

## **EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 13 NO CORPO LÚTEO BOVINO.** Namíbia Aparecida Teixeira, José Buratini Junior , Anthony C. S. Castilho, Inês C. Giometti, Isabela B. Costa, Mariana F. Machado - Reprodução Animal - Zootecnia – Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências- Campus de Botucatu.

A otimização da exploração do potencial reprodutivo das fêmeas superiores ou de espécies ameaçadas requer uma compreensão mais ampla da fisiologia folicular e luteal. Sabe-se que as gonadotrofinas desempenham um papel chave na regulação destes processos, mas fortes evidências indicam também a participação de fatores de crescimento em vias parácrinas e autócrinas (Fortune et al., 2001; Salli et al., 1998). O desenvolvimento luteal tem início com a ovulação a partir do pico pré-ovulatório de LH decorrente da maior pulsatilidade do GnRH que é estimulada pela intensificação da secreção de estradiol pelo folículo dominante diante de níveis reduzidos de progesterona (Karsch et al., 1979). O corpo lúteo (CL) é considerado uma glândula endócrina transitória, que tem como produto secretório primário a progesterona (Juengel & Niswender, 1999). O CL rapidamente se desenvolve a partir da parede do folículo rompido, o que requer alta atividade vascular e mitótica, além de expressiva reorganização tecidual e diferenciação celular (Acosta et al., 2004; Guraya, 1971). A formação de uma extensa rede de capilares é fundamental para a nutrição e manutenção da alta atividade metabólica e secretória dessa glândula transitória, sendo a angiogênese proporcionada pela proliferação e migração ordenada de células endoteliais (Reynolds et al., 1992). Os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) desempenham papel importante como indutores de proliferação e diferenciação celular durante toda vida (Igarashi et al., 1998). Dentre eles, o mais estudado no CL é o FGF-2 (FGF básico), sendo considerado, juntamente com os fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGFs), um dos principais reguladores locais (Favier et al., 2001; Plendl et al., 2000, Gospodarowicz et al., 1986; Grazul-Biska et al., 1995). Fortes evidências indicam a participação do FGF-2 como elemento mediador de interações químicas entre os tipos celulares que constituem o CL (Stirling et al., 1991; Redmer & Reynolds, 1996). No entanto outros FGFs estão presentes no ovário. Salli et al (1998) detectaram a expressão gênica e proteica do FGF-7 (KGF-I) durante todas as fases do desenvolvimento luteal bovino sem sinais de regulação. Cinco genes distintos codificam receptores para FGFs (FGFR1-5; Ornitz et al., 1996). Recentemente, a expressão gênica do FGFR-3c e FGFR-4 foi detectada ao longo do desenvolvimento luteal em nosso laboratório (dados não publicados). O FGF-13, também conhecido como fator homólogo aos FGFs 2 (FHF-2), ativa preferencialmente o FGFR-3c e o FGFR-4, está envolvido no controle da proliferação e diferenciação neuronal (Greene et al., 1998), mas ainda não foi investigado no ovário. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a expressão do RNAm do FGF-13 em distintas fases do desenvolvimento do CL bovino.

