CAROLINA DO PRADO

Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em
diferentes estágios do ciclo estral

São Paulo

2004

CAROLINA DO PRADO

Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes
estágios do ciclo estral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1448
FMVZ

Prado, Carolina do
Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes
estágios do ciclo estral / Carolina do Prado. – São Paulo : C. Prado, 2004.
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Glândulas endócrinas. 2. Búfalos. 3. Fatores de crescimento.
4. Imuno-histoquímica. 5. Tratamento superovulatório. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

PARECER

Interessado: Carolina do Prado

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 570/2004, intitulado: "Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral", no qual foram utilizados 12 bovinos (peças de matadouro), sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Paula de Carvalho Papa, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 16 de novembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PRADO, Carolina do

Título: Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Alguns planos que tracei deram errado.
Outros deram até mais certo do que eu esperava.
A vida é assim mesmo: dias de muito, dias de nada.*

*Alguns problemas eu superei.
Outros me superaram.
Os que ficaram têm me ensinado que são gigantes apenas quando lhes dou uma
importância exagerada.*

*Algumas batalhas eu ganhei com honra ao mérito.
Outras eu precisei perder.
Por incrível que pareça foi muito bom descobrir que não sou invencível.*

*Alguns amigos vieram para ficar.
Outros me conquistaram, se fizeram imprescindíveis e partiram.
Conviver com a saudade é o preço por ter conhecido e convivido com pessoas tão
essenciais e especiais.*

*Alguns dias foram de sol, de extremo calor.
Outros foram de frio, chuva e muita neblina.
Isso me ensinou a dirigir com cuidado para evitar acidentes.*

*Alguns trechos do caminho estiveram sempre iluminados.
Outros eram de escuridão profunda.
Hoje eu não tenho mais medo do escuro porque o enfrentei e vi que nele não havia
nenhum bicho papão.*

*Algumas pontes da vida eu percorri cantando e de pé.
Outras eu atravessei em prantos e rastejando.
Que diferença faz se eu estava de pé, curvada ou no chão?
O importante foi ter atravessado cada uma delas e TER CHEGADO ATÉ AQUI...*

*À minha **vovó Clarinha** por não medir esforços para fazer de mim o alguém que sou hoje*

*Ao meu **vovô Sylvio** (in memoriam) pela constante “presença”*

*À minha **vovó Irene** pelo contínuo encorajamento de seguir sempre em frente*

*Ao meu **vovô Izidoro** pelo exemplo de vida e dignidade*

*Aos meus pais **Daisy** e **Isidoro** pelo amor sem limites*

*Aos meus irmãos **Vinicius**, **Mariana**, **Anna** e **Gabriel** simplesmente pelo fato de existirem*

*Ao meu namorado **Marlon** por fazer parte da minha vida e dos meus sonhos*

DEDICO

A Deus por iluminar meus caminhos

*À minha orientadora Prof^{ta}. **Paula de Carvalho Papa** pela amizade, confiança, oportunidade e ensinamentos a mim compartilhados*

*À Prof^{ta}. Dr^a. **Maria Angélica Miglino** pela oportunidade concedida*

*Ao Prof. **Pedro Primo Bombonato** pelas incansáveis conversas extra-classe e principalmente por ter acreditado que eu tinha jeito*

*Ao Prof. **José Roberto Kfoury Jr.** e Prof. **Francisco Hernandez Javier Blasquez** por disponibilizarem seus laboratórios*

*Aos professores **Luciano Ricardo Marcondes da Silva**, **Sérgio Antonio Moassab Melhem**, pela amizade, incentivo e confiança*

*À **Universidade de Taubaté**, nas pessoas de: Prof. **Nivaldo Zolner**, Prof. **José Carlos Simões Florençano** e Prof. **Nilson Frando Martins** pelo incondicional apoio na impressão dos exemplares*

Aos familiares pela extrema paciência nos inúmeros momentos de mal-humor e por entenderem minha ausência

*A todos os amigos que se fizeram ímpares na execução deste trabalho, quer seja com palavras de incentivo quer pondo realmente a mão na "massa", em especial: **Gerson**, "**Dudu**", "**Hill**", "**Emmo**", "**Li**", "**Jana**", "**Maria Rita**", "**Rose**", "**Cris**", **Rodrigo**, "**Rafa**", "**Sch**", "**Dedeco**", "**Fê**", **Flávio**, "**Naia**", **Karina**, "**Cadu**", "**Laurinha**", "**Thi**", "**Edu**", "**Garbelo**", "**Drica**" e "**Tati**"*

Aos amigos de Taubaté (ou não!) que mesmo de longe torceram por mim

*A todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, em especial: "**Índio**", "**Jaque**", **Maicon**, "**Paulinha**", "**Aninha**", "**Vandinha**", "**Lele**", **Ronaldo** e **Diogo**, pela amizade e ajuda sempre que necessária*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais um sonho

Meu eterno MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

PRADO, C. **Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral.** [Immunolocalization of the bFGF in corpus luteum of buffalos in different stages of the estrous cycle]. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória cuja formação e manutenção são dependentes da angiogênese. O bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) é um dos mais importantes fatores de crescimento angiogênicos no corpo lúteo que, além de possuir propriedades mitogênicas, modula a diferenciação e migração celular. Recentes estudos sugerem a participação desse fator como modulador local de funções nas células luteínicas. Sendo assim, objetivou-se caracterizar a expressão da proteína e do mRNA do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral e também em búfalas superovuladas em fase luteínica média. Foram utilizados corpos lúteos (CLL) de 15 búfalas, os quais foram divididos em cinco grupos: corpo hemorrágico (CH), corpo lúteo maduro (CL), CL em regressão (CR), corpo *albicans* (CA) e corpo lúteo de animais superovulados (CS). As amostras foram fixadas em formol tamponado a 4%, depois desidratadas em uma série de etanol com concentrações crescentes e incluídas em Histosec[®]. Cortes de 5µm de espessura foram submetidos a imuno-histoquímica para posterior localização tecidual da proteína do bFGF. Para a localização do mRNA, cortes de 10µm foram submetidos à Hibridização in situ. A expressão do bFGF foi detectada nas células luteínicas, endoteliais e perivasculares nos diferentes estágios do ciclo estral e

também no CL de animais superovulados. A fase luteínica média (CL) foi a fase do ciclo estral de maior expressão da proteína e do mRNA deste fator tanto nas células luteínicas quanto endoteliais e perivasculares. Os animais superovulados apresentaram expressão da proteína ainda mais intensa que animais não tratados em fase de CL, indicando ser este tratamento um estimulador da função ovariana tanto em relação à angiogênese quanto à proliferação de células luteínicas. A expressão espaço-temporal do bFGF no CL de búfalas difere em parte do padrão descrito para bovinos, nos quais o bFGF encontra-se expresso em maior intensidade nas células luteínicas em fase de CH ou fase luteínica inicial. Expressão diferencial de isoformas entre as duas espécies nas várias fases do ciclo estral pode levar a uma diferença de detecção pelo anticorpo utilizado na imuno-histoquímica da proteína. Os resultados obtidos apontam para um papel local do bFGF na modulação das funções do CL de búfalas ao longo do ciclo estral e também em fase de CL em animais superovulados.

Palavras-chave: Glândulas endócrinas. Búfalo. Fatores de crescimento. Imuno-histoquímica. Tratamento superovulatório.

ABSTRACT

PRADO, C. **Immunolocalization of the bFGF in corpus luteum of buffalos in different stages of the estrous cycle.** [Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral]. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Corpus luteum (CL) is a transitory endocrine gland which formation and maintenance are angiogenesis-dependent. The bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) is one of the most important angiogenic growth factors in CL which, besides possessing mitogenic properties, modulates the differentiation and cellular migration. Recent studies suggest the participation of this factor as local modulator of luteal cell functions. The present study intends therefore to characterize the expression of the protein and mRNA of bFGF in water buffalo CL in different stages of the estrous cycle and in buffaloes' CL on day 6 after ovulation of animals submitted to superovulatory treatment. For the present study we used 15 corpora lutea of water buffalo, which were divided in five groups: corpus hemorrhagicans (CH), mature corpus luteum (CL), CL in regression (CR), corpus albicans (CA) and CL of superovulated animals (CS). The samples were fixed in 4% buffered formol solution, dehydrated in a serie of ethanol in growing concentrations and included in Histosec[®]. Sections of 5 µm thickness were submitted to immunohistochemistry for subsequent histological localization of bFGF. For the localization of bFGF mRNA, sections of 10 µm thickness were submitted to *in situ* Hybridization. Expression of bFGF was identified in luteal, endothelial and perivascular cells in different stages of

estrous cycle and also in CL of superovulated animals. The middle luteal phase showed the most prominent expression of protein and mRNA of the factor in luteal as well as endothelial and perivascular cells. Superovulated animals expressed the protein in a more intensive way than that of untreated animals in the middle luteal phase, indicating that this treatment is probably an stimulator of the ovarian function related to the angiogenesis and also to the proliferation of cells. The. space-temporary expression of bFGF in the CL of water buffalo differs partially from that described for the bovine CL, in which bFGF is expressed in larger intensity in luteal cells of the initial luteal phase (CH). Isoforms differential expression between the two species during CL life span could lead to differences in protein antibody detection pattern. The results point toward a local role of bFGF in the modulation of CL functions in water buffalo along the estrous cycle and also in the of CL in superovulated animals.

Key-works: Endocrine gland. Water buffalo. Growth factor. Immunohistochemistry.
Superovulatory treatment.

Lista de Figuras

- Figura 1 A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF em células placentárias bovinas, 400x. B: Fotomicrografia de reação negativa (controle) de células de corpo lúteo bovino, 200x. C, D, E, F: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF em células de corpo hemorrágico (200x), corpo lúteo maduro (400x), corpo lúteo em regressão (200x) corpo *albicans* (200x), respectivamente, na espécie bovina utilizando-se o anticorpo monoclonal bMF-2. Setas de diferentes cores indicam diferentes tipos celulares: vermelha = endotelial, laranja = perivascular e amarela = luteínica..... 47
- Figura 2 A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bMF-2) em corpo hemorrágico de fêmeas bubalinas: observar reação praticamente ausente nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e luteínicas (seta amarela). Aumento de 200x. B: Reação de hibridização *in situ* no mesmo tecido: observar o sinal do mRNA marcando as células endoteliais (seta vermelha) e algumas células luteínicas pequenas (seta amarela). Aumento de 200x..... 52
- Figura 3 A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bMF-2) de corpo lúteo maduro de fêmeas bubalinas: observar intensa reação nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e luteínicas (seta amarela). Aumento de 200x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar grande expressão do mRNA no citoplasma (seta azul) e em algumas células luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x..... 53
- Figura 4 A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo lúteo em regressão de fêmeas bubalinas: observar a diminuição da expressão da proteína nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e B: luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar o sinal do mRNA marcando as células endoteliais (seta vermelha) e algumas células luteínicas pequenas (seta amarela). Aumento de 200x..... 54

Figura 5	A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo <i>albicans</i> de fêmeas bubalinas: observar acentuada diminuição da reação nas células luteínicas (seta amarela); células endoteliais (seta vermelha) ainda expressam bastante bFGF. Aumento de 400x. B: Reação de hibridização <i>in situ</i> : observar o sinal do mRNA em algumas células luteínicas (seta amarela) e células endoteliais (seta vermelha). Aumento de 400x.....	55
Figura 6	A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo lúteo de fêmeas bubalinas superovuladas: observar intensa expressão da proteína nas células luteínicas (seta amarela), endoteliais (seta vermelha) e perivasculars (seta laranja). Aumento de 400x. B: Reação de hibridização <i>in situ</i> : observar aumento da expressão do mRNA em células luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1	Imunolocalizacao do bFGF em CLL de búfalas em diferentes fases do ciclo estral e em animais superovulados.....	49
----------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Búfalos	23
3.1.1 Origem	23
3.1.2 Estacionalidade reprodutiva	24
3.1.3 Ciclo estral	24
3.1.4 Dinâmica folicular	24
3.1.5 Formação do corpo lúteo	26
3.1.6 Luteólise	27
3.2 Histologia do corpo lúteo	28
3.3 Angiogênese e vasculogênese	29
3.3.1 Angiogênese no ovário	30
3.4 Vascularização do corpo lúteo	31
3.5 FGF (FIBROBLAST GROWTH FACTOR)	32
3.5.1 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	33
3.5.2 Expressão do bFGF no ovário e no corpo lúteo ao longo do ciclo estral	34
3.6 SUPEROVULAÇÃO	37
3.6.1 Dinâmica folicular durante o tratamento superovulatório	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Exame microscópio dos corpos lúteos	40

4.2	Fixação dos tecidos.....	40
4.3	Imuno-histoquímica do bFGF.....	41
4.4	Hibridização in situ do bFGF.....	42
4.5	Análise das reações.....	44
4.6	Soluções Utilizadas para Imuno-histoquímica e Hibridização <i>in situ</i>.....	44
5	RESULTADOS.....	46
6	DISCUSSÃO.....	57
6.1	Discussão da metodologia.....	58
6.2	Discussão dos resultados.....	59
7	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O rebanho mundial de bubalinos é estimado em 150 milhões de cabeças. Esses animais estão distribuídos nos vários continentes e são altamente adaptados aos climas tropicais e subtropicais além de serem os únicos adaptados às áreas alagadas. A criação de bubalinos no Brasil apresenta um crescimento de 12,7% ao ano (MIRANDA, 1986), atualmente o rebanho brasileiro de búfalos é de aproximadamente um milhão de animais (ANUALPEC, 2004). São animais que apresentam, além de vantagens na relação custo-benefício, poucas doenças reprodutivas se comparados aos bovinos (MIRANDA, 1986), o que torna a caracterização de seu processo reprodutivo de grande valia para o incremento da pecuária nacional. Através de comparações é possível estabelecer parâmetros que auxiliam a compreensão de doenças comuns aos bovinos, como por exemplo, cistos ovarianos.

