LUCIANA ALVES DE FÁTIMA

**Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de
búfalas**

São Paulo

2008

LUCIANA ALVES DE FÁTIMA

Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas

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 Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2035
FMVZ

Fátima, Luciana Alves de
Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas / Luciana Alves de Fátima. – São Paulo : L. A. Fátima, 2008.
126 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2008.

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. Búfalo. 2. Corpo lúteo. 3. Fatores de Crescimento. 4. Angiogênese. 5. Superovulação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão gênica e protéica do sistema VEGF em corpo lúteo de búfalos superovulados e não manipulados", protocolado sob o nº 1140/2007, utilizando 20 (vinte) búfalos (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Gene and protein expression of VEGF – system in corpus luteum of non-manipulated and superovulated water buffalo", protocol number 1140/2007, utilizing 20 (twenty) buffaloes, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Fátima, Luciana Alves

Título: **Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas**

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 Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério.
É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e
ciência.
Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está
praticamente
morto e seus olhos estão ofuscados".*

Albert Einstein

DEDICO

*Aos meus pais José Maria e Irene das Graças , que
sempre acreditaram e torceram por mim*

*Aos meus irmãos... Renata, Alex, Aline, Diego e Isadora ...
sempre companheiros.....*

Amo todos vocês.....

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Deus tem uma resposta positiva para todas as coisas negativas que nós dizemos a nós mesmos.

Quando dizes:

*"Não posso resolver as coisas..." Deus te diz:
"Eu guiarei os seus passos".*

Quando dizes:

*"É impossível..." Deus te diz:
"Tudo é possível"*

Quando dizes:

*"Me sinto muito sozinho..." Deus te diz:
"Não te deixarei nem te desampararei"*

Quando dizes:

*"Eu não posso fazer..." Deus nos diz:
"Tudo podes fazer."*

Quando disser:

*"Não sei como seguir..."
Deus te diz:
"Eu ensinarei o caminho"*

Quando dizes:

*"Eu tenho medo..." Deus te diz:
"Não tema jamais, que eu estou contigo"*

Quando dizes:

*"Estou muito cansado..." Deus diz:
"Eu te farei descansar. "*

Obrigada a Deus e a Santo Expedito por terem guiado meus passos durante todo esse caminho..e toda a minha vida.....

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, que me guiou por este caminho cheio de obstáculos com muita competência e dedicação, e tornou-se uma grande amiga.

AGRADEÇO...

À Professora Maria Angélica Miglino, pela confiança depositada em mim, e por tornar possível o ingresso na Pos-graduação.

Aos Professores do setor de Anatomia, Francisco Javier H. Blasquez, José Roberto Kfoury Júnior, Pedro Primo Bombonato, pelo aprendizado durante as aulas de Pós-Graduação, e por terem disponibilizado seus laboratórios para execução dos experimentos.

Ao Professor Pietro Sampaio Baruselli pela disponibilidade do material dos búfalos superovulados.

Ao professor José Buratini Jr por ter disponibilizado seu laboratório e colaborar na execução dos experimentos.

Aos técnicos Diogo, Edinaldo (Índio) e Ronaldo pela disponibilidade durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários do setor de Antomia Maicon e Jackeline, pela consideração, simpatia e auxílio durante a minha estada neste programa.

Ao colega Carlos Eduardo Bezerra Moura (Cadu), pela disponibilidade do material para realização deste trabalho.

Ao amigo Carlos Roberto Bueno Junior, pelas conversas e pela paciência e dedicação em ensinar-me a técnica de Western blotting.

Liza e Joana, amigas e companheiras de todos os dias por terem ajudado na finalização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, Mariana, Laura e Alex, pela ajuda durante a realização deste trabalho, pela companhia e amizade.

À amiga Danila pelas conversas, ensinamentos, paciência e dedicação.

Minha irmã Aline, pela ajuda especial.....e por ser especial....e estar aqui junto comigo todos os dias.....sendo uma super companheira.....

Aos amigos e companheiros de república...Regina Bolina e Paulo Herrinque, pela força, amizade e paciência.

Às amigas Roseâmely Angélica (Nêga), Adriana Rodrigues (in memorian), a ajuda de vocês foi fundamental para tornar possível a vinda para São Paulo.

Aos amigos e colegas de pós-graduação com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar um desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a esta coordenadoria pelo auxílio concedido.

RESUMO

FATIMA, L. A. **Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas.** [Expression of angiogenic factors in cyclic and superovulated buffalo corpus luteum]. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O uso de biotecnologias pode ser um método eficaz para melhorar a eficiência da reprodução e aumentar a produção de animais geneticamente superiores. O tratamento superovulatório é uma técnica comum utilizada com o objetivo de difundir o material genético desejado, embora seu uso em búfalos ainda apresente limitações, principalmente relacionada à baixa taxa de recuperação de embriões. O corpo lúteo (CL) é uma glândula reprodutiva transitória que produz progesterona, requerida para o estabelecimento e manutenção da prenhez e regulação do ciclo reprodutivo. O desenvolvimento e as funções do corpo lúteo são afetados pela hiperestimulação ovariana. As células luteínicas de animais superovulados apresentam características compatíveis com alta síntese de proteína. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) são reguladores importantes do desenvolvimento e função do CL, e também são afetados pelo tratamento superovulatório. Vários estudos sugerem que o LH (hormônio luteinizante) e hCG (gonadotrofina coriônica humana) modulam a expressão dos fatores de crescimento. Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica e protéica dos sistemas VEGF e bFGF em corpo lúteo cíclico de búfalas não tratadas e superovuladas. Foram utilizados vinte corporea lutea (CLL) divididos em 5 grupos de acordo com o estágio do ciclo estral (2, 6, 12, 17 e 26 dias após ovulação –p.o.) e o grupo 6 era composto de CLL de animais superovulados no dia 6 p.o. Os CLL foram coletados em abatedouro, dissecados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para posterior extração de proteína e de mRNA. A análise protéica do VEGF, KDR, bFGF, FGFR-2 e FGFR-3 foi determinada por western blotting, enquanto a análise da expressão gênica de VEGF, KDR, Flt-1, bFGF, FGFR-1 a 4, por RT-PCR em tempo real. No CL de búfalas superovuladas observou-se maior expressão protéica dos sistemas VEGF e bFGF, em relação aos animais não tratados ($p < 0,05$). Por outro lado, a expressão do mRNA de todos os genes estudados decresceu (sistema VEGF-A $p < 0,001$, bFGF, FGFR-1 e FGFR-3, $p < 0,05$) ou apresentou tendência a decrescer (FGFR-2 e FGFR-4, $p < 0,1$) nos

animais superovulados. Durante o ciclo estral, a expressão protéica do VEGF não variou, apesar da expressão de todas as outras proteínas e mRNA estudados apresentarem variações de acordo com a fase do ciclo estral. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento superovulatório aumenta a taxa de tradução dos fatores angiogênicos no CL de búfalas, e que a expressão dos sistemas VEGF e bFGF ao longo do ciclo estral é tempo-dependente, indicando um papel importante destes fatores na regulação das funções do CL.

Palavras-chave: Búfalo. Corpo lúteo. Fatores de Crescimento. Angiogênese. Superovulação.

ABSTRACT

FATIMA, L. A. Expression of angiogenic factors in cyclic and superovulated buffalo corpus luteum. [**Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas**]. 2008.126f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Biotechniques can be an effective way of improving reproduction efficiency and enhancing the production of genetically superior animals. The superovulatory treatment is a common technique aiming to spread desired genetical material, although its use in buffalos still presents limitations, mainly the low embryo recovery rate. The corpus luteum (CL) is a temporary endocrine gland that produces progesterone (P), which is required to the establishment and maintenance of pregnancy and regulation of reproductive cycle. CL development and function are affected by ovarian hyperstimulation. The luteal cells of superovulated animals are described to show characteristics compatible with higher protein synthesis. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are important regulators of CL and are also affected by superovulatory treatment. Several studies suggest that LH (luteinizing hormone) and hCG (human chorionic gonadotropin) modulate expression of growth factors. The aim of this work was to access gene and protein expression of VEGF and bFGF systems in cyclic CL of non-treated and superovulated water buffalos. Twenty water buffaloes corpora lutea (CLL) were divided in five groups according to estrous cycle stage (days 2, 6, 12, 17 and 26 after ovulation - p.o.) and the sixth group was composed by superovulated CLL from day 6 p.o. The CLL were collected at the slaughterhouse, dissected and frozen immediately in liquid nitrogen for posterior protein and mRNA extraction. Protein expression of VEGF and its receptors KDR and Flt-1 as well as bFGF and its receptors FGFR-2 and FGFR-3 was measured by western blotting (WB). For the relative gene expression of VEGF, KDR, Flt-1, bFGF, FGFR-1 to 4, we used real time RT-PCR. VEGF and bFGF systems protein expression showed an increase ($p < 0.05$) in superovulated CLL compared to non-treated CLL on day 6 after p.o. On the other hand, mRNA expression from all studied genes was decreased (VEGF-A system $p < 0.001$, bFGF, FGFR-1 and FGFR-3, $p < 0.05$) or tended to decrease

(FGFR-2 and FGFR-4, $p < 0.1$) in superovulated CLL. In estrous cycle CLL VEGF protein did not show a time dependent expression although all other proteins and mRNAs expression were dependent on estrous cycle stage. These results indicate that the superovulatory treatment increased transduction rate of angiogenic factors in CL and that VEGF and bFGF systems are expressed in a time-dependent manner during the estrous cycle, indicating that these growth factors are important regulators of CL function.

Key words: Buffalo. Corpus luteum. Angiogenesis. Growth factors. Superovulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Análise da proteína VEGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após a ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) gráfico representando o conteúdo total do VEGF em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 005$) entre os grupos.....	62
Figura 2 -	Análise da proteína KDR em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após a ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) gráfico representando o conteúdo total do KDR em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 005$) entre os grupos.....	63
Figura 3 -	Testes feitos com Flt-1, (A) usando como controles placenta bovina (PL; retângulo) e músculo esquelético (ME; círculos), (B) CL em diferentes dias após a ovulação; M = marcador de peso molecular.....	64
Figura 4 -	Análise das proteínas VEGF em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo VEGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do VEGF em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	65
Figura 5 -	Análise das proteínas KDR em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo KDR expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do KDR em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. * significa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.....	66
Figura 6	Análise da proteína bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do bFGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do bFGF em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	68
Figura 7 -	Análise da proteína FGFR-2 em corpo lúteo de búfalas em	

	diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FGFR-2 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	69
Figura 8 -	Análise da proteína FGFR-3 em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FGFR-3 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	70
Figura 9 -	Análise das proteínas bFGF em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo bFGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	71
Figura 10 -	Análise das proteínas FGFR-2 em corpo lúteo de búfalas não tratadas e superovuladas no dia 6 p.o. (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo FGFR-2 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. * significa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.....	72
Figura 11 -	Análise das proteínas FGFR-3 em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. (A) Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo de FGFR-3 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; (B) Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-3 em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.....	73
Figura 12 -	Expressão relativa do mRNA (UA) do VEGF (A), Flt-1 (B) e KDR (C) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média ± desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,001$	76
Figura 13 -	Expressão relativa do mRNA do VEGF (A), Flt-1 (B) e KDR (C) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 após-ovulação. As barras representam a média ± desvio padrão de três (CL) e cinco (CS)	

	animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,001$	77
Figura 14 -	Expressão relativa do mRNA do bFGF (A), FGFR-1 (B) e FGFR-2 (C) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,05$	79
Figura 15 -	Expressão relativa do mRNA do FGFR-3 (A) e FGFR-4 (B) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,05$	80
Figura 16 -	Expressão relativa do mRNA do bFGF (A), FGFR-1 (B) e FGFR-2 (C) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 após a ovulação. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três (CL) e cinco (CS) animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,05$	81
Figura 17 -	Expressão relativa do mRNA FGFR-3 (A) e FGFR-4 (B) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 pós-ovulação. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três (CL) e cinco (CS) animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,001$	82
Figura 18 -	Eletroforese em gel de agarose 1,1% e brometo de etídeo após digestão do vetor contendo o fragmento do receptor KDR. 1 - Banda correspondente ao vetor 2 - Banda correspondente ao produto de amplificação do KDR M – marcador de peso molecular.....	85
Figura 19 -	Seqüência parcial do KDR da espécie bubalina.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre o VEGF e do bFGF e seus respectivos receptores no CL cíclico de búfalas, em UA/ proteínas totais como também em UA/g de tecido.....	74
Tabela 2 - Correlação da expressão gênica entre o VEGF e do bFGF e seus respectivos receptores no CL cíclico de búfalas.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro - 1	Identificação dos anticorpos primários utilizados no Western blotting.....	47
Quadro - 2	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do GAPDH, VEGF, Flt-1, KDR, bFGF, FGFR-1,FGFR-2, FGFR-3, e FGFR-4 S = sense e A = anti-sense.....	52
Quadro - 3	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do bFGF, FGFR-1,FGFR-2, FGFR-3, e FGFR-4 S = sense, A = anti-sense e P= probe (sonda).....	53
Quadro - 4	Seqüência dos primers utilizados na amplificação do KDR para clonagem S = sense e A = anti-sense.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
ANOVA	análise de variância
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CL	corpo lúteo
CLL	corporea lútea
CTGF	fator de crescimento do tecido conjuntivo
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAse	enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
d. p.o.	dias após a ovulação
E ₂	estradiol-17β
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
EGF	fator de crescimento epidermal
EPM	erro padrão médio
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGFR	receptor para o fator de crescimento fibroblástico
Flt-1	fms-like tyrosine kinase
FSH	hormônio folículo estimulante
FHSR	receptor para o hormônio folículo estimulante

GnRH	hormônio liberador de gonadotropinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HIF α	fator induzido por hipóxia
HLGAGs	glicosaminoglicanos heparino-miméticos
HS	sulfato de heparina
HSPG	proteoglicanos contendo sulfato de heparina
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
Kd	constante de dissociação
KDa	kilodaltons
KDR	kinase insert domain containing receptor
LH	hormônio luteinizante
LHR	receptor para o hormônio luteinizante
M	molar
mg	miligramas
mL	mililitro
mM	milimolar
MAPK	quinase mitógeno-ativada
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
nm	nanômetros
NP	neurofilinas
O.D.	densidade óptica
P ₄	progesterona
p.o.	após ovulação
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PGF _{2α}	prostaglandina 2 α

PIGF	fator de crescimento placentário
PKC	proteína quinase c
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride
RNA	ácido ribonucléico
rBST	somatotropina recombinante bovina
RNase	enzim que degrada o ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
RTKs	receptores tirosina-quinase
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i>
StAR	proteína reguladora aguda da esteroidogênese
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
TGF	fator de crescimento tumoral
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR	receptor para fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUCAO	25
2 OBJETIVOS.....	28
3 REVISÃO DA LITERATURA	30
3.1 SUPEROVULAÇÃO	30
3.2 CORPO LÚTEO.....	32
3.3 ANGIOGÊNESE NO CORPO LÚTEO.....	33
3.4 FATORES DE CRESCIMENTO	34
3.4.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e seus receptores.....	35
3.4.2 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) e seus receptores.....	37
3.5 FATORES DE CRESCIMENTO NO CORPO LÚTEO.....	39
3.6 A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO NO CL..	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA WESTERN BLOTTING	45
4.2 WESTERN BLOTTING.....	46
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	48
4.4 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	49
4.5 CONFECÇÃO DO CDNA.....	49
4.6 PCR EM TEMPO REAL	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4.8 PCR PARA O SEQUENCIAMENTO.....	56
4.9 PURIFICAÇÃO DO DNA	57
4.10 LIGAÇÃO AO VETOR	58
4.11 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES E	

TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO.....	58
4.12 MINI-PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	59
4.13 SEQÜENCIAMENTO	60
5 RESULTADOS	61
5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS VEGF, Flt-1 E KDR NO CORPOLÚTEODE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS.....	62
5.2 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS bFGF, FGFR-2 E FGFR-3 NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS.....	69
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO VEGF, DO bFGF E DE SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES.....	76
5.4. EXPRESSÃO DO mRNA DO VEGF, Flt-1 E KDR NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS.....	78
5.5. EXPRESSÃO DO mRNA DO bFGF, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 E FGFR-4 NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS.....	81
5.6. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO VEGF, bFGF E RESPECTIVOS RECEPTORES.....	86
5.7. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	88
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O manejo reprodutivo é um dos segmentos mais importantes na produção animal. O emprego de biotecnologias é um meio de melhorar a eficiência reprodutiva e aumentar a produção de animais geneticamente superiores. As técnicas mais utilizadas no manejo reprodutivo são a superovulação, transferência de embriões, sincronização de cio, além da produção de embriões in vitro (REICHENBACH et al., 2002).

O tratamento superovulatório visa o aumento do número de ovulações, provocada mediante a administração de gonadotrofinas exógenas. É uma técnica bastante utilizada em espécies domésticas, mas ainda apresenta limitações na espécie bubalina (BARUSELLI et al., 2007)

As fêmeas bubalinas respondem ao tratamento superovulatório, mas apresentam baixa eficiência quando comparadas a fêmeas bovinas na recuperação de embriões. Apenas 34,8% das ovulações de búfalas submetidas à estimulação do crescimento folicular resultam na colheita de estruturas embrionárias (BARUSELLI et al., 2000).

A hiperestimulação ovariana provoca alterações morfológicas e funcionais importantes no CL. Alguns trabalhos apontam um aumento significativo das concentrações circulantes de progesterona produzidas pelo CL de bovinos formado após o tratamento com eCG (BARUSELLI et al., 2004). Além disso, búfalas superovuladas apresentam um CL com maior densidade vascular, além de apresentarem também uma alta concentração de progesterona plasmática (Papa et al., 2007). Outros trabalhos associam o aumento da concentração plasmática de progesterona com o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da gestação (BINELLI et al., 2001), o que denota a importância da perfeita interação entre o CL, a produção hormonal e o sucesso reprodutivo.

