

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CÉLULAS BINUCLEADAS TROFOBLÁSTICAS: EFEITO
DOS SEUS PRODUTOS DE SECREÇÃO NA PRODUÇÃO
DE PROSTAGLANDINA F2 α E AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE LACTOGÊNIO
PLACENTÁRIO E FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTÉLIO
VASCULAR EM PLACENTAS BOVINAS**

Lorivaldo Paz Landim Junior

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2006**

L257c Landim Jr., Lorivaldo Paz
Células Binucleadas Trofoblásticas: efeito dos seus produtos de secreção na produção de Prostaglandina F2 α e avaliação da expressão gênica relativa de Lactogênio Placentário e Fator de Crescimento Endotélio Vascular em placentas bovinas / Lorivaldo Paz Landim Junior. -- Jaboticabal, 2006
xix, 80 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: Maria Angélica Miglino, Paula de Carvalho Papa, César Roberto Esper, Vera Fernanda M. Hossepian de Lima
Bibliografia

1. Reprodução Animal. 2. Placenta. 3. Células Binucleadas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CÉLULAS BINUCLEADAS TROFOBLÁSTICAS: EFEITO DOS SEUS PRODUTOS DE SECREÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA F_{2α} E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO E FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTÉLIO VASCULAR EM PLACENTAS BOVINAS


AUTOR: LORIVALDO PAZ LANDIM JÚNIOR


ORIENTADOR: Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA (REPRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora:


Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

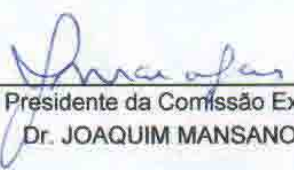

Dra. MARIA ANGÉLICA MIGLINO


Dra. PAULA DE CARVALHO PAPA


Dr. CESAR ROBERTO ESPER


Dra. VERA FERNANDA M. H. DE LIMA

Data da realização: 27 de janeiro de 2006.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

DADOS CURRICULARES

LORIVALDO PAZ LANDIM JUNIOR - nascido em Jales – SP, aos 10 dias do mês de Julho de 1976; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em fevereiro de 1994; participou do Programa Especial de Treinamento – Grupo PET/CAPES, de agosto de 1995 a março de 1998; concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em janeiro de 1999; trabalhou como médico veterinário residente na Faz. Cravinhos (Cravinhos – SP) no período de dezembro 1998 a março de 1999; trabalhou como agente de desenvolvimento junto ao projeto SAI (Sistema Agroindustrial Integrado) – convênio SEBRAE-SP e CATI - no período de maio de 1999 a janeiro de 2000, na região de São José do Rio Preto - SP; Adquiriu o título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em fevereiro de 2002. Ingressou o curso de doutorado em março de 2002, junto ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

EPÍGRAFE

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

(Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

Trilhar caminhos, criar jornadas, traduzir uma vida ...
Assim começa, apenas, parte de uma história.

Aos responsáveis pelo início desta história, meus pais **Lorivaldo** e **Maria José**, que hoje e sempre serão os guias deste caminho, desta jornada, desta vida...

Aos meus irmãos, **Manoel** e **Christina**, co-autores de tantas histórias e tantos exemplos.

Aos meus sobrinhos **Felipe**, **Luíza** e **Beatriz**, os novos personagens, fonte para novas histórias, à quem quero ser também um exemplo em suas vidas.

À minha namorada **Rubia**, que já é parte desta história e trilha um caminho, jornada e vida em comum...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A razão fundamental da vida pode ser resumida ao agradecimento, por isso, inicialmente agradeço a Deus por esta oportunidade, uma grande dádiva...

Como poderei traduzir todos os meus sentimentos em palavras? Mesmo assim ainda seriam insuficientes para expressar minha gratidão, meu amor e a tudo que meus pais, **Lorivaldo** e **Maria José**, proporcionaram para nos orgulharmos desta conquista. Seria egoísta mencionar que este momento representa apenas meu mérito. Se hoje tenho conquistas é porque em toda minha vida tive vocês ao meu lado, aprendendo sempre com suas palavras e ações, por mais simples que possam pensar... mas com um grande significado, orgulho e honra.

Com o mesmo amor e gratidão, agradeço aos meus irmãos **Manoel** e **Christina** e meus sobrinhos **Felipe**, **Luiza** e **Beatriz** por todo incentivo, ajuda e esperança depositados, fazendo com que minha dedicação fosse renovada a cada dia.

O limite das palavras tornam-se, também, insuficientes para revelar ou traduzir meus sentimentos e minha gratidão à minha namorada **Rubia**, que com paciência, carinho, amor e cumplicidade representaram e representam a vontade em prosseguir, viver o presente e o otimismo do futuro.

Aos meus orientadores, professores **Maria Angélica** e **Joaquim**, que ao longo deste anos dispuseram-se a este “desafio”, sem limites ao conhecimento, dedicação e companheirismo.

Ao professor **Mario Binelli** por dispor o laboratório para os experimentos com radioimuno ensaio e pelo exemplo de determinação, dinamismo e conhecimento.

Ao professor **Flávio Meirelles** por dispor o laboratório para os experimentos em biologia molecular e por todo conhecimento oferecido.

Ao professor **João Pizauro** pela amizade e auxílio dispensados.

A todos os professores, funcionários e estagiários do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal.

À minha segunda e grande família de amigos de Jaboticabal; Anderson, Maricy, Ricardo, Carol, Juan, Celina, Guilherme, Serginho, Tiago, Fernanda Santiago, Fernando Garcia, Carlos Larsson Jr., Alexandre Barreto, Walt, Luciana, Gabriela, Denise, Fernanda Velasque, Taiana, Rodrigo, Diogo e a todos que, ao longo destes 12 anos desde a graduação, me acolheram e dividiram bons momentos.

Aos novos e velhos amigos da Reprodução Animal, Alessandra, Alexandre Wolf, Ana Paula, André Buck, Andréa, Antônio, Cassiana, Christina, Danilas, Edson, Eliana, Érika, Éric, Felipe, Gabriel, Gerson, Giovana, Juliana, Kleber, Letícia, Mabel, Marcelo, Max, Naiara, Sandra, Sara, Simone, Tânia, Tatiane, Viviane.

Aos amigos de Pirassununga Cláudia Bertan, Felipe Braga, Fernando Biase, Giovana, Isabele, Lígia, Patrícia, Raquel, Sylvia e Vanessa Marques.

Aos amigos do Judô, pela amizade, companheirismo e paciência, trazendo o princípio de “Jita-Kyoei” (bem estar e benefícios mútuos). “Domo Arigato”!

Aos “melhores amigos” Tank, Tibi, Raiska e Dunga.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº 02/02107-2, no período de Abril de 2002 a Janeiro de 2006.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Considerações sobre a Célula Binucleada Trofoblástica (BNC)	04
2.2 Considerações sobre a Célula Endometrial Bovina (BEND)	11
2.3 Falhas na manutenção da gestação	13
2.3.1 Considerações gerais	13
2.3.2 Influências do reconhecimento materno da gestação	14
2.3.3 Influências placentárias	18
2.4 Considerações sobre vascularização placentária e VEGF	21
2.5 Considerações sobre LP bovino	25
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Avaliação da expressão gênica relativa (frequência de RNAm) de LP e VEGF em placentas	31
4.1.1 Amostras	31
4.1.2 Extração do RNA total	32
4.1.3 Síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT-PCR)	32
4.1.4 Caracterização da expressão dos genes com PCR em tempo real	33
4.1.4.1 Análise estatística	34
4.2 Radioimunoensaio para dosagem de PGF2 α em meio de cultura	34
4.2.1 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Determinação da reta padrão e cálculo das eficiências das reações ...	36

5.1.1	Reta padrão e eficiência do VEGF	36
5.1.2	Retas padrão e eficiências do GAPDH e VEGF	37
5.1.3	Validação dos experimentos para cálculo da expressão relativa	38
5.1.4	Apresentação dos valores de C_t s das amostras analisadas	39
5.1.5	Expressão relativa de LP e VEGF nas placentas de animais FIV e TN	40
5.2	Dosagem de $PGF2\alpha$ em meio de cultura condicionado	42
6.	DISCUSSÃO	45
6.1	Expressão gênica relativa de VEGF em placentas	45
6.2	Expressão gênica relativa de LP em placentas	46
6.3	Efeito dos produtos secretados pelas BNCs na produção de $PGF2\alpha$ pelas células BEND.....	49
7.	CONCLUSÕES	52
8.	REFERÊNCIAS	53
9.	APÊNDICES	74
Apêndice 1	– Extração de RNA total de tecidos	74
Apêndice 2	– Técnica de radioimunoensaio para dosagem de $PGF2\alpha$ em meio de cultura	76
Apêndice 3	– Descrição dos primers e sondas utilizados para estudo da expressão gênica relativa pelo sistema TaqMan [®] de detecção	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

BNC – células binucleadas trofoblásticas (binucleate trophoblast cells)

bp – pares de base

BEND – célula endometrial bovina (bovine endometrial cells)

CL – corpo lúteo

CN – controle negativo

COX-2 – ciclooxigenase-2

C_t – Ponto de cruzamento na curva de amplificação pela linha de “threshold” (linha arbitrária situada na fase exponencial de amplificação)

DAG – diacil glicerol

DEPC – dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DPM – desintegrações por minuto

cDNA – DNA complementar

E₂ – estradiol

FIV – fecundação *in vitro*

FGFB-2 – fator B-2 de crescimento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor B-2)

Flt-1 – Tirosina quinase 1 semelhante ao Fms (Fms-like tyrosine kinase-1)

GAPDH – gliceraldeído fosfato desidrogenase

GH – hormônio somatotrópico (Growth Hormone)

GHR – receptor de somatotropina (Growth hormone Receptor)

rbGH – hormônio somatotrópico bovino recombinante (recombinant bovine Growth Hormone)

H₂O – água

IA – Inseminação Artificial

IFN τ - Interferon-tau

bIFN τ - Interferon-tau bovino

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Insulin-like Growth Factor-1)

kDa – kilo Dalton

KDR – receptor contendo domínio de kinase inserido (Kinase insert Domain containing Receptor)

LP – lactogênio placentário

bLP – lactogênio placentário bovino

oLP – lactogênio placentário ovino

mg – miligrama

ng – nanograma

μ g – micrograma

pg – picograma

mL – mililitro

μ L - microlitro

mM – milimolar

μ M – micromolar

μ m – micrômetro

MCSS – Meio Completo Sem Soro

MHC-1 – complexo maior de histocompatibilidade-1 (Major Histocompatibility Complex)

MN – monta natural

P₄ – progesterona

PAG – glicoproteínas associadas à gestação (pregnancy-associated glycoproteins)

bPAG – PAG bovina

PCR – reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

RIE – radioimunoensaio

RT-PCR – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

PDBu – forbol 12,13 dibutirato

PGE2 – prostaglandina E2

PGF2 α - prostaglandina F2 alfa

PIV – produção *in vitro*

PPAR γ - Receptor-gama do proliferador ativado de peroxissoma (peroxisome proliferator-activated receptor-gama)

PRL – prolactina

PRLR – receptor de prolactina (Prolactin receptor)

PRP – proteína relacionada à prolactina (Prolactin-related protein)

q.s.p – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

TE – Transferência de Embriões

TN – transferência nuclear

VEGF– fator de crescimento endotélio vascular (vascular endothelial growth factor)

VEGFR – receptor de VEGF

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema da migração da célula binucleada trofoblástica em direção ao epitélio uterino e respectiva fusão	07
Figura 2. Esquema da divisão nuclear da célula binucleada trofoblástica e sua migração em direção ao epitélio uterino	09
Figura 3. Disposição dos tratamentos na placa de cultivo de células BEND .	35
Figura 4. Curva de amplificação em PCR tempo real correspondente ao gene codificador de VEGF em três diferentes diluições	36
Figura 5. Curva de regressão correspondente à amplificação do VEGF em três diferentes diluições (1; 0,1 e 0,01), apresentando uma inclinação absoluta de 3,23	37
Figura 6. Curva de amplificação em PCR tempo real correspondente ao gene codificador de GAPDH (curva azul) e LP (curva verde) em três diferentes diluições	37
Figura 7. Curva de regressão correspondente à amplificação do GAPDH (azul) e LP (verde) em três diferentes diluições (1; 0,1 e 0,01), apresentando as inclinações absolutas de 3,58 e 3,45, respectivamente para GAPDH e LP	38
Figura 8 A e B. Representação esquemática das regressões logarítmicas das diferenças entre $C_{t_{LP}} - C_{t_{GAPDH}}$ (ΔC_t LP) e $C_{t_{VEGF}} - C_{t_{GAPDH}}$ (ΔC_t VEGF) em função da diluição da amostra, indicando os valores absolutos de inclinação da reta $<0,1$ (0,04 para LP e 0,02 para VEGF)	39

- Figura 9.** Expressão de VEGF nas placentas de animais TN ($-1,415; \pm 1,03$) e FIV ($-0,720; \pm 1,28$), em relação às placentas de animais MN ($p > 0,05$) 41
- Figura 10.** Expressão de LP nas placentas de animais FIV ($-3,182; \pm 0,20$) e TN ($0,111; \pm 0,50$), em relação às placentas de animais MN ($p > 0,05$) 41
- Figura 11.** Representação esquemática da produção de $\text{PGF}_2\alpha$ de acordo com os diferentes meios de cultura (condicionado ou puro), sob a presença ou ausência de PDBu, em três diferentes diluições (1:25, 1:50 e 1:100) 44

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Apresentação dos valores de Cts para cada um dos genes em suas diferentes diluições, bem como a diferença entre gene-alvo e controle endógeno (ΔC_t)	38
Tabela 2. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de MN (grupo controle).....	40
Tabela 3. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de FIV	40
Tabela 4. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de TN	40
Tabela 5. Produção média de $PGF2\alpha$ (pg/mL) pelas células BEND mediante a presença de meio de cultura exposto às BNCs (condicionado) durante 15 dias de cultivo, em diferentes diluições, ou somente meio de cultura (DMEM 10%SFB, não condicionado), na presença de estimulador (PDBu) ou ausência (\emptyset)	43

**CÉLULAS BINUCLEADAS TROFOBLÁSTICAS: EFEITO DOS SEUS
PRODUTOS DE SECREÇÃO NA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA F2 α E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE LACTOGÊNIO
PLACENTÁRIO E FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTÉLIO VASCULAR EM
PLACENTAS BOVINAS**

RESUMO - Devido às elevadas perdas gestacionais verificadas nas fases embrionária e fetal, principalmente em animais produzidos *in vitro* (TN e/ou FIV), o presente trabalho avaliou, por RIE, a participação dos produtos secretados pelas BNCs na síntese *in vitro* de PGF2 α pelas células BEND e constatou que o meio condicionado, na presença de PDBu, determinou o aumento da produção de PGF2 α (de 435,84^a para 1323,94^b pg/mL; p<0,05), mas não na ausência de PDBu (19,01^a; 15,08^a; 16,83^a e 23,10^a pg/mL; respectivamente para MCSS; 1:25; 1:50 e 1:100; p<0,05), indicando a participação destes produtos na modulação da síntese de PGF2 α , provavelmente na etapa da enzima PKC. A expressão gênica relativa de LP e VEGF foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real, em placentas de animais TN e FIV, comparados a animais MN e, embora haja uma tendência de “down-regulation” para o VEGF (-1,41^a e -0,72^a; respectivamente para TN e FIV, p<0,05) não se verificou diferença na expressão entre os grupos. Quanto ao LP, também não foi verificada diferença na sua expressão, embora haja uma tendência numérica de “up-regulation” em TN (+0,11) e “down-regulation” em FIV (-3,18). Estes dados confirmam a capacidade de modulação de síntese de PGF2 α pela BNC, bem como a não diferença na expressão gênica relativa de VEGF e LP em placentas de animais TN e FIV, quando comparados à MN.

Palavras-chave: bovino, placenta, VEGF, LP, PGF2 α , expressão gênica

**TROPHOBLAST BINUCLEATE CELLS: EFFECT OF THEIR SECRETION
PRODUCTS ON PGF2 α PRODUCTION AND RELATIVE GENE EXPRESSION
OF PLACENTAL LACTOGEN AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH
FACTOR FROM BOVINE PLACENTOMES**

SUMARY - Due to the high pregnancy failures during foetal and embryo stages, mainly in *in vitro* produced-animals (by NT and/or IVF), this work evaluated the BNCs products on *in vitro* PGF2 α synthesis, by RIA, from BEND cells and showed that the conditioned medium, with PDBu, increased the PGF2 α synthesis (from 435.84^a to 1323.94^bpg/mL, p<0.05), but not without PDBu (19.01^a; 15.08^a; 16.83^a and 23.10^a pg/mL; respectively to MCSS; 1:25; 1:50 and 1:100; p<0.05), showing the function of these cellular products on PGF2 α synthesis modulation, probably at PKC level. The PL and VEGF relative gene expression were evaluated, by Real Time PCR, in NT and IVF placentas, compared to AI placentas and, although there was a tendency for VEGF to be down-regulated (-1,41^a and -0,72^a; respectively to TN and IVF, p<0,05), no differences between groups were observed. In relation to LP gene expression, although there was a tendency for up-regulation in NT group (+0.11) and down-regulation in IVF (-3.18), no statistical differences were shown also. These data shown the modulation capacity on PGF2 α synthesis by BNC, as well the no differences on relative gene expression of VEGF and PL in NT and FIV placentas, when compared to IA placentas.

Key words: bovine, placenta, VEGF, PL, PGF2 α , gene expression.

1. INTRODUÇÃO

As estatísticas confirmam um crescimento da população mundial, e com isso, uma maior necessidade de aquisição de nutrientes (FAO, 2003). Neste aspecto, os bovinos ainda são mundialmente considerados como a maior fonte de proteína animal à população. Baseando-se nestas informações, estudos contínuos são elaborados com objetivo de melhoria dos índices reprodutivos, e consequentemente, produtivos.

O estudo reprodutivo apresenta ferramentas de avaliação dos processos modulados na interação concepto e organismo materno, influenciado tanto por fatores externos, como internos (ambiente uterino, fatores endócrinos, comunicação materno-fetal).

Para manutenção da gestação, considerando-se desde o momento da fecundação, alguns requisitos são necessários como competência da unidade uterina, competência da unidade embrionária e sincronia entre estas unidades. É sabido que uma grande porcentagem de embriões é perdida entre os dias 8 e 16 da gestação, representado pelo período de alongação do concepto e reconhecimento materno da gestação, associado à manutenção do Corpo Lúteo (CL) (DISKIN & SREENAN, 1980).

Entende-se por reconhecimento materno da gestação como a interação endócrina, bioquímica e molecular entre o concepto e o tecido uterino levando à manutenção do CL, garantindo concentrações ótimas de progesterona na circulação sanguínea para manutenção da gestação (mecanismos que inibem a luteólise para garantia das concentrações plasmáticas de progesterona até a complementação da placenta como fonte produtora adicional deste hormônio) (HANSEN, 1991).

Em ruminantes, o diálogo materno-fetal é realizado pelo Interferon-tau (IFN τ), produzido pelas células do trofoblasto, que interage com as células endometriais bloqueando a síntese e liberação de Prostaglandina F 2α (PGF 2α)

que atua no evento da luteólise. Falhas de uma comunicação apropriada entre concepto e útero podem levar à interrupção da gestação (THATCHER *et al.*, 1997).

Os mecanismos de atuação do IFN τ sobre as células endometriais e a inibição da síntese e liberação de PGF2 α são amplamente descritos, bem como as interações enzimáticas e respostas celulares do processo de antiluteólise, regidas pelo IFN τ . No início da gestação, ao redor dos dias 15 a 18, células do epitélio trofoblástico secretam IFN τ que se liga a receptores de células endometriais e promovem um mecanismo de inibição de produção de PGF2 α (BINELLI *et al.*, 2000b; THATCHER *et al.*, 2002). Após este curto período de atuação do IFN τ , os mecanismos que promovem a manutenção do CL e inibição da síntese de PGF2 α até a complementação da placenta como fonte produtora de progesterona ainda não estão totalmente elucidados, havendo portanto, a necessidade de maiores estudos para compreensão destes fenômenos.

A partir do conceito sobre diálogo materno-fetal, as células trofoblásticas representam a principal unidade de interação com o organismo materno. Dentre as linhagens de células trofoblásticas, destaca-se em ruminantes a Célula Binucleada Trofoblástica (BNC) que se origina a partir de uma célula uninucleada pelo mecanismo de endoduplicação, ou seja, realiza uma cariocinese, sem a ocorrência de uma citocinese (KLISCH, 1999; 2000). A Célula Binucleada, que pode ser observada a partir do 17º dia da gestação, migra em direção ao epitélio uterino (endométrio) e se funde formando células trinucleadas, conferindo à placenta dos ruminantes a classificação de sinepiteliocorial (WOODING, 1992).

Dentre as funções da BNC, destaca-se a produção de lactogênio placentário, glicoproteínas associadas à gestação (PAGs), progesterona, estrógeno e modulação na síntese de prostanóides (prostaglandinas e prostaciclina); amplificados devido à condição binucleada desta célula. Por estar em íntimo contato com o estroma uterino, seus produtos de secreção são facilmente liberados próximos aos vasos sanguíneos maternos.

Devido às características fisiológicas e morfológicas da Célula Binucleada Trofoblástica, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a participação dos seus produtos de secreção, obtidos em culturas enriquecidas com BNCs, para compreensão dos fenômenos de antiluteólise após o período de atuação do IFN τ .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre a Célula Binucleada Trofoblástica (BNC)

As Células Binucleadas Trofoblásticas (BNCs) são encontradas no trofoblasto da placenta de ruminantes desde o período de adesão do concepto ao epitélio uterino até os momentos que precedem o parto (GREENSTEIN *et al.*, 1958; BJÖRKMAN, 1968; WOODING, 1982) possuindo como precursores as células trofoblásticas uninucleadas (BJÖRKMAN, 1982; WOODING, 1982) que realizam um mecanismo de endoduplicação, ou seja, realiza cariocinese sem a ocorrência de citocinese (BJÖRKMAN, 1982), sendo que o acréscimo no número destas células ocorre, provavelmente, pelo contínuo recrutamento e transformação de células trofoblásticas uninucleadas (WINSATT *et al.*, 1980). A significância funcional desta multiplicação de genomas está ligada a um aumento da capacidade de síntese, causada por um adicional número de genes copiados, disponíveis para transcrição (KLISCH *et al.*, 1999; 2000).

Em bovinos, as células binucleadas surgem no epitélio coriônico aos 17 dias de gestação e permanecem até o final (GREENSTEIN *et al.*, 1958, BJÖRKMAN, 1968), circundadas por células uninucleadas, sem haver união à membrana basal, com um número aparentemente estável ao longo da gestação, representando cerca de 15 a 20% do total de células do epitélio coriônico (WOODING & WATHES, 1980; WOODING, 1992).

Segundo Flood (1991) as células binucleadas constituem, em bovinos, aproximadamente 10% das células trofoblásticas nos dias 18-20 da gestação e 20% no restante da gestação. Somente 20% destas células possuem capacidade de migração. Após a migração, estas células podem ser observadas no epitélio uterino, onde realizam fusões com as células epiteliais, formando as células multinucleadas gigantes que correspondem a 50% da área do epitélio materno, no 24º dia da gestação. Estes eventos são similares nas ovelhas, mas, nas vacas, a atividade mitótica e o produto residual das células maternas são menores,

ocorrendo total reconstituição do epitélio uterino, na migração deixado pela célula trofoblástica.

Winsatt (1980) descreveu a formação das células binucleadas a partir das células do trofoblasto no 17º dia de gestação. As células binucleadas jovens estão habitualmente situadas intimamente no trofoblasto. A divisão nuclear ocorre sem a necessidade de divisão do citoplasma, o que determina a condição binucleada (diplocariócito) ou multinucleada. Esta divisão nuclear é finalizada por mitose. A divisão citoplasmática nunca ocorre nas células gigantes, mostrando sua incapacidade de proliferação.

Em várias espécies de ruminantes, tais como ovinos, caprinos, bovinos e cervídeos, as células binucleadas são encontradas e a sua origem se procede a partir de células uninucleadas do trofoectoderma fetal. Inicialmente estão presentes em número reduzido, no entanto, detêm um denso volume citoplasmático, um pequeno número de mitocôndrias, muitos polirribossomos e um extenso sistema de cisternas de retículo endoplasmático, algumas vezes apresentam grande número de aparelhos de Golgi, sendo, este último, responsável pela grande quantidade de grânulos característicos que variam de densidade quando observadas após fixação e coloração convencionais, cada qual contendo microvesículas. As células binucleadas maduras apresentam-se completamente granuladas e aumentam o seu volume citoplasmático, encontrando-se próximas da superfície do epitélio uninuclear trofoectodérmico, embora não façam parte desta junção compacta do epitélio. Muitas vezes esta é a primeira barreira de migração para as células binucleadas. A segunda barreira é o tecido de interdigitação com o epitélio trofoectodérmico que forma a junção microvilar. Este tecido é, inicialmente, o epitélio uterino materno, mas consideravelmente modificado, incluindo a transformação para sincício durante a implantação e desenvolvimento placentário em todos os ruminantes (WOODING, 1982).

Assim como Winsatt (1980), Dantzer (1989) também descreveu a ocorrência das células binucleadas a partir do 17º dia de gestação, na qual estas

células representam cerca de 20% das células trofoblásticas, havendo um decréscimo nas semanas que precedem o parto. Apresentam-se de forma diferenciada, volumosas, com 2 núcleos esféricos e nucléolos bem evidentes. O aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso estão bem desenvolvidos e uma agregação regional de grânulos é característica. Os hormônios sintetizados pelas células binucleadas são secretados nos capilares maternos. Os hormônios identificados incluem lactogênio placentário, estrógeno (MATAMOROS *et al.*, 1994), progesterona e prostanoídes, como prostaciclina e prostaglandinas (REIMERS *et al.* 1985; GROSS & WILLIAMS, 1988).

Estimativas de frequência das células binucleadas e sua migração indicaram que muitas, se não todas, migram e estas evidências foram confirmadas usando técnicas de auto-radiografia e imunocitoquímica. O resultado desta migração é a fusão de uma célula binucleada com uma célula do epitélio uterino ou da parede sincicial. Esta fusão libera os grânulos característicos das células binucleadas próximas à circulação materna, enquanto mantêm a barreira trofoblástica de troca materno-fetal. As células binucleadas de ruminantes parecem representar um papel central, formando estruturas e secretando produtos na interface materno-fetal que pode ser crucial no estabelecimento e manutenção da gestação (MORAIS-PINTO, 2000).

Estudos com a inclusão nuclear de timidina tritiada demonstram claramente que a maioria dos núcleos do sincício é derivada da migração das células binucleadas do trofoectoderma. A uniformidade e extensão da produção e migração das células binucleadas, indicam um papel central no desenvolvimento e função da placenta dos ruminantes. O número de células binucleadas começa a diminuir somente nas últimas semanas da gestação (WOODING *et al.*, 1993).

A formação e migração das células binucleadas foi descrita por Wooding & Wathes (1980), na qual a célula binucleada é formada no córion e sintetiza grânulos; em seguida move-se e entra em contato com a junção microvilar e altera as junções laterais do epitélio uterino até alcançar a membrana basal do epitélio uterino (Figura 1). A maioria das células binucleadas é encontrada no epitélio

uterino, os grânulos são liberados no espaço intercelular, junto aos vasos maternos ou diretamente no interior de células uterinas adjacentes. Em uma fase posterior ocorre a redução do citoplasma da célula binucleada, apresentação de núcleos densos e diminuição do número de grânulos. Em uma progressão, os núcleos tornam-se altamente densos ou picnóticos e a célula desprende-se, retornando novamente à junção microvilar.

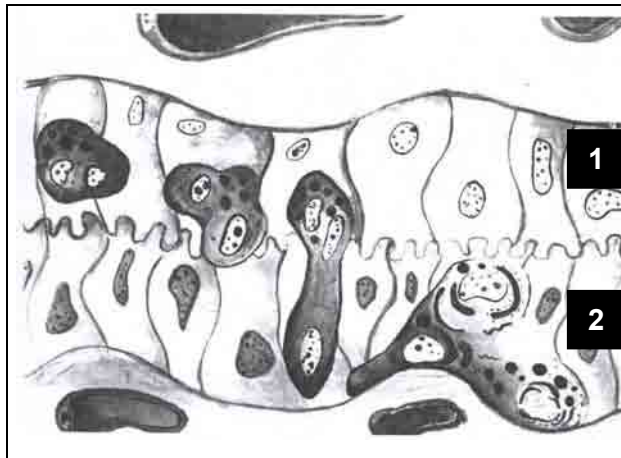


Figura 1. Esquema da migração da célula binucleada trofoblástica em direção ao epitélio uterino e respectiva fusão; 1. epitélio trofoblástico, 2. epitélio uterino. (Adaptado de MORAIS-PINTO, 2000).

Visto que as células binucleadas não aparecem no epitélio uterino até o período tardio de pré-implantação (ao redor do 17º dia de gestação), torna-se evidente que elas sejam originadas inicialmente da transformação direta de células trofoblásticas colunares ordinárias. Novas células gigantes continuam a se formar desta maneira por toda a gestação. As células binucleadas se diferenciam dentro do trofoectoderma fetal, iniciam com um pequeno volume citoplasmático, poucas mitocôndrias, muitos polirribossomos e um extenso sistema de cisternas de retículo endoplasmático desenvolvendo-se junto com o aparelho de Golgi, produzindo grânulos característicos com densidade variada. As células binucleadas maduras e totalmente repletas de granulações chegam a um tamanho considerável e permanecem muito próximas ao topo do epitélio trofoectodérmico

uninucleado, normalmente não fazendo parte da junção apical que mantém estas células unidas (MORAIS-PINTO, 2000).

Com respeito à caracterização morfológica e cinética da célula binucleada trofoblástica, estudos realizados por Winsat *et al.* (1980) verificaram a polarização das células, observando figuras de mitose, embora o verdadeiro significado da multiplicação nuclear em relação à sua fisiologia, não tenha sido ainda convincentemente analisada. Neste processo parece haver a divisão nuclear sem a divisão citoplasmática, tornando a célula bi ou multinucleada. O acréscimo no número destas células ocorre provavelmente pela contínua transformação do trofoblasto em células gigantes. O aparelho de Golgi, nas células binucleadas trofoblásticas, está situado em regiões adjacentes dos núcleos, estando sempre rodeado por vacúolos que parecem conter material precipitado em seu interior que se cora tanto por corantes ácidos, quanto por básicos. No entanto, devido a basofilia ser neutralizada pela ribonuclease, acredita-se que contenha ácido ribonucléico. O material destes grânulos também se cora pelo ácido periódico e apresenta evidências de atividade fosfatase alcalina. As mitocôndrias apresentam-se uniformemente granulares, geralmente segregadas no citoplasma supranuclear (CARVALHO, 2000).

A determinação do nível de ploidia por hibridização *in situ* com uma prova de DNA específico utilizando-se um cromossomo Y, mostrou que a maioria dos núcleos das células fetais (bovinas) são tetraplóides. Geralmente os dois núcleos tetraplóides estão sempre juntos. Estes achados indicam que a poliploidização é um aspecto normal no desenvolvimento da maioria das células binucleadas. Um novo modelo para o desenvolvimento destas células foi proposto: primeiramente ocorre uma mitose acitocinética que origina as células binucleadas com dois núcleos diplóides; esta célula entra em uma segunda mitose acitocinética na qual os cromossomos dos dois núcleos formam uma figura de mitose comum. O resultado é uma célula com dois núcleos tetraplóides, que passam por uma fase "S" adicional, mas não entram em uma nova mitose (KLISCH *et al.*, 1999, 2000) (Figura 2).

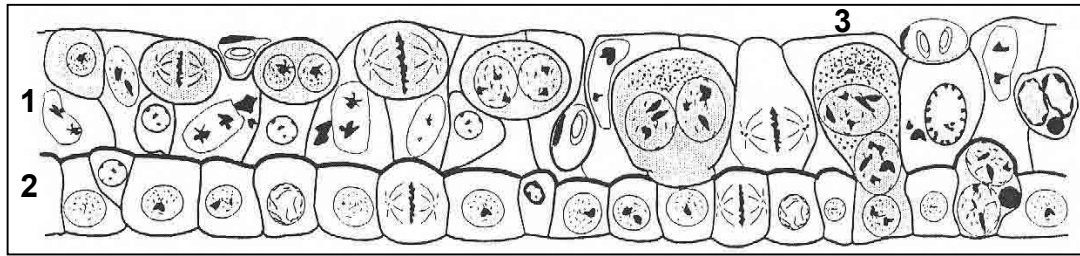


Figura 2. Esquema da divisão nuclear da célula binucleada trofoblástica e sua migração em direção ao epitélio uterino. 1. epitélio trofoblástico, 2. epitélio uterino, 3 fusão da célula binucleada com célula do epitélio uterino (Adaptado de KLISCH *et al.*, 1999).

As células binucleadas de ruminantes são secretoras, tendo a capacidade de produzir e transportar proteínas para o organismo materno. Uma de suas maiores expressões, as glicoproteínas associadas à gestação, é resultado da multiplicação de genes, com aproximadamente 100 cópias de genes. (KLISCH *et al.*, 2000). A presença da glicoproteína associada à gestação de bovinos (bPAG) nos grânulos das células binucleadas do trofoblasto foi relatada por Zoli *et al.* (1992) por métodos imunocitoquímicos. Além de proteínas associadas à gestação, o LP também é produzido pelas células binucleadas (WOODING & FLINT, 1994), bem como a produção de esteróides e metabolismo de prostaglandinas (KLISCH *et al.*, 2000). Utilizando métodos imunocitoquímicos, Morgan *et al.* (1989) demonstraram que o lactogênio placentário bovino (bLP) estava presente nas células binucleadas, encontradas no trofoectoderma aos 21 dias de gestação. Uma segunda proteína, o antígeno SBU-3, que está ausente nos estágios iniciais da gestação, aparece de forma abrupta nos grânulos das células binucleadas aos 30 dias de gestação, coincidente com o início do desenvolvimento dos vilos. Subsequentemente, os grânulos contêm tanto bLP quanto o antígeno SBU-3. Esta produção sequencial de proteínas indicam que as células binucleadas possuem diferentes funções de acordo com o estágio da gestação e têm um importante papel durante a implantação e o desenvolvimento dos vilos.

Com a utilização de técnicas imunohistoquímicas, Duello *et al.* (1986) conseguiram localizar o bLP nas células binucleadas do placentônio bovino. Células binucleadas marcadas foram demonstradas em toda a camada do trofoblasto. Os processos celulares das BNCs que se estendem em direção ao

epitélio uterino foram reativas, assim como as células inseridas na camada do epitélio uterino, com íntima aproximação ou aposição à membrana basal materna.

Acerca deste período de adesão, Milosavljevic *et al.*(1989) analisando RNAm das BNCs da placenta de bovinos, concluíram que estas células transcreviam dois membros da família dos genes PRL (“Post-transcriptional Regulation of Prolactin”) que influenciavam no desenvolvimento fetal e adaptação materna à gestação, em bovinos.

Muitas espécies secretam um hormônio protéico de origem placentária que possuem homologia estrutural e funcional com o hormônio do crescimento e a prolactina. Inicialmente foi denominado como somatotropina coriônica, mas é comumente denominado de lactogênio placentário. Dentre suas funções, observa-se sua influência na mamogênese, lactogênese, esteroiogênese (ovariana e placentária) e alteração no metabolismo materno para acomodar o crescimento e desenvolvimento do feto (PATEL *et al.*, 1996; SPENCER *et al.*, 1999).

Wooding *et al.* (1996) demonstraram que as células trofoblásticas binucleadas na placenta de ruminantes apresentavam características específicas durante seu desenvolvimento, maturação e capacidade migratória, e estavam situadas tanto nas regiões cotiledonárias, como nas intercotiledonárias. No entanto, estas células apresentavam expressões protéicas diferentes dependendo da sua localização. O lactogênio placentário ovino (oLP) é expresso em todas as células binucleadas, enquanto o SBU-3, somente no cotilédone.

Uma característica observada por Winsatt (1980), a partir de provas histofisiológicas, demonstra a capacidade fagocitária da célula binucleada.

Sobre a atividade fagocitária das células trofoblásticas, existem considerações de que os hematomas encontrados em placentas de ovinos sirvam como fonte adicional de ferro para o desenvolvimento embrionário, na medida em que as hemácias são fagocitadas e digeridas pelo trofoblasto (PEREIRA, 2000).

Uma considerável perda embrionária precoce em ruminantes ocorre nos períodos iniciais da implantação. Uma melhor compreensão das interações celulares materno-fetais é requerida para o desenvolvimento placentário, bem

como o conhecimento de aspectos sobre a fisiologia das perdas embrionárias. Nos ruminantes, uma população de células binucleadas aparece no correto estágio de desenvolvimento, com importante papel nas modificações do epitélio uterino e a formação de estruturas placentárias definidas (WOODING, 1984). Ao analisar o RNAm das células binucleadas da placenta de bovinos, Milosavljevic *et al.* (1989) concluíram que estas células transcreviam 2 membros da família dos genes PRL que influenciavam no desenvolvimento fetal e adaptação materna à gestação.

No que se refere ao estudo de retenção de placentas, Santos *et al.* (1996) mencionaram que as células binucleadas presentes no placentônio, em bovinos leiteiros, durante diferentes fases da gestação, estavam correlacionadas com a retenção placentária quando seu número não diminuía no final da gestação.

Métodos são descritos para preparo e manutenção de trofoblasto ovino em monocamadas de cultivo celular. Steven *et al.* (1980) sugeriram que as células binucleadas, que surgem na 2ª semana de incubação na cultura de trofoblasto, eram formadas por divisão nuclear das células uninucleadas e possuíam correlação com a taxa de produção de lactogênio placentário ovino.

Quanto à produção de hormônios, Matamoros *et al.* (1994) avaliaram a produção de estrógeno pelas células binucleadas trofoblásticas *in vitro* e seus efeitos sobre o cortisol, progesterona, pregnenolona, testosterona e androstenediona.

2.2 Considerações sobre a Célula Endometrial Bovina (BEND)

As células endometriais bovinas BEND constituem uma linhagem de células endometriais obtidas no 14º dia do ciclo estral de fêmeas bovinas, que adquiriram espontaneamente a capacidade de replicação *in vitro*. Esta linhagem celular foi caracterizada e registrada na “American Type Culture Collection” (ATCC nº CRL-2398), onde se encontra descrita toda a metodologia para seu cultivo, a qual pode ser utilizada por até 25 repiques, sem apresentar qualquer alteração fenotípica (BINELLI *et al.*, 2000).

Além de se apresentarem morfológicamente semelhantes às células endometriais epiteliais, as células BEND são capazes de responder a estimuladores e inibidores da produção de Prostaglandina F2 α (PGF2 α) e têm sido utilizadas em estudos para entendimento dos mecanismos celulares e moleculares na manutenção da prenhez em bovinos (BERTAN, 2004).

As células BEND são especificamente indicadas para estudos relacionados à regulação da produção de PGF2 α no endométrio no final da fase luteínica, pois são oriundas de animais no 14^o dia do ciclo estral, sendo portanto, previamente expostas à progesterona, necessária para o desencadeamento da produção de PGF2 α , bem como ser bioquimicamente apta para sua produção frente a estimuladores diversos (BERTAN, 2004).

Binelli *et al.* (2000) verificaram que as células BEND são estimuladas quanto à produção de PGF2 α pela ação do forbol 12,13 dibutirato (PDBu, estimulador da enzima fosfoquinase-C) e, simultaneamente inibidas, quando é adicionado Interferon-tau (IFN τ) ao meio de cultivo, mesmo na presença do estimulador PDBu. O pré-tratamento das células BEND com somatotropina bovina recombinante (rbGH) ou com fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) foi capaz de potencializar os efeitos do PDBu na produção de PGF2 α e de RNAm de cicloxigenase-2 (COX-2), enquanto o pré-tratamento com ácidos graxos poliinsaturados resultou na diminuição na produção de PGF2 α , induzida pelo PDBu, demonstrando que estas células guardam importantes semelhanças com a fisiologia e endocrinologia dos eventos observados *in vivo* (BERTAN, 2004).

2.3 Falhas na manutenção da gestação

2.3.1 Considerações gerais

É bem estabelecido que a incidência de falhas na gestação, em populações bovinas, é maior durante o período embrionário (entre os dias 1 e 42 da prenhez) do que no período fetal (42 a 280 dias) ou neonatal (até 28 dias após o parto). A perda embrionária, associada à falha no reconhecimento materno anterior ao 18^o

dia da gestação, representa aproximadamente 40% de todas as perdas em bovinos (FARIN et al., 2004a).

Uma variedade de métodos tem sido utilizada na produção *in vitro* (PIV) e clonagem de embriões bovinos. Muitos laboratórios demonstraram que estes embriões PIV possuem diferenças distintas na morfologia, competência no desenvolvimento e, mais recentemente, expressão gênica, comparada aos embriões produzidos *in vivo* (FARIN, 2004a, 2004b, NIEMANN et al., 2002).

Embriões PIV possuem maiores taxas de perda embrionária precoce e abortamentos quando comparados aos produzidos por meio de inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE) (KRUIP & DEN DAAS, 1997). Fatores envolvidos nas falhas de manutenção da prenhez de embriões PIV incluem o sistema de cultivo embrionário, qualidade embrionária, número de embriões transferidos por receptora, sincronia entre desenvolvimento embrionário e dia do estro da receptora, embriões congelados *versus in natura*, estresse térmico sobre o embrião e/ou receptora. As perdas verificadas entre a metade e o final da prenhez ocorrem mais freqüentemente em receptoras de embriões PIV (7 a 20% superiores) do que embriões produzidos *in vivo*, sendo os motivos atribuídos ao desenvolvimento e/ou função placentária insuficientes (FARIN et al., 2004a).

As perdas de prenhez resultantes de transferência de embriões clonados são superiores quando comparados aos embriões PIV, na qual apenas 10% das receptoras conseguem levar um feto clonado a termo (HEYMANN et al., 2002, HILL et al., 2000). As perdas são comuns durante os primeiros dois meses de prenhez, e novamente, durante os períodos fetal tardio e perinatal (HEYMANN, 2002). Hill *et al.* (2000) relataram que as taxas de prenhez no dia 30 foram similares para receptoras gestando embriões clonados (45%) e embriões controle (58%). No entanto, entre os dias 30 e 90 da gestação, 82% dos fetos clonados morreram, enquanto todos os fetos do grupo controle sobreviveram. Estes autores atribuem a baixa viabilidade dos clones entre os dias 35 e 60 ao inadequado desenvolvimento da membrana córioalantóide. Estas perdas têm sido atribuídas

ao elevado decréscimo na vascularização placentária, à ocorrência de completa avascularização da membrana corioalantóide, decréscimo no número de placentônios e aumento no tamanho dos mesmos (LEE *et al.*, 2004; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002). Outros fatores que podem ser responsáveis, em parte, pela perda embrionária precoce de embriões clonados, incluem modificações do “imprinting” genômico e rejeição imunológica do concepto (Mc EVOY, 2003). Durante o período final da prenhez, anormalidades associadas com a função placentária, incluindo volume excessivo de líquido alantóico (hidroalantóide) e gestação prolongada, também contribuem para perdas significativas na prenhez de fetos clonados (TAVERNE *et al.*, 2002; HEYMANN *et al.*, 2002).

2.3.2 Influências do reconhecimento materno da gestação

O reconhecimento materno da gestação reflete, de várias formas, como o organismo materno responde à presença do concepto em seu trato reprodutivo. Uma parte das informações bioquímicas pode ser considerada irrelevante à gestação, mas alguns reflexos promovidos pela ação do concepto tornam-se essenciais nos controles da função do corpo lúteo, suprimento sanguíneo uterino, sistema imunológico materno e outros aspectos da fisiologia materna. Muito provavelmente ocorra um conflito genético entre mãe e concepto, mas existe um comum interesse no sucesso da manutenção da gestação, promovido por mecanismos sinalizadores entre o trofoblasto e organismo materno (ROBERTS, 1996). Portanto, o processo de implantação e sucesso na manutenção da gestação possuem como fator limitante a ação das células trofoblásticas (HERRLER *et al.*, 2003).

O crescimento e desenvolvimