al., 2003), demonstrando que o estradiol pode ser um fator regulador para este tipo celular. A diferença na regulação da expressão gênica do FGFR-3c pelo estradiol em diferentes tipos celulares (células endometriais e células da granulosa) não deve ser atribuída à ausência de receptores estrogênicos, uma vez que a expressão gênica e protéica do receptor de estradiol foi encontrada em células da granulosa de folículos antrais bovinos (ROSENFELD et al., 1999; SCHAMS et al., 2002). Contudo, diferentes graus de expressão do receptor poderiam justificar essa diferença.

Os efeitos da ativação do FGFR-3c em células da granulosa ainda precisam ser investigados. Contudo, há indícios de que a ativação desse

receptor altere a esteroidogênese. A concentração de progesterona aumentou em cultivo de células da granulosa de ovários imaturos de ratas tratadas com FGF-9, ligante eficaz do FGFR-3c, e este receptor foi detectado por imunohistoquímica nas células do cultivo (DRUMMOND et al., 2004).

A expressão gênica do FGFR-4 foi detectada exclusivamente em células da teca e não variou em relação aos níveis intrafoliculares de estradiol, mas diminuiu com o tamanho dos folículos. Sendo assim, os resultados indicam regulação da expressão do FGFR-4 ao longo do desenvolvimento e sua participação na mediação da ação dos FGF para indução de proliferação ou diferenciação da camada da teca, principalmente durante o início da fase antral do desenvolvimento folicular.

A ausência de variação da expressão gênica do FGFR-4 com a concentração intrafolicular de estradiol indica que este hormônio não desempenha papel regulador importante da transcrição do FGFR-4, o que provavelmente cabe a outros fatores ainda não investigados.

Como a expressão do FGFR-4 não foi detectada em células da granulosa e, portanto, considerando-se que ela ocorre apenas na camada da teca, decidiu-se incluir folículos inteiros de 2 a 4mm de diâmetro na análise da expressão do FGFR-4, a fim de obter um quadro mais amplo sobre o efeito do diâmetro sobre a expressão do FGFR-4. Vale destacar que folículos inteiros de 2 a 4mm de diâmetro foram analisados, uma vez que a separação dos tipos celulares nesses folículos mostrou-se tecnicamente inviável. Essa análise revelou maior expressão do FGFR-4 em folículos com diâmetro entre 2 a 4mm em relação às demais categorias, indicando expressão máxima do FGFR-4 no

início da fase antral e confirmando sua diminuição gradativa com o aumento do tamanho dos folículos.

Por outro lado, a expressão do FGFR-3c não foi investigada nesta classe de folículos, porque seria impossível determinar a participação relativa do RNAm de origem tecal ou das células da granulosa, uma vez que a expressão deste gene foi detectada nos dois tipos celulares.

A análise do padrão de expressão do FGFR-4 em bovinos à luz da literatura também sugere diferenças interespecíficas interessantes. O FGFR-4 não foi encontrado por “Northern Blotting” nem por hibridização *in situ* em ovários de ratas (ASAKAI et al., 1994). Em contrapartida, a expressão do FGFR-4 foi detectada por hibridização *in situ* exclusivamente em células da granulosa em folículos primários e secundários de camundongos (PUSCHECK et al., 1997) e por RT-PCR em ovários humanos (VALVE et al, 2000). Esta constatação, associada às diferenças interespecíficas relativas ao FGFR-3c já abordadas, sugerem padrões espécie-específicos de regulação da expressão dos FGF e seus receptores.

O RNAm do FGFR-4 foi detectado em folículos pré-antrais de ovários fetais bovinos recuperados de fetos individualizados, porém sua expressão somente foi verificada em uma pequena parcela das amostras de folículos primordiais, primários e secundários (BURATINI et al., 2004b). Neste mesmo estudo a freqüência da expressão do FGFR-3c, citado anteriormente, foi predominante em relação ao do FGFR-4 nesta fase do desenvolvimento folicular. Desta forma, a maior expressão do FGFR-4 em folículos de 2 a 4mm em relação aos folículos de maior diâmetro observada no presente trabalho,

combinada à infreqüente expressão do FGFR-4 em folículos pré-antrais indica um papel predominante para o FGFR-4 como mediador no controle do desenvolvimento antral inicial.