Ovários foram obtidos em matadouro e transportados em solução fisiológica gelada até o laboratório, onde foram dissecados e os CLs separados e classificados em quatro estágios, levando em consideração coloração externa, presença ou não de vasos sanguíneos na superfície, presença de epitélio recobrimo o ponto de ruptura, grau de protusão e tamanho (Ireland et al., 1980). Dez corpos lúteos foram selecionados para cada estágio de desenvolvimento. Fragmentos de 50 a 100 mg de tecido luteal foram imersos em 1ml de solução Trizol (Invitrogen) e triturados em homogenizador de tecidos. O RNA total foi extraído conforme o protocolo Trizol (Invitrogen). As amostras de RNA foram tratadas com DNase conforme as instruções do protocolo DNase I- Amplification Grade (Invitrogen). A expressão do RNAm que codifica o FGF-13 foi investigada por RT-PCR. A reação de transcrição reversa foi realizada com o “kit” SuperScript III (Invitrogen), 1 ug de RNA total e “primer” oligoDT. Como controle interno do RT-PCR foi utilizado o gene constitutivo GAPDH (“primer sense”: 5’ tgt tcc agt atg att cca cc 3’; “primer antisense”: 5’ tcc acc acc ctg ttg ctg 3’). Cérebro fetal foi utilizado com controle positivo para amplificação de fragmento do FGF-13, que utilizou “primers” delineados a partir das seqüências de humanos, ratos e camundongos (“primer sense”: 5’ tgt gct gta ctt tgt gcg tag a 3’; “primer antisense”: 5’ ttc ttc cat gca aca gat atg aa 3’). A PCR foi realizada com 0,5µl de cDNA em uma solução contendo 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4µM de “primers” específicos, 0,2mM de dNTPs e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, num volume total de 25µl. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos e submetidas a ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 70°C por 1 minuto. Água em substituição ao cDNA foi utilizada como controle negativo no PCR. O RT-PCR semi-quantitativo foi validado através da escolha de concentração de RNA, volume de cDNA e número de ciclos de PCR dentro da fase de incremento exponencial da reação. O número de ciclos determinado para

amplificação do FGF-13 e GAPDH, foi 31 e 24, respectivamente. Os produtos da PCR foram separados e visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e as imagens foram digitalizadas utilizando-se o sistema Image Master VDS (Pharmacia Biotech, D&R Israel). O efeito do estágio de desenvolvimento sobre a expressão gênica do FGF-13 foi testado por ANOVA.

A expressão do FGF-13 foi detectada em todas as amostras de CL (Fig. 1) e não diferiu entre os quatro estágios do desenvolvimento luteal ( $p>0,05$ ). Os valores médios (RNA<sub>m</sub> FGF-13/GAPDH) foram  $63,04 \pm 35,65$  ( $n=10$ );  $70,04 \pm 30,21$  ( $n=10$ );  $80,69 \pm 35,26$  ( $n=10$ ); e  $72,12 \pm 42,03$  ( $n=10$ ) para os estágios 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Fig. 2). Mediante a obtenção de CLs em diferentes estágios de desenvolvimento caracterizados morfológicamente e emprego da técnica RT-PCR semiquantitativo, o presente trabalho demonstra pela primeira vez a expressão do FGF-13 no CL bovino. Embora os presentes dados não indiquem regulação da expressão gênica do FGF-13 durante o desenvolvimento luteal, a presença do RNA mensageiro que o codifica, sugere um possível papel do FGF-13 como regulador da atividade celular no CL. Esta hipótese é compatível com estudos anteriores que demonstraram que o FGF-13 causa aumento no número de neurônios corticais e estimula sua diferenciação (Greene et al., 1998).

#### BOLSA: FAPESP

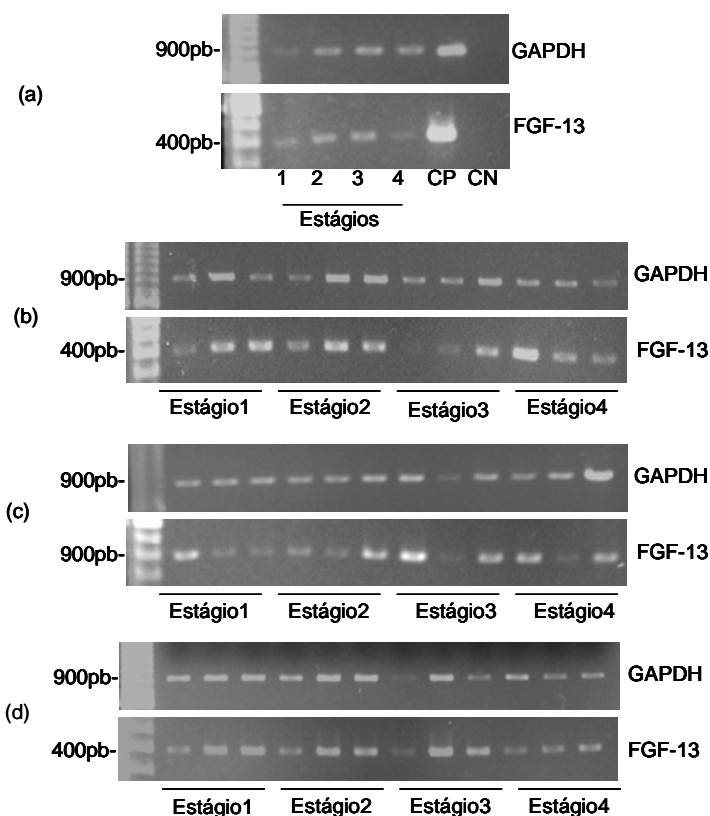


Fig.1: Expressão gênica do GAPDH e do FGF-13 em CLs bovinos (CP= controle positivo: cérebro fetal, CN=controle negativo: água em substituição ao cDNA; pb=pares de bases).

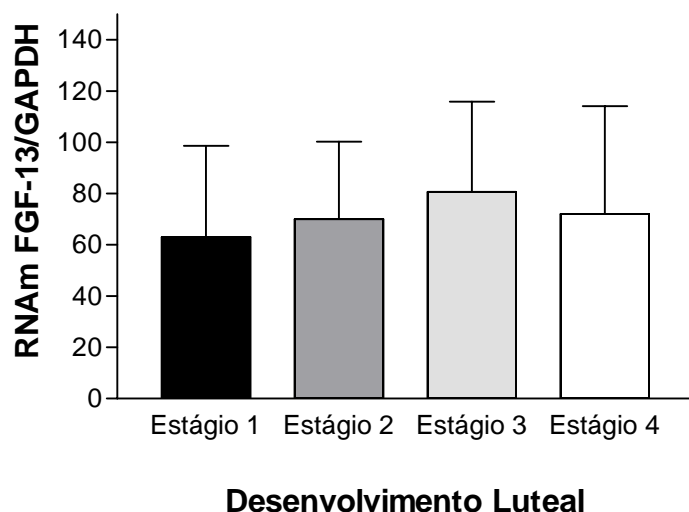


Fig. 2: Valores relativos da expressão gênica do FGF-13 (média±EPM) durante o desenvolvimento luteal bovino.

## BIBLIOGRAFIA:

Acosta, T.J., Miyamoto, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Reproduction*, v.82-83, p.127-140, 2004.

Favier J, Corvol P. Physiological angiogenesis. *Therapie*, v. 56, p. 455-463, 2001.

Fortune, J.E. Selection and maintenance of the dominant follicle: an introduction. *Biol. Reprod.*, v.65, p.637, 2001.

Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J. Human fibroblastic growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo j.*, v. 5, p. 2523-2528, 1986.

Grazul-Bilska, Redmer, D.A., Jablonska-Shriff A., Biondini, M.E., Reynolds, L.P. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 73, p. 491-500; 1995.

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.

Guraya, S.S. Morphology, histochemistry and biochemistry of human ovarian compartments and steroid hormone synthesis. *Physiol. Ver.*, v.51, p.785-807, 1971.

Igarashi, M., Finch, P. W., Aaronson, S. A., Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.*, v.273, p. 13230-13235, 1998.

Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by cross appearance of corpus luteum, *J. Dairy Science*, v. 63, p. 155-160, 1980.

Juengel, L.J., Niswender, G.D. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic animals. *J. Reprod. Fertile. Suppl.*, v.54, p.193-205, 1999.

Karsch, F.J., Foster D. L., Legan S.J., Ryan K.D., Peter G.K. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone and luteinizing hormone. *Endocrinology*, v.105, p.421-426, 1979.

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.

Plendl, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat. Hist. Embryol.*, v. 29, p. 257-266, 2000.

Redmer, D., Reynolds, L.P. Angiogenesis in the ovary. *J. Repro. Fer.*, v.1, p.182-192, 1996.

Reynolds, L.P., Killilea, S. Redmer, D.A . Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.*, v. 6, p. 886-892, 1992.

Salli, U., Bartol, F. F., Wiley, A. A., Tarleton, B. J., Braden, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, v.59, p.77-83, 1998.

Stirling, D., Waterman, M.R., Simpson, E.R. Expression of mRNA encoding basic fibroblastic growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fertil.*, v. 91, p. 1-8, 1991.