A obtenção do maior número de gestações durante a vida reprodutiva de uma fêmea é a principal finalidade de todo manejo reprodutivo. Ainda, a obtenção do maior número de gestações a partir de uma fêmea de qualidade zootécnica superior representa o objetivo maior do tratamento superovulatório. A caracterização do ciclo estral e, especificamente, do desenvolvimento do corpo lúteo (CL), torna-se fundamental para compreensão do processo reprodutivo. Uma das características da formação do CL é a angiogênese (novos capilares que se desenvolvem a partir de vasos pré-existentes), o que possibilita o desenvolvimento desse órgão e o exercício de suas funções. É um fenômeno que depende do balanço entre os fatores estimuladores e inibidores da angiogênese (FOLKMAN; SHING, 1992; KUWANO et

al., 1994, LIN et al., 2002). Sabe-se que o rápido aumento da vascularização luteínica é estimulado por fatores angiogênicos produzidos no próprio corpo lúteo (REYNOLDS; REDMER, 1988), como bFGF (basic fibroblast growth factor (GRAZUL-BILSKA et al., 1992; GRAZUL-BILSKA et al., 1993; BERISHA et al., 2000; SCHAMS et al., 2001) e VEGF (vascular endothelial growth factor) (PLENDL, 2000). Ademais, existe uma íntima relação entre o desenvolvimento da vascularização com aumento da taxa do fluxo sanguíneo e a produção hormonal (STORMSHAK et al., 1963; NISWENDER et al., 1976, KOBAYASHI et al., 2001, MOURA et al., 2003). Embora alguns estudos tenham caracterizado a expressão desses fatores de crescimento no corpo lúteo dos bovinos, tanto durante o ciclo estral quanto ao longo da gestação (REYNOLDS et al., 1988; BERISHA et al., 2000; HAYASHI et al., 2000), até o presente momento existe apenas um estudo realizado em nosso grupo a respeito da expressão do VEGF no corpo lúteo bubalino (MOURA, 2003). Assim sendo, o presente estudo hipotetiza que a expressão da proteína e do mRNA do bFGF em corpo lúteo de búfalas varia de acordo com os diferentes estágios do ciclo estral e que o corpo lúteo de búfalas submetidas à superovulação se comporta diferentemente em relação à expressão deste fator.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Para testar as hipóteses levantadas, este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- ❖ detectar a proteína e o mRNA do bFGF no tecido luteínico de búfalas em diferentes fases do ciclo estral
- ❖ detectar a proteína e o mRNA do bFGF no tecido luteínico de búfalas submetidas à superovulação
- ❖ comparar os resultados obtidos para animais superovulados e animais não tratados
- ❖ verificar a distribuição espaço-temporal do bFGF de acordo com a fase do ciclo estral

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O presente estudo foi desenvolvido a partir de extensa revisão de literatura a respeito dos fatores que influenciam a angiogênese no corpo lúteo (CL) bem como a relação que estes fatores podem exercer sobre a produção de esteróides no CL. Animais superovulados foram incluídos no estudo, uma vez que estes animais apresentam um padrão vascular particular em seu CL.

3.1 Búfalos

A criação destes animais apresenta inúmeras vantagens, principalmente sua alta resistência a um grande número de doenças, apresentando poucas patologias reprodutivas se comparado aos bovinos (MIRANDA, 1986).

3.1.1 Origem

De acordo com Oliveira; Almeida e Souza Filho (1997), os bubalinos originaram-se do continente asiático, levados posteriormente à Europa, Oceania e Américas. Foram introduzidos no Brasil através da Ilha de Marajó. Habitam, hoje, os mais variados ecossistemas do planeta. Os principais países criadores são os do Oriente e da Europa. No Brasil, estão presentes em todas as regiões, predominando na região Norte, a qual apresenta um efetivo em torno de 50% do total nacional.

3.1.2 Estacionalidade reprodutiva

Os búfalos, quando criados em localidades distantes da região equatorial, têm um comportamento reprodutivo influenciado pela diminuição das horas de luz do dia (ZICARELLI, 1990). Pode-se dizer que os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos, semelhantes aos ovinos e caprinos. Devido a tal característica, na região centro-sul do país, onde há variação anual na duração de horas de luz conforme a estação, observa-se uma concentração maior das manifestações de cio no período do outono (BARUSELLI, 1993).

3.1.3 Ciclo estral

O ciclo estral, de acordo com a literatura, tem duração média de 21 dias, podendo haver variações dependendo da raça. As fases do ciclo estral dividem-se em: proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro tem a duração média de 21,20 horas, o estro de 11 a 58 horas, e o metaestro de 19,20 horas. O mesmo autor também observou o início dos estros, mais concentrados (84%) das 18 às 6 horas (HAFEZ, 1995).

3.1.4 Dinâmica folicular

Lucy et al. (1992) definem a dinâmica folicular como sendo o processo de crescimento e regressão de um conjunto de folículos antrais, um dos quais se desenvolve até atingir a fase de folículo pré-ovulatório. O crescimento folicular em bovinos se dá através de ondas, como comprovado em estudos endócrinos e ultra-

sonográficos (DRIANCOURT, 1991; FORTUNE et al., 1991; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; KNOPF et al., 1989; ROCHE; BOLAND, 1991; SAVIO et al., 1990; SIROIS; FORTUNE, 1988). Lucy et al. (1992) relatam que a cada onda de crescimento folicular se desenvolve um folículo dominante, o qual impede o crescimento de folículos menores. Os folículos dominantes ao crescerem e atingirem seu diâmetro máximo não ovulam e dão início ao processo de regressão, possibilitando o crescimento de uma nova onda. Durante a última onda de crescimento folicular, o folículo dominante que se desenvolve é o folículo ovulatório.

Trabalhos realizados por Baruselli (1997) descrevem que as fêmeas bubalinas possuem desenvolvimento folicular decorrente de ondas, à semelhança dos bovinos (DRIANCOURT, 1991; FORTUNE et al., 1991; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; KNOPF et al., 1989; ROCHE; BOLAND, 1991; SAVIO et al., 1990; SIROIS; FORTUNE, 1988). Observou-se um maior número de búfalas com ciclos de duas ondas de crescimento folicular. Em fêmeas bovinas há controvérsias a respeito do número de ondas durante o ciclo estral. Alguns autores descrevem a existência de um maior número de animais que apresentam 3 ondas de crescimento durante o ciclo estral (SAVIO; BOLAND; ROCHE, 1990; SIROIS; FORTUNE, 1988). Outros autores, no entanto, demonstraram que, na maioria dos bovinos, ocorre o aparecimento de 2 ondas de crescimento folicular (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b; KNOPF et al., 1989). Entretanto, há concordância de que o número de ondas está relacionado à duração do ciclo estral.

Baruselli et al. (1997) concluíram em seus trabalhos que a dinâmica folicular na espécie bubalina é similar à da espécie bovina, que a frequência dos ciclos com

duas ondas é maior, embora também tenham sido observados ciclos com 3 e 1 onda de crescimento, bem como que o número de ondas foliculares associa-se à duração da fase luteínica e do ciclo estral.

3.1.5 Formação do Corpo Lúteo

De acordo com Motta et al. (1994), o corpo lúteo se desenvolve após a ruptura do folículo ovariano, auxiliado pela força de contração das células musculares lisas da camada da teca. A partir desta ruptura formam-se pregas que compõem a parede interna do corpo lúteo e penetram em sua cavidade central. Tais pregas consistem em uma porção central de tecido estromático que contém grandes vasos dilatados (HILLIER, 1994). Nesta fase, o CL é chamado de corpo hemorrágico, o qual se forma a partir de uma cavidade central preenchida por fluído contendo hemácias e coágulos que podem ser vistos entre as pregas formadas na cavidade (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967).

As células da granulosa que se desenvolveram poucos dias antes da ovulação, continuam o processo de hipertrofia e luteinização de modo a ocorrer o espessamento da camada granulosa, o estrato basal apresenta células com núcleo e citoplasma aumentados e as células da teca interna sofrem luteinização e o ponto de ruptura do folículo é cicatrizado (BASSET, 1943).

Se não houver fertilização, ocorrerá a regressão do CL, permitindo a maturação de outros folículos ovarianos. À medida que ocorre degeneração celular, o órgão atenua seu tamanho, torna-se branco ou castanho-claro e passa a denominar-se

corpus albicans. A regressão do CL é caracterizada por espessamento das paredes arteriais, redução dos grânulos citoplasmáticos, arredondamento dos contornos celulares e vacuolização periférica das grandes células luteínicas. Após dois ou três ciclos, apenas uma cicatriz visível de tecido conjuntivo permanece. O CL bovino do ciclo estral começa a regredir 14 a 15 dias após o estro e seu tamanho pode ser reduzido pela metade dentro de 36 horas (KOOS, 1993). Na fase de regressão, em fêmeas bubalinas, o peso do CL diminui um terço e o peso do corpo *albicans* equivale a um quarto do CL maduro (EL-SHEIKH; SAKLA; AMIN, 1967). A vascularização do CL também diminui drasticamente quando do início da regressão (MOURA et al., 2003).

3.1.6 Luteólise

A regressão do CL bovino durante o ciclo estral depende de aumentos dos pulsos de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) (PATE; TOWNSON, 1994). No período médio do ciclo estral os folículos secretam estradiol, que estimula a síntese de receptores de ocitocina no endométrio. O CL secreta ocitocina que age sobre as células glandulares do endométrio e estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dessa forma, segue-se a regressão do CL com a subsequente queda dos níveis plasmáticos de progesterona. Ocorre a ovulação do folículo pré-ovulatório e se inicia um novo ciclo estral. O declínio rápido da progesterona (P_4) em razão da regressão do CL é elemento essencial para a completa seqüência de eventos que levam ao próximo cio e ovulação. Durante o período de luteólise, o endométrio emite secreções pulsáteis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que provocam a regressão do CL. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a secreção de ocitocina do CL e a ocitocina luteínica estimula ainda mais a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do útero,

caracterizando o sistema de “feedback” (retroalimentação) positivo. Nesse modelo, a luteólise tem início como resultado da elevação e ativação de receptores de estradiol, que induzem o aumento de receptores de ocitocina no endométrio, deflagrando o mecanismo de feedback descrito acima. Estudos verificaram que a produção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos ruminantes depende dos efeitos da P_4 , estrógenos e ocitocina no epitélio uterino (BAZER et al., 1994).