O dados presentes sobre expressão do FGFR-3c e FGFR-4 são inéditos em bovinos, mas a literatura dispõe de informações sobre outros FGFR nessa espécie. Berisha et al. (2004), verificaram a expressão gênica do FGFR-2b e FGFR-2c em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. A expressão do FGFR-2b aumentou em células da granulosa com a concentração de estradiol no fluido folicular. Em células da teca, o FGFR-2b também se mostrou expresso, mas sem sinais de variação com concentração de estradiol, configurando um padrão de expressão semelhante ao observado no presente trabalho para o FGFR-3c. Com relação à expressão gênica do FGFR-2c, níveis relativamente altos foram relatados tanto para células da teca quanto da granulosa, porém sem sinais de regulação.

Apesar da semelhança entre os padrões de expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-2b em folículos antrais, eles não compartilham os mesmos ligantes (ORNITZ et al., 1996), o que não garante que eles sejam ativados simultaneamente. Já o FGFR-2c e FGFR-3c têm ligantes em comum (FGF-2, FGF-4, FGF-8 e FGF-9) (ORNITZ et al., 1996), sugerindo ativação simultânea e combinação de suas ações intracelulares no controle das camadas da teca e da granulosa. Contudo, não há dados disponíveis sobre efeitos específicos da ativação de diferentes FGFR no folículo ovariano.

A questão sobre quais ligantes de fato ativam o FGFR-3c e o FGFR-4 no folículo ovariano permanece para ser elucidada. Além do FGF-8, o FGF-1,

FGF-2, FGF-4, FGF-9 e FGF-13 também ativam eficientemente tanto o FGFR-3c quanto o FGFR-4 (ORNITZ et al., 1996; GREENE et al., 1998). Dentre eles, apenas o FGF-1, FGF-2, e FGF-8 foram investigados em folículos antrais bovinos.

Resultados recentes reforçam a hipótese da participação do FGFR-3c e FGFR-4 na regulação da foliculogênese mediante ativação do FGF-8. Além de ser expresso nas três categorias de folículos pré-antrais (BURATINI et al., 2004b), o RNAm do FGF-8 foi detectado em células da teca, da granulosa e em oócitos de folículos antrais bovinos (COSTA, 2004). A análise da distribuição dos sinais da expressão do FGF-8 indicou maior frequência em células da granulosa de folículos com níveis intermediários de estradiol (5 a 100ng/mL) em comparação aos folículos com níveis inferiores (<5ng/mL) ou superiores (>100ng/mL) de estradiol, sugerindo um aumento na expressão do FGF-8 com o aumento do estradiol intrafolicular, sendo posteriormente inibida em folículos altamente estrogênicos (>100ng/mL). Portanto, o padrão da expressão gênica do FGF-8, associado aos dados presentes sobre seus receptores, sugere um papel importante para este gene como regulador parácrino e/ou autócrino ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos.

A expressão do FGF-1 e FGF-2 foi detectada predominantemente em células da teca (BERISHA et al., 2004). Além disso, o FGF-2 foi localizado por imunohistoquímica predominantemente na camada da teca e o FGF-1 na camada da granulosa (BERISHA et al., 2000 e 2004). Contudo, apenas os níveis de RNAm do FGF-2 aumentaram com a concentração intrafolicular de

estradiol de forma semelhante ao padrão de expressão do FGFR-3c em células da granulosa observado no presente estudo. Sendo assim, os resultados presentes corroboram a hipótese sugerida por Berisha et al. (2004) de que os FGF estão envolvidos no processo de foliculogênese, especialmente no controle do crescimento final de folículos dominantes pré-ovulatórios pela estimulação da angiogênese, sobrevivência e proliferação das células da granulosa.

Em conjunto, os resultados presentes sugerem a participação do FGFR-3c no controle da camada da teca e, especialmente, da camada da granulosa de folículos dominantes após o desvio folicular. Já o padrão de expressão do FGFR-4 sugere sua participação na regulação da camada da teca durante o início da fase antral do desenvolvimento folicular bovino.

6. CONCLUSÕES

- A expressão do FGFR-3c e FGFR-4 varia ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos;
- O RNAm do FGFR-3c é expresso em células da teca e da granulosa e o RNAm do FGFR-4 em células da teca de folículos antrais bovinos;
- Os níveis de RNAm do FGFR-3c aumentaram com a concentração de estradiol no fluido folicular e com o diâmetro folicular em células da granulosa, confirmando a hipótese de regulação da expressão deste gene ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos;
- Os níveis de RNAm do FGFR-4 diminuíram com o aumento do diâmetro folicular em células da teca, confirmando a hipótese de regulação da expressão deste gene ao longo do desenvolvimento folicular antral em bovinos;
- O padrão da expressão gênica do FGFR-3c indica sua participação no controle da camada da teca e, especialmente, da camada da granulosa em folículos dominantes após o desvio;
- O padrão da expressão gênica do FGFR-4 indica sua participação no controle da camada da teca durante o crescimento antral inicial.