O corpo lúteo é um órgão de intensa angiogênese, com formação de densa rede de capilares que possibilita a células produtoras de hormônios obterem oxigênio, nutrientes e hormônios necessários para a síntese e liberação de uma grande quantidade de progesterona requerida para o estabelecimento e manutenção da prenhez (GAYTÁN et al., 1999). Sabe-se que o rápido aumento da vascularização luteínica é estimulado por fatores angiogênicos produzidos no próprio corpo lúteo (REYNOLDS e REDMER, 1988) como o bFGF (GRAZUL-BILSKA et al., 1992; GRAZUL-BILSKA et al., 1993; BERISHA et al., 2000; SCHAMS et al., 2001) e o VEGF (BERISHA et al., 2000; PLENDL, 2000; WULFF et al., 2000; SCHAMS; BERISHA, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que as gonadotrofinas estimulam a produção de VEGF (CHRISTENSON et al., 1997; LEE et al., 1997; PIETROWSKI KECK; 2004; MAYBIN e DUNCAN, 2004) e que o FSH induz a expressão de receptores de bFGF (SHIKONE; YAMOTO; NAKANO, 1992). Diante disto, fazem-se necessários estudos para avaliar melhor a expressão dos fatores de crescimento no CL cíclico de búfalas como também a influência do tratamento superovulatório na expressão desses fatores, a fim de se conhecer melhor o funcionamento do CL bubalino e embasar futuros estudos e abordagem da técnica de superovulação para otimizar o processo reprodutivo nesta espécie.

Desta forma, a proposta deste estudo foi examinar a expressão gênica e protéica do VEGF, bFGF e seus receptores ao longo do ciclo estral em búfalas bem como em animais submetidos ao tratamento superovulatório comparando-os com animais não tratados no mesmo dia do ciclo estral.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVOS

Hipotetizou-se que a expressão gênica e protéica do VEGF e seus receptores, como também do bFGF e seus receptores varia de acordo com fase do ciclo estral no CL de búfalas. Além disso, que o sistema VEGF e bFGF em búfalas superovuladas se comporta de forma diferente em relação a búfalas não manipuladas na mesma fase do ciclo estral.

Para testar esta hipótese os seguintes objetivos específicos foram determinados:

1. Quantificar a expressão gênica e protéica do VEGF e seus receptores, Flt-1 e KDR, nas diferentes fases do corpo lúteo cíclico (2 , 6 , 12, 17 e 26 dias pós ovulação – p.o.) de búfalas não manipuladas.
2. Quantificar a expressão gênica do bFGF e seus receptores FGFR-1 a 4, como também a expressão protéica do bFGF e seus receptores FGFR-2 e 3 nas diferentes fases do corpo lúteo (2 , 6 , 12, 17 e 26 dias p.o.) de búfalas não manipuladas.
3. Quantificar a expressão gênica e protéica do VEGF e seus receptores, bem como do bFGF e seus receptores em búfalas submetidas ao tratamento superovulatório no dia 6 p.o.
4. Comparar os dados obtidos em animais não manipulados com animais superovuladas no dia 6.o.
5. Clonagem e seqüenciamento do KDR bubalino, e inserção da seqüência no GenBank

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão de literatura são abordados temas referentes a superovulação e morfologia do corpo lúteo, bem como aos aspectos relacionados a angiogênese luteínica. Em seguida, os fatores de crescimento VEGF e bFGF, bem como seus receptores, e a relação destes com a angiogênese e o tratamento superovulatório.

3.1 SUPEROVULAÇÃO

A superovulação é uma técnica utilizada para estimular o crescimento e a múltipla ovulação dos folículos antrais através da administração de gonadotrofinas exógenas. O objetivo é que um número maior de folículos do que o geneticamente estabelecido durante um ciclo sexual natural seja selecionado e recrutado (ADAMS, 1994).

Os principais hormônios aplicados diretamente na superestimulação ovariana são: o FSH (hormônio folículo-estimulante), LH (hormônio luteinizante), e a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Esses hormônios são glicoproteínas pertencentes à família das “cysteine Knot growth factor” (HERR et al., 2004).

Folículos em vários estágios de desenvolvimento estão normalmente presentes nos ovários. O objetivo do tratamento superovulatório é fornecer àqueles folículos que normalmente se tornariam atrésicos, um meio hormonal adequado para que continuem seus processos de maturação, culminando com a ovulação (DINIZ et al., 1999). As gonadotrofinas estimulam o crescimento dos folículos pequenos, revertendo a atresia dos folículos acima de 1,7mm (MOOR; KRUIP; GREEN, 1984).

Um dos fatores determinantes para a resposta ovariana está relacionado ao tipo e a forma de administração das gonadotrofinas (COGNÍÉ, 1999). Um tratamento com excessivas doses de LH causa a ativação prematura dos oócitos.

Em vacas superovuladas com FSH, a alta concentração de LH resulta em baixa fecundação (BÉNYEI; BARROS, 2000).

Atualmente estuda-se a utilização da somatotropina recombinante bovina (rBST), substância que acarreta o aumento de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), sobre o recrutamento folicular ovariano (LUCY, 2000). Em búfalas submetidas ao tratamento com rBST ocorreu um aumento do número e da proporção de embriões transferíveis (SONGSASEN et al., 1999) e aumento na taxa de recuperação de embriões e, apesar de não significativo, do número de estruturas embrionárias recuperadas em relação ao grupo não tratado com rBST (BARUSELLI et al., 2003). Em outros estudos realizados testando-se o tamanho da dose de BST observou-se que doses mais baixas desse hormônio parecem mais eficientes para recuperação de estruturas embrionárias (CARVALHO et al., 2007) .

Outro fator importante que causa variabilidade das respostas ovarianas a estimulação exógena por gonadotrofinas, pode ser a fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra no início do tratamento, o que interfere no número de folículos responsáveis às gonadotrofinas (DINIZ et al., 1999). As principais variações estão relacionadas ao número de CL, de óvulos/embriões e de embriões apropriados para serem congelados e transferidos para uma receptora (BARUSELLI et al., 2006). O protocolo convencional para iniciar a hiperestimulação ovariana é iniciado durante a fase média do ciclo estral, aos 8-12 dias após o estro (BO et al., 1995).

Algumas estratégias vêm sendo estudadas para estabelecer o período ideal para iniciar a hiperestimulação com uma maior eficiência do tratamento. Vários estudos têm demonstrado a importância do tratamento com gonadotrofinas ser iniciado no momento da emergência da segunda onda de crescimento folicular, pois a ausência do folículo dominante no início do tratamento aumenta a eficácia da superovulação (ADAMS et al., 1994; MAPLETOFT et al., 2002). A sincronização das ondas foliculares antes do tratamento superovulatório é um passo importante. Um estudo feito por Bo et al. (1996) mostrou que a sincronização das ondas de crescimento folicular, com estradiol-17 β (E₂) e progesterona (P₄), seguidos por administração de FSH aumenta a eficiência da resposta superovulatória (BO et al., 2002). Além do estradiol e da P₄ outros estudos mostram que o GnRH (KOHRAM et

al., 1998), LH, hCG (BÓ et al., 1993; 1995) também são usados para controlar a emergência de ondas foliculares. Em búfalos é importante o uso dessas técnicas antes do tratamento superovulatório, pois o comportamento estral é discreto e a detecção do estro é difícil (BARUSELLI, 2007).

Fêmeas bubalinas quando submetidas ao tratamento superovulatório apresentam, em média, uma taxa de ovulação de 62,8%, semelhantes a observada por Stock, Ellington e Fortune (1996) em bovinos. O número de ovulações foi correlacionado ao número de CL no dia da colheita de embriões, demonstrando, portanto, que a ovulação na espécie bubalina foi seguida de formação de CL (BARRUSELLI et al., 1997).

3.2 CORPO LÚTEO

As funções ovarianas são reguladas primeiramente pelas gonodotrofinas FSH e LH e seus receptores (FHSR e LHR), mas além delas existem evidências que fatores produzidos localmente, como os hormônios esteróides, peptídeos e fatores de crescimento são essenciais para o desenvolvimento folicular e ovulação (revisado por BERISHA; SCHAMS, 2005).

A formação do CL é iniciada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas nas células da teca e da granulosa do folículo pré-ovulatório induzidos pelo LH. Essas mudanças incluem diferenciação das células da teca e da granulosa em células luteínicas, intensivo remodelamento de tecido, crescimento do leito vascular e alteração na esteroidogênese para aumentar a produção de progesterona (REYNOLDS; REDMER 1999; FRASER; LUNN 2001; SCHAMS; BERISHA, 2004).

O CL é um tecido heterogêneo composto por células endoteliais, células luteínicas grandes e pequenas (esteroidogênicas), fibroblastos, células musculares lisas e células do sistema imunológico (REYNOLDS et al., 1994). Sua principal função é a produção de progesterona, que é essencial para o estabelecimento e manutenção da prenhez (SCHAMS; BERISHA, 2004).

Na espécie bubalina o CL encontra-se profundo no estroma ovariano e geralmente pequeno quando comparado ao do bovino, seu peso máximo chega a 2,3g, e diâmetro de 15 mm (ROY; MULLICK, 1964). Diferenças no tamanho do CL implicam também diferenças na produção de progesterona. O CL dos zebuínos é menor quando comparado ao dos taurinos, e conseqüentemente a quantidade de progesterona produzida também é inferior (SEGERSON et al., 1984).

De acordo com Moura (2003) em búfalas, o corpo hemorrágico CH (fase luteínica inicial) possui uma estrutura lobular bem definida. Os lóbulos possuem uma cavidade central que passa a ser preenchida por células luteínicas e vasos sanguíneos conforme o CL se desenvolve. O CL maduro é marcado pela presença de células luteínicas que apresentam núcleo central, grande e esférico. O corpo lúteo em regressão apresenta invasão por tecido conjuntivo caracterizado pela desorganização celular e grandes espaços intersticiais; no *corpo albicans* ocorre predomínio de tecido conjuntivo fibroso, raras células luteínicas e escassos vasos sanguíneos.

A transição do folículo para o corpo lúteo e a subsequente luteólise resulta em um massivo crescimento e regressão dos vasos sanguíneos (PLENDL, 2000). A densidade vascular no CL de búfalos varia de acordo com o período de desenvolvimento do CL. Existe uma redução de 33% na densidade vascular da fase de corpo lúteo maduro em relação ao corpo hemorrágico, de 6% entre o corpo lúteo maduro e corpo lúteo em regressão e de 69% entre o corpo lúteo em regressão e corpo *albicans* (MOURA, 2003).

3.3 ANGIOGÊNESE NO CORPO LÚTEO

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em um processo envolvendo migração e proliferação de células endoteliais já existentes nos vasos. É um processo complexo e requer um delicado balanço entre promotores e inibidores (SCHAMS; e BERISHA, 2004). Em tecidos adultos, a angiogênese é um fenômeno altamente controlado e os órgãos

reprodutivos durante o ciclo estral são um dos poucos exemplos nos quais a angiogênese ocorre de forma acelerada, o que levou Zhang et al. (2005) a descreverem o corpo lúteo como um “tumor transitório”.

No CL, a angiogênese tem suas origens na vascularização do folículo pré-ovulatório (SUZUKI et al., 1998). A nova vascularização começa com a perda da integridade da membrana basal, acompanhado por extensivo remodelamento de tecido, com o começo da invasão das células da granulosa em diferenciação, contendo regiões para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente da camada da teca. Os próximos dias são associados com um período de intensa angiogênese resultando na formação de novos microvasos que se estendem por todo tecido (KAMAT et al., 1995; PLENDL, 2000).

A angiogênese luteínica é hormonalmente regulada pelo LH (SUGINO et al., 2000). Além do LH, a hipóxia e IGFs aumentam ainda mais a expressão de fatores de crescimento nas células luteínicas contribuindo para a formação e manutenção da vascularização (MARTINEZ-CHEQUER et al., 2003).

Em um sistema de fisiológico *in vitro* que mimetiza a angiogênese, Robinson et al. (2008) mostraram que se utilizando células primárias derivadas do CL, sob estimulação de doses fisiológicas de LH, bFGF e VEGF, ocorre a produção de estruturas tubulares e pontos de ramificação, e após 9 dias de cultura, uma rede de células endoteliais foi desenvolvida, semelhante a uma rede capilar, o que demonstra a importância do LH e dos fatores de crescimento na formação dos vasos sanguíneos do CL.

3.4 FATORES DE CRESCIMENTO

Uma breve descrição dos fatores de crescimento VEGF e bFGF, bem como de seus receptores, se faz necessária para justificar a utilização dos mesmos no presente trabalho.

3.4.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e seus receptores

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) recebeu essa denominação no final da década de 1980. Inicialmente descrito como fator de permeabilidade vascular, ele foi isolado pela primeira vez em líquido ascítico de cobaias em 1983 (SENGER et al., 1983). Além dos efeitos angiogênicos e de permeabilidade vascular, outras pesquisas sugerem que o VEGF tem efeitos pró-inflamatório e neuroprotetor (FERRARA et al., 1992).

O VEGF desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis quanto a sua ausência provocam danos na formação vascular sistêmica. Assim sendo, outras funções fisiológicas que dependem de angiogênese são prejudicadas quando da supressão ou ausência de VEGF, como reparação tecidual de feridas (NISSEN et al., 1998), crescimento ósseo (GERBER et al., 1999) e ovulação (FERRARA et al., 1998).

Quando se fala em VEGF, fala-se de uma família de moléculas semelhantes (isoformas) que são codificadas por um único gene, constituída por diversas proteínas identificadas por letras (VEGF-A a F; PAAVONEN et al., 1996; ACHEN et al., 1998; MEYER et al., 1999; SUTO et al., 2005; YAMAZAKI et al., 2005) e pelo fator de crescimento placentário (PIGF; PARK et al., 1994). O VEGF nativo ou VEGF-A consiste de uma glicoproteína homodimérica básica de 45 kDa, ligante de heparina, codificada por um único gene e com habilidade de promover o crescimento das células endoteliais derivadas de artérias, veias e linfáticos (FERRARA, 2004).

Em seres humanos, existem pelo menos oito isoformas do VEGF-A (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206) que são geradas por derivação alternativa de um único gene. A nomenclatura utilizada para nomear as diferentes isoformas baseia-se na quantidade de aminoácidos que cada molécula de proteína secretada possui (BATES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003). A quantidade de aminoácidos define características de cada molécula como, por exemplo, a capacidade de ligação a

heparina e sua solubilidade (PARK; KELLER; FERRARA, 1993; POLTORAK et al., 1997).

O VEGF age através dos receptores VEGFR-1/Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase* – 1; DE VRIES et al., 1992) e o VEGFR-2/KDR (*Kinase insert domain containing region*; TERMAN et al., 1992). São receptores tirosina-quinase (RTKs) caracterizados por possuírem sete domínios imunoglobulina – miméticos em sua porção extracelular, uma região transmembrânica única e uma seqüência tirosina-quinase interrompida pelo domínio de inserção a quinase em sua porção intracelular (SHIBUYA et al., 1990). O VEGFR-3/Flt-4 (*Fms-like tyrosine kinase* – 4; KAIPAINEN et al., 1995), outro membro da mesma família de RTKs age como receptor dos VEGF-C e VEGF-D (KARKHAINEN et al., 2002). Estes receptores são expressos em células endoteliais, mas alguns outros tipos celulares podem expressar um ou ambos os receptores. O VEGF se liga ao Flt-1 com uma constante de dissociação (K_d) de aproximadamente 10-20pM (DE VRIES, et al., 1992). Entretanto, o KDR tem uma menor afinidade com o VEGF, a K_d é estimada em aproximadamente 75-125pM (TERMAS et al., 1992).

Uma importância crítica do VEGF na angiogênese foi demonstrada estudando-se ratos, nos quais a deleção de ambos ou um único alelo do VEGF é letal durante o desenvolvimento fetal devido a interrupção da angiogênese embrionária; sua expressão aumentada de maneira anormal também induz a morte fetal, devido a hiper-vascularização e tecidos aumentados (STOUFFER et al., 2001). Quando realizada uma deleção dos genes do Flt-1 e KDR em camundongos homozigotos os efeitos também foram letais. Enquanto os camundongos nocaute para o KDR falharam na formação de células endoteliais e seus precursores, os camundongos nocaute para o Flt-1 formaram células endoteliais, mas a formação da rede vascular foi anormal (FONH et al., 1995; SHALABY et al., 1995).

O KDR é expresso principalmente em células endoteliais angiogênicas e medeia os efeitos do VEGF de proliferação e migração. O Flt-1 participa da formação do arranjo da rede vascular (BOONYAPRAKOB et al., 2003), além de ser expresso em células endoteliais proliferativas e quiescentes (BERISHA et al., 2000). Entretanto algumas isoformas do VEGF-A se ligam seletivamente as neurofilinas NP-1 (VEGF165) e NP-2 (VEGF165 e VEGF145) outro tipo de receptores

transmembrânicos, primeiro identificados no crescimento neuronal como mediadores do controle da orientação axonal (STOUFFER et al., 2001), e considerados co-receptores responsáveis por aumentar a afinidade entre o VEGF e o KDR (KARAMYSHEVA, 2007).

A expressão do VEGF é regulada por vários fatores. A hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do VEGF (SHARKEY et al., 2000). Recentemente foi mostrado que no útero de ratos o estradiol induz a produção de VEGF via indução da produção de HIF α (fator induzido por hipóxia) e o recrutamento dessa proteína para promover a indução do VEGF (KAZI et al., 2005). O LH, hCG e IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina 1) também são potentes estimuladores da expressão e da secreção da proteína VEGF em células granulosas de bovinos (SCHAMS et al., 2001). A progesterona também tem um efeito estimulatório na produção de VEGF, em vários tipos de células como células cancerosas da mama (HYDER et al., 1998) células da retina de bovino (SONE et al., 1996), células da granulosa de rato (SHIKAWA, 2003) e de bovino (ROBINSON et al., 2007). Outros fatores que regulam a expressão do VEGF são o TNF α (fator de necrose tumoral) as citocinas, TGF- α e β (fator de crescimento tumoral α e β), fator de crescimento epidermal, interleucinas (ROBINSON; STRINGER, 2001; SCHAMS et al., 2001). O bFGF também modula a expressão gênica do VEGF e seus receptores KDR e Flt-1 (STAVRI et al., 1995; GABLER et al., 2004).

3.4.2 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) e seus receptores

Os FGFs compõem uma família de aproximadamente 25 membros, numerados de 1 a 25, estruturados e identificados (KATOH; KATOH, 2005), que induzem a atividade mitogênica, quimiotática e angiogênica em células de origem mesodérmica e neuroectodérmica (BASILICO; MOSCATELLI, 1992). A família dos FGFs apresenta uma seqüência central de 140 aminoácidos altamente homólogos entre os diferentes membros FGFs, além disso possuem uma forte afinidade a heparina e aos glicosaminoglicanos heparino-miméticos (HLGAGS; BURGESS; MACIAG, 1989).

O bFGF (FGF-2) foi primeiramente purificado a partir de extratos de pituitária de bovinos (GOSPODAROWICZ, 1975), tem a propriedade de ligar-se a heparina e ao sulfato de heparina (NUGENT; IOZZO, 2000). É uma proteína que se apresenta naturalmente em 5 isoformas originadas por traduções alternativas de seu mRNA. A tradução de um códon AUG origina a isoforma de menor peso molecular (18 kDa), enquanto as traduções de quatro códons CUG originam as formas de alto peso molecular (22, 22,5, 24 e 34 kDa; ARNAUD et al., 1999; OKADA-BAN; THIERY; JOUANNEAU, 2000). As traduções alternativas regulam a localização celular das diferentes isoformas e podem modular suas funções (BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991).