3.2 HISTOLOGIA DO CORPO LÚTEO

O CL consiste de vários tipos celulares, sendo que as células produtoras de P_4 recebem a denominação de células luteínicas. As demais assumem um papel de suporte e sustentação e correspondem a 20% do volume do CL: são aquelas associadas com áreas vasculares (células endotélias e perivasculares), macrófagos, células musculares lisas derivadas da teca folicular e fibroblastos (MOTTA et al., 1994).

Segundo Hillier (1994), na ovulação, o estrato granuloso torna-se vascularizado por vasos da teca interna. As células da granulosa aumentam, tornam-se luteínicas e contribuem para população das grandes células luteínicas. Na maioria das espécies, as células da teca interna também contribuem para formação do CL, como ocorre na vaca, os fibroblastos da teca interna tornam-se arredondadas e juntamente com algumas células trabeculares luteínicas e paraluteínicas, ambas provavelmente com origem na teca externa, contribuem para a população das pequenas células luteínicas.

Koos (1993) afirma que a luteinização das células do folículo ovariano inclui mudanças morfológicas e bioquímicas e uma total reorganização destas células no CL. Após a onda pré-ovulatória de LH, a membrana basal localizada entre a teca interna e membrana granulosa começa a se romper. Vasos sanguíneos da teca interna invadem o espaço antral folicular sob influência dos fatores angiogênicos, desenvolvendo-se uma nova e mais rica estrutura vascular. Durante a luteinização há uma significativa hipertrofia e hiperplasia das células da teca. Com o progresso da luteinização, as células da teca estão mais livres e migram para o interior da cavidade folicular dispondo-se entre as células da granulosa luteinizadas. As células da granulosa acumulam retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e grânulos contendo glicogênio. Enquanto há uma significativa atividade mitótica nas células da teca, ocorre pouca ou nenhuma mitose em células da granulosa luteinizadas.

3.3 ANGIOGÊNESE E VASCULOGÊNESE

O desenvolvimento e crescimento de células e tecidos dependem de um suprimento sanguíneo adequado. Dois processos morfogenéticos que correspondem a uma parte vital no desenvolvimento embrionário e fetal são responsáveis pela formação de vasos sanguíneos: um deles é a vasculogênese, que corresponde à formação dos vasos sanguíneos, por meio da diferenciação de células precursoras de origem mesodérmica. O segundo é a angiogênese, definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos pré-existentes. A vasculogênese é principalmente encontrada no período pré-natal. No adulto, a angiogênese é relatada particularmente em doenças como tumores em crescimento, metástases e no processo de cicatrização. A angiogênese

fisiológica, no adulto, ocorre principalmente no sistema reprodutor feminino, mais precisamente no útero, placenta, ovário e glândulas mamárias durante a gestação e nos ovários e no útero a cada novo ciclo reprodutivo (PLENDL, 2000).

3.3.1 Angiogênese no ovário

Angiogênese ou formação de novos vasos sanguíneos ocorre no ovário durante o desenvolvimento folicular e formação do CL; no endométrio uterino ocorre durante a fase proliferativa do ciclo estral e menstrual. O ovário aparece como modelo ideal para estudos relacionados a tal fenômeno, uma vez que o crescimento de vasos sanguíneos ocorre continuada e ciclicamente durante toda a vida reprodutiva (FRANSER; LUNN, 2000).

Durante o desenvolvimento do folículo, uma rica rede capilar progressivamente se desenvolve na camada tecal ao redor da camada granulosa avascular. Após a ovulação, os vasos da teca proliferam e invadem a camada granulosa. Estes novos vasos suprem as células do CL, tornando possível a comunicação endócrina entre o ovário, hipotálamo-hipófise e útero, necessária para coordenação da ovulação, fertilização e implantação (KOOS, 1993).

Após a ovulação e desintegração da lâmina basal, os vasos da teca invadem a camada granulosa para formar a rede vascular luteínica. Como resultado desta proliferação, as células endoteliais constituem o tipo celular mais numeroso no CL (KOOS, 1993).

De acordo com Plendl (2000) uma rede vascular se desenvolve dentro do CL para assegurar a função deste órgão, que funciona como uma glândula endócrina transitória e desempenha papel essencial na manutenção da gestação.

3.4 Vascularização do Corpo Lúteo

Estudos comprovam a existência de crescimento e regressão em massa dos vasos sanguíneos durante toda a vida do CL (AUGUSTIN, 2000; MURAKAMI et al., 1988; BASSET, 1943; HOSSAIN; O'SCHEA, 1983; FORSMAN; McCORMACK, 1991). O crescimento e a regressão são fenômenos que ocorrem nos leitos vasculares. Sendo assim, primeiramente ocorre o rompimento da membrana basal dos capilares, seguido da proliferação e migração das células endoteliais e, posteriormente novos vasos se formam por meio de anastomoses ocorridas entre estas células (LOSORDO; ISNER, 2001).

A quantidade de vasos no CL varia de acordo com a fase do ciclo estral (TAMANINI; DE AMBROGI, 2004). Valores de densidade vascular obtidos por Moura et al. (2003) descrevem a brusca mudança da vascularização do CL bubalino ao longo do ciclo estral: a densidade vascular média do CL de búfalos ao longo do ciclo estral foi de $17,8 \pm 3,33$ vasos/mm² para corpo hemorrágico (CH), $11,92 \pm 3,57$ vasos/mm² para corpo lúteo maduro (CL), $10,38 \pm 2,42$ vasos/mm² para corpo lúteo em regressão (CR) e $3,46 \pm 1,66$ vasos/mm² para corpo *albicans* (CA). Em relação aos animais superovulados, os referidos autores descrevem que os mesmos apresentaram densidade vascular três vezes maior ($37,78 \pm 8,89$ vasos/mm²) que animais não submetidos ao tratamento superovulatório em mesma fase de ciclo estral.

Valores da densidade vascular nas diversas fases do CL bovino revelam acelerado desenvolvimento da rede vascular quando o CL se apresenta em fase inicial (MEYER; McGEACHIE, 1988). Após acelerado crescimento vascular nesta fase, estudos mostraram que ocorre uma diminuição progressiva da vascularização a partir do 17^o dia do ciclo (AUGUSTIN et al., 1995). Na fase luteínica final, ocorre um decréscimo na densidade vascular do CL, observada em animais com CL ao 26^o dia após a ovulação, correspondendo à fase de corpo *albicans* (GAYTAN et al., 1999).

Reynolds (1986) relata que abundante vascularização luteínica associa-se às altas taxas de fluxo sanguíneo e metabólico e que o fluxo sanguíneo ovariano está correlacionado com as concentrações de P₄ sistêmicas. Moura et al. (2003) relatam que a concentração de P₄ sérica está positivamente correlacionada à densidade vascular ($r = 0,87$; $p < 0,05$).

3.5 FGF (FIBROBLAST GROWTH FACTOR)

Constituintes de uma família de proteína, os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) agregam 24 membros estruturalmente identificados até o presente (FISCHER; DRAPER; NEUMANN, 2003). Os FGFs, além da capacidade de estimular a proliferação de grande variedade de células, apresentam atividade angiogênica. Em estágios iniciais e tardios de desenvolvimento, essas moléculas encontram-se expressas, indicando importante papel como fatores de crescimento e diferenciação (IGARASHI; FINCH; ARONSON, 1998).

Trabalhos sugerem que membros da família dos FGF estão envolvidos em processos de foliculogênese, contexto no qual o basic Fibroblast Growth Factor (ou FGF-2) é o melhor estudado (NEUFIELD et al., 1987).

3.5.1 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

Gospodarowicz (1975) relata que o bFGF (FGF-2) foi inicialmente purificado a partir de extratos da pituitária de bovinos. Este fator apresenta a propriedade de ligar-se a heparina e ao sulfato de heparina (NUGENT; IOZZO, 2000), bem como modular importantes ações no desenvolvimento e funções de diversos órgãos e sistemas (BIKFALVI et al., 1997).

Nos diversos tipos celulares o bFGF possui propriedades mitogênicas, incluindo condrócitos (ARGENTIN; CICCHETTI, 2000; FUJIMOTO et al., 1999), células da granulosa e teca (ROBERTS; ELLIS, 1999) e células endoteliais vasculares (IRUELA-ARISPE; RODRIGUEZ-MANZANEQUE; ABU-JAWDEH, 1999; LANG et al., 2001; ROGELJ et al., 1989).

Este fator é um importante modulador da diferenciação (FUJIMOTO et al., 1999; ROGELJ et al., 1989) e migração (BIKFALVI et al., 1995) celular, além de ser um potente indutor da angiogênese sob condições normais, sejam elas *in vitro* ou *in vivo* (INGBER; FOLKMAN, 1989; LAZAROUS et al., 1995).

A proteína bFGF foi inicialmente identificada apresentando peso molecular de 15 kDa (GOSPODAROWICK 1975) derivada, por meio de proteólise, de uma proteína

de 18 kDa (BIKFALVI et al., 1997). Formas maiores de bFGF, de 22, 22,5, 24 e 34 kDa, também foram identificadas como resultantes da tradução de códons CUG (ARNAUD et al., 1999; OKADA-BAN; THIERY; JOUANNEAU, 2000).

DAVIS et al. (1997) relatam que a isoforma de 18 kDa localiza-se no citoplasma. Tal isoforma exerce ações celulares parácrinas e/ou autócrinas (ARESE et al., 1999; BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997).

Isoformas que possuem alto peso molecular apresentam localização nuclear (BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991; DAVIS et al., 1997; RENKO et al., 1990; YU et al., 1993), sendo responsáveis por efeitos intrácrinos (ARESE et al., 1999; BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997).

3.5.2 Expressão do bFGF no ovário e corpo lúteo ao longo do ciclo estral

Estudos realizados por van Wezel et al. (1995), constataram que, no ovário de mamíferos, o fator de crescimento bFGF implicou na proliferação de células da granulosa e na angiogênese do corpo lúteo. Com o auxílio de técnicas de imunohistoquímica a expressão desse fator pode ser localizada em folículos maduros e em CL de bovinos (GROTHER; UNSICKER, 1989; ZHENG et al., 1993; SCHAMS et al., 1994), ratos (WORDINGER et al., 1993) e em ovário de rato (ASAKAI et al., 1993), enquanto receptores do bFGF ou seu mRNA foram demonstrados em folículos maduros bovino (WANDJI et al., 1992), de rato (Asakai et al., 1993, 1994), bem como no CL de ratos (ASAKAI et al., 1993, 1994). No entanto, Shimasaki et al. (1988) não verificaram a presença de sinal de mRNA do bFGF em ovários de ratos

com 6 semanas e Stirling; Waterman e Simpson. (1991) afirmaram existir falta de mRNA de bFGF em folículos antrais bovinos. Em contraste, o mRNA que codifica bFGF foi identificado em ovários de ratos com 4 semanas, utilizando-se o método de RT-PCR (KOOS; OLSON, 1989). Apesar de todos estes estudos, o papel de bFGF em ativação de folicular está obscuro.

No CL bovino, a proteína do bFGF foi localizada por meio de imuno-histoquímica em células vasculares do corpo lúteo em fase luteínica inicial (dia 1 – 7 pós-ovulação (p.o.)) e diminuiu durante a fase luteínica média (dia 8 – 12 p.o.). Por outro lado, a imunorreação nas células luteínicas grandes aumentou durante esta fase (SCHAMS et al., 1994 apud GABLER et al., 2004). No CL ovino a imunolocalização do bFGF restringiu às pequenas células luteínicas (GRAZUL-BILSKA et al., 1992). Em células luteínicas de ratos do dia 5 do ciclo, o citoplasma apresentou-se intensamente corado para o bFGF quando utilizado a anticorpo monoclonal mAb 3H3. Os núcleos e os espaços intercelulares não apresentaram coloração, indicando que a célula produtora de bFGF é a célula esteroideogênica luteínica (ASAKAI et al., 1993). O mesmo grupo identificou o mRNA do FGFR-1 no CL de ratas utilizando a técnica de hibridização *in situ* e concluíram que tanto o bFGF quanto seus receptores estão presentes no mesmo tipo celular.

Ao examinarem CLL bovinos maduros e em fase de regressão van Wezel et al. (1995) relatam que ocorre reação positiva desse fator em células luteínicas em ambas as fases analisadas. Tal reação positiva apresenta-se no citoplasma das células e ausente no núcleo. Células do estroma e endoteliais não foram coradas positivamente. Em CL humano foi observada imunorreação positiva para o bFGF em

células luteínicas derivadas das células da granulosa durante a fase luteínica inicial; na fase luteínica tardia a reação tornou-se negativa. Já nas células luteínicas derivadas da teca, o bFGF apresentou intensa imunorreação tanto em fase de formação quanto de regressão (YAMAMOTO et al., 1997). A análise da proteína com peso molecular de 18 kDa por meio de western blot demonstrou alta concentração no CL durante toda fase luteínica do rato (TAMURA; ASAKAI; OKAMOTO, 1991).

Experimentos que analisaram a expressão do aFGF e bFGF por PCR após indução de luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$ em CL bovino, detectaram um aumento da expressão do aFGF após 4 horas atingindo o máximo após 12 horas da injeção. O mesmo padrão foi observado para a expressão do mRNA do bFGF, a qual já se apresentou aumentada após 2 horas da injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Durante a luteólise estrutural, isto é, após 64 horas da injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o mRNA de ambos os FGFs apresentaram-se significativamente “down” regulados (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). Em CLL de ratos, foram identificados os transcritos de mRNA do bFGF, através de hibridização *in situ*, principalmente em fase luteínica inicial (GUTHRIDGE et al., 1992a; 1992b), fase na qual a expressão do mRNA foi máxima em relação às demais fases do ciclo ovariano estudadas.

Trabalhos utilizando cultura de células endoteliais bovinas estimuladas com estradiol em dose de 10^{-9}M aumentaram significativamente a expressão do mRNA do bFGF comparadas com células controle não tratadas. No mesmo experimento, o próprio bFGF foi capaz de estimular sua expressão nas doses testadas de 1 e 10 ng/ml. Em dose de 100 ng/ml, o bFGF estimulou a expressão do mRNA do VEGFR-1. A expressão do VEGF não foi afetada pela presença do bFGF (GABLER et al., 2004).

Quando analisada a influência do bFGF sobre a produção de P_4 em células luteínicas bovinas cultivadas, observou-se que este estímulo é particularmente efetivo na fase luteínica inicial (MIYAMOTO; OKUDA; SCHAMS, 1992) e na fase luteínica média (entre dias 8 e 12 p.o.) (LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996). Este peptídeo também estimulou a liberação de ocitocina durante as fases luteínicas inicial, média e tardia (LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996). Em ovinos, quando células luteínicas foram estimuladas com bFGF ocorreu aumento de sua proliferação de maneira dose dependente em todas as fases de desenvolvimento do CL, mas os efeitos sobre a produção de P_4 foram variáveis (GRAZUL-BILSKA et al., 1992). Foi verificado em células luteínicas de rato, tratadas com bFGF, aumento da produção de $PGF_{2\alpha}$ de maneira dose dependente e maior produção de P_4 em fase luteínica inicial do que nas fases luteínicas média e tardia (TAMURA; ASAKAI; OKAMOTO, 1991).

3.6 SUPEROVULAÇÃO

A indução da superovulação é um método amplamente utilizado para aumentar o número de embriões viáveis ou transferíveis visando a multiplicação de animais com alto valor zootécnico. É uma técnica realizada através da administração de gonadotrofinas exógenas, que estimulam o crescimento e a múltipla ovulação dos folículos antrais (ADAMS et al. 1993).

Moor; Kruip e Green (1984) sustentam fortemente o conceito de que as gonadotrofinas exógenas reduzem o processo de atresia nos animais

superovulados. Uma redução da atresia nas classes de folículos de 1,7 mm de diâmetro, aumenta diretamente o número de folículos capazes de responder plenamente à gonadotrofina; folículos abaixo deste tamanho, seriam incapazes de atingir o tamanho pré-ovulatório nos 4 a 5 dias de tratamento com gonadotrofina e responder à onda de LH.

O FSH é uma gonadotrofina hipofisária de origem porcina ou eqüina, semelhante à Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (MOOR; KRUIP; GREEN, 1984), que é usado comumente na indução do crescimento folicular e na superovulação, produzindo um menor número de folículos anovulatórios quando comparado ao eCG (CARVALHO, 1995).

3.6.1 Dinâmica folicular durante o tratamento superovulatório

Estudos demonstram que, até o momento, o tratamento ovulatório em bubalinos apresenta-se com baixa eficiência.

Trabalhos propostos por BARUSELLI (1997) descreveu a resposta folicular de fêmeas bubalinas quando submetidas ao tratamento superovulatório: estas apresentam, em média, uma taxa de ovulação de 62,8%, semelhante à observada por Stock; Ellington e Fortune (1996) em bovinos. Em média, o número de ovulações foi correlacionado ao número de corpos lúteos no dia da colheita de embriões, demonstrando, portanto, que a ovulação na espécie bubalina foi seguida da formação de corpos lúteos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Para o presente estudo utilizaram-se corpos lúteos (CLL) de 15 búfalas, abatidas no abatedouro Frivale, localizado no município de Cajati – SP e também no abatedouro Argus, localizado em Curitiba – PR. Os animais superovulados foram abatidos no 6º dia do ciclo estral na cidade de Piracicaba – SP. Os CLL foram divididos em cinco grupos: grupo 1, corpo hemorrágico (CH) – 2º dia após a ovulação; grupo 2, corpo lúteo maduro (CL) – 9º dia após a ovulação; grupo 3, CL em regressão (CR) – 18º dia após a ovulação; grupo 4, corpo *albicans* (CA) – 26º dia após ovulação e grupo 5, CL de animais superovulados (CS) abatidos no 6º dia após ovulação. .

4.1 Exame microscópio dos corpos lúteos

Os CLL foram submetidos à classificação histológica para confirmação do grupo ao qual pertenciam. Esta foi realizada por meio de exame microscópico dos cortes de 5 µm preparados em micrótomo Leica® (RM2065) e corados com hematoxilina-eosina como descrito por Moura (2003).

4.2 Fixação dos tecidos

As amostras foram cortadas em pedaços de 0,5 cm de largura, fixadas em formol tamponado a 4% por 24 horas. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em PBS, o qual foi trocado uma vez por semana, até a inclusão das mesmas em Histosec® (Merck, Alemanha).

4.3 Imuno-histoquímica do bFGF

As secções de corpo lúteo foram desparafinizadas em xilol 2 vezes por 10 minutos, reidratadas em série de etanol com concentrações decrescentes (absoluto I e II, 96% e 70% , 5 minutos cada) e lavadas com água destilada (1 vez, 5 minutos). Realizou-se a imersão das lâminas em solução de tampão citrato com posterior tratamento em microondas para melhor exposição dos antígenos (3 vezes, 5 minutos, potência máxima). Durante 30 minutos bloqueou-se a atividade peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 1,0% em PBS e lavadas com tampão fosfato. Em todas as lavagens seguintes utilizou-se solução tamponada de fosfato (PBS) a 0,15 M e pH 7,2 (3 vezes, 5 minutos cada, com agitação). Visando a redução das ligações inespecíficas, as secções foram incubadas por 20 minutos em solução de bloqueio composta de 0,07% de BSA (Bovine Serum Albumine; Vector Laboratories Inc., USA) e 0,0003% de Triton (Triton X-100; Sigma-Adrich Co., USA) em PBS. Durante o período de 20 horas à temperatura de 4°C, as secções foram incubadas com anticorpo primário (clone bMF-2, Upstate, NY). Após a lavagem com PBS, foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário (BA-1400, Vector Laboratories, CA) e novamente lavadas com PBS. Em seguida, para a amplificação do sinal da reação, incubou-se as secções por 45 minutos com complexo de peroxidase-estreptavidina-biotina (Vectastain-Elite-ABC-Kit®; Vector Laboratories Inc., USA). Após lavagem em tampão fosfato, a reação específica de imunohistoquímica foi revelada utilizando-se NovaRed por 5 minutos (NovaRed™; Vector Laboratories Inc., USA). Por fim, as secções foram lavadas em água destilada e contra-coradas com Hematoxilina por 8 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 15 minutos e então montadas com glicerina/gelatina.

4.4 Hibridização in situ do bFGF

Esta parte dos experimentos foi realizada junto ao Instituto de Anatomia, Histologia e Embriologia, da Universidade Justus-Liebig em Giessen. Os reagentes e equipamentos necessários para tal procedimento foram gentilmente disponibilizados pelo Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser e pela Dra. Christiane Pfarrer.

Cada experimento de hibridização in situ necessitou três dias para sua realização. No primeiro dia, as seções foram desparafinizadas, de forma não estéril, em xilol por 5 minutos em estufa a 60°C e, em seguida, 2 vezes em xilol a temperatura ambiente. As lâminas foram rapidamente mergulhadas em etanol 96% e permaneceram durante 5 minutos em etanol 70%. Feito isso, os procedimentos passaram a ser estéreis. As lâminas foram mergulhadas em água DEPC e permaneceram 20 minutos em ácido clorídrico 0,2 N. Os cortes foram lavados 2 vezes em SSC, em banho maria a 70°C por 15 minutos e depois lavados rapidamente em PBSM. A incubação foi feita com proteinase K (para digestão do tecido e exposição dos ácidos nucleicos) em câmara úmida por 25 minutos em estufa a 37°C. As lâminas foram então imersas em solução de glicerina a 2%, permaneceram por 15 segundos em ácido acético 20% e em seguida foram lavadas em PBSM. Foram mergulhadas por 10 minutos em solução de formaldeído e novamente lavadas em PBSM. Os cortes foram submetidos a uma solução composta de 20% de glicerol diluído em DEPC por 30 minutos sendo em seguida, lavados rapidamente 2 vezes em SSC. Estes então, foram colocados em uma placa fria sobre a qual aguardaram que a placa quente atingisse a temperatura de 70°C. Permaneceram então por 12 minutos sobre a placa quente. Na sequência pipetou-se, com as lâminas sobre gelo, 50 µl de

sonda e tampão de hibridização sobre os cortes e os mesmos foram cobertos com lamínula. As lâminas foram colocadas em câmara úmida com formamida e incubadas “overnight” em estufa a 37°C para ocorrer o anelamento da sonda da sequência alvo. No dia seguinte foram lavadas 4 vezes por 10 minutos em SSC em banho maria a 37°C e incubadas em câmara úmida com RNase A e RNase T a 37°C por 30 minutos. As mesmas foram lavadas 4 vezes com SSC a 37°C por 5 minutos, posteriormente lavadas 2 vezes com SSC a 60°C por 15 minutos, 2 vezes com SSC a 42°C por 15 minutos, depois lavadas com SSC em temperatura ambiente por 5 minutos. A partir deste passo iniciou-se a reação de imunohistoquímica para localização da sonda já pareada com a sequência alvo. Os cortes permaneceram 10 minutos em TNMT em temperatura ambiente e posteriormente foram incubados por 60 minutos em 3% BSA (Bovine Serum Albumin) diluído em 1 x TNMT a temperatura ambiente e posteriormente lavadas por 10 minutos em 1 x TNMT também a temperatura ambiente. Feito isto, as lâminas foram colocadas para escorrer e incubadas “overnight” em câmara úmida com 1332 µl de TNMT, 666 µl de BSA a 3%, 0,5 µl do anticorpo anti-Dig-Fab. No terceiro dia foram lavadas 1 vez em NTB durante 5 minutos e novamente lavadas 1 vez em NTB contendo 0,4% de levamizol por 5 minutos. Incubou-se a reação em câmara úmida, escura, sob a capela, em NTBBCIP por 3 horas. Quando a coloração estava forte o suficiente, as lâminas foram lavadas com NTB e levamizol por 5 minutos e posteriormente lavadas em água destilada por 5 minutos.

4.5 Análise das reações

Para análise da localização tecidual da proteína e do mRNA do bFGF foi utilizado um programa de imagem computadorizado. Para tanto, as imagens foram capturadas por câmara digital Leica DC 300F (Leica, Cambridge/UK) de alta resolução acoplada ao microscópio DMO da Leica (Leica[®], Cambridge/UK) e transmitidas para microcomputador, por meio do programa de análise de imagem Leica Qwin (Leica[®], Cambridge/UK). As fotomicrografias foram observadas pela mesma pessoa para que se pudesse padronizar a escala de intensidade de coloração atribuída aos cortes dos diferentes animais e grupos.

4.6 Soluções Utilizadas para Imuno-histoquímica e Hibridização *in situ*

Todos os reagentes foram adquiridos de Sigma, Darmstadt, Alemanha, caso não recebam outra especificação.

ABC[®] Elite

1 gota solução A

1 gota solução B

2,5 ml PBS

Água DEPC

1000 ml de Água deionizada

0,5 ml solução de dietilpirocarbonato

Nova Red[®]

3 gotas solução 1

2 gotas solução 2

2 gotas solução 3

2 gotas H_2O_2

PBSM (Tampão Fosfato contendo MgCl_2)

1 tablete de PBS

1 ml de MgCl_2

200 ml de água DEPC

Preparado da Sonda

2 μl água DEPC

2 μl DNA de esperma de salmão

4 μl tRNA de levedura

2 μl sonda marcada com digoxigenina

Tampão de Hibridização

28 μl água DEPC

20 μl 20 x SSC

2 μl reagente de Denhardt

100 μl Formamida a 50%

40 μl Dextransulfato a 50%

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

Placenta bovina (Figura 1 A) foi utilizada como controle positivo para validar o anticorpo monoclonal (bFM-2) em nossas condições. Corpo lúteo bovino foi utilizado com controle positivo da expressão do bFGF em CL (Figura 1 C-F). Para controle negativo da reação (Figura 1 B) foi utilizado um anticorpo para controle de isotipo

FIGURA 1 - A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF em células placentárias bovinas, 400x. B: Fotomicrografia de reação negativa (controle) de células de corpo lúteo bovino, 200x. C, D, E, F: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF em células de corpo hemorrágico (200x), corpo lúteo maduro (400x), corpo lúteo em regressão (200x) corpo *albicans* (200x), respectivamente, na espécie bovina utilizando-se o anticorpo monoclonal bMF-2. Setas de diferentes cores indicam diferentes tipos celulares: vermelha = endotelial, laranja = perivascular e amarela = luteínica.

Como pode ser observado, a reação de imuno-histoquímica foi positiva para células placentárias (Figura 1A) e também para células do corpo lúteo (Figura 1 C-F). Estas, por sua vez, apresentaram diferentes intensidades de coloração dependente do estágio de desenvolvimento do corpo lúteo e da população celular observada, conforme descrito a seguir.

Corpo hemorrágico (CH): nesta fase, observa-se intensa expressão da proteína do bFGF tanto nas células endoteliais quanto luteínicas e perivasculares.

Corpo Lúteo Maduro (CL): a expressão da proteína desse fator foi observada nas células endoteliais e perivasculares com maior intensidade e nas células luteínicas com menor intensidade.

Corpo Lúteo em Regressão: a proteína do fator apresentou-se expressa nas células luteínicas e perivasculares. Tal expressão foi observada em menor intensidade nas células endoteliais.

Corpo albicans: observa-se uma diminuição acentuada da expressão da proteína do bFGF em todos os tipos celulares analisados.

A expressão da proteína bFGF foi identificada por técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* no corpo lúteo de búfalas nas diversas fases do ciclo estral e também em búfalas submetidas à superovulação. Os resultados obtidos pela técnica de imuno-histoquímica permitiram uma quantificação relativa da expressão desta proteína, o que poder ser visualizado na Tabela 1.

TABELA 1: Imunolocalização do bFGF em CLL de búfalas em diferentes fases do ciclo estral e em animais superovulados.

	CH	CL	CR	CA	CS
Células luteínicas	-	+++	+	-	++++
Células endoteliais	++	+++	+++	++	++++
Células perivasculares	-	+++	++	++	++++

Corpo hemorrágico (CH), corpo lúteo maduro (CL), corpo lúteo em regressão (CR), corpo *albicans* (CA), corpo lúteo de animais superovulados (CS). Escore: - reação ausente; + reação fraca; ++ reação moderada; +++ reação intensa; ++++ reação muito intensa.

Os dados acima destacam a variação da intensidade das reações nas células luteínicas, endoteliais e perivasculares durante as quatro fases do ciclo estral e em animais superovulados. Nas células luteínicas observou-se uma maior variação da expressão do fator ao longo do ciclo estral: ausência de reação positiva do bFGF para CH e expressão acentuada para CS. Nas células endoteliais a intensidade de expressão variou menos enquanto que nas células perivasculares, a mudança mais acentuada de expressão ocorreu entre o estágio de corpo hemorrágico e o estágio de corpo lúteo maduro.

Corpo Hemorrágico (CH): nesta fase, observou-se que o CH é formado por uma região lobular separada por septos compostos de tecido conjuntivo, nos quais localizavam-se a maioria dos vasos sanguíneos. Esses septos possuíam em sua região central uma cavidade preenchida por células luteínicas (Figura 2 A). Com a técnica de imuno-histoquímica, não foi evidenciada a presença de células luteínicas positivas para a proteína bFGF. Tal reação positiva foi encontrada distribuída por todo o citoplasma apenas em poucas células endoteliais. Esses achados foram confirmados com a hibridização *in situ*, onde o sinal do mRNA também foi identificado nas células endoteliais. No entanto, o núcleo de algumas células luteínicas pequenas apresentou sinal positivo para o mRNA do bFGF (Figura 1 B),

enquanto que a detecção da proteína não foi possível neste grupo celular durante a fase de corpo hemorrágico.

Corpo Lúteo Maduro (CL): observou-se nessa fase a presença de células luteínicas com núcleo central grande e esférico, citoplasma rico em granulações e espaço intercelular reduzido. A maioria das células luteínicas apresentaram reação positiva para o bFGF localizada no citoplasma, assim como as células perivasculares e endoteliais (Figura 3 A). Quando realizada a técnica de hibridização *in situ* para acesso do mRNA do bFGF observou-se sinal nas células endoteliais e luteínicas, e nestas últimas o sinal localizava-se principalmente no citoplasma (Figura 3 B).

Corpo Lúteo em Regressão (CR): notou-se início de desorganização celular. As células luteínicas apresentaram núcleo pequeno e densas granulações periféricas de coloração esbranquiçada quando observadas à microscopia de luz. A expressão do bFGF foi observada nas células endoteliais, perivasculares tanto no núcleo quanto no citoplasma e apenas no citoplasma das células luteínicas (Figura 4 A e B). O sinal do mRNA apresentou-se menos intenso nas células luteínicas quando comparado ao sinal da fase anterior (CL); células endoteliais também apresentaram sinal de mRNA de bFGF (Figura 4 C).

Corpo *albicans* (CA): foram encontradas poucas células luteínicas e poucos vasos sanguíneos. Estes, quando presentes, apresentavam-se calibrosos e expressavam bFGF em quantidade considerável para a fase do ciclo estudada. A expressão do bFGF diminuiu por completo nas células luteínicas e permaneceu, em menor intensidade, nas células perivasculares e endoteliais (Figura 5 A). A marcação do

mRNA foi observada nas células endoteliais e possibilitou uma melhor visualização da diminuição da quantidade de capilares no corpo lúteo em estágio final de desestruturação (Figura 5 B).

Corpo Lúteo de Animais Superovulados (CS): A característica histológica mais evidente das células luteínicas dos animais submetidos à superovulação é o tamanho do citoplasma e do núcleo. Enquanto as células luteínicas de animais não tratados apresentam núcleos grandes em relação ao citoplasma, a relação se inverte nos animais superovulados. A expressão da proteína do bFGF foi a mais intensa observada em todos os grupos abordados por este trabalho: tanto células endoteliais quanto perivasculares e luteínicas, neste grupo, apresentaram reação intensa para bFGF (Figura 6 A). Quando acessado o mRNA por meio de hibridização in situ, observou-se sinal nas células luteínicas (principalmente no citoplasma), endoteliais e perivasculares (Figura 6 B).

FIGURA 2 - A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bMF-2) em corpo hemorrágico de fêmeas bubalinas: observar reação praticamente ausente nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e luteínicas (seta amarela). Aumento de 200x. B: Reação de hibridização *in situ* no mesmo tecido: observar o sinal do mRNA marcando as células endoteliais (seta vermelha) e algumas células luteínicas pequenas (seta amarela). Aumento de 200x.

FIGURA 3 - A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bMF-2) de corpo lúteo maduro de fêmeas bubalinas: observar intensa reação nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e luteínicas (seta amarela). Aumento de 200x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar grande expressão do mRNA no citoplasma (seta azul) e em algumas células luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x.

FIGURA 4 - A. Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo lúteo em regressão de fêmeas bubalinas: observar a diminuição da expressão da proteína nas células endoteliais (seta vermelha), perivasculares (seta laranja) e B: luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar o sinal do mRNA marcando as células endoteliais (seta vermelha) e algumas células luteínicas pequenas (seta amarela). Aumento de 200x.

FIGURA 5 - A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo *albicans* de fêmeas bubalinas: observar acentuada diminuição da reação nas células luteínicas (seta amarela); células endoteliais (seta vermelha) ainda expressam bastante bFGF. Aumento de 400x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar o sinal do mRNA em algumas células luteínicas (seta amarela) e células endoteliais (seta vermelha). Aumento de 400x.

FIGURA 6 - A: Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para bFGF (clone bFM-2) de corpo lúteo de fêmeas bubalinas superovuladas: observar intensa expressão da proteína nas células luteínicas (seta amarela), endoteliais (seta vermelha) e perivascularares (seta laranja). Aumento de 400x. B: Reação de hibridização *in situ*: observar aumento da expressão do mRNA em células luteínicas (seta amarela). Aumento de 400x.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A discussão será conduzida em 2 partes. Primeiramente discutiremos a metodologia utilizada e posteriormente os resultados obtidos no presente trabalho.

6.1 Discussão da metodologia

Para a fixação dos tecidos foi utilizado formaldeído a 4%, que permite maior retenção do RNA celular se comparado a fixadores precipitativos. Esta fixação também se apresentou adequada para o desenvolvimento dos testes de imuno-histoquímica.

O emblocamento dos tecidos analisados foi feito com resina Histosec[®] (Merck, Alemanha), que substituiu o emblocamento tradicional em parafina e não apresentou diferenças nos resultados obtidos.

Os testes de imuno-histoquímica foram delineados a partir da metodologia utilizada por Weise (2001), na qual o anticorpo monoclonal anti-bFGF, uma imunoglobulina da classe IgG, subclasse 1κ (clone bMF-2, Upstate, NY) foi utilizado para detectar o bFGF na placenta bovina. Este anticorpo é altamente específico para o bFGF bovino e não apresenta reação cruzada com o aFGF. Nos testes realizados, também foi utilizada placenta bovina como primeiro controle positivo e CL bovino como controle específico para o tecido que foi estudado. Como controle negativo desta reação o primeiro teste foi realizado utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-toxina de *Clostridium perfringens*, de mesmas classe e subclasse do anticorpo primário

utilizado, cedido gentilmente pelo Instituto de Higiene e Doenças Infecciosas dos Animais, da Universidade de Giessen, Alemanha.

O princípio da hibridização *in situ* é o anelamento específico de uma sonda de ácido nucléico marcada com sua seqüência complementar no tecido fixado, seguido de visualização da localização desta sonda. A sonda utilizada pode ser de vários tipos como, por exemplo, sondas de DNA de fita dupla ou única, oligonucleotídeos e sondas de RNA de fita única. Neste trabalho foi utilizado uma sonda de RNA de fita única marcada com digoxigenina. Este composto não radioativo pode ser detectado por anticorpos disponíveis comercialmente (neste trabalho foi utilizado o anticorpo anti-Dig-Fab) o que facilita a condução dos experimentos. A escolha do hapteno não radioativo para a marcação da sonda apresenta vantagens como o aumento da segurança do procedimento e diminuição de seus custos.

6.2 Discussão dos resultados

O ciclo ovariano é caracterizado por eventos repetitivos de proliferação celular, diferenciação e transformação que acompanham o desenvolvimento folicular, a formação e a regressão do CL (SCHAMS; BERISHA, 2004). Apesar da regulação endócrina do corpo lúteo ser o mais importante mecanismo de controle da função luteínica, é de consenso geral que outros fatores de origem extra e intraovariana apresentem potencial para modular a resposta local a estes hormônios ou desempenhem funções específicas diretas. O bFGF pode ser considerado um destes fatores que é produzido dentro do próprio CL desempenhando funções como a regulação da angiogênese (VAN WEZEL et al., 1995) ou modulando a resposta

das células luteínicas à ação do hormônio luteinizante (LH) (GRASSELLI et al., 2002; MIYAMOTO; OKUDA; SCHAMS, 1992; LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996; GRAZUL-BILSKA et al., 1991; TAMURA; ASAKAI; OKAMOTO, 1991). Neste contexto, estudou-se a localização tecidual da proteína e do mRNA do bFGF durante a formação e regressão do CL bubalino e também em fase luteínica média nos CLL de animais superovulados.

O CL bovino, utilizado como controle positivo apresentou a expressão da proteína do bFGF diferentemente de acordo com a fase luteínica e a população celular pesquisada. Em fase luteínica inicial (ou fase de corpo hemorrágico – CH), observou-se intensa expressão da proteína do bFGF tanto nas células endoteliais quanto luteínicas e perivasculares. Em fase luteínica média (ou fase de corpo lúteo madura – CL), o bFGF foi observado em células endoteliais e perivasculares com maior intensidade e nas células luteínicas com menor intensidade. Já na fase luteínica tardia (ou fase de corpo lúteo em regressão – CR), este fator apresentou aumento da expressão tanto nas células luteínicas quanto perivasculares. Tal expressão foi observada em menor intensidade nas células endoteliais. Quando o corpo lúteo encontrava-se em franco estágio de regressão estrutural (ou fase de corpo albicans – CA), observou-se ausência da expressão da proteína do bFGF em todos os tipos celulares analisados. Os resultados deste estudo estão de acordo com o descrito na literatura para CL da espécie bovina. Foi relatado que a maior concentração do bFGF aparece durante a fase luteínica inicial, diminuindo significativamente por volta do dia 7 p.o. e aumentando novamente na fase luteínica tardia (SCHAMS et al., 1994 apud SCHAMS; BERISHA, 2004). Os mesmos autores relatam que durante a fase luteínica inicial, o bFGF foi detectado no citoplasma das

células endoteliais e também de células musculares lisas das artérias; as células luteínicas apresentaram maior expressão desse fator entre os dias 8 e 12, período no qual muitos capilares não apresentavam mais a expressão da proteína. Já o mRNA do bFGF apresentou-se aumentado após 4 horas da administração do agente luteolítico $\text{PGF}_{2\alpha}$, atingindo o máximo de sua expressão após 12 horas da injeção. Durante a luteólise estrutural, isto é, após 64 horas da injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o mRNA de ambos os FGFs apresentaram-se significativamente “down” regulados (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). Em CL de ratos, foram identificados os transcritos de mRNA do bFGF, através de hibridização *in situ*, principalmente em fase luteínica inicial (GUTHRIDGE et al., 1992a; 1992b), fase na qual a expressão do mRNA foi máxima em relação às demais fases do ciclo ovariano estudadas. A localização dominante do bFGF em células endoteliais no início da fase luteínica, sugere que esse fator seja responsável pelo crescimento endotelial (SCHAMS; BERISHA, 2004). Já na fase luteínica média, quando sua localização aparece predominantemente nas células luteínicas, associada ao fato de que seu receptor (FGFR-1) também foi encontrado nas mesmas células durante esta fase (ASAKAI et al., 1993), pode-se hipotetizar que o bFGF apresente ações autócrinas e module funções luteínicas.

Uma vez que o anticorpo utilizado foi capaz de detectar a expressão do bFGF em CL bovino durante toda fase luteínica e que estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura para esta espécie, julgou-se pertinente a utilização do mesmo anticorpo monoclonal para a detecção do bFGF em CL bubalino, uma vez que a homologia entre as seqüência do bFGF para as diferentes espécies é alta (ESCH et al., 1985; ABRAHAM et al., 1986; KUOKAWA et al., 1987; SIMPSON et al., 1987; SHIMASAKI et al., 1988). O anticorpo bFM-2 reconhece as isoformas pequenas, de

16 e 18 kDa do bFGF, mesmo que estas estejam inativadas pelo calor (MATSUZAKI et al., 1989), representando uma opção segura para as reações de imuno-histoquímica, nas quais as amostras sofrem um tratamento no microondas sob altas temperaturas.

No CL de búfalas a reação imuno-histoquímica para a detecção do bFGF apresentou-se praticamente ausente em fase luteínica inicial (CH) tanto nas células endoteliais, quanto perivasculares e mesmo luteínicas. Em fase luteínica média (CL) esta expressão aumentou consideravelmente em todos os tipos celulares analisados. A fase luteínica tardia (CR) apresenta diminuição da expressão em relação à fase luteínica média. Esta diminuição torna-se mais acentuada quando o CL encontra-se em fase de luteólise estrutural (CA).

Apesar de não se encontrar publicada a seqüência do bFGF bubalino, parte-se do princípio que esta apresente maior homologia em relação a seqüência bovina (NEUVIANS et al., gi:27806627; gi:31342942) do que em relação à ovina (SIMPSON et al., 1987), murina (SHIMASAKI et al., 1988) ou humana (ABRAHAM et al., 1986; KUOKAWA et al., 1987) e exclui-se a possibilidade de não ter havido imunorreação positiva na fase luteínica inicial em virtude do não reconhecimento do bFGF bubalino. Uma possível justificativa seria a ocorrência de isoformas de maior peso molecular no CL bubalino na fase luteínica inicial, as quais não seriam reconhecidas pelo anticorpo utilizado (MATSUZAKI et al., 1989). É possível que outros tipos celulares, que não o luteínico, expressem isoformas de 25 ou 23 kDa na fase luteínica inicial como foi demonstrado na espécie murina utilizando-se western blot de tecido luteínico e células luteínicas separadamente (ASAKAI et al., 1993). Esta

hipótese pode ser embasada também pelos achados de hibridização *in situ* deste trabalho: como mostrado na Figura 2B, células endoteliais e células luteínicas pequenas apresentaram reação nuclear positiva à marcação da sonda utilizada. Segundo Asakai et al. (1993), as isoformas de maior peso molecular encontram-se no núcleo e as de menor peso no citoplasma.

Na fase luteínica média, houve um aumento da expressão da proteína do bFGF tanto nas células luteínicas quanto nas endoteliais e perivasculares. Estes achados foram reproduzidos pela localização do mRNA do bFGF nesta fase. Como mostra a Figura 3 A e B, existe uma grande expressão citoplasmática da proteína e do mRNA. Poucas células luteínicas apresentaram também nesta fase a expressão nuclear do transcrito. De acordo com Schams e Berisha (2004), as células luteínicas bovinas da fase luteínica média são as únicas a expressarem o fator nesta fase. No entanto, resultados do presente trabalho apontam um aumento de expressão do bFGF também em células endoteliais e perivasculares se comparada à fase luteínica inicial. Como descrito pelos mesmos autores, a mudança de localização da proteína em relação aos tipos celulares constituintes do CL reflete uma mudança de expressão das diferentes isoformas. Como citado anteriormente, é possível que também as células endoteliais que apresentavam expressão nuclear de mRNA do bFGF na fase luteínica inicial, expressem nesta fase isoformas de menor peso molecular, que puderam ser reconhecidas pelo anticorpo utilizado. Estudos de imuno-histoquímica realizados em búfalos por Moura (2003) para localizar a proteína do Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), outro importante agente angiogênico no CL, demonstram que o VEGF encontra-se expresso em menor quantidade na fase luteínica inicial se comparada à fase luteínica média. Em conjunto, estes

achados sugerem que tanto o VEGF quanto o bFGF no búfalo contribuem mais para a manutenção do leito vascular estabelecido durante a formação do CL do que para o estímulo da angiogênese em si, que é observada em sua plenitude na fase luteínica inicial como demonstram os valores de densidade vascular para esta espécie (MOURA et al., 2003).

Na fase luteínica tardia, tanto a técnica de imuno-histoquímica quanto a de hibridização *in situ* detectaram uma diminuição da proteína e do mRNA do bFGF, respectivamente, em todos os tipos celulares analisados (Figura 4 AB e C) . Apesar de estudos sobre a expressão do bFGF nesta fase relatarem a máxima expressão tanto da proteína (YAMAMOTO et al., 1997; VAN WEZEL et al. 1995) quanto do mRNA (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004; GUTHRIDGE et al., 1992a; 1992b) logo após início da luteólise funcional não foi verificado o mesmo padrão. Apesar de existir uma variação de duração do ciclo estral de mais de 30%, poder-se-ia afirmar que os CLL utilizados no presente estudo, que foram coletados no dia 18 p.o. e representaram a fase luteínica tardia, não correspondam mais à fase imediatamente posterior ao início da luteólise funcional, uma vez que a progesterona plasmática na espécie bovina (McDONALD'S, 2003) e na espécie bubalina (HATTAB et al., 2000) começa a decair no dia 16 p.o. Como citado anteriormente em relação à expressão do VEGF no CL bubalino, a expressão do bFGF nesta fase também está de acordo com os achados de Moura (2003), que descreveu uma diminuição expressiva da proteína do VEGF em fase de regressão do CL.

Quando o CL encontra-se em processo de regressão estrutural (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004; SCHAMS; BERISHA, 2004), existe uma modificação da

morfologia e distribuição celular neste órgão. Neste estágio, denominado de fase de corpo *albicans* no presente estudo, foi verificada uma drástica diminuição da expressão da proteína e do mRNA do bFGF, como demonstrado na Figura 5 A e B. O mesmo foi descrito para o bFGF de outras espécies (SCHAMS et al., 1994; GABLER et al., 2004, GRAZUL-BILSKA et al., 1992; ASAKAI et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1997; NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). Esta pequena expressão, mesmo quando o CL não desempenha mais sua função principal de produtor de progesterona, pode ser explicada pela necessidade de manutenção de alguns leitos vasculares que carregam células fagocitárias, como macrófagos, por exemplo, as quais serão responsáveis pela desestruturação total deste órgão (WEBB; WOAD; AMSTRONG, 2002).

O CL bubalino submetido ao tratamento superovulatório apresenta características peculiares como a altíssima densidade vascular ($37,78 \pm 8,89$ vs $11,92 \pm 3,57$ para animais não tratados em mesma fase do ciclo estral) e maior expressão do VEGF (MOURA et al., 2003; MOURA, 2003). A célula luteínica do animal superovulado também se diferencia da célula luteínica de animais não tratados demonstrando características que refletem uma maior atividade de síntese como, por exemplo, o aumento da quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de mitocôndrias (ARTONI et al., 2004). No presente estudo, a expressão da proteína do bFGF também se mostrou aumentada nos animais superovulados se comparados aos animais não tratados em mesma fase do ciclo estral (Figura 3A comparada à Figura 6A). Esta maior expressão da proteína em CL de animais superovulados pode ser um reflexo tanto do aumento da síntese total de proteína (ARTONI et al., 2004) quanto do aumento da expressão do fator desencadeado pela ação do FSH

presente no tratamento superovulatório: o FSH aumentou a expressão do mRNA do bFGF em células de Sertoli de ratos em 5 vezes após 24h de tratamento. Após 72h observou-se aumento das isoformas de 18 e 24 kDa (MULLANEY; SKINNER, 1992). Uma influência do FSH sobre a produção de bFGF em folículos ou em CL bovino não foi relatada, no entanto, sabe-se que o FSH é capaz de estimular a síntese de receptores para bFGF contribuindo assim para otimização das ações do fator no CL (SHIKONE; YAMOTO; NAKANO, 1992). O FSH também estimula a síntese de DNA pelas células endoteliais, aumentando sua proliferação e contribuindo para a intensa vascularização do CL nestes animais, o que está de acordo com Maciel et al. (1992), ao relatar que o CL que vacas superovuladas com FSH apresentam maior número de células endoteliais do que as do grupo controle. É provável que o bFGF esteja envolvido com o recrutamento folicular em bovinos, uma vez que sua presença foi identificada no citoplasma de oócitos de folículos primordiais e primários (VAN WEZEL et al., 1995). Além disso, a elevada expressão do bFGF no CL de animais superovulados pode justificar a maior densidade vascular encontrada (MOURA et al., 2003) pois este fator é um agente angiogênico potente.

Os experimentos de hibridização *in situ* deste trabalho também identificaram o mRNA do bFGF em células luteínicas e endoteliais de animais superovulados (Figura 6B). Ao contrário da proteína, quando comparamos esta expressão com aquela de animais não submetidos ao tratamento superovulatório percebe-se que os animais superovulados apresentam quantidade igual ou menor do mRNA do fator. Níveis baixos de expressão gênica do bFGF podem ser freqüentemente encontrados na presença de altos níveis da proteína. Isso pode ser explicado pelo estoque deste fator na matriz extracelular (GOSPODARODOWICZ et al., 1987). Além disso, a

maior quantidade de proteína em relação à quantidade de mRNA pode ser um reflexo de uma atividade de tradução aumentada, o que estaria de acordo com as observações de Artoni et al. (2004) em relação a alta atividade de síntese proteica da célula luteínica dos animais superovulados.

Os animais utilizados neste estudo para a detecção da proteína e do mRNA do bFGF foram os mesmos animais utilizados por Moura (2003) para detecção do VEGF e seus receptores. Em seu trabalho, Moura coletou sangue destes animais e dosou a concentração plasmática de progesterona para correlacioná-la à densidade vascular encontrada nos CLL estudados. Uma vez que a concentração média de progesterona dos animais do presente estudo apresentam os valores de $0,77 \pm 0,1$ ng/ml para o grupo denominado de CH, $1,37 \pm 0,16$ ng/ml para o grupo denominado de CL, $3,13 \pm 0,87$ ng/ml para o grupo CR, $0,22 \pm 0,02$ para o grupo CA e $5,58 \pm 0,97$ para o grupo CS (animais superovulados), pode-se analisar o perfil da concentração plasmática de P_4 correlacionando-o à expressão do bFGF.

No presente trabalho a expressão da proteína do bFGF apresentou um perfil semelhante ao apresentado pelas flutuações da P_4 plasmática: na fase luteínica inicial (CH) apresenta-se baixa, aumenta durante a fase luteínica média (CL), na fase luteínica tardia (CR) apresenta-se aumentada em relação à fase anterior e atinge níveis basais na fase luteínica de regressão morfológica (CA). A maior concentração de P_4 encontrada na fase luteínica tardia (CR) em relação à fase luteínica média (CL) deve-se ao fato de que o pico de P_4 nos bubalinos ocorre por volta do dia 13 p.o. (BEG, SANWAL; YADAV, 1997), ou seja, ainda não ocorreu no momento estudado da fase luteínica média (dia 9 p.o.) e já está diminuindo no dia 18

p.o. (fase de CR) quando os animais já se encontram em luteólise funcional. Quando observamos a produção de progesterona do corpo lúteo superovulado também podemos correlacioná-la à expressão do bFGF no CL bubalino. Os animais superovulados apresentaram concentrações plasmáticas de P_4 significativamente maior do que os animais controle em mesma fase do ciclo estral mesmo quando o valor de P_4 foi corrigido pelo número de CLL apresentados por cada animal superovulado (MOURA et al., 2003). A influência direta do bFGF sobre a produção de P_4 foi descrita por vários autores utilizando o modelo do CL como órgão esteroidogênico. Em células bovinas cultivadas sob influência do bFGF, observou-se aumento da produção de P_4 particularmente na fase luteínica inicial (MIYAMOTO; OKUDA; SCHAMS, 1992) e na fase luteínica média (entre dias 8 e 12 p.o.) (LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996). Em ovinos, quando células luteínicas foram estimuladas com bFGF ocorreu aumento de sua proliferação de maneira dose dependente em todas as fases de desenvolvimento do corpo lúteo, mas os efeitos sobre a produção de progesterona foram variáveis (GRAZUL-BILSKA et al., 1991). Foi verificado em células luteínicas de rato tratadas com bFGF, maior produção de progesterona em fase luteínica inicial do que nas fases luteínicas média e tardia (TAMURA; ASAKAI; OKAMOTO, 1991). Em células da granulosa de folículos pré-antrais de suínos demonstrou-se que o bFGF estimula a produção de P_4 mesmo quando adicionado ao meio em doses baixas (GRASSELLI et al., 2002). Células placentárias bovinas aos 210 dias de gestação (fase gestacional na qual a placenta é capaz de manter a gestação produzindo P_4 em quantidades suficientes) também podem aumentar sua produção de P_4 depois da adição do bFGF (CAMPOS et al., 2004). Acredita-se que esta influência esteja relacionada ao aumento da atividade de enzimas esteroidogênicas, como foi descrito por Roy e Greenwald (1991) para a

ação do epidermal growth factor (EGF) sobre a produção de P_4 . Estudos mais recentes indicam que provavelmente o estímulo da produção de P_4 pelos fatores angiogênicos bFGF e VEGF deva-se a um aumento da expressão das enzimas esteroidogênicas (STOUFFER et al., 2004).

A espécie bubalina adquire papel cada vez mais importante na agropecuária brasileira. Por ser um animal resistente e gerar produtos de alto valor comercial, como o couro e a mussarela, o rebanho nacional cresce anualmente. O interesse econômico em torno dos búfalos gerou um campo para desenvolvimento de pesquisas, principalmente na área de reprodução voltada a esta espécie. Biotécnicas como inseminação artificial, superovulação e transferência de embriões têm sido utilizadas também para os búfalos com resultados semelhantes aos obtidos para o rebanho bovino. No entanto, algumas delas, como a superovulação, necessitam aprimoramento para que alcancem resultados melhores. Este trabalho visou estudar o seguinte aspecto relacionado ao CL de búfalos superovulados: a expressão do bFGF, fator este estimulador da angiogênese e da produção de P_4 . Os resultados gerados por este estudo apontam que o bFGF também está presente em CL de animais superovulados e pode vir a ser alvo de manipulação gênica para obtenção de resultados melhores relacionados à superovulação.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

1. A expressão da proteína do bFGF apresentou variações ao longo das diferentes fases do ciclo estral no CL de búfalas não tratadas.
2. A expressão do mRNA do bFGF apresentou variações ao longo das diferentes fases do ciclo estral no CL de búfalas não tratadas.
3. A expressão da proteína não se mostrou um reflexo da expressão do mRNA em algumas das fases estudadas nem em fase luteínica média de animais superovulados.
4. Em CL de animais submetidos à superovulação a expressão da proteína do bFGF se mostrou aumentada se comparada aos animais não tratados em mesma fase do ciclo estral.
5. A expressão diferencial do bFGF nas diferentes populações celulares ao longo da fase luteínica de búfalos sugere participação deste fator em diferentes eventos celulares.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. A.; MERGIA, A.; WHANG, J. L.; TUMOLO, A.; FRIEDMAN, J.; HJERRILD, K. A.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J. C. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. **Science**, n.1; v. 233 (4763), p. 545-8, 1986.
- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 259-271, 1994.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. FNP®, p.300, 2004.
- ARESE, M.; CHEN, Y.; FLORKIEWICZ, R. Z.; GUALANDRIS, A.; SHEN, B.; RIFKIN, D. B. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 5, p. 1429-1444, 1999.
- ARGENTIN, G.; CICCHETTI, R. In vitro proliferation of achondroplastic and normal mouse chondrocytes, before and after basic fibroblast growth factor stimulation. **Cell Proliferation**, v. 33, n. 6, p. 397-405, 2000.
- ARNAUD, E.; TOURIOL, C.; BOUTONNET, C.; GENSAC, M.; VAGNER, S.; PRATS, H.; PRATS, A. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 1, p. 505-514, 1999.
- ARTONI, L. P. A.; MOURA, C. E. B.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T. V.; KFOURY Jr., J. R.; MIGLINO, M. A.; BARUSELLI, P. S.; PFARRER, C.; LEISER, R.; PAPA, P. C. Ultrastructural features from superovulated corpora lútea of water buffalo. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. **Anais**, p. 363, 2004.

ASAKAI, R.; TAMURA, K.; EISHI, Y.; IWAMOTO, M.; KATO, Y.; OKAMOTO, R. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Receptors Decrease with Luteal Age in Rat Ovarian Luteal Cells: Colocalization of bFGF Receptors and bFGF in Luteal Cells. **Endocrinology**, v. 133, p. 1074-1084, 1993.

ASAKAI, R.; SONG, S.; ITOH, N.; YAMAKUNI, T.; TAMURA, K.; OKAMOTO, R. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 104, n. 1, p. 75-80, 1994.

AUGUSTIN, H. G. Vascular morphogenesis in the ovary. **Baillieres Best Pract Res clin Obstet Gynaccol**, v. 14, n. 6, p. 867-882, 2000.

AUGUSTIN, H.G.; BRAUN, K.; TELEMENAKIS, I.; MODLICH, U.; KUHN, W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in the physiological model of blood vessel growth and regression. **American Journal of Pathology**. v. 147, n. 2, p. 339-351, 1995.

BARUSELLI, P. S. Manejo reprodutivo de bubalinos. **Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Manual Técnico**, 1993.

BARUSELLI, P. S. **Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. 1997. 96f. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A. et al. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, p. 1531-1547, 1997.

BASSET, D. L. The changes in vascular pattern of the ovary of the albino rat during the oestrus cycle. **American journal of Anatomy**, v. 73, p. 257-291, 1943.

BAZER, F. W.; OTT, L. T.; SPENCER, T. E. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: signals from the throphoblast. **Theriogenology**, 41: 79-94, 1994.

BEG, M.A.; SANWAL, P. C.; YADAV, M.C. Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrous cycle: a preliminary report. **Theriogenology**, v. 47, p. 423-432, 1997.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1106-1114, 2000.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; QUARTO, N.; MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 1, p. 233-243, 1995.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 26-45, 1997.

BUGLER, B.; AMALRIC, F.; PRATS, H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 1, p. 573-577, 1991.

CAMPOS, D. B.; ARTONI, L. P.; TEIXEIRA, A.; KFOURY Jr.; J. R.; MIGLINO, M. A.; BIRGEL Jr., E.; BURATINI Jr., JOSÉ; MACHADO, U.; PAPA, P. C. Progesterone production in cattle placenta under the influence of VEGF and bFGF in vitro. **Biology of Reproduction**, special issue, p. 245, 2004.

CARVALHO, J. B. P. **Efeito do pré-tratamento com FSH ou FSH-LH no início do ciclo estral sobre a resposta ovariana de vacas superovuladas – “priming”**. 1995. 72 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DAVIS, M. G.; ZHOU, M.; ALI, S.; COFFIN, J. D.; DOETSCHMAN, T.; DORN II, G. W. Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 4, p. 1061-1072, 1997.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 55-79, 1991.

EL-SHEIKH, A. S.; SAKLA, F. B.; AMIN, S. O. Changes in the desntiy and progesterone content of luteal tissue in the egyptian búfalo during the Oestrus cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 39, p. 163-171, 1967.

ESCH, F.; BAIRD, A.; LING, N.; UENO, N.; HILL, F.; DENOROY, L.; KLEPPER, R.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHIEN, P.; GUILLEMIN, R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 82, n. 19, p. 6507-11, 1985.

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.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 267, 10931-10934, 1992.

FORSMAN, A. D.; McCORMACK, J. T. Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrus cycle. **The Anatomical Records**, v. 233, p. 515-520, 1992.

FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A. M. et al. Follicle selection in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, n. 43, p. 187-98, 1991.

FRANSER, H. M.; LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British Medical Bulletin**, v.3, n.56, p.787-97, 2000.

FUJIMOTO, E.; OCHI, M.; KATO, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SUMEN, Y.; IKUTA, Y. Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 119, n. 3-4, p. 139-145, 1999.

GABLER, C.; PLATH-GABLER, A.; KILLIAN, G. J.; BERISHA, B.; SCAHMS, D. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 321-327, 2004.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDOL.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J. E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology of Reproduction**. v. 60, n. 4, p. 914-919, 1999.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989a.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-30, 1989b.

GOSPODAROWICZ, D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 7, p. 2515-2520, 1975.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. 1987 Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. **Endocrinological Review**, v. 8, n. 95 - I, p. 14, 1987.

GRASELLI, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine cells. **Reproduction Domestic animals**, v. 37, p. 362-368, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Secretion of angiogenic activity and progesterone by ovine luteal cell types in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 69 p. 2099-2107, 1991.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P.; SLANGER, W. D.; REDMER, D. A. Production of heparin binding angiogenic factor(s) by bovine corpora lutea during pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 254-262, 1992.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D.; ZHENG, J.; REYNOLDS, L. P. Initial characterization of endothelial mitogens produced by bovine corpora lutea from the estrous cycle. **Biochemical Cellular Biology**, v. 71, p. 270-277, 1993.

GROTHER, C.; UNSICKER, K. Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal gland, ovary, and pituitary. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, p. 1877-1883, 1989.

GUTHRIDGE, M.; BERTOLINI, J.; COWLING, J.; HEARN, M. T. Localization of bFGF mRNA in cyclic rat ovary, diethylstilbesterol primed rat ovary, and cultured rat granulosa cells. **Growth Factors**, v. 7, n. 1, p. 15-25, 1992a.

GUTHRIDGE, M.; SCHMITT, J.; BERTOLINI, J.; COWLING, J.; RUNTING, A.; KATSAHAMBAS, S.; DRUMMOND, A. E.; HEARN, M. T. Studies on basic fibroblast growth factor (FGF-beta) gene expression in the rat and pig ovary using in situ hybridization and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction techniques. **Growth Factors**, v. 61, p. 219-29, 1992b.

HAFAZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6ª edição. p. 582, 1995.

HATTAB, S. A.; KADOOM, A. K.; PALME, R.; BAMBERG, E. Effect of Crestar™ on estrus synchronization and the relationship between fecal and plasma concentrations of progestagens in buffalo cows. **Theriogenology**, v. 54, p. 1007-1017, 2000.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 162-167, 2000.

HILLIER, S. Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. In: FINDLAY, J. K. **Molecular biology of the female reproductive system**. California: Academic press, p. 1-27, 1994.

HOSSAIN, M. I.; O'SHEA, J. D. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. **Journal of Anatomy**, v. 137, p. 457-466, 1983.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; ARONSON, S. A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor-10 (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.1323-95, 1998.

INGBER, D. E.; FOLKMAN, J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. **Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 1, p. 317-330, 1989.

IRUELA-ARISPE, M. L.; RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; ABU-JAWDEH, G. Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. **Microcirculation**, v. 6, n. 2, p. 127-140, 1999.

KNOFF, K.; KASTELIC, J. P.; SCALLENBERGER, E. et al. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, p. 111-9, 1989.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localization of angiotensin II in the bovine corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 369-380, 2001.

KOOS, R. D.; OLSON, C. E. Expression of basic fibroblast growth factor in the rat ovary: detection of mRNA using reverse transcription–polymerase chain reaction amplification. **Molecular Endocrinology**, v. 3, p. 2041–2048, 1989.

KOOS, R. D. Ovarian angiogenesis. In: ADASHI, E. Y.; LEUNG, P. C. K. **The ovary**. Raven Press, p. 433–453, 1993.

KUOKAWA, T.; SASADA, R.; IWANE, M.; IGARASHI, K. Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. **FEBS Letter**, v. 213, n. 1, p. 189–94, 1987.

KUWANO, M.; USHIRO, S.; RYUTO, M.; SAMOTO, K.; IZUMI, H.; ITO, K.; ABE, T.; NAKAMURA, T.; ONO, M.; KOHNO, K. Regulation of angiogenesis by growth factors. In **Gann Monograph on Cancer Research No 42. Growth Factors: Cell Growth, Morphogenesis and Transformation** (ed.) Nakamura T & Matsumoto K., pp. 113–125. Boca Roton, FL: CRC Press, 1994.

LANG, I.; HOFFMANN, C.; OLIP, H.; PABST, M. A.; HAHN, T.; DOHR, G.; DESOYE, G. Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. **Cell Proliferation**, v. 34, n. 3, p. 143–155, 2001.

LAZAROUS, D. F.; SCHEINOWITZ, M.; SHOU, M.; HODGE, E.; RAJANAYAGAM, S.; HUNSBERGER, S.; ROBISON Jr., W. G.; STIBER, J. A.; CORREA, R.; EPSTEIN, S. E.; UNGER, E. F. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. **Circulation**, v. 91, n. 1, p. 145–153, 1995.

LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy in vitro. **Reproductive Fertility and Development.**, v. 8, n. 6, p. 1003–11, 1996.

LIN, R.; LECOUTER, J.; KOWALSKI, J.; FERRARA, N. Characterization of EG-VEGF signaling in adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8724–9, 2002.

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. M. Estrogen and angiogenesis. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 21, p. 6-12, 2001.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, R. L. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MACIEL, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GUSTAFSSON, H. Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. **Zentralblatt Veterinärmedizinische Arznei.**, v. 39, n. 2, p. 89-97, 1992.

MATSUZAKI, K.; YOSHITAKE, Y.; MATUO, Y.; SASAKI, H.; NISHIKAWA, K. Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/ basic fibroblast growth factor that block its biological activity: Invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 86, p. 9911-9915, 1989.

PINEDA, M. H. IN: PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. **McDONALD'S Veterinary endocrinology and reproduction**. Fifth edition, p. 283, 2003.

MEYER, G. T.; McGEACHIE, J. K. Angiogenesis in the corpus luteum of pregnant rats: a stereologic and autoradiographic study. **Anatomical Records**, v. 1, n. 222. p. 18-25, 1988.

MIRANDA, W. C. **A Criação de Búfalos no Brasil**, São Paulo, Editora dos Criadores, 1986.

MIYAMOTO, A.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor β 1 and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 135, p. 103-114, 1992.

MOOR, R. M.; KRUIP, T. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103-116, 1984.

MOTTA, P. M.; VIZZA, E.; CORRER, S.; MACCHIARELLI, G.; MUGLIA, U. An ultrastructural study of the fibromuscular capsule of the corpus luteum in mice. **Acta Anatomica**, v. 149, p. 247-254, 1994.

MOURA, C. E. B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos**. 2003. 122p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOURA, C. E. B., CAMPOS, D. B., PEREIRA, F. T. V., OLIVEIRA, M. F., MIGLINO, M. A.; PAPA, P. C. Microvascularization and capillary density of corpus luteum from superovulated and control buffalo cows. **Acta Microscópica**, v. 12, p. 83-84, 2003.

MULLANEY, B. P.; SKINNER, M. K. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Gene Expression and Protein Production during Pubertal Development of the Seminiferous Tubule: Follicle-Stimulating Hormone- Induced Sertoli Cell bFGF Expression. **Endocrinology**, v. 131, 1992.

MURAKAMI, T.; IKEBUCHI, Y.; OHTSUKA, A.; TAGUCHI, T.; OHTANI, O. The blood vascular wreath of rat ovarian follicle, with special reference to its changes in ovulation and luteinization: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. **Archive of Histology and cytology**, v. 51, n. 4, p. 299-313.

NEUFIELD, G., FERRARA, N., SCHWEIGERER, L., MITCHELL, R., GOSPODAROWICZ, D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. **Endocrinology**, v.121, p.597-603, 1987.

NEUVIANS, T. P.; SCHAMS, D.; BERISHA, B.; PFAFFL, M. W. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>>. gi:27806627; gi:31342942. Último acesso em 18 nov 2004.

NEUVIANS, T. P.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 389-395, 2004.

NISWENDER, G. D.; REIMERS, T. J.; DIEKMAN, M. A.; NETT, T. M. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 64-81, 1976.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, n. 2, p. 115-120, 2000.

OKADA-BAN, M.; THIERY, J. P.; JOUANNEAU, J. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 263-267, 2000.

OLIVEIRA, G. J. C.; ALMEIDA, A. M. L.; SOUZA FILHO, U. A. **O búfalo no Brasil**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, 236 p, 1997.

PATE, J. L.; TOWNSON, D. H. Novel local regulators in luteal regression. **Journal of Animal Science**, v. 72 (sppl 3), p. 31-42, 1994.

PLENDL, J. Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. **Anatomy Histology Embryology**, v. 29, p. 257-266, 2000.

REYNOLDS, L. P. Utero-ovarian interactions during early pregnancy: role of conceptus-induced vasodilation. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 47-61, 1986.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Secretion of angiogenic activity by placental tissues of cows at several stages of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 497-502, 1988.

RENKO, M.; QUARTO, N.; MORIMOTO, T.; RIFKIN, D. B. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. **Journal of Cellular Physiology**, v. 144, n. 1, p. 108-114, 1990.

ROBERTS, R. D.; ELLIS, R. C. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1387-1392, 1999.

ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Turnover of dominant follicle in cattle of different reproductive stage. **Theriogenology**, v. 35, p. 81-90, 1991.

ROGELJ, S.; KLAGSBRUN, M.; ATZMON, R.; KUROKAWA, M.; HAIMOVITZ, A.; FUKS, Z.; VLODAVSKY, I. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 2, p. 823-831, 1989.

ROY, S. K.; GREENWALD, G. S. In vitro effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, and follicle-stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 889, 1991.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Development of dominant follicles and ovarian activity in the post-partum period of dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 581-591, 1990.

SCHAMS, D.; AMSELGRUBER, F. J. R.; EINSPANIER, R.; SINOWATZ, F.; GOSPODAROWICZ, D. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 2, p. 907-912, 1994.

SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; MIYAMOTO, A. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of cultured bovine granulosa cells. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 109, n. 3, p. 155-162, 2001.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 241-251, 2004.

SHIKONE, T.; YAMOTO, M.; NAKANO, R. Follicle stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1063–1068, 1992.

SHIMASAKI, S.; EMOTO, N.; KOBAYASHI, A.; MERCADO, M.; SHIBATA, F.; COOKSEY, K.; BAIRD, A.; LING, N. Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 30, n. 157 (1), p. 256-63, 1988.

SIMPSON, R. J.; MORITZ, R. L.; LLOYD, C. J.; FABRI, L. J.; NICE, E. C.; RUBIRA, M. R.; BURGESS, A. W. Primary structure of ovine pituitary basic fibroblast growth factor. **FEBS Letter**, v.224, p. 128-132, 1987.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308-317, 1988.

STIRLING, D.; WATERMAN, M. R.; SIMPSON, E. R. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 1–8, 1991.

STOCK, A. E.; ELLINGTON, J. E.; FORTUNE, J. E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v. 45, p. 1091-102, 1996.

STORMSHAK, F.; INSKEEP, E. K.; LYNN, J. E.; POPE, A. L.; CASIDA, L. E. Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 1021-1026, 1963.

STOUFFER, R. L.; MOLSKNESS, T. A.; YONG, K. A.; XU, F. Endocrine and local control of angiogenesis and proteases in the primate corpus luteum. **Biology of Reproduction**, special issue, p. 86, 2004

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. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 807–813, 1992.

WEBB, R.; WOAD, K. J.; AMSTRONG, D. G. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 277-285, 2002.

WEISE, S. Untersuchungen zum Vorkommen von Wachstumsfaktoren (aFGF, bFGF, TGF-[alpha]) und deren Rezeptoren (FGF-R, EGF-R) in der Plazenta des Rindes URN: [urn:nbn:de:hebis:26-opus-4579](http://nbn:de:hebis:26-opus-4579), URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2001/457/>, 2001.

WORDINGER, R. J.; BRUN-ZINKERNAGEL, A. M.; CHANG, I. F. C. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse ovarian follicles. **Growth Factors**, v. 9, n. 4, p. 279-89, 1993.

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. **Gynecology and Endocrinology**, v. 11, n. 4, p. 223-30, 1997.

TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in development follicle and corpus luteum. **Reproduction of Domestic Animals**, v.39, p. 206-216, 2004.

TAMURA, K.; ASAKAI, R.; OKAMOTO, R. Basic fibroblast growth factor in rat corpus luteum stimulates prostaglandin F2-alpha production. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 15; n. 178 (1), p. 393-9, 1991.

VAN WEZEL, I. L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W. D.; RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, p. 133–140, 1995.

ZAYED, A.E.; MEGAHEDE, G. A. Morphological and functional observations on the cyclic corpus luteum in Egyptian buffaloes (*Bus bubalis*). **Assiut Veterinary Medicine Journal**. v. 40, n. 80, p. 1-16, 1999.

ZHENG, J.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrus cycle. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1177-1189. 1993.

ZICARELLI, L. Considerazioni sull'allevamento bufalino. Salerno, Ente Regionale Sviluppo Agricolo in Campânia, 70p., 1990.