7. 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.
- ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M.H., BENECCHI, E., CARABATSOS, M.J.
Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-53, 2001.
- AMSTERDAM, A., KANNAN, K., GIVOL, D., YOSHIDA, Y., TAJIMA, K., DANTES, A.
Apoptosis of granulosa cells and female infertility in achondroplastic mice expressing mutant fibroblast growth factor receptor 3G374R. **Mol. Endocrinol.**, v.15, p.1610-23, 2001.
- ARAKI, S., SHIMADA, Y., KAJI, K., HAYASHI, H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.29, p.1194-200, 1990.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-71, 1997.
- BURATINI JR., J., PINTO, M.G.L., GIOMETTI, I.C., COSTA, I.B., TEIXEIRA, A.B., BARROS, C.M., PRICE, C.A. Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) gene expression in bovine antral follicles. **Biol. Reprod.**, v. esp., p.269, 2004a (Abstract).
- 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, 2004b.
- 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. 2004c (trabalho não publicado).

- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fertil.**, v.55, p.27-36, 1979.
- CAMPBELL, B.K., TELFER, E.E., WEBB, R., BAIRD, D.T. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.163, p.131-9, 2000.
- CANCILLA, B., DAVIES, A., FORD-PERRIS, M., RISBRIDGER, G.P. Discrete cell- and stage-specific localization of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. **J. Endocrinol.**, v.164, p.149-59, 2000.
- COSTA, I.B. **Expressão gênica do fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF-8) em folículos antrais bovinos.** Botucatu, 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- 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.
- CROSSLEY, P.H., MARTIN, G.R. The mouse FGF8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. **Development**, v.121, p.439-51, 1995.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.
- DRUMMOND, A.E., DYSON, M., FINDLAY, J.K. FGF9 stimulates ovarian progesterone production. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, suppl., p.218, 2004 (Abstract).
- DRUMMOND, A.E., SU, K., TELLBACH, M., BRITT, K., FINDLAY, J.K. FGF9: a male sex-determining factor identified in the ovary. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.15, suppl., p.90, 2003 (Abstract).

- ELVIN, J.A., YAN, C., MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.25, p.1-5, 2000.
- ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biol. Reprod.**, v.15, p.555-60, 1976.
- FAIR, T., HULSHOF, S.C., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.208-15, 1997.
- 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.
- FISCHER, S., DRAPER, B.W., NEUMANN, C.J. The zebrafish FGF-24 mutant identifies additional level of FGF signaling involved in vertebrate fore limb initiation. **Development**, v.130, p.3515-24, 2003.
- 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.
- 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., KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v.42, p.987-1001, 1994.
- 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.
- GOLDFARB, M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.7, p.311-25, 1996.
- 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.

- GORE-LANGTON, R.E., ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.571-628.
- GREENE, J.M., LI, Y.L., YOUREY, P.A., GRUBER, J., CARTER, K.C., SHELL, B.K., DILLON, P.A., FLORENCE, C., DUAN, D.R., BLUNT, A., ORNITZ, D.M., RUBEN, S.M., ALDERSON, R.F. Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. **Eur. J. Neurosci.**, v.10, p.1911-25, 1998.
- GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I., WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1322-8, 2000.
- HERTING, A.T., ADAMS, E.C. Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. **J. Cell. Biol.**, v.34, p.647-75, 1967.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Rev. Citol.**, v.124, p.43-101, 1991.
- HUGHES, S.E. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, v.45, p.1005-19, 1997.
- 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.
- 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.

- 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.
- LEUNG, H.Y., DICKSON, C., ROBSON, C.N., NEAL, D.E. Over-expression of fibroblast growth factor-8 in human prostate cancer. **Oncogene**, v.12, p.1833-5, 1996.
- LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3615-26, 1992.
- LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.301-7, 1987.
- MACARTHUR, G.A., LAWSHÉ, A., XU, J., CAMPOS-OCAMPO, S., HEIKINHEIMO, M., CHELLAIAH, A., ORNITZ, D.M. FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. **Development**, v.121, p.3603-13, 1995a.
- MACARTHUR, G.A., SHANKAR, D.B., SHACKLEFORD, G.M. FGF-8, activated by proviral insertion, cooperates with the WNT-1 transgene in murine mammary tumorigenesis. **J. Virol.**, v.69, p.2501-7, 1995b.
- 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.

- MCGRATH, S.A., ESQUELA, A.F., LEE, S. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor 9. **Mol. Endocrinol.**, v.9, p.131-6, 1995.
- 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., 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., BOSCH, M., PISSELET, C., MONGET, P., MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.51, suppl., p.3-23, 1997.
- NEUFELD, G., FERRARA, N., SCHWEIGERER, L., MITCHELL, R., GOSPODAROWICZ, D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. **Endocrinology**, v.121, p.597-603, 1987.
- 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.
- 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.
- 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.
- PARROT, J.A., VIGNE, J.L., CHU, B.Z., SKINNER, M.K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratynocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their actions on granulosa cells. **Endocrinology**, v.135, p.569-75, 1994.

- PRICE, C.A. The control of FSH secretion in the larger domestic species. **J. Endocrinol.**, v.131, p.177-84, 1991.
- PUSCHECK, E.E., PATEL, Y., RAPPOLEE, D.A. Fibroblast growth factor receptor (FGFR-4), but not FGFR-3c is expressed in the pregnant ovary. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.132, p.169-76, 1997.
- 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.
- ROSENFELD, C.S., YUAN, X., MANIKKAM, M., CALDER, M.D., GARVERICK, H.A., LUBAHN, D.B. Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor- β within the ovarian follicle. **Biol. Reprod.**, v.60, p.691-7, 1999.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3v.
- SAHMI, M., NICOLA, E.S., SILVA, J.M., PRICE, C.A. Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.223, p.43-54, 2004.
- SCHAMS, D., BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.23, p.53-65, 2002.
- SCHMITT, J.F., HEARN, M.T.W., RISBRIDGER, G.P. Expression of fibroblast growth factor-8 in adult rat tissues and human prostate carcinoma cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.57, p.173-8, 1996.

- SHIKONE, T., YAMOTO, M., NAKANO, R. Follicle stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.131, p.1063-8, 1992.
- 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.
- SIMON, A.M., GOODENOUGH, D.A., LI, E., PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v.385, p.525-9, 1997.
- SIRARD, M.A., DUFORT, I., COENEN, K., TREMBLAY, K., MASSICOTTE, L., ROBERT, C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction**, v.61, suppl., p.117-29, 2003.
- 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.
- SMITH, P., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., MacNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the FecB gene. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.485-90, 1994.
- SONG, Z., POWELL, W.C., KASAHARA, N., VAN BOKHOVEN, A., MILLER, G.J., ROY-BURMAN, P. The effect of fibroblast growth factor 8, isoform b, on the biology of prostate carcinoma cells and their interaction with stromal cells. **Cancer Res.**, v.60, p.6730-6, 2000.

- 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.
- SUNDERLAND, S.J., CROWE, M.A., BOLAND, M.P. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.101, p.547-55, 1994.
- TANAKA, A., MIYAMOTO, K., MINAMINO, M., TAKEDA, M., SATO, B., MATSUO, H., MATSUMOTO, K. Cloning and characterization of androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p.8928-32, 1992.
- TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777-82, 2001.
- VALVE, E., MARTIKAINEN, P., SEPPÄNEN, J., OKSJOKI, S., HINKKA, S., ANTTILA, L., GRENNAM, S., KLEMI, P., HÄRKÖNEN, P. Expression of fibroblast growth factor (FGF)-8 isoforms and FGF receptors in human ovarian tumors. **Int. J. Cancer**, v.88, p.718-25, 2000.
- 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 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.

- WANDJI, S.A., PELLETIER, G., SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v.47, p.807-13, 1992.
- 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.
- WING, L.Y., CHUANG, P., WU, M., CHEN, H., TSAI, S. Expression and mitogenic effect of fibroblast growth factor-9 in human endometriotic implant is regulated by aberrant production of estradiol. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, p.5547-54, 2003.
- WU, J., PAYSON, R.A., LANG, J.C., CHIU, I. Activation of fibroblast growth factor 8 gene expression in human embryonal carcinoma cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.62, p.1-10, 1997.
- YAMAMOTO, S., KONISHI, I., NAMBU, K., KOMATSU, T., MANDAI, M., KURODA, H., MATSUSHITA, K., MORI, T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. **Gynecol. Endocrinol.**, v.11, p.223-30, 1997.
- YANG, X., KUBOTA, C., SUZUKI, H., TANEJA, M., BOLS, P.E.J., PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. **Theriogenology**, v.49, p.471-82, 1998.