Para desempenharem seus efeitos biológicos, os FGFs agem através de sinalização via receptores tirosina-quinase da superfície celular. Estes receptores são codificados por cinco genes diferentes, tem alta afinidade pelos membros dessa família, e são chamados de FGFR-1 a 5 (SLEEMAN et al., 2001). Além disso, são caracterizados por possuírem um domínio extracelular, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs. A porção extracelular está dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (Ig-like); D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. São nos domínios D3 que “splicing” alternativos nos FGFR-1, 2, e 3 geram isoformas funcionais dos tipos b e c (FGFRIIIb e FGFRIIIc; revisado por ESWARAKUMAR et al., 2005). Há uma especificidade de expressão destes “splicings” em função da origem celular. Tecidos e células de origem epitelial expressam o “splicing” IIIb e as de origem mesenquimal o IIIc, indicando uma possível relação cruzada entre expressão do FGF com atividade do tecido (ZHANG et al., 2006). O bFGF pode se ligar aos cinco receptores, mas possui afinidade maior pelos receptores que possuem o domínio IIIc (COLEMAN, 2003). O quinto receptor de FGF difere dos outros quatro, este receptor é composto por uma proteína de membrana e um domínio extracelular composto por 16 cisteínas (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999). Ligações do FGF com seus receptores induz a dimerização do FGFR, o que é um passo essencial para ativação e desencadeamento dos sinais intracelulares (LEMMON; SCHLESSINGER, 1994).

O bFGF liberado pela célula se associa às proteoglicanas contendo sulfato de heparina (HSPG), presentes nas superfícies celulares e matriz extracelular (AVIEZER et al., 1994). O sulfato de heparina (HS) é um ativo e essencial componente da sinalização FGF/FGFRs, sugerindo que a atividade do FGF e sua especificidade pode ser modulada por HS e conseqüentemente por enzimas que sintetizam e degradam os HS. Lin et al. (1999) demonstraram que mutações em duas enzimas envolvidas na biosíntese de heparina resultam em defeitos de sinalização do FGF durante o desenvolvimento.

A modulação do gene do bFGF parece ser regulada pelo LH (ROBISON et al., 2007), por diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo as IL-1a e 1b (GAY, WINKLES, 1991), TGF β (PERTOVAARA; SAKSELA; ALITALO, 1993) e interferon α (DINNEY et al., 1998). Além disso, o bFGF parece estimular sua própria expressão, e juntamente com o VEGF regula positivamente a expressão do mRNA dos FGFRs (GABLER et al., 2004).

3.5 FATORES DE CRESCIMENTO NO CORPO LÚTEO

O bFGF e o VEGF aumentam a secreção de progesterona por células luteínicas em várias espécies (GOSPODAROWICZ et al., 1977; MIYAMOTO et al., 1992; GRAZUL-BILSKA et al., 1995; LIEBERMANN et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2001, Yamashita et al., 2008), indicando que o bFGF e o VEGF estão envolvidos na formação do CL e controle da secreção de P₄. Trabalhos realizados utilizando-se anticorpos anti- bFGF ou anti- VEGF descreveram uma diminuição de 50% do volume do CL quando comparado ao grupo controle no dia 8 do ciclo estral, devido ao menor número de células endoteliais. Um decréscimo na expressão do mRNA da StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese) (YAMASHITA et al., 2008), enzima que transfere colesterol para o interior da membrana mitocondrial e contribui para a produção de progesterona (CHRISTENSON; STRAUSS, 2001), também foi observado e parece regulado pelo bFGF e VEGF (YAMASHITA et al., 2008).

Em CL de bovinos são encontrados níveis de mRNA do VEGF e do receptor VEGFR-2 mais elevados durante as fases inicial e média quando comparados com o último estágio luteínico (BERISHA et al., 2000; FRASER et al., 2005). Segundo Wulff et al. (2000), este nível aumentado da expressão do mRNA do VEGF durante a primeira fase é devido à intensa angiogênese vista neste momento. Análises semiquantitativas por PCR mostraram, em humanos, expressão do mRNA do VEGFR-1 e VEGFR-2 em todas as fases luteínicas com um decréscimo bem acentuado na última fase. Essas proteínas foram localizadas principalmente no citoplasma de células da granulosa luteinizadas (ENDO et al., 2001). Papa et al. (2007) quantificaram a expressão da proteína do VEGF e seus receptores em CL de búfalas por meio de imuno-histoquímica e observaram forte reação positiva para o VEGF, Flt-1- e KDR em células luteínicas e endoteliais a partir do dia 2 pós-ovulação.

Sabe-se que o estradiol é necessário para o desenvolvimento do CL e a manutenção de suas funções durante a prenhez aumentando a expressão do VEGF em células granulosas luteinizadas (GARRIDO et al., 1993). Além disso, a inibição do VEGF ou VEGFR-1 *in vivo* durante a fase luteínica média em primatas não humanos impede a angiogênese luteínica e suprime a secreção de progesterona (FRASER et al., 2000; WULFF et al., 2001). Por outro lado a $PGF_{2\alpha}$ influencia negativamente a expressão do sistema VEGF (VONNAHME, et al., 2006).

No CL de bovinos já foram detectados os FGFs 1, 2 (b), 7, 8 e 10 (ZHENG et al., 1991; VAN ZENGEL et al., 1995; CASTILHO et al., 2008).

O bFGF estimula a proliferação de células luteínicas (GOSPODAROWICZ et al., 1977; GRAZUL-BILSKA et al., 1995) e a secreção de progesterona em ruminantes (MIYAMOTO et al., 1992; LIEBERMAN et al., 1996) e inibe a secreção de relaxina em células luteínicas de suínos em cultura (TAYLOR; CLARK, 1992).

Em CL de bovinos a expressão do bFGF é alta durante a primeira fase luteínica (1-2 dias), decrescendo significativamente nos dias 5-7 do ciclo estral e aumentando novamente durante a última fase luteínica. Ocorre uma dramática mudança na localização do bFGF durante o ciclo estral em bovinos. No início do ciclo (dias 1-3) o bFGF foi detectado intensamente no citoplasma das células

endoteliais dos capilares e em células do músculo liso das artérias. Já na fase luteínica média, nos dias 8-12 do ciclo estral, a maioria das células vasculares não se mostraram positivas para o bFGF, a proteína foi localizada exclusivamente no citoplasma das células luteínicas. Com mudanças na localização existe também uma mudança no peso molecular de 18 para 16 kDa, esse último representando a forma incompleta que contém 15 aminoácidos a menos que a forma regular (SCHAMS et al., 1994; BERISHA e SCHAMS ; 2005).

O FGF-7 foi detectado em células luteínicas pequenas de bovinos, enquanto o FGF-10 foi localizado nas células luteínicas grandes e pequenas como também nas células endoteliais, e a expressão destes dois fatores foi constante durante todo o ciclo estral (SALLI et al., 1998; BURATINI et al., 2007; CASTILHO et al., 2008)

Alta expressão do gene FGFR-1 foi encontrada em células luteínicas na primeira fase luteínica em ovelhas (DORAISWAMY et al., 1998). Também em ovelhas a expressão protéica e do mRNA do FGFR-2 foi mais alta nos últimos estágios luteínicos quando comparado aos estágios inicial e médio do desenvolvimento do CL (DORAISWAMY et al., 1998). O mesmo padrão de expressão também foi encontrado para o FGFR2b em CL de bovino, sugerindo que o aumento da expressão do FGFR-2 pode desempenhar uma função durante a apoptose e ou remodelamento do tecido no CL em regressão (CASTILHO et al., 2008)

3.6 A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO NO CL

Alguns trabalhos mostram que ocorrem mudanças anatômo-funcionais no corpo lúteo, sob a influência do tratamento superovulatório. Essas mudanças também afetam a expressão dos fatores de crescimento que são importantes no desenvolvimento e manutenção do CL.

Segundo Moura (2003) e Papa et al. (2007), o CL de búfalas superovuladas apresentou densidade vascular maior do que CL de búfalas não manipuladas. Além

disso, houve uma intensa imunoreatividade das células luteínicas e endoteliais para o VEGF e seus receptores, demonstrando uma maior expressão deste sistema em resposta ao tratamento superovulatório. Altas concentrações de progesterona (PAPA et al., 2007) como também de estradiol (MISRA et al., 1998) são encontradas em búfalas superovuladas.

As células luteínicas de animais superovulados apresentam características que refletem maior atividade de síntese protéica, como, aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de mitocôndrias (MEYER et al., 1991; SMITH et al. 1991; HEALTH et al., 1983), além de alterações no formato do núcleo e na condensação da cromatina (ARTONI et al., 2004).

Trabalhos realizados por Shweiki et al. (1993) e MacClure et al. (1994) mostraram que em primatas e ratos, com ovários hiperestimulados, ocorre uma elevação dos níveis do mRNA do VEGF, predominantemente após uma onda de LH. Um aumento do LH resulta em maior expressão do mRNA do VEGF pelas células da granulosa do folículo ovariano (HAZZARD et al., 1999). Além disso, o FSH estimula a proliferação de células endoteliais em CL de macacos (CHRISTENSO et al., 1997) e também estimula a expressão do mRNA VEGF em células da granulosa (DOLD et al., 1997; LAITINEN et al., 1997). Christenson e Stouffer (2002) demonstraram que a síntese e a secreção da proteína VEGF em células da granulosa de macacos é aumentada 8 vezes em resposta ao hCG.

Após estimulação de ratas com hCG também foi observado um aumento da expressão do mRNA do VEGF e aumento da permeabilidade vascular no ovário (GÓMEZ et al., 2002). Quando comparado os efeitos estimulatórios do LH, FSH e hCG, Gómez et al. (2004), demonstraram que o LH e FSH tem um efeito menor na indução da permeabilidade vascular, e embora o hCG tenha uma meia vida mais longa e uma maior atividade biológica que o LH, aconselha-se o uso de LH em concentrações reduzidas para prevenir indesejáveis mudanças na permeabilidade vascular via indução da expressão do VEGF.

Shikone et al. (1992) mostraram que o FSH induz a expressão de receptores para o bFGF em cultura de células da granulosa de ratos. O tratamento com FSH aumenta o número de sítios de ligação por célula, mas não muda a afinidade desses

sítios para o bFGF. A cicloheximida, um inibidor de síntese de proteína, inibiu o aumento do número de receptores causado pelo FSH em uma maneira dose-dependente, sugerindo que o aumento do número de receptores é dependente da síntese de proteína.

Por outro lado, Phan et al. (2006) mostraram que o hCG parece não influenciar a expressão do bFGF em células da granulosa luteínica de humanos, mas a expressão desse fator apresenta uma leve tendência a ser diminuída após o tratamento com hCG. Neste mesmo trabalho foi mostrado que o hCG diminui a expressão do gene CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo, que é uma proteína multifuncional, produzida por vários tecidos (KIM et al., 1997; OEMAR; LUSCHER, 1997; BRIGSTOCK, 1999; WANDJI et al., 2000; SLEE et al., 2001). O CTGF tem um efeito inibitório nos mecanismos de ligação do VEGF com seus receptores (INOKI et al., 2002). A regulação positiva do VEGF pelo hCG pode ser devida a ação direta do hCG, induzindo a transcrição do gene, ou pela interposição do HIF_{2α}, que por sua vez regula a expressão do VEGF (HERR et al., 2004). Ou ainda, o hCG pode aumentar a expressão do VEGF indiretamente, via supressão do CTGF que é um inibidor do VEGF (PHAN et al., 2006).

Em mulheres afetadas pela síndrome do ovário policístico, a qual pode ser resultado de tratamentos superovulatórios, ocorre desenvolvimento folicular anormal, e alta permeabilidade dos vasos sanguíneos acompanhado de uma produção anormal de quantidades de VEGF (NEULEN et al., 1995).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foram utilizadas amostras de corpos lúteos de 20 fêmeas adultas da espécie bubalina (*Bubalis bubalis*), obtidas imediatamente após o abate dos animais. Estas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para extração protéica ou de RNA. Após a determinação da fase do ciclo estral para animais não manipulados feita previamente por Moura (2003), as amostras foram divididas em 5 grupos, a saber, grupo 1: 2 dias após a ovulação - p.o. (n=3); grupo 2: 6 dias p.o. (n=3); grupo 3: 12 dias p.o. (n=3), grupo 4: 17 dias p.o. (n=3), grupo 5: 26 dias p.o. (n=3). O grupo 6 consiste de animais superovulados, que foram abatidos no 6º dia do ciclo na cidade de Piracicaba (n=5).

4.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA WESTERN BLOTTING

Para a determinação do VEGF e do bFGF (proteínas presentes no citoplasma) as amostras de CL de búfalos foram homogeneizadas através de homogenizador em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em tampão de lise hipotônico contendo 10mM de TRIS/HCl 5mM de EDTA, pH 7.4, na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamidina (20µg/ml), pepstatina (1µg/ml), leupeptina (0.5µg/ml), apoproteína (0.1µg/ml) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100µg/ml). O processo de homogeneização foi realizado três vezes durante 15 segundos, com intervalos de 20 segundos entre as homogeneizações. Todo o processo foi realizado a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 1000g durante dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1,5ml e armazenados a -20°C.

Para quantificação dos receptores Flt-1, KDR, FGFR-2 e FGFR-3 (receptores presentes na membrana plasmática) as amostras de CL de búfalos foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 Kinematica® (Brinkman, Westbury, USA) a 24.000 rpm durante 30 segundos em tampão de homogeneização (TRIS HCL 10mM; EDTA 1,0 mM; sacarose 250mM) em proporção de 1:6 (peso volume). Em seguida foi realizada uma centrifugação de 1000g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspenso em tampão (1/3 do volume inicial) e submetido à nova centrifugação de 1000g por 10 minutos a 4°C. Juntos os dois sobrenadantes foram submetidos a uma ultracentrifugação de 150.000g durante 75 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento ressuspenso em tampão de homogeneização e estocado a -20°C.

A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

4.2 WESTERN BLOTTING

As amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (*sodium-dodecyl-sulfate*) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS–poliacrilamida em concentrações de 6% para os receptores e 15 % para o VEGF e o bFGF, em uma voltagem de 100V. Após a separação as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose hybond-ecl (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), sob corrente constante de 120 mA, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris-HCL (Tris-HCL 12,5 mM glicina 95 mM, 1% sds e 20% de metanol). A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de coomassie.

Após a transferência ocorreu o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, que foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS-T com o detergente *tween* 20 (TBS-T; 1% *tween* 20) e leite desnatado (5%) por 2 horas em temperatura

ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana então foi incubada com um anticorpo primário diluído em TBS-T e 3% de albumina a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos em solução de TBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em TBS-T 1% de albumina por 2 horas em temperatura ambiente com agitação constante.

Como anticorpos primários foram utilizados os produtos descritos no quadro

1.

Anticorpo	Clone Isotipo	Hospedeiro	Seqüência	Firma e Nº de Catálogo	Diluição
Anti-VEGF	Policlonal	Coelho	Terminação N do VEGF-A humano	VEGF (A20):sc-152	1:200
Anti-Flt-1	Policlonal	Coelho	Terminação carboxila do Flt-1 humano	Flt-1 (C17): sc-316	1:500
Anti-KDR	Policlonal	Coelho	Terminação carboxila do KDR murino.	Flk-1 (C20): sc-315	1:800
Anti-bFGF	Monoclonal	mouse	bovino	Upstate 05-118	1:600
Anti-FGFR-2	Policlonal	Coelho	Terminação N do FGFR-2 humano	Sigma F 0300	1:800
Anti-FGFR-3	Policlonal	Coelho	Terminação N do FGFR-3 humano	Sigma F0425	1:800

Quadro -1 Identificação dos anticorpos primários utilizados no Western blotting

Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos conjugados à peroxidase (IgG anti-mouse ou anti-rabbit, ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA) na titulação de 1:5000.

Após 3 lavagens em TBS-T, o sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) por 2 minutos, o qual produziu uma reação de luminescência no local de ligação do segundo anticorpo. As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Filme RX_A IBF Filmes do Brasil, São Paulo, Brasil), a temperatura ambiente, durante 30 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (IBF Filmes do Brasil, São Paulo).

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol[®]. Cerca de 40 mg de tecidos forão pesados em gelo e acrescidos de 500µl de Trizol e homogeneizados com o auxílio do aparelho homogenizador de tecidos (Polytron Ultra Turrax T-25). O homogenato foi armazenado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, 100 µl de clorofórmio foram adicionados (200µl para cada ml de Trizol) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm a 4°C.

Enquanto isso, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500 µl de isopropanol. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para os tubos contendo isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras passaram novamente por uma centrifugação por 10 minutos, 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de álcool 75% diluído em água DEPC. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 7.000 rpm a 4 °C, o excesso de álcool retirado e o precipitado (RNA Total) solubilizado em 200µl de água tratada com DEPC.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção 1:5, ou seja, 40 µl de H₂O DEPC foram adicionados a 10 µl do RNA total e homogeneizados suavemente. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf, Deutschland, Germany) 260/280nm. A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®, Carlsband, USA), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (unidade/ µl) e água “RNase free” (água MiliQ autoclavada) suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu a temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25mM) e incubada por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

4.5 CONFECÇÃO DO CDNA

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o “Kit SuperScript III (Invitrogen®, Carlsband, USA) cujo protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratado com DNase, (Invitrogen®), 1µl de oligonucleotídeos iniciadores Oligo (dt) (500 µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 µl de DEPC . Essa solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minutos. Após essas etapas, foram adicionados à solução 4µl de tampão, 1µl de DTT(0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor”(40Unidades/ µl), na sequência, foi acrescido de 1µl (200U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° por 15 minutos e finalmente a 4 ° C por 2 minutos. O cDNA

foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação dos genes alvo pela técnica de PCR em tempo real.

4.6 PCR EM TEMPO REAL

Após a transcrição reversa (RT), foi realizado o PCR em Tempo Real (Real Time PCR) no aparelho ABIPrism[®] 7500 (Applied Biosystems, Foster, USA). Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. A amplificação é detectada onde as condições “ótimas” para o PCR são mantidas, ou seja, na fase exponencial.

Como controle interno das reações de PCR em tempo real foi utilizado a amplificação do gene constitutivamente expresso GAPDH, a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. O PCR para amplificação de fragmentos dos genes alvo (VEGF, Flt-1 e KDR) e do GAPDH utilizado para normalizar estes genes foi realizado utilizando o “kit” Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster, USA) Foi preparada uma mistura (Mix) para cada gene estudado. Neste mix foram adicionados, por amostra a ser analisada, 25 μl Sybr Green[®] (Applied Biosystems, Foster, USA), 5 μl de primers sense e 5 μl de primers anti-sense (concentração final de 900mM, quadro 2), 5 μl de água miliQ[®] autoclavada e 10 μl de cDNA para um volume final de 50 μl que foi dividido em dois tubos (ou poços) contendo 25 μl cada. O PCR para amplificação de fragmentos dos genes alvo (bFGF, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4) e do GAPDH utilizado para normalizar estes genes foi realizado utilizando o sistema TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster, USA) conforme o protocolo descrito a seguir. Foi preparada uma mistura (Mix) para cada gene estudado. Neste mix foram adicionados, por amostra a ser analisada, 6,25 μl de tampão Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Foster, USA), 0.5 μl de

primers sense, anti-sense (concentração final de 900mM, quadro 3) e sonda (concentração final de 250mM) para os genes alvo e 0.5µl de primers sense, 0.5 µl de primers anti-sense e 0.5 µl de sonda (mesma concentração final acima) para o controle endógeno, 2.5µl de cDNA e a quantidade de água miliQ® autoclavada necessária para completar um volume final de 12,5µl.

Para otimização da concentração de cDNA a ser utilizado bem como para cálculo da eficiência da amplificação do controle endógeno, foi construída uma curva padrão com as seguintes quantidades de cDNA: 0,5, 0,25, 0,0625 e 0,03125µg. Estas quantidades foram testadas em duplicata. Duas amostras foram utilizadas (uma com expressão esperada alta e outra baixa dos genes que foram avaliados).

O cálculo da eficiência para os genes alvo foi feito através do programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. O cálculo da eficiência para GAPDH foi feito pela formula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, na qual E= eficiência e slope = valor obtido a partir da curva padrão gerada pelo aparelho ABI 7500.

O cálculo da quantificação relativa dos genes-alvo foi feito através da formula de Pfaffl :

$$(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{calibrador} - \text{amostra})}$$

$$R = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{calibrador} - \text{amostra})}$$

R (ratio) = expressão relativa do gene alvo

E_{target} = eficiência de amplificação do gene alvo

E_{ref} = eficiência de amplificação do gene de referência (GAPDH)

$$\Delta CP_{\text{target}} = CP_{\text{do gene alvo}} - CP_{\text{do gene de referência}}$$

$$\Delta CP_{\text{ref}} = CP_{\text{do gene alvo}} - CP_{\text{do gene de referência}}$$

Nestes experimentos as condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos à 95°C e 40 ciclos por 15 segundos à 95°C e 60°C por 1 minuto. No experimento utilizando o Power Sybr Green Master Mix, foram necessários, para a curva de dissociação, 15 segundos à 95°, 1 minuto à 60°C e 15 segundos à 95°C

<u>Gene alvo</u>	<u>Número da sequência no GeneBank</u>	<u>Primers</u>	<u>Tamanho do amplicom</u>
GAPDH	AB098985	S GCG ATA CTC ACT CTT CTA CTT TCG A A TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC	74
VEGF	NM_174216	S GCC CAC TGA GGA GTT CAA CAT A CTG GTC TTG GTG AGG TTT GAT C	60
Flt-1	X94263	S GCC TGA AAT CTA CCA GAT CAT GTT G A TTC CAC AAG CTC CAC GAA TCT T	58
KDR	X94298	S ACT GCA GTG ATG GCG TCT T A CTT GTA GGC TCC AGT ATC ATT TCC A	64

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do GAPDH, VEGF, Flt-1, KDR, bFGF, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, e FGFR-4 **S**= sense e **A** = anti-sense

<u>Gene alvo</u>	<u>Número da sequência no GeneBank</u>	<u>Primers</u>	<u>Tamanho do amplicom</u>
bFGF	NM_174216	S CCGGTCAAGGAAATACTCCAGTTG A GGTCTGTGTTTGGGTCCAAGTTTAT P TATGTGGCACTGAAACGA	60
FGFR-1	BC134637	S GGATGGCACC GGAGGC A CCAAGACCACACGTCACCTCT P CTTGTTTGACCGGATCTAC	59
FGFR2	X94263	S TCGGAATGTAAC TTTTGAGGATGCT A TCAACCATGCAGAGTGAAAGG P CTTGGCGGGTAATTC	58
FGFR3	X94298	S GTGTCCTGCGCCTACCA A CCTCAGTCACCAGCACGTT P CTGTGGATGCACTTCTG	64
FGFR-4	XM_602166	S GGAATGTATCTGCTGAGGATGCA A AGGAAAGGCCGATGGAGTTG P CCAGGCAGGTGTACTC	66

Quadro 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do bFGF, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, e FGFR-4 **S**= sense, **A** = anti-sense e **P**= probe (sonda).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos, quando não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logarítmicos e analisados pelo programa estatístico Minitab. Teste ANOVA paramétrico foi utilizado para análise de variância para os sistemas VEGF e bFGF nos diferentes estágios do ciclo estral. Teste t-Student foi utilizado para comparação das médias obtidas para os animais superovulados e não manipulados na mesma fase do ciclo estral. Foram considerados estatisticamente significativos os valores para $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos a partir da média das amostras de cada grupo, do desvio e/ou erro padrão. Foi realizado o teste de correlação de

Pearson para análise da correlação da expressão gênica e protéica dos fatores estudados e os valores considerados significativos para $p < 0,05$.

4.8 PCR PARA O SEQÜENCIAMENTO

O PCR para amplificação do segmento do gene do KDR foi feito a partir de 3 amostras diferentes utilizando-se cDNA de CL de búfalo. Para cada reação utilizou-se 2 μ l de tampão 10x para PCR (200mM Tris-HCL- Ph 8.4, 500mM KCL) 0,6 μ l de Mg, 1,6 μ l de dNTP, 1 μ l de DMSO, 1 μ l de cada primer (concentração final de 1 picomol, quadro 4) 0,2 μ l de Platinum[®] *Taq* 5U/ μ l, 3 μ l de cDNA e 9,6 de água MilliQ autoclavada. O programa utilizado no termociclador para reação de amplificação foi: 94°C por 2 minutos (pré-desnaturação), 39 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60 °C por dois minutos (anelamento), 72 °C por 1,5 minutos (alongamento) seguidos de uma extensão final por 30 minutos a 72°C. O produto amplificado obtido da reação de PCR foi identificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1x (4,8g Tris Base, 1,14 ml ácido acético, 2 ml de EDTA 0,5M em 1 L de água destilada), ainda foram acrescentados no gel 1,9 μ l de brometo de etídeo para coloração das bandas que representam o produto amplificado. Em seguida o gel foi submetido a uma corrente de 125v e 300 mA por 35 minutos. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1Kb Plus de DNA *Ladder* (Invitrogen®, Carlsband, USA). Aos produtos do PCR e ao marcador de peso molecular foram acrescentados tampão de amostra (50% azul de bromofenol, 0,25% glicerol em água MilliQ). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas.

Gene alvo <u>KDR</u>	Numero da seqüência no GeneBank <u>XM 611785</u>
Primers	Tamanho do amplicom
S gaggtgcgggatggagag A aagaccacgccagcataact	606

Quadro 4. Seqüência dos primers utilizados na amplificação do KDR para clonagem **S** = sense e **A** = anti-sense

4.9 PURIFICAÇÃO DO DNA

Os produtos de PCR obtidos nas amplificações descritas para a clonagem do KDR foram extraídos e purificados seguindo as especificações do kit de extração de gel PureLink™ Quik Gel Extration Kit (Invitrogen®, Carlsband, USA). Para tanto, cortou-se a banda específica do gel utilizando-se uma lâmina de bisturi estéril sobre o transiluminador. A banda foi colocada em um tubo de 1,5 ml, pesada e a esta adicionou-se 30 µl de tampão de solubilização para cada 10mg de gel. As amostras foram incubadas em banho-maria a temperatura de 50°C por 15 minutos pra dissolução do gel. Em seguida o DNA foi purificado: para tanto, as amostras foram colocadas em uma coluna de extração e esta foi centrifugada 1 min a 12000g. Foi realizada uma lavagem com tampão de lavagem e etanol, incubação por 5min, e em seguida centrifugação a 12000g por 1 min. Uma centrifugação adicional por 1 minuto à 12.000g foi feita para retirar o excesso de solução de lavagem. Em seguida, a coluna de extração foi transferida para um tubo limpo de 1,5 ml e a amostra foi eluída através da adição de 30 µl de Tampão TE (10nM Tris-HCL pH 8,5; 0,5 mM EDTA) no centro da coluna que foi centrifugada por 1 minuto. O DNA purificado foi armazenado a -20°

4.10 LIGAÇÃO AO VETOR

O kit utilizado foi o Topo TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Invitrogen®, Carlsband, USA) cujo vetor é o pCR[®] 4-TOPO. Para tanto utilizou-se 4 µl do DNA purificado, 1 µl do vetor e 1µl solução salina (1.2M NaCl, 0.06M MgCl₂). A reação foi homogenizada gentilmente e incubada 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida colocada em gelo.

4.11 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Para a preparação das bactérias competentes utilizadas na transformação, utilizou-se o protocolo descrito por Hanahan (1985). No dia anterior à preparação das células competentes a *E. coli* DH5α foi inoculada em uma placa contendo meio LB agar. Uma colônia isolada foi novamente inoculada em 10 mL de meio LB (triptona 2 %; 0,5 % de extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂ e 10 mM MgSO₄), e incubada a 37°C sob agitação de 200rpm por 15 horas. Desse pré-inóculo foram transferidos 300µl para 30 ml de meio LB, que foram agitados por aproximadamente 3 horas a 37°C. Medidas da densidade óptica (O.D.) foram realizadas de hora em hora para monitorar o crescimento das células até atingir no espectrofotômetro sob densidade óptica (O.D.) de 600nm os valores entre 0,3-0,5. Atingida a O.D. desejada, foi feita uma centrifugação de 5000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em tampão ST (100mM CaCl₂, 20mM NaOAc, ph 6,5). O material em suspensão permaneceu no gelo por 30 minutos, passou por uma nova centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos e o *pellet* foi resuspenso em tampão ST com 10 % de glicerol. Alíquotas de 200µl de células competentes foram pré-resfriadas em gelo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

A transformação foi feita por choque térmico: 6µl de cada reação de ligação foram acrescentados a uma alíquota de 200µl de *E. coli* DH5α competente. Este

material foi incubado por 30 minutos no gelo, e então, submetido a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e colocado novamente em gelo por 10 minutos. Imediatamente foram adicionados às células 500µl de meio LB. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 6000rpm por 40 seg. o sobrenadante descartado e o restante plaqueado (50 a 100µl) em meio LB ágar com ampicilina (50 mg/mL). As placas foram mantidas invertidas na estufa a 37°C por 12 horas. As colônias obtidas foram cultivadas individualmente em meio LB contendo 50mg/mL de ampicilina a 37°C overnight sob agitação constante de 200 rpm.

4.12 MINI-PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para o isolamento do DNA plasmidial foi utilizado o PureLink™ Quiki Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen®, Carlsband, USA). Para tanto, 5ml da cultura overnight foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 250µl de tampão de ressuspensão com RNase (50nM Tris-HCL, pH 8.0; 10mM EDTA). Em seguida foi adicionado 250 µl de tampão de lise (200mM NaOH, 1% de SDS) homogeneizados gentilmente e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente foram adicionados 350 µl de tampão de precipitação por tubo seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 10 min. a 12000g.

O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de extração e esta foi centrifugada a 12 000g por 1 minuto. Posteriormente foram adicionados 700µl de tampão de lavagem com etanol e uma centrifugação a 12000g por 1 minuto foi feita. Uma nova centrifugação de 1 minuto foi realizada para remover o tampão residual. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL e o DNA foi eluído através da adição de 50 µl de tampão TE, incubação por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugação a 12,000g por 2 minutos. O DNA plasmidial foi então estocado a -20°C.

A presença do fragmento inserido foi confirmada por digestão do vetor com a enzima ECOR1 (5 µl de solução contendo o vetor, 3,5 µl de água, 1 µl de buffer

ECOR1 e 0,5 µl de enzima ECOR1) durante 2 horas a 37 °C seguida de verificação em gel de agarose 1,1%.

4.13 SEQÜENCIAMENTO

Antes de serem enviadas para o sequenciamento, as amostras contendo os vetores foram quantificadas (DNA) e diluídas para obtenção de uma solução com concentração de 115ng/ul. Os vetores contendo os produtos de PCR do KDR foram seqüenciados em um MegaBACE 1000, sistema de análise de DNA de 96 capilares (GE Healthcare, Waukesha, USA). As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. Foram seqüenciadas três amostras independentes da seqüência clonada para que uma comparação de nucleotídeos fosse realizada e possíveis erros de seqüenciamento fossem evitados.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Inicialmente são demonstrados os resultados relativos a expressão protéica dos sistemas VEGF e bFGF no CL cíclico de búfalas não tratadas e superovuladas, em seguida, os resultados referentes a expressão gênica, bem como os de clonagem e sequenciamento do gene KDR bubalino.

5.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS VEGF, Flt-1 E KDR NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS

O a expressão do VEGF, no CL de búfalas, analisado em UA/ 50 µg de proteínas totais (Figura 1A) ou em UA/g de tecido (Figura 1B) apresenta uma expressão constante ao longo do ciclo estral.

A expressão do KDR, em UA/ 50 µg de proteínas totais, apresentou diferenças significativas durante as fases do ciclo estral. A expressão foi mais alta na primeira fase estudada (2 p.o.; $p < 0.001$), decrescendo no dia 6 p.o. ($p < 0.001$), aumentando novamente no dia 12 p.o. ($p < 0.001$), e decrescendo mais uma vez no dia 17 p.o. e mantendo-se constante até o dia 26 p.o. ($p < 0.001$, Figura 2A). Quando estes valores foram considerados em UA/g de tecido, a expressão do KDR teve um perfil semelhante, mas apresentou uma diferença significativa entre os dias 2 e 12 p.o. ($p < 0,05$), o que não foi visto quando analisamos a expressão em relação à proteínas totais.

A expressão do Flt-1 não pode ser quantificada por Western blotting. Foi evidenciada uma banda de aproximadamente 50 kDa, a qual não corresponde ao Flt-1, já que este tem peso molecular entre 180 e 210kDa (SUGINO et al., 2000; CELIK-OZENCI et al., 2003; KACZMAREK et al., 2006). Vários testes foram feitos, mas sem resultados satisfatórios. Observamos em um dos testes, utilizando placenta bovina como controle positivo para o anticorpo utilizado, que a banda correspondente ao Flt-1 (200kDa) foi detectada, mas também observamos uma

banda na altura de 50 kDa (Figura 1C), como observado para o CL bubalino. Outro tecido controle utilizado foi músculo esquelético de camundongo, que também apresentou uma banda na altura de 200KDa (Figura 3) .

Observou-se que os animais superovulados, apresentaram no dia 6 p. o. um aumento na expressão do VEGF ($p < 0,05$; Figura 4A) e do KDR ($p < 0,001$; Figura 5A) em relação aos animais não-tratados no mesmo dia do ciclo estral, quando os resultados são expressos em UA/ 50 μ g de proteínas totais. Quando expressos em UA/g de tecido, apenas o KDR continua apresentando diferença entre os grupos ($p < 0,05$; Figura 5B).

(A)

(B)

Figura 1- Análise da proteína VEGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após a ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** gráfico representando o conteúdo total do VEGF em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 005$) entre os grupos

Figura 2 -Análise da proteína KDR em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após a ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** gráfico representando o conteúdo total do KDR em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Figura 3 - Testes feitos com Flt-1, **(A)** usando como controles placenta bovina (PL; retângulo) e músculo esquelético (ME; círculos), **(B)** CL em diferentes dias após a ovulação; M = marcador de peso molecular

Figura 4 - Análise das proteínas VEGF em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo VEGF expresso em UA/50 μg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do VEGF em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos

(A)

(B)

Figura 5- Análise das proteínas KDR em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo KDR expresso em UA/50 μg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do KDR em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. * significa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupo

5.2 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS bFGF, FGFR-2 E FGFR-3 NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS

No corpo lúteo de búfalas ao longo do ciclo estral, em termos de UA/ 50 µg de proteínas totais (Figura 6A), a proteína do bFGF mostra uma expressão constante do dia 2 ao dia 17 p.o. e decresce no dia 26 p.o. ($p < 0,05$).

Quando analisamos estes valores em UA/g de tecido a expressão do bFGF foi mais elevada nos dias 6 e 17 p.o. ($p < 0,05$; Figura 6B), em relação aos demais dias estudados, porém o maior decréscimo ocorre entre os dias 17 e 26, como também observado analisando-se a expressão do bFGF por 50 µg de proteínas submetidas à eletroforese .

A expressão do FGFR-2 no corpo lúteo de búfalas, em UA/ 50 µg de proteínas totais, é constante nos dias 2 e 6 p.o. e aumenta no dia 12 p.o. ($p < 0,05$), permanecendo assim até o dia 17 p.o. e decrescendo novamente no dia 26 p.o. ($p < 0,05$; Figura 7A).

Em relação à expressão em UA/g de tecido, o FGFR-2 foi mais expresso nos dias 12 e 17 p.o. ($p < 0,05$; Figura 7B), no entanto o perfil de expressão pode ser considerado o mesmo.

O FGFR-3 (Figura 8A) tem a expressão constante do dia 2 ao dia 6 p.o. e aumentada no dia 12 p.o. ($p < 0,05$), decrescendo nos dias 17 e 26 p.o. ($p < 0,05$).

Quando estes valores são considerados em UA/g de tecido (fig. 8B) o FGFR-3 também se encontra mais expresso no dia 12 p.o. ($p = 0,021$).

No corpo lúteo de búfalas superovuladas a expressão do bFGF (figura 9) do FGFR-2 (figura 10) e do FGFR-3 (figura 11) estão aumentadas quando comparadas a búfalas não tratadas no dia 6 p.o. ($p < 0,001$). A expressão se apresenta aumentada quando os valores são expressos em UA/ 50 µg de proteínas totais e também quando estes valores são considerados em UA/g de tecido

(A)

(B)

Figura 6 - Análise da proteína bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do bFGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do bFGF em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos

Figura 7 - Análise da proteína FGFR-2 em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FGFR-2 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos

Figura 8 - Análise da proteína FGFR-3 em corpo lúteo de búfalas em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26): **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FGFR-3 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos

Figura 9 - Análise das proteínas bFGF em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo bFGF expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Figura 10 - Análise das proteínas FGFR-2 em corpo lúteo de búfalas não tratadas e superovuladas no dia 6 p.o. **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo FGFR-2 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-2 em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. * significa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos

Figura 11- Análise das proteínas FGFR-3 em corpo lúteo de búfalas não tratadas (CL) e superovuladas (CS) no dia 6 p.o. **(A)** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo de FGFR-3 expresso em UA/50 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese; **(B)** Gráfico representando o conteúdo total do FGFR-3 em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de três animais. * significam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupo

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO VEGF, DO bFGF E DE SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES

No CL, quando analisado em UA/ proteínas totais de tecido, o VEGF e o bFGF apresentam correlações positivas com FGFR-2 ($r = 0,934$ e $r = 0,934$, respectivamente, $p < 0,05$). Quando analisando em UA/g de tecido, o VEGF apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) com o bFGF ($r = 0,924$), e o KDR apresentou correlação positiva com o FGFR-2 ($r = 0,965$) e com o FGFR-3 ($r = 0,905$). O FGFR-2 apresentou correlação positiva com o FGFR-3 ($r = 0,974$). As demais correlações obtidas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 Correlação entre o VEGF e o bFGF e seus respectivos receptores no CL cíclico de búfalas, em UA/ proteínas totais como também em UA/g de tecido.

Correlação	UA/ proteínas totais		UA/ g de tecido	
	r	p	r	p
VEGF x KDR	-0,797	0,107	-0,008	0,990
VEGF x bFGF	0,761	0,189	0,924	0,025*
VEGF x FGFR-2	0,934	0,020*	0,763	0,134
VEGF x FGFR-3	0,214	-0,730	-0,809	0,097
KDR x bFGF	0,586	0,299	-0,818	0,090
KDR x FGFR-2	0,426	0,475	0,965	0,008*
KDR x FGFR-3	0,629	0,256	0,905	0,034*
bFGF x FGFR-2	0,934	0,020*	0,063	-0,857
bFGF x FGFR-3	0,214	0,730	0,021	-0,932
FGFR-2 x FGFR-3	0,294	0,632	0,974	0,005*

5.4 EXPRESSÃO DO mRNA DO VEGF, Flt-1 E KDR NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS

A expressão do mRNA do VEGF apresentou-se constante do dia 2 ao dia 6 p.o. aumentando ($p<0,01$) no dia 12 p.o. e permanecendo assim até o dia 17 p.o. No dia 26 p.o. ocorreu um decréscimo ($p<0,001$) nesta expressão (Figura.12A).

Neste estudo, a expressão do mRNA do Flt-1 não variou entre os dias 2 e 12 p.o., decrescendo ($p<0,01$) no dia 17 e decrescendo ainda mais ($p<0,05$) no dia 26 p. o. (Figura 12B).

A expressão do mRNA do KDR observada foi semelhante a do VEGF durante as fases do ciclo estral estudadas: do dia 2 ao dia 6 p.o. a expressão foi constante, aumentando no dia 12 ($p<0,01$), permanecendo assim até o dia 17 e decaindo ($p<0,001$) no dia 26 p.o. (Figura 12C). Observou-se que os animais superovulados apresentaram no dia 6 p.o. um decréscimo ($p<0,001$) na expressão do mRNA do sistema VEGF em relação aos animais não tratados (Figuras 13 A, B e C).

Figura12 - Expressão relativa do mRNA (UA) do VEGF (A), Flt-1 (B) e KDR (C) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,001$

(A) **(B)** **(C)**

Figura13 - Expressão relativa do mRNA do VEGF (A), Flt-1 (B) e KDR(C) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 após-ovulação. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três (CL) e cinco (CS) animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,001$

5.5 EXPRESSÃO DO mRNA DO bFGF, FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 E FGFR-4 NO CORPO LÚTEO DE BÚFALAS SUPEROVULADAS E NÃO TRATADAS

Na figura 14A estão representados os resultados obtidos para a expressão do mRNA do bFGF. Observou-se que ocorreu um aumento na expressão do bFGF do dia 2 ao dia 6 p.o., decrescendo no dia 12 p.o., voltando a aumentar no dia 17 p.o. e permanecendo assim até dia e 26 p.o. ($p<0,05$).

A expressão do mRNA do FGFR-1 foi constante do dia 6 ao dia 12 p.o., aumentou no dia 17 p.o. e voltou a decair no dia 26 p.o. ($p<0,05$; Figura 14B).

Neste estudo, a expressão do mRNA do FGFR-2 aumentou do dia 2 ao dia 6 p.o. continuando assim até o dia 12 p.o., aumentando novamente no dia 17 p.o. e permanecendo assim até o dia 26 p.o. ($p<0,05$; Figura 14C).

A expressão do mRNA do FGFR-3 observada foi semelhante à do bFGF durante todas as fases do ciclo estral estudadas: do dia 2 ao dia 6 p.o., a expressão foi aumentada, no dia 12 p.o. decaiu, e voltou a aumentar no dia 17 p.o. ($p<0,05$) permanecendo assim até o dia 26 p. o. (Figura 15A).

A expressão do mRNA FGFR-4 no CL bubalino foi constante durante todo o ciclo estral (Figura 15B)

Nos animais superovuladas no dia 6 p.o., foi observado um decréscimo na expressão do mRNA do bFGF, do FGFR-1 e do FGFR-3 em relação a animais não tratados na mesma fase do ciclo ($p<0,05$). No entanto, não foi observada diferença significativa para o mRNA do FGFR-2 e FGFR-4, apesar de apresentarem tendência a maior expressão nos animais não tratados (Figuras 16 A, B e C e Figuras 17 A e B, respectivamente).

Figura 14 - Expressão relativa do mRNA do bFGF (A), FGFR-1 (B) e FGFR-2 (C) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,05$

(A)

(B)

Figura 15 - Expressão relativa do mRNA do FGFR-3 (A) e FGFR-4 (B) no corpo lúteo em diferentes dias após ovulação (2, 6, 12, 17 e 26). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três animais por grupo. Diferentes letras significam diferença significativa para $p < 0,05$

Figura 16 - Expressão relativa do mRNA do bFGF (A), FGFR-1 (B) e FGFR-2 (C) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 após a ovulação. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três (CL) e cinco (CS) animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,05$

(A) **(B)**

Figura 17 - Expressão relativa do mRNA FGFR-3 (A) e FGFR-4 (B) no corpo lúteo de búfalas superovuladas (CS) comparado com animais não tratados (CL) no dia 6 pós-ovulação. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três (CL) e cinco (CS) animais por grupo. * significam diferença significativa para $p < 0,001$

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO VEGF, bFGF E RESPECTIVOS RECEPTORES

No CL de búfalas, o mRNA do VEGF apresentou correlação negativa com o Flt-1 ($p < 0,05$, $r = -0,6101$) e correlação positiva com o KDR ($p < 0,001$, $r = 0,896$). Na análise entre os receptores, foi encontrada correlação negativa entre o Flt-1 e o KDR ($p < 0,05$, $r = -0,708$). O mRNA do bFGF apresentou correlação positiva com o FGFR-2 ($p < 0,05$, $r = 0,677$) e com o FGFR-3 ($p < 0,05$, $r = 0,832$). Demais valores de correlações entre os transcritos estudados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 Correlação da expressão gênica entre o VEGF e do bFGF e seus respectivos receptores no CL cíclico de búfalas.

Correlação	r	p	Correlação	r	p
VEGF x Flt-1	-0,610	0,016	KDR x FGFR-1	0,407	0,132
VEG x KDR	0,896	0,000	KDR x FGFR-2	0,122	0,666
Flt-1 x KDR	-0,708	0,003	KDR x FGFR-3	-0,1000	0,7229
VEGF x bFGF	0,003	0,980	KDR x FGFR-4	0,032	0,909
VEGF x FGFR-1	0,4821	0,068	bFGF x FGFR-1	0,1536	0,5848
VEGF x FGFR-2	0,125	0,657	bFGF x FGFR-2	0,674	0,005
VEGF x FGFR-3	-0,0750	0,759	bFGF x FGFR-3	0,8321	0,001
VEGF x FGFR-4	0,257	0,3549	bFGF x FGFR-4	0,2607	0,3480
Flt-1 x bFGF	0,135	0,629	FGFR-1 x FGFR-2	0,2556	0,3579
Flt-1 x FGFR-1	-0,103	0,713	FGFR-1 x FGFR-3	0,1679	0,5499
Flt-1 x FGFR-2	0,262	0,346	FGFR-1 x FGFR-4	0,1667	0,3440
Flt-1 x FGFR-3	0,257	0,3549	FGFR-2 x FGFR-3	0,203	0,468
Flt-1 x FGFR-4	-0,057	0,8397	FGFR-2 x FGFR-4	0,286	0,301
KDR x bFGF	-0,130	0,638	FGFR-3 x FGFR-4	0,1429	0,6115

5.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

Na figura 19 está representado as bandas referentes ao vetor e ao produto de amplificação do KDR após digestão com a enzima de restrição, confirmando a presença do inserto.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1,1% e brometo de etídeo após digestão do vetor contendo o fragmento do receptor KDR. **1** - Banda correspondente ao vetor **2** - Banda correspondente ao produto de amplificação do KDR **M** – marcador de peso molecular

O processo de clonagem parcial do KDR forneceu uma seqüência de **607** pares de bases. As seqüências foram alinhadas e comparadas como demonstrado abaixo (Figura 19).

```

G G G G G G A T G G A G A G A A G G G T A T G G C C C T T G T T G T G G T T G G T G G A G A C C C G G G T G C C T C T G G G G T T T T T T A G A G C T T T C C C T T G A T C
G G C G G A T G G A G A G A A G G G C T A T G G C C C T T G T C T G T G G T C T G G T G G A G A C C C G G G T G C C T C T G G G G T T T T T T A G A G C T T T C C C T T G A T C
G T G G G A T G G A G A G A A G G G C T A T G G C C C T T G T C T G T G G T T G G T G G A G A C C C G G G T G C C T C T G G G G T T T T T T A G A G C T T T C C C T T G A T C

C A C C C A G G C T C A G C A T C C A A A A A G A C A T A C T T A C A G T T A T G G T A A C A C A A C G C T T C A G A T T A C T T G A G G G G T C A G A G G G A C T T G A C T G
C A C C C A G G C T C A G C A T C C A A A A A G A C A T A C T T A C A G T T A T G G T A A C A C A A C G C T T C A G A T T A C T T G A G G G G T C A G A G G G A C T T G A C T G
C A C C C A G G C T C A G C A T C C A A A A A G A C A T A C T T A C A G T T A T G G T A A C A C A A C G C T T C A G A T T A C T T G A G G G G T C A G A G G G A C T T G A C T G

G C C C A A C A A T C A G A G A G C T C T G A G A A A A G A G T G G A G G T C A C A G A T T T G C A G T G A T G G C T T C T T C T G T A A G A T G C T C A C A A T T T C C G A A G T C
G C C C A A C A A T C A G A G A G C T C T G A G A A A A G A G T G G A G G T C A C A G A T T T G C A G T G A T G G C T T C T T C T G T A A G A T G C T C A C A A T T T C C G A A G T C
G C C C A A C A A T C A G A G A G C T C T G A G A A A A G A G T G G A G G T C A C A G A T T T G C A G T G A T G G C T T C T T C T G T A A G A T G C T C A C A A T T T C C G A A G T C

A T T G G A A A T G A T A C T G G A G C C T A C A A G T G T T C T A C C A G G A C A T G A A T G G G T C C G T T G T T A T G T G T A T G T T A A G A T T A T A G G T C T C C G T T T A T
A T T G G A A A T G A T A C T G G A G C C T A C A A G T G T T C T A C C A G G A C A T G A A T G G G T C C G T T G T T A T G T G T A T G T T C A A G A T T A T A G G T C T C C G T T T A T
A T T G G A A A T G A T A C T G G A G C C T A C A A G T G T T C T A C C A G G A C A T G A A T G G G T C C G T T G T T A T G T G T A T G T T A A G A T T A T A G G T C T C C G T T T A T

T G T T C T G T T A G G A C C A G A T G A A G T T G T A A T C A T G A G A A C A A A A A C A A A A C T G T G G T G A T T C C A T G T T T G G G G A T G T T T C A G A C C T C A A T
T G T T C T G T T A G G A C C A G A T T G T A A T C A T G A G A A C A A A A A C A A A A C T G T G G T G A T T C C A T G T T T G G G G A T G T T T C A G A C C T C A A T
T G T T C T G T T A G G A C C A G A T G A A G T T G T A A T C A T G A G A A C A A A A A C A A A A C T G T G G T G A T T C C A T G T T T G G G G A T G T T T C A G A C C T C A A T

G T G T A T C T C T G C A A G G T A T C C A G A A A A A A G A T T T G T C C T G A T G G T A A A G A A T T T C C T G G G A C A G A A G A A A G G T T C A G T A T T C C C A G T A T
G T G A C A T C T C T G C A A G G T A T C C A G A A A A A A G A T T T G T C C T G A T G G T A A A G A A T T T C C T G G G A C A G A A G A A A G G T T C A G T A T T C C C A G T A T
G T G T A T C T C T G C A A G G T A T C C A G A A A A A A G A T T T G T C C T G A T G G T A A A G A A T T T C C T G G G A C A G A A G A A A G G T T C A G T A T T C C C A G T A T

T A T A G A T T A G T T A T G C T G G G T G T G G T C T T A A
T A T G A T T A G T T A T G C T G G G T G T G G T C T T A A
T A T G A T T A G T T A T G C T G G G T G T G G T C T T A A

```

Figura 19 – Seqüência parcial do KDR da espécie bubalina

O alinhamento e análise das pares de bases das seqüências possibilitaram demonstrar que a seqüência parcial do KDR é:

```
GTGCGGGATGGAGAGCAAGGCGCTACTGGCCCTTGCTCTGTGGCTCTGCGTG
GAGACCCGGGCTGCCTCTGTGGGTTTTCTAGTGTTTCCCTTGATCCACCCAGG
CTCAGCATCCAAAAAGACATACTTACAGTTATGGCTAACACAACGCTTCAGATTA
CTTGCAAGGGGTCAGAGGGACTTGCACTGGCTCTGGCCCAACAATCAGAGCAGC
TCTGAGAAAAGAGTGGAGGTCACAGATTGCAGTGATGGCTTCTTCTGTAAGATG
CTCACAATTTCCGAAGTGATTGGAAATGATACTGGAGCCTACAAGTGCTTCTACC
AGGACACTGACATGGGCTCCGTTGTTTATGTGTATGTTCAAGATTATAGGTCTCC
GTTTATTGCTTCTGTTAGCGACCAGCATGAAGTTGTGTACATCACTGAGAACAAA
AACAAAACACTGTGGTGATTCCATGTTTGGGGACTGTTTCAGACCTCAAATGTGTCA
CTCTGTGCAAGGTATCCAGAAAAAAGATTTGTTCCCTGATGGTAACAGAATTTCTT
GGGGACAGCAAGAAAGGCTTCAGTATTCCCAGCTATATGATTAGTTATGCTGGC
GTGGTCTTAA
```

A seqüência do KDR bubalino apresentou homologia aos genes KDR bovino (99%, número de acesso NM_001007193.1), humano (99%, BC001594), rato (99%, NM_207587), murino (99%, BC014875.1), suíno (99%, NM_001007193.1), eqüino (99%, XM 001916946) e canino (98% NM 001048024.1).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento VEGF (FERRARA et al., 1998) e bFGF (GOSPODAROWICZ et al. 1987) são apontados como os principais agentes angiogênicos no CL. Neste estudo, avaliamos a expressão desses fatores e seus receptores em nível gênico e protéico em CL bubalino ao longo do ciclo estral e em animais superovulados. Observamos diferentes padrões de expressão tempo dependente, além de diferenças na expressão desses fatores em animais submetidos ao tratamento superovulatório.

Diferenças na expressão do VEGF no CL ao longo do ciclo estral já foram demonstradas em varias espécies; bovinos (BERISHA et al., 2000), ovinos (REDMER et al., 1996); eqüinos (AL-ZI'ABI et al., 2003) macacos (HAZZARD et al., 2000; TESONE et al., 2005), humanos (OTANI et al., 1999; SUGINO et al., 2000) suínos (BOONYAPRAKOB 2003; KACZMAREK et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

No presente estudo observou-se maior expressão do mRNA do VEGF no dia 12 p.o., ou seja, na fase de CL maduro, no entanto quando observamos a expressão protéica do VEGF por meio de Western blotting não encontramos variações significativas ao longo do ciclo estral. Padrão de expressão de mRNA semelhante foi encontrado em CL de suínos com alta expressão do VEGF até o dia 15 p.o. (KACZMAREK et al., 2007), e em CL de macacos com alta de expressão do VEGF também no dia 12 p. o. (HAZZARD et al., 2000). Em humanos (OTANI et al., 1999; SUGINO et al., 2000) e em eqüinos (AL-ZI'ABI et al., 2003) foi encontrada alta expressão do VEGF tanto na fase luteínica média como na fase luteínica inicial. Sabe-se que em CL de vacas a concentração da proteína VEGF durante a primeira fase luteínica (1-7 d. p.o.) é alta, seguida por um decréscimo na última fase luteínica (13-18 d.p.o.) e depois da regressão (a partir de 18 d.p.o.; BERISHA et al., 2000), em CL de éguas a concentração de proteínas está aumentada nas fases luteínicas inicial e média (FERREIRA-DIAS et al., 2005). A presença do VEGF na fase luteínica inicial onde a angiogênese é mais intensa sugere a participação desse fator na formação dos vasos sanguíneos (REDMER et al., 1996; BERISHA et al., 2000), enquanto a expressão deste fator também na fase luteínica media mostra uma

função não angiogênica, como sua participação na esteroidogênese (OTANI et al., 1999; SUGINO et al., 2000; AL-ZI'ABI et al., 2003).

A expressão do mRNA do Flt-1 no CL de búfalas ao longo do ciclo estral apresentou-se constante do dia 2 ao dia 12 seguida de decréscimo nos dias 17 e 26 p.o., perfil este também observado em humanos (SUGINO et al., 2000) e bovinos (BERISHA et al., 2000). Em suínos (BOONYAPRAKOB et al., 2003) e cabras (KAWATE et al., 2003), a expressão do Flt-1 além de estar aumentada na fase luteínica média também apresentou-se aumentada no CL em regressão. O alta expressão do mRNA do Flt-1 na fase luteínica inicial é inversamente correlacionada com a expressão do VEGF, sugerindo que o Flt-1 pode estar envolvido em um mecanismo de “feedback” negativo, responsável pelo controle da mediação das funções do VEGF na angiogênese, que na fase luteínica inicial é mais intensa (RIBERIO et al., 2007).

Ao analisarmos a expressão protéica do Flt-1 pela técnica de Western blotting no CL de búfalo não foi possível observamos a banda correspondente a essa proteína que na maioria das espécies tem um peso de aproximadamente 200kda (SUGINO ET al., 2000; CELIK-OZENCI et al., 2004; KACZMAREK et al., 2007). O anticorpo utilizado (anticorpo policlonal produzido em coelho contra humano) reconhece o Flt-1 de camundongo, rato e humano, e diante dos testes feitos, provamos que o anticorpo foi funcional tanto para o rato como também foi para o bovino. Trabalhos utilizando o mesmo anticorpo em CL de suínos (KACZMAREK et al., 2007) e de humanos (SUGINO et al., 2000) detectou-se uma banda de aproximadamente 200kDa referente ao Flt-1, em nossos experimentos foi observado uma banda de aproximadamente 50 kDa, que muito provavelmente não corresponde ao Flt-1: podendo ter ocorrido uma reação cruzada, ou seja, o anticorpo reconheceu um antígeno similar ao seu antígeno específico ou também pode ter havido o reconhecimento de uma parte degradada da proteína estudada nas amostras de CL. Como as outras proteínas estudadas foram quantificadas por apresentarem o peso molecular esperado, sugerimos que o método de estocagem utilizado para CL bubalino não foi ideal para a conservação do Flt-1.

O KDR é um importante mediador dos efeitos mitogênicos, angiogênicos e de permeabilidade vascular do VEGF. No CL de búfalas o KDR apresentou maior

expressão protéica nos dias 2 e 12 p.o., seguidas de queda de expressão nos dias 6, 17 e 26 p.o., coincidindo com os resultados encontrados para expressão do mRNA no dia 12, 17 e 26 p.o. Recentemente Kaczmarek et al. (2007) demonstraram um perfil de expressão semelhante em CL de suínos, sugerindo uma ação não angiogênica deste receptor. Resultados de trabalhos com CL de bovinos (BERISHA et al., 2000), humanos (SUGINO et al., 2000), e caprinos (KAWATE et al., 2003;) mostraram um aumento da expressão do KDR durante o desenvolvimento do CL.

Diferenças no padrão de expressão dos receptores podem indicar que a cascata de transdução de sinal induzido por cada um dos receptores é diferente (FERRARA et al., 1997). O Flt-1 e o KDR são dependentes da fosforilação de tirosina, e o VEGF induz uma maior cascata de fosforização por meio da ligação com o KDR. Em resposta a estimulação com VEGF, o KDR é auto-fosforilado principalmente na região carboxila terminal e vários resíduos de tirosinas (Tyr) como o 951, 1054, 1175 e 1224 são fosforilados (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2005). O Flt-1 é autofosforilado nas tirosinas 1169, 1213, 1242, 1327 e (CUNNINGHAM et al., 1995; SAWANO., 1997; ITO et al., 2001). A tirosina 1169 do Flt-1 corresponde à tirosina 1175 do KDR, que é o principal alvo para a via MAP-kinase na indução da angiogênese (SAKURAI et al., 2005). A fosforização destes resíduos pelo respectivo receptor tem a função de desencadear uma mesma resposta, entretanto, a fosforilação da tirosina 1169 é relativamente fraca, e ativa fracamente essa via intracelular (SAWANO et al., 1997). A ativação do KDR em células desprovidas de Flt-1 resulta em resposta mitogênica, enquanto que a ativação do Flt-1 em células desprovidas de KDR não induz proliferação. No entanto a ativação do Flt-1 pelo VEGF induz migração celular, resposta que também é obtida a partir da ativação do KDR pelo VEGF (KLAGSBRUN; D'AMORE 1996; ZIMMERMAM et al., 1996; YOSHIDA et al., 1996; FERRARA et al., 1997). Além disso, essas diferenças podem ser fundamentais para a regulação das funções do CL. A presença Flt-1 principalmente na fase luteínica inicial no CL indica sua ação na angiogênese luteínica e a presença do KDR principalmente na fase luteínica média, coincide com a fase de maior produção de progesterona (SUGINO et al., 2002; PUNYADEERA et al., 2006).

Em um estudo realizado por Papa et al. (2007), no qual a expressão da proteína do VEGF de seus receptores foi acessada por imuno-histoquímica em CL

de búfalas, observou-se que a fase de CL maduro (ou fase luteínica média) apresentou maior expressão tanto do VEGF quanto de seus receptores (Flt-1 e KDR). Tal estudo utilizou os mesmos animais do presente estudo, porém os resultados são parcialmente discordantes. Em relação à expressão do KDR, observou-se o mesmo padrão e maior expresso no dia 12 p.o. Quando observamos a expressão da proteína do VEGF, há diferença em relação à fase de maior expressão, muito provavelmente devido ao uso de anticorpos diferentes na imunohistoquímica e no Western blotting. No trabalho realizado por Papa et al. utilizou-se, o VG76e um anticorpo monoclonal produzido em camundongo contra toda a sequência do VEGF-A189 humano, que reconhece as isoformas 121, 165 e 189, já no nosso trabalho foi utilizado um anticorpo policlonal produzido em coelho também contra um peptídeo humano VEGF(A-20) sc-152, que também reconhece as isoformas 121, 165 e 189, e mesmo apesar disso podem se comportar de maneira diferente, Kaczmarek (2007), utilizando o anticorpo VEGF (A-20) sc-152 observou em CL de suínos, uma única banda de aproximadamente 37kDa, correspondente ao VEGF 165, o que corrobora com nossos resultados, pois encontramos uma banda de aproximadamente 46 kDa que possivelmente também é o VEGF 165. Sendo assim, na técnica de western blotting pode-se acessar uma isoforma principalmente, enquanto que na imunohistoquímica todas as isoformas podem ser acessadas ao mesmo tempo o que poderia explicar uma possível discordância de resultados de expressão protéica.

A rápida mudança cíclica no crescimento e regressão do CL está associada com a rápida mudança na vascularização. O desenvolvimento do CL é acompanhado de um dramático aumento no número de vasos sanguíneos (AUGUSTIN et al., 1995; FRASER; LUNN, 2001; REDMER et al., 2001). A angiogênese em bovinos é normalmente completada entre os dias 5 e 7 do ciclo estral, mas a expressão do VEGF e seus receptores também na fase luteínica média sugere uma função do VEGF na manutenção das células endoteliais que rodeiam os capilares ou as próprias células luteínicas (BERISHA et al., 2000). De acordo com Alon et al. (1995) um limiar de concentração de VEGF é requerido para inibir a apoptose das células endoteliais, por meio da indução da expressão de proteínas anti-apoptóticas (GERBER et al., 1998), essencial para estabilização dos vasos sanguíneos. Recentemente foi mostrado que o VEGF também protege as células da

granulosa contra a morte apoptótica pela redução da expressão da ativa caspase-3 (GREENAWAY ET al., 2004). Kaczmarek et al. (2007) sugeriram que em suínos, durante fase luteínica média, o VEGF pode ser um fator importante na sobrevivência não somente para células endoteliais, mas também para células luteínicas. Estes dados corroboram para explicar a presença do VEGF e seus receptores durante todo o ciclo estral em búfalas.

O CL tem um grande aporte de fluxo sanguíneo por unidade de tecido, o qual está altamente correlacionado com o padrão de secreção de progesterona (REYNOLDS; REDMER, 1999; ACOSTA et al., 2004). Isto tem uma particular importância em vacas já que uma inadequada secreção de progesterona pós-ovulação está associada com baixo desenvolvimento embrionário e redução da fertilidade (MANN; LAMMING, 1995; LIU et al., 1995). Estudos realizados por Moura et al. (2003) e Papa et al. (2007) em búfalas, mostraram uma grande correlação entre a densidade vascular e a expressão do VEGF e seus receptores em células luteínicas e também uma grande correlação entre a expressão do VEGF e a concentração de progesterona plasmática, sendo que a maior produção de progesterona foi encontrada na fase luteínica média correspondendo à máxima atividade secretória do corpo lúteo. Ainda observaram uma diminuição nesses níveis a partir do dia 18 do ciclo, em virtude do processo de luteólise, no qual existe regressão dos vasos com conseqüente redução do aporte sanguíneo e diminuição dos precursores de hormônios esteróides. O VEGF aumenta a permeabilidade vascular para facilitar a transferência de colesterol para células luteínicas resultando em uma melhora da função luteínica, como a intensa produção de progesterona (DICKSON et al., 2001)

Expressão dos FGFs e seus receptores no CL ao longo do ciclo estral já foi demonstrada por vários autores (SCHAMS et al., 1994; PRADO, 2004; CASTILHO et al., 2008).

Em búfalos, o mRNA do bFGF encontra-se mais expresso no dia 6. p.o, e também nos dias 17 e 26 p.o. A expressão protéica acompanha a expressão do mRNA quando esta é analisada em relação à quantidade da proteína bFGF por grama de tecido de CL. Quando analisada a expressão protéica referente a proteínas totais submetidas à eletroforese, esta expressão manteve-se constante

entre os dias 2 e 17 p.o. e decaiu no dia 26 p.o. O bFGF foi detectado no CL de búfalas nas células endoteliais, luteínicas e perivasculares. É interessante ressaltar que na primeira fase luteínica o bFGF foi detectado somente em células endoteliais, no CL maduro em todas as células presentes no CL, e no CL em regressão também foi detectado em todas as células mas com uma menor expressão nas células luteínicas; já no corpo albicans o bFGF foi detectado somente nas células endoteliais e perivasculares (PRADO, 2004). Um aumento na expressão do bFGF nas últimas fases luteínicas e na luteólise também foi visto em CL de bovinos (SCHAMS et al., 1994). Este aumento de expressão do mRNA do bFGF durante as últimas fases luteínicas pode ser devido ao envolvimento do bFGF na indução da luteólise, como estimulador da secreção de prostaglandina em células luteínicas de bovinos (NEUVIANS et al., 2004). Da mesma forma Tanja et al. (2004), observaram alta expressão do bFGF na luteólise funcional induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ em CL de bovinos e relacionaram esta alta expressão a uma tentativa do bFGF em regular a regressão do CL, bem como a seu envolvimento na redução da resposta inflamatória do tecido em regressão. Em células da veia umbilical de humanos, a resposta inflamatória de células endoteliais por citosinas, como o TNF ou interleucina 1b, é marcadamente reduzida após um pré-tratamento com bFGF (GRIFFIOEN et al., 1996), evidenciando seu efeito anti-inflamatório (CIRCOLO et al., 1990). Quando ocorre a inibição da expressão de citosinas, ocorre também a indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) que induz vasodilatação pela produção de óxido nítrico (COLASANTI et al., 1995), conferindo às citosinas um papel importante durante a luteólise nos bovinos (PATE, 1995; PATE; KEYES, 2001; PETROFF et al., 2001), que muito provavelmente é modulado pelo bFGF (TANJA et al., 2004). A presença aumentada do bFGF nas últimas fases luteínicas no CL de búfalas indica que o bFGF também possa estar envolvido no processo de luteólise nessa espécie.

O mRNA dos receptores FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 apresentaram um perfil semelhante de expressão: ocorre aumento de expressão do mRNA nas últimas fases luteínicas. Os FGFR-2 e FGFR-3 apresentaram uma correlação positiva com a expressão do bFGF. A expressão protéica destes receptores não acompanhou a expressão do mRNA, como aconteceu também com a expressão do bFGF, apontando para mecanismos regulatórios pós-transcricionais envolvidos na fisiologia luteínica (PUNYADEERA et al., 2006). A expressão do mRNA do FGFR-4

apresentou-se constante durante todo o ciclo estral. No CL de ovinos, o FGFR-1 e FGFR-2 também foram mais expressos na última fase luteínica. (DORAISWASMY et al., 1992). Estes dados sustentam a hipótese de que o bFGF possa estar envolvido na indução da luteólise e de seus receptores 1, 2 e 3 participarem como mediadores deste processo.

Outra provável explicação para a expressão aumentada do mRNA do bFGF e seus receptores no CL já em luteólise, pode ser que estes fatores desempenhem um papel importante durante a apoptose e/ou o remodelamento do tecido no CL, o que também foi sugerido por Castilho et al. (2008) quando estudou a expressão do FGFR2b em CL de bovino e encontrou uma expressão mais alta deste fator nos últimos estágios do CL quando comparado ao estágio inicial. De fato, existem genes que são regulados positivamente no CL em regressão e que estão envolvidos no controle da apoptose e do remodelamento do tecido, como o fator pro-apoptótico (FAZ, TANIGUCHI et al., 2002) e genes componentes da matriz extracelular, como o colágeno α 1 e 2 e a decorina (CASEY et al., 2005).

O bFGF possui afinidades diferentes com cada receptor (COLEMAN, 2003), indicando que o desencadeamento dos sinais intracelulares são regulados pela especificidade bFGF/FGFRs. A expressão diferenciada dos FGFRs ao longo do ciclo estral no CL de búfalas indica diferentes funções desencadeadas por cada um dos receptores. A ação dos FGFRs envolve a ativação de várias vias paralelas de sinalização com subsequente autofosforilação dos receptores seguida do recrutamento de moléculas adaptadoras (CROSS et al., 2001). A ativação da via MAPK (mitógeno ativador da proteína quinase), que leva a ativação da proteína quinase C (PKC) é requerida para uma completa resposta do bFGF em células endoteliais, (PRESTA et al., 1991). Sabe-se que um resíduo de tirosina no FGFR-1 medeia a ação mitogênica do bFGF (DELL RIO et al., 1999) e que tanto o FGFR-1 quanto o FGFR-2 estão ligados a proliferação de células endoteliais (CROSS et al. 2001).

Neste trabalho analisamos a expressão gênica dos FGFRs 1 a 4 bem como do bFGF e a expressão protéica do bFGF, FGFR-2 e FGFR-3, devido à falta de anticorpos disponíveis anti FGFR-1 e FGFR-4. Acreditamos, no entanto, que os dados apresentados de expressão gênica sem a correspondente expressão protéica

também colaboraram para uma melhor compreensão do papel do bFGF no desenvolvimento, manutenção e regressão do CL bubalino.

Observando a correlação positiva entre a produção de progesterona e a expressão do VEGF (PAPA et al., 2007) e do bFGF (PRADO, 2004) no CL de búfalas, podemos inferir sobre a provável influência desses fatores na produção de progesterona. Quando ocorre o pico pré-ovulatório de LH, a diferenciação das células foliculares em células luteínicas (luteinização) é desencadeada e caracteriza-se por um aumento da produção de esteróides C21 devido à mudança na expressão das enzimas responsáveis pela síntese de progesterona e estradiol-17 β (JUENGEL; NISWENDER, 1999). Sabe-se que em células bovinas cultivadas sob a influência do bFGF, ocorre um aumento na produção de progesterona principalmente na fase luteínica inicial (MIYAMOTO OKUDA; SCHAMS, 1992) e na fase luteínica média (LIEBERMAN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996). Em células luteínicas de rato tratadas com bFGF, foi observada maior produção de progesterona na fase luteínica inicial (TAMURA; ASAKAI; OKAMOTO, 1991). A inibição do VEGF utilizando anticorpo anti-VEGF durante a fase luteínica média em macacos suprimiu a função do CL que foi refletida no rápido declínio da produção de progesterona (DICKSON et al., 2001). Segundo Yamashita et al., (2008) O controle da produção de progesterona no CL em desenvolvimento pelo VEGF e pelo bFGF ocorre devido a regulação da expressão gênica da StAR (steroidogenic acute regulatory protein ou proteína regulatória da esteroidogênese), uma enzima importante na via de produção de progesterona (CHRISTENSON e STRAUSS, 2001).

Os sistemas VEGF e bFGF, dentre os fatores de crescimento, são os mais importantes estimuladores da angiogênese, sendo assim são importantes para manutenção do CL. A expressão destes fatores em búfalas ao longo do ciclo estral mostrou-se tempo depende, sugerindo um papel importante na regulação das funções do CL desta espécie também.

A superovulação é uma técnica realizada através da administração de gonadotrofinas exógenas, que estimulam o crescimento e a múltipla ovulação dos folículos antrais (ADAMS, 1994) e vários estudos sugerem que as gonadotrofinas modulam a expressão dos fatores de crescimento (CHRISTENSON et al. 1997; LEE et al., 1997; MAYBIN E DUNCA, 2004; PIETROWSKI; KECK, 2004).

Nossos resultados demonstram uma maior expressão da proteína do VEGF e KDR em comparação aos animais não tratados no mesmo dia do ciclo estral, o que está de acordo com Papa et al. (2007) que encontraram alta expressão destas proteína nas células luteínicas dos mesmos animais e também alta densidade vascular devido a estimulação da angiogênese. Mas surpreendentemente nestes animais, a expressão do mRNA do VEGF e KDR estavam significativamente diminuídas, o que aponta para um incremento na maquinaria de tradução da célula luteínica estimulada pelo tratamento superovulatório ao mesmo tempo que adicionalmente pode haver uma diminuição da estabilidade do mRNA, também induzida pelo tratamento superovulatório.

Um padrão semelhante de expressão tanto protéica quanto de mRNA foi encontrado para o sistema bFGF. A expressão protéica do bFGF, FGFR-2 e FGFR-3 encontra-se aumentada, enquanto a expressão do mRNA bFGF, FGFR-1 e FGFR-3 encontra-se diminuída e do FGFR-2 e FGFR-4 com tendência à diminuição em comparação aos animais não tratados no mesmo dia do ciclo estral. Estes achados estão de acordo com os achados de Prado (2004), que observou uma maior expressão do bFGF nas células luteínicas de búfalas superovuladas e menor expressão do mRNA acessado pela técnica de hibridização *in situ*.

Nossos resultados sugerem que o tratamento superovulatório é capaz de aumentar a habilidade de síntese protéica das células luteínicas. As células luteínicas de animais superovulados demonstram características morfológicas que refletem uma maior atividade de síntese protéica (ARTONI et al., 2004), como por exemplo, aumento da quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias, diferença na condensação de cromatina e mudança no formato do núcleo (HEATH et al., 1983; MEYER et al., 1991). O retículo endoplasmático rugoso é responsável diretamente pela síntese de proteínas, sendo especialmente desenvolvido nas células que participam ativamente dessa síntese (BAUMANN ; WALZ, 2001). Células como as do ácino pancreático, e células do plasma, que são células secretórias, uma grande parte do citoplasma é preenchida com RER e vesículas de secreção (LODISH et al., 2008). As mitocôndrias estão relacionadas com a síntese de aminoácidos e de esteróides (DE ROBERTIS et al., 2003). O remodelamento da cromatina e características dos núcleos estão envolvidos na síntese de mRNA, onde ocorre uma relação entre diminuição da condensação da

cromatina e o aumento da síntese de mRNA (SHUMAKER et al., 2003; DECHAT et al., 2008; LODISH et al., 2008).

Shikone et al. (1992) demonstraram que o FSH induz a expressão de receptores para o bFGF em cultura de células da granulosa de ratos, e que essa indução é dependente da síntese de proteína. Em trabalhos realizados por Hazzard et al. (1999), foi observado um aumento de 6 vezes na concentração da proteína VEGF após administração de hCG em células da granulosa de ratos, entretanto não ocorreu mudanças na expressão do mRNA, sugerindo que as gonadotrofinas promovem uma regulação pos-transcricional na produção de VEGF.

Existem vários dados que sugerem que o LH e o hCG modulam a expressão do VEGF e ambos FSH e LH/hCG, via ativação de seus receptores, são capazes de induzir a expressão do mRNA do VEGF em células da granulosa (CHRISTENSON et al. 1997; LEE et al. 1997, MAYBIN e DUNCA, 2004; PIETROWSKI; KECK, 2004). Em primatas e ratos com ovários hiperestimulados ocorre uma elevação dos níveis de VEGF, predominantemente após uma onda de hormônio luteinizante (MACCLAURE et al., 1994; SHWEIKI et al., 1993). A expressão do mRNA do bFGF e de seus receptores em células da granulosa e da teca de suínos é aumentada após administração de eCG (SHIMIZU et al., 2002). Por outro lado Phan et al. (2006) mostraram que o hCG parece não influenciar a expressão do mRNA do bFGF em células da granulosa luteínica de humanos, mas a expressão desse fator apresenta uma leve tendência a ser diminuída após o tratamento com hCG.

Segundo Artini et al. (1998), as concentrações plasmáticas de VEGF e o número de oócitos coletados são diretamente proporcionais e a administração de gonadotrofinas pode ser feita para estimular a produção de VEGF e promover o desenvolvimento de um alto número de oócitos. Em humanos, a concentração de VEGF no fluido folicular é maior que as concentrações plasmáticas depois da administração de FSH. Além disso, a administração de baixas doses de hCG também aumentam a produção de VEGF pelas células da granulosa em primatas não humanos (CHRISTENSON; STOUFFER 1997).

Em um trabalho realizado por Moura (2003) e Papa et al. (2007) utilizando os mesmo animais de nosso trabalho, foi demonstrado que os animais superovulados

apresentaram maior concentração de progesterona, quando comparados a animais não tratados na mesma fase do ciclo estral. Esta produção aumentada pode ser correlacionada com expressão protéica dos fatores de crescimento em estudo, pois estes também se apresentaram mais expressos nos animais superovulados. Barruselli et al. (2004) também demonstraram significativo aumento das concentrações circulantes de progesterona produzidas pelo CL formado após o tratamento com eCG. Existem trabalhos que associam o aumento da concentração plasmática de progesterona com o desenvolvimento embrionário e estabelecimento da gestação (BINELLI et al., 2001). É sabido que o bFGF e o VEGF aumentam a secreção de progesterona por células luteínicas em várias espécies (GOSPODAROWICZ et al., 1977; MIYAMOTO et al., 1992; GRAZUL-BILSKA et al., 1995; KOBAYASHI et al., 2001; LIEBERMANN et al., 1996; REYNOLDS et al., 2000; YAMASHITA et al., 2008), indicando que o bFGF e o VEGF além de estarem envolvidos na formação do CL, influenciam o controle da secreção de P4.

A estabilidade dos mRNAs é um importante mecanismo passível de regulação. O tempo em que estão disponíveis para tradução antes de serem degradados, além do controle de sua estabilidade constituem a principal via de regulação da tradução (GUHANIYOGI; BREWER, 2001). Sabe-se que as gonadotrofinas influenciam a estabilidade de alguns mRNAs. O hCG aumenta a transcrição do gene da betaglicana via aumento na estabilidade do mRNA. O LH e o FSH aumentam a estabilidade do mRNA do EGF (epidermal growth factor; CHOI et al., 2005) e do gene CYP19 (SAHMI et al., 2006). Em contraste, o hCG diminui a expressão do gene dos receptores do GnRH via diminuição da estabilidade do mRNA (LI et al., 1996). O LH diminui a transcrição de genes como o LHR e o ER- β em células da granulosa, predominantemente pela diminuição da estabilidade e conseqüente aumento da degradação do mRNA (GUO et al., 2001). Diante destes dados, podemos sugerir que a diminuição da expressão do mRNA no CL de búfalas superovuladas possa também ser um reflexo da diminuição da estabilidade e conseqüente aumento na degradação do mRNA e que o aumento de síntese protéica de alguns fatores possa ser o desenvolvimento de mecanismos compensatórios para esta diminuição.

Em relação ao seqüenciamento parcial do KDR, quando analisamos a parte do gene do KDR seqüenciado, observamos uma grande homologia com outras

espécies. A evolução dos seres vivos faz com que sistemas biológicos preservem sua estrutura e funcionalidade. As mudanças nos seres vivos são causadas por alterações nas suas moléculas de DNA. Este processo faz com que seja comum a existência de seqüências semelhantes de DNA em diferentes organismos. Quanto mais semelhantes e mais próximos os organismos estão na escala evolutiva, mais semelhantes são suas seqüências genéticas. Genes homólogos são aqueles que, apesar de pertencerem a diferentes organismos, são estruturalmente semelhantes e cumprem funções idênticas. A homologia é usada em Biologia e outras áreas para descobrir características de um novo gene através da descoberta da existência de genes homólogos a este gene que já possuem anotações precisas de suas características (HAAS, 1993; DURBIN, 1998).

Como os búfalos vêm adquirindo um papel cada vez mais importante na agropecuária brasileira torna-se importante o seqüenciamento do gene VEGF e seus receptores nesta espécie, como também de outros genes envolvidos na reprodução. Encontramos alta homologia do gene KDR com outras espécies como os bovinos, mas justifica-se esse seqüenciamento, porque pequenas diferenças no DNA podem determinar maior ou menor expressão de determinadas características. Estamos em processo de inserção desta seqüência do KDR no banco de genes, a fim de disponibilizar estes dados para outros pesquisadores.

No CL de búfalas superovuladas a expressão protéica tanto do sistema VEGF quanto do bFGF está aumentada, e a expressão gênica está diminuída indicando uma importante função destes fatores em resposta ao tratamento superovulatório, e mostrando que o tratamento superovulatório parece aumentar a taxa de tradução dos fatores angiogênicos. Considerando estes resultados, podemos sugerir a possibilidade dos sistemas VEGF e bFGF serem alvos de manipulação para tentar otimizar resultados obtidos após aplicação de biotécnicas reprodutivas.

7CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

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

- O mRNA e proteína do VEGF e seus receptores KDR e Flt-1 são expressos de maneira tempo dependente durante o ciclo estral, e a expressão mais alta foi encontrada no dia 12 p.o. sugerindo um papel não angiogênico destes fatores.
- A expressão gênica do bFGF e seus receptores 1, 2, 3, bem como a expressão protéica do bFGF e os receptores 2 e 3 também se apresentou de maneira tempo dependente, e atingiu níveis mais altos nas últimas fases luteínicas, o que sugere um papel importante deste fator durante a luteólise na espécie bubalina.
- O tratamento superovulatório influencia a expressão do mRNA tanto do sistema VEGF quanto do bFGF induzindo uma diminuição dos mesmos.
- O tratamento superovulatório aumenta a taxa de tradução dos fatores de crescimento VEGF e bFGF e seus receptores no CL de búfalas.
- A clonagem de uma parte da sequência do gene KDR bubalino demonstra que esta proteína é altamente conservada entre as espécies.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACHEN, M. G.; JELTSCH, M.; KUKK, E.; MAKINEN, T.; VITALI, A.; WILKS, A. F.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 2, p. 548-553, 1998.
- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal of Reproduction Science**, v. 82, p. 127-140. 2004.
- 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, 1993.
- ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M. R. Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p. 1103-1113, 1994.
- ALON, T.; HEMO, I.; ITIN, A.; PE'ER, J.; STONE, J.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. **Nature Medicine**, v. 1. n. 10, p. 1024-1028, 1995.
- AL-ZI'ABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 12, p. 259-270, 2003.
- 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, p. 505-514, 1999.
- ARTINI, P. G.; DE MICHEROUX, A. A.; D'AMBROGIO, G. Growth hormone cotreatment with gonadotropins in ovulation induction. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 11, p. 763-79, 1996.
- ARTONI, L. P.; MOURA, C. 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 lutea of water buffalo. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto

Seguro. **Anais do 15th International Congress of Animal Reproduction**, 2004, p. 363.

AUGUSTIN, H. G. B.; RAUN, K.; TELEMENAKIS, I.; MODLICH, U.; KUHN, W. Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. **The American Journal of Pathology**, v. 147, p. 339–351, 1995.

AVIEZER, D.; HECHT, D.; SAFRAN, M.; EISINGER, M.; DAVID, G.; YAYON, A. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. **Cell**, v. 79, n. 6, p.1005-1013, 1994.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHI, M.; ZICARELLI, L. Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, 2003. **Roma: CNAB**, 2003, v.1, p. 269-273.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; FERRAZE, M. L.; BARNABE, R. C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 285-292, 2007.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; PORTO-FILHO, R.; CARVALHO, N. A. T.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, Z. Failure of oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 491, 2000. Apresentado: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 25., 2000, Maastrich. **Abstract...** 2000.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531-47, 1997.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S., SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Advanced Cancer Research**, v. 59, p.115-165, 1992.

BENYEI, B.; BARROS, C. C. W. Effect of superovulation on performance of bovine embryo donors imported from temperate zone to tropical climate during the first two years of adaptation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.2, p. 125-126, 2000.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 305-317, 2005.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPAINER, 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**, n. 63, p. 1106-1114, 2000.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular Reproduction of Development**, v. 67, n. 2, p. 162-171, 2004.

BATES, D. O.; HARPER, S. J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 225–237, 2002.

BAUMANN, O.; WALZ, B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. **International Review of Cytology**, v. 205, p. 149-214, 2001.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: MADUREIRA E. H.; BARUSELLI, P. S. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: FUNVET, 2000. p. 99-114.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus E-17b treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 897–910, 1996.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43. p. 31–40, 1995.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53–72, 2002.

BO, G. A.; MARTÍNEZ, M.; NASSER, L. F.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. Follicular dynamics in bos indicus and bos taurus beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 2, p. 221, 1993.

BOONYAPRAKOB, U.; GADSBY, J. E.; HEDGPETH, V.; ROUTH, P.; ALMOND, G. W. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 126, p. 393–405, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRIGSTOCK, D. R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 189-206, 1999.

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, p. 573-577, 1991.

BURATINI JR., J.; PINTO, M. G.; CASTILHO, A. C.; AMORIN, R. L.; GIOMETTI, I.C.; PORTELA, V. M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 743–750, 2007.

BURGESS, W. H.; MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 575-606, 1989.

CARVALHO, N. A. T.; NAGASAKU, E. M.; VANNUCCI, F. S.; TOLEDO, L. M.; CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, M. I. A. B.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; MARTIZ, C. C.; BARUSELLI, P. S. Use of different doses of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: **WORLD BUFFALO CONGRESS**, 8., 2007, Caserta, Italy. **Proceedings of the 8th World Buffalo Congress**, Caserta, Italy: WBC, 2007. p. 143.

CASEY, O. M.; MORRIS, D. G.; POWELL, R.; SREENAN, J. M.; FITZPATRICK, R. Analysis of gene expression in non-regressed and regressed bovine corpus luteum tissue using a customized ovarian cDNA array. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1963-1976, 2005.

CASTILHO, A. C.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; PRICE, C. A.; AMORIN, R. L.; PAPA, P. C.; BURATINI JR., J. Expression of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor-2B, in the corpus luteum. **Molecular Reproduction Development**, v.75, p. 940–945, 2008.

CELIK-OZENCI, C.; AKKOYUNLU, G.; KAYSLI, U. A.; ARICI, A.; DEMIR, R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 120, n. 5, p. 383-390, 2003.

CHOI, J. H.; CHOI, K. C.; AUERSPER, G. N.; LEUNG, P. C. Gonadotropins up-regulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. **Endocrine-related Cancer**, v.12, n. 2, p. 407-421, 2005.

CHRISTENSON, L.; STOUFFER, R. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre and periovulatory follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 186, n. 2, p. 137-147, 2002.

CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. **Endocrinology**, v. 37, p. 367-374, 1997.

CHRISTENSON, L. K.; STRAUSS, J. F. Steroidogenic acute regulatory protein: An update on its regulation and mechanism of action. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 576–586, 2001.

CIRCOLO, A.; PIERCE, G. F.; KATZ, Y.; STRUNK, R. C. Antiinflammatory effects of polypeptide growth factors. Platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, and fibroblast growth factor inhibit the cytokine-induced expression of the alternative complement pathway activator factor B in human fibroblasts. **Journal of Biology Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 5066-5071, 1990.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p.105-116, 1999.

COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MENEGAZZI, M.; MARIOTTO, S.; GIORDANO, E.; CALDARERA, C. M.; SOGOS, V.; LAURO, G. M.; SUZUKI, H. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26731-26733, 1995.

COLEMAN, A. B. Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 2, p. 85-94, 2003.

CROSS, M. J.; CLAEISSON-WELSH, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 201-207, 2001.

CUNNINGHAM, S. A.; WAXHAM, M. N.; ARRATE, P. M.; BROCK, T. A. Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20254-20257, 1995.

DECHAT, T.; PFLEGHAAR, K.; SENGUPTA, K.; SHIMI, T.; SHUMAKER, D. K.; SOLIMANDO, L.; GOLDMAN, R. D. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. **Genes Development**, v. 1, n. 22, p. 832-853, 2008.

DEL RIO-TSONIS, K.; TROMBLEY, M. T.; MCMAHON, G.; TSONIS, P. A. Regulation of lens regeneration by fibroblast growth factor receptor 1. **Developmental Dynamics**, v. 213, n.1, p.140-146, 1998.

DE ROBERTIS JR., E.; HIB, J.; PONZIO, R.; **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 414p.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 989-991, 1992.

DICKSON, S. E.; FRASER, H. M. Inhibition of early luteal angiogenesis by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment in the primate. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 2339-2344, 2001.

DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; MENDES JR., J. O. B.; ESPER, C. R. Eficiência de dois diferentes produtos hormonais na superovulação de vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p. 319-20, 1999.

DOLDI, N.; BASSAN, M.; MESSA, A.; FERRAI, A. Expression of vascular endothelial growth factor in human luteinizing granulosa cells and its correlation with the response to controlled ovarian hyperstimulation. **Gynecological Endocrinology**, v.11, p. 263–7, 1997.

DORAISWAMTY, V.; KNUTSON, D. L.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 and -2 in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Growth Factors**, v.16, p. 125–133, 1998.

DURBIN, R.; EDDY, S.; KROGH, A.; MITCHISON, G. **Biological sequence analysis**, Cambridge Univ Pr, Cambridge 1998.

ENDO, T.; KITAJIMA, Y.; NISHIKAWA, A.; MANASE, K.; SHIBUYA, M.; KUDO, R. Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1, and Ets-1 in human corpora lutea. **Reproductive Biology**, v. 76, p. 762-767, 2001.

ESWARAKUMAR, V.P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 280, p. 1358–1366, 2001.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 581–611, 2004.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H. P.; GYYEN T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V., HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 4, p. 336-340, 1998.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor: **Endocrinology Reviews**, v. 18, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; HAUKE, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the vascular growth factor family of proteins. **Endocrine Reviews**, v.13, p. 18-32, 1992.

FERREIRA-DIAS G.; MATEUS, L.; SOLA, S.; RAMALHO, R. M.; CASTRO, R. E.; RODRIGUES, C. M. P. Apoptosis in the equine cyclic corpus luteum. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 39, n.4, p. 284, 2005.

FONH, G. H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, p. 66-70, 1995.

FRASER, H. M.; DICKSON, S. E; LUNN, S. F.; WULFF, C.; MORRIS, K. D.; CARROLL, V. A.; BICKENELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, p. 995-1000, 2000.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. **Reproduction**, v.121, p. 355–362, 2001.

FRASER, H. M.; BELL, J.; WILSON, H.; TAYLOR, P. D.; MORGAN, K.; ANDERSON, R. A.; DUNCAN, W. C. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 427–434, 2005.

GABLER, C.; PLATH-GABLER, A.; KILLIAN, G. J.; BERISHA, B.; SCHAMS, 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.

GARRIDO, C.; SAULE, S.; GOSPODAROWICZ, D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. **Growth Factors**, v.8, p.109-117, 1993.

GAY, C. G.; WINKLES, J. A. Interleukin 1 regulates heparin-binding growth factor 2 gene expression in vascular smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 1, p. 296-300, 1991.

GAYTÁN, F.; MORALES, C.; GARCÍA-PARDO, L.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.417-425, 1998.

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 623-8, 1999.

GÓMEZ, R.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 2164-2171, 2002.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 95-114, 1987.

GOSPODAROWICZ, D.; ILL, C. R.; BIRDWELL, C. R. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. **Endocrinology**, v.100, p. 1121–1128, 1977.

GOSPODAROWICZ, D.; RUDLAND, P.; LINDSTROM, J.; BENIRSCHKE, K. Fibroblast growth factor: its localization, purification, mode of action, and physiological significance. **Advances in metabolic disorders**, v. 8, p. 301-335, 1975.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; JABLONKA-SHARIFF, A.; BIONDINI, M. E.; REYNOLDS, L. P. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: Effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 491–500, 1995.

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

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

GREENAWAY, J.; CONNOR, K.; PEDERSEN, H. G.; COOMBER, B. L.; LAMARRE, J.; PETRIK, J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 2896-2905, 2004.

GRIFFIOEN, A. W.; DAMEN, C. A.; BLIJHAM, G. H.; GROENEWEGEN, G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. **Blood**, v. 88, n. 2, p. 667-673, 1996.

GUHANIYOGI, J.; BREWER, G.; Regulation of mRNA stability in mammalian cells **Gene**, v. 7, n. 265, p. 11-23, 2001.

GUO, X. Z.; SU, J. D.; SUN, Q. W.; JIAO, B. H. Expression of estrogen receptor (ER) -alpha and -beta transcripts in the neonatal and adult rat cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulb. **Cell Research**, v.11, n. 4, p. 321-324, 2001.

HAAS, J.; JEFFREY, S.; ARONSON, A.; CHRISTIAN OVERTON, G. **Analogical reasoning for knowledge discovery in a molecular biology database.** 1993.

HANAHAN, D. Oncogenes in transgenic mice. **Nature**, v.6, n. 5994, p. 503-5044, 1984.

HAZZARD, T. M.; CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n.11, p. 993-8, 2000.

HEATH, E.; WEINSTEIN, P.; MERRITT, B.; SHANKS, R.; HIXON J. Effects of prostaglandins on the bovine corpus luteum: granules, lipid inclusions and progesterone secretion. **Biology Reproduction**, v. 29, p. 977-85, 1983.

HERR, D.; KECK, C.; TEMPFER, C.; PIETROWSKI, D. Chorionic gonadotropin regulates the transcript level of VHL, p53, and HIF-2alpha in human granulosa lutein cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 4, p. 397-401, 2004.

HYDER, S. M.; HUANG, J. C.; NAWAZ, Z.; BOETTGER-TONG, H.; MÄKELÄ, S.; CHIAPPETTA, C.; STANCEL, G. M. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. **Environmental Health Perspective**, v. 108, n. 5, p. 785-790, 2000.

INOKI, I.; SHIOMI, T.; HASHIMOTO, G.; ENOMOTO, H.; NAKAMURA, H.; MAKINO, K.; IKEDA, E.; TAKATA, S.; KOBAYASHI, K.; OKADA, Y. Connective tissue growth

factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. **The FASEB journal**, v. 16, n. 2, p. 219-221, 2002.

ISHIKAWA, K.; OHBA, T.; TANAKA, N.; IQBAL, M.; OKAMURA, Y.; OKAMURA, H. Organ-specific production control of vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome-model rats. **Endocrinology Journal**, v. 50, n. 5, p. 515-25, 2003.

ITO, A.; SHINKAI, M.; HAKAMADA, K.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Radiation-inducible TNF-alpha gene expression under stress-inducible promoter gadd 153 for cancer therapy. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 598-601, 2001.

JUENGEL, J. L.; NISWENDER, G. D. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 193-205, 1999.

KACZMAREK, M. M.; KOWALCZYK, A. E.; WACLAWIK, A.; SCHAMS, D.; ZIECIK, J. A. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in the Porcine Corpus Luteum During the Estrous Cycle and Early Pregnancy. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 730-739, 2007.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V. W.; FANG, G. H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995.

KAMAT, B. R.; BROWN, L. F.; MANSEAU, E. J.; SENGHER, D. R.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 157-165, 1995.

KARKKAINEN, M. J.; MAKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. E2-E5, 2002.

KATOH, Y.; KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification on FGF-25. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 767-770, 2005.

KAWATE, N.; TSUJI, M.; TAMADA, H.; INABA, T.; SAWADA, T. Changes of messenger RNAs encoding vascular endothelial growth factor and its receptors

during the development and maintenance of caprine corpora lutea. **Molecular Reproduction Development**, v. 64, n. 2, p. 166-71, 2003.

KAZI, A. A.; JONES, J. M.; KOOS, R. D. Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. **Molecular Endocrinology**, v.19, n. 8, p. 2006-2019, 2005.

KIM, H. S.; NAGALLA, S. R.; OH, Y.; WILSON, E.; ROBERTS JR., C. T.; ROSENFELD, R. G. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 12981-12986, 1997.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v. 53, p. 217, 1991.

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

KOHRAM, H.; TWAGIRAMUNGU, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1175-1186, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LANGE, T.; GUTTMANN-RAVIV, N.; BARUCH, L.; MACHLUF, M.; NEUFELD, G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 17164-17169, 2003.

LEE, A.; CHRISTENSON, L. K.; PATTON, P. E.; BURRY, K. A.; STOUFFER, R. L. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2756-61, 1997.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. **Trends of Biochemical Sciences**, v. 19, n. 11, 459-63, 1994.

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

LIN, X.; BUFF, E. M.; PERRIMON, N.; MICHELSON, A. M. Heparin sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development. **Development**, v. 126, n. 17, p. 3715-23, 1999.

LIU, H. C.; PYRGIOTIS, E.; DAVIS, O.; ROSENWAKS, Z. Active corpus luteum function at pre-, peri- and postimplantation is essential for a viable pregnancy. **Early Pregnancy**, v. 1, p. 281-287, 1995.

LODISH, M. B.; POWELL, A. C.; ABU-ASAB, M.; COCHRAN, C.; LENZ, P.; LIBUTTI, S. K.; PINGPANK, J. F.; TSOKOS, M.; GORDEN, P. Insulinoma and gastrinoma syndromes from a single intrapancreatic neuroendocrine tumor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1123-8, 2008.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1635-1647, 2000.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, n. 1, p. 1-5, 1995.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, nutrition, development, Saskatchewan**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.

MAYBIN, J. A.; DUNCAN, W. C. The human corpus luteum: which cells have progesterone receptors? **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 423-31, 2004.

MCCLURE, N.; HEALY, D.; ROGERS, P. A. W.; SULLIVAN, J.; BEATON, L.; HANING JR., R. V.; CONOLLY, D. T.; ROBERTSON, D. M. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. **The Plancet**, v. 344, p. 235-236, 1994.

MARTINEZ-CHEQUER, J.C.; STOUFFER, R.; HAZZARD, T. M.; PATTON, P. E.; MOLSKNESS, T. A. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor (VEGF)-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1112-1118, 2003.

MEYER, G. T.; BRUCE, N. W.; Structural and functional reserve of steroidogenic membranes in stimulated luteal cells of pregnant rats. **Journal Anatomy**, v. 177, p. 31–40, 1991.

MEYER, M.; CLAUSS, M.; LEPPLE-WIENHUES, A.; WALTENBERGER, J.; AUGUSTIN, H. G.; ZICHE, M.; LANZ, C.; BUTTNER, M.; RZIHA, H.; DEHIO, C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. **The Embo Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 363-374, 1999.

MISRA, A. K.; KASIRAJ, R.; RAO, M. M.; RANGAREDDY, N. S.; JAISWAL, R. S., PANT, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, p. 637-649, 1998.

MIYAMOTO, A.; OKUDA, K.; SCHWEIGERT, F. J.; SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, London, v. 135, n. 1, 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.

MOURA, C. E. B. **Expressão do VEGF do corpo lúteo de búfalos**. 2003.122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NEULEN, J.; YAN, Z.; RACZEK, S.; WEINDEL, K.; KECK, C.; WEICH, H. A.; MARMÉ, D.; BRECKWOLDT, M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Freiburg, v. 80, n. 6, p. 1967-1971, 1995.

NEUVIANS, T. P.; SCHAMS, D.; BERISHA, B.; PFAFFL, M. W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor

in prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.70, p. 473–480, 2004.

NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A. E.; VOLIN, M. V.; GAMELLI, R. L.; DIPIETRO, L. A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, 1998.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 32, n. 2, p. 115-120, 2000.

OEMAR, B. S.; LÜSCHER, T. F. Connective tissue growth factor. Friend or foe? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Zürich, v. 17, n. 8, p. 1483-1489, 1997.

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.

OTANI, N.; MIMARI, S.; YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; OTANI, H.; NISHIYAMA R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. **Journal Clinic Endocrinology**, v. 84, p. 3845–3851, 1999.

PAAVONEN, K.; HORELLI-KUITUNEN, N.; CHILOV, D.; KUKK, E.; PENNANEN, S.; KALLIONIEMI, O.; PAJUSOLA, K.; OLOFSSON, B.; ERIKSSON, U.; JOUKOV, V.; PALOTIE, A.; ALITALO, K. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localized to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. **Circulation**, v. 93, p. 1079-1082, 1996.

PAPA, P.C.; MOURAL, C. E. B. ; ARTONI, L. P.; FÁTIMA, L. A.; CAMPOS, D. B.; MARQUES JR., J. E. B.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, B. M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, 2007.

PARK, J. E.; CHEN, H. H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, 1994.

PARK, J. E.; KELLER, G. A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Molecular biology of the cell**, v. 4, n. p. 12, 1317-1326, 1993.

PATE, J. L. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, Columbus, v. 49, p. 365-377, 1995.

PATE, J. L.; LANDIS KEYES, P. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, Ohio, v. 122, n. 5, p. 665-676, 2001.

PERTOVAARA, L.; SAKSELA, O.; ALITALO, K. Enhanced bFGF gene expression in response to transforming growth factor-beta stimulation of AKR-2B cells. **Growth Factors**, v. 9, n. 1, p. 81-86, 1993.

PETROFF, M. G.; PETROFF, B. K.; PATE, J. L. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. **Reproduction**, Ohio, v. 121, n. 5, p. 753-760, 2001.

PHAN, B.; RAKENIUS, A.; PIETROWSKI, D.; BETTENDORF, H.; KECK, C.; HERR, D. hCG-dependent regulation of angiogenic factors in human granulosa lutein cells. **Molecular reproduction and development**, Freiburg, v. 73, n. 7, p. 878-884, 2006.

PLENDL, J. Angiogenesis and Vascular regression in the ovary. **Antomy Histology Embryology**, v. 29, p. 257-266, 2000.

POLTORAK, Z.; COHEN, T.; SIVAN, R.; KANDELIS, Y.; SPIRA, G.; VLODAVSKY, I.; KESHET, E.; NEUFELD, G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, Israel, v. 272, n. 11, p. 7151-7158, 1997.

PRADO, C. **Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral**. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PRESTA, M.; TIBERIO, L.; RUSNATI, M.; DELL'ERA, P.; RAGNOTTI, G. Basic fibroblast growth factor requires a long-lasting activation of protein kinase C to induce cell proliferation in transformed fetal bovine aortic endothelial cells. **Cell Regulation**, v. 2, n. 9, p. 719-726, 1991.

PUNYADEERA, C.; THIJSSSEN, V. L.; TCHAIKOVSKI, S.; KAMPS, R.; DELVOUX, B.; DUNSELMAN, G. A.; DE GOEIJ, A. F.; GRIFFIOEN, A. W.; GROOTHUIS, P. G. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor ligands and receptors during menstruation and post-menstrual repair of human endometrium. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, n. 6, p. 367-375, 2006.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, v. 13, n. 339, p. 62-66, 2003.

RAVINDRANATH, N.; SRILATHA, N. S.; SAIRAM, M. R.; MOUDGAL, N. R. Ability of deglycosylated human chorionic gonadotropin (dghCG) to block luteal function and establishment of pregnancy in bonnet monkeys (*Macaca radiata*). **Indian journal of experimental biology**, v. 30, n.11, p. 982-986, 1992.

REDMER, D. A.; DAI, Y.; LI, J.; CHARNOCK-JONES, D. S.; SMITH, S. K.; REYNOLDS, L. P.; MOOR, R. M. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. **Journal Reproduction Fertility**, v. 108, n. 1, p. 157-165, 1996.

REDMER, D. A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B. J.; FISHER, K.; JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 879-889, 2001.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002 p.153-160

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, n. 1, p. 497-502, 1988.

REYNOLDS, K.; FARZANEH, F.; COLLINS, W. P.; CAMPBELL, S.; BOURNE, T. H.; LAWTON, F.; MOGHADDAM, A.; HARRIS, A. L.; BICKNELL, R. Association of ovarian malignancy with expression of platelet-derived endothelial cell growth factor **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 16, 1234-1238, 1994.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Growth and development of the corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p.181-191, 1999.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrinology**, v. 12, p. 1-9, 2000.

RIBEIRO, L. A.; BACCI, M. L.; SEREN, E.; TAMANINI, C. Ç.; FORNI, M. Ç. Characterization and differential expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors in swine corpus luteum throughout estrous cycle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 2, p.163-171, 2007.

ROBINSON, C. J.; STRINGER, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. **Journal of Cell Science**, Colchester, v. 114, n. 5, p. 853-865, 2001.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; MANN, G. E.; HUNTER, M. G. A novel physiological culture system that mimics luteal angiogenesis. **Reproduction**, v. 135, n. 3, p. 405-413, 2008.

ROBINSON, R. S.; NICKLIN, L. T.; HAMMOND, A. J.; SCHAMS, D.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor A during the follicle-luteal transition in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 28-36, 2007.

ROY, D. J.; MULLICK, D. N. Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. **Endocrinology**, v. 75, p. 284–287, 1964.

SAHMI, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 190, n. 1, p. 107-115, 2006.

SAKURAI, M.; TADA, A.; SUZUKI, K.; YOSHINO, K.; SUGIHARA, N.; MATSUKUBO, T. Percentile curves for food acceptance response scores in assessing chewing functions in adults. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 46, n. 4, p. 123-134, 2005.

SALLI, U.; BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; TARLETON, B. J.; BRADEN, T. D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 77–83, 1998.

SAWANO, A.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S.; SHIBUYA, M. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 238, n. 2, p. 487-491, 1997.

SCHAMS, D. Growth factors in milk. **Endocrinology Regulation**, v. 28, n. 1, p. 3-8, 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 vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 109, n. 3, p. 155-162, 2001.

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

SENGER, D. R.; CONNOLLY, D. T.; VAN DE WATER, L.; FEDER, J.; DVORAK, H. F. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Research**, v. 50, n. 6, p. 1774-1778, 1990.

SENGER, D. R.; GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; PERRUZZI, C. A. HARVEY', V. S.; DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCHI, T. P.; GERTSENSTEIN M.; WU, X. F.; BREITMAN, M. L. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, London, v. 376, p. 62–66, 1995

SHARKEY, A. M.; DAY, K.; MCPHERSON, A.; MALIK, S.; LICENCE, D.; SMITH, S. K.; CHARNOCK-JONES, D. S. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Cambridge, v. 85, n. 1, p. 402-409, 2000.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SHIBUYIA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human

receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v. 5, p. 519-524, 1990.

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

SHIMIZU, T.; JIANG, J. Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, Aoba-ku, v. 67, n. 6, p. 1846-1852, 2002.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 2235-2243, 1993.

SHUMAKER, D. K.; KUCZMARSKI, E. R.; GOLDMAN, R. D. The nucleus: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 358-366, 2003.

SLEE, R. B.; HILLIER, S. G.; LARGUE, P.; HARLOW, C. R.; MIELE, G.; CLINTON, M. Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. **Endocrinology**, Edinburgh, v. 142, n. 3, p. 1082-1089, 2001.

SLEEMAN, M.; FRASER, J.; MCDONALD, M.; YUAN, S.; WHITE, D.; GRANDISON, P.; KUMBLE, K.; WATSON, J. D.; MURISON, J. G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. **Gene**, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 171-182, 2001.

SMITH, C. J.; RICHARDS, J. S.; YASIN, K.; SANGSTER, J. N.; SRIDARAN, R. Changes in rat luteal ultrastructure and P450_{scc} mRNA and protein content after in vivo treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 2, p. 382-391, 1991.

SONE, H.; OKUDA, Y.; KAWAKAMI, Y.; HANATANI, M.; SUZUKI, H.; KOZAWA, T.; HONMURA, S.; YAMASHITA, K. Vascular endothelial growth factor level in aqueous humor of diabetic patients with rubeotic glaucoma is markedly elevated. **Diabetes Care**, v. 19, n. 11, p. 1306-1307, 1996.

SONGSASEN, N.; YIENGVISAVAKUL, V.; BUNTARACHA, B.; PHAREE, S.; APIMETEETUMRONG, M.; SUKWONGS, Y. Effect of treatment with recombinant

bovine somatotropin on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 377-384, 1999.

STAUBER, D. J.; DIGABRIELE, A. D.; HENDRICKSON, W. A. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 49-54, 1999.

STAVRI, G. T.; ZACHARY, I. C.; BASKERVILLE, P. A.; MARTIN, J. F.; ERUSALIMSKY, J. D. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. **Circulation**, v. 92, n. 1, p. 11-14, 1995.

STOUFFER, R. L.; MARTINEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A.; XU, F.; HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 567-575, 2001.

SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE, U. M.; KATO, H. Expression of factor of growth of vascular endothelial and your receivers in the luteum of human body during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 85, p. 3919-3924, 2000.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, Japan, v. 280, p. 2126–2131, 2005.

SUZUKI T.; SASANO H.; TAKAYA R.; FUKYAY T.; YAJIMA A.; NAGURA H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. **Human Reproduction**, v. 13, p. 953-959, 1998.

TANIGUCHI, H.; YOKOMIZO, Y.; OKUDA, K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Okayama, v. 66, n. 3, p. 754-759, 2002.

TAYLOR, M. J.; CLARK, C. Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. **Endocrinology**, v. 130, p. 1951–1956, 1992.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. **Biochemical**

And Biophysical Research Communications, New York, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

TESONE, M.; STOUFFER, R. L.; BORMAN, S. M.; HENNEBOLD, J. D.; MOLSKNESS, T. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the monkey corpus luteum during the menstrual cycle: isoform-selective messenger RNA expression in vivo and hypoxia-regulated protein secretion in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 927-934, 2005.

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.

VONNAHME, K. A.; REDMER, D. A.; BOROWCZYK, E.; BILSKI, J. J.; LUTHER, J. S.; JOHNSON, M. L.; REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F₂α-induced regression in sheep. **Reproduction**, v. 131, n. 6, p. 1115-1126, 2006.

WANDJI, S. A.; GADSBY, J. E.; BARBER, J. A.; HAMMOND, J. M. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. **Endocrinology**, Pennsylvania, v. 141, n. 7, p. 2648-2657, 2000.

WULFF, C.; WILSON, H.; LARGUE, P.; DUNCAN, W. C.; ARMSTRONG, D. G.; FRASER, H. M. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 4302–4309, 2000.

WULFF, C.; WILSON, H.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; LUNN, S. F.; FRASER, H. M. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with vascular endothelial growth factor trap(A40). **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 86, p. 3377–3386, 2001.

YAMASHITA, H.; KAMADA, D.; SHIRASUNA, K.; MOTOZUMI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 9, p. 1449-1456, 2008.

YAMAZAKI, Y.; TOKUNAGA, Y.; TAKANI, K.; MORITA, T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. **Biochemistry**, Japan, v. 44, p. 8858–8864, 2005.

YOSHIDA, A.; ADAMD-APTE, B.; ZELTER, B. R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. **Growth Factors**, v. 3, n. 1-2, p. 57-56, 1996.

ZHANG, B.; YAN, L.; TSANG, P. C.; MOSES, M. A. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and regulation by tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) in the bovine corpus luteum. **Molecular reproduction and development**, v. 70, n. 2, p. 122-132, 2005.

ZHANG, X.; STAPPERNBECK, T. S.; WHITE, A. C. ; LAVINE, K. J.; GORDON, J.; ORNITZ, D. M. Reciprocal epithelial-mesenchymal fgf signaling is required for cecal development. **Development**, v. 133, n. 1, p. 173-180, 2006.

ZHENG, J.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1177–1189, 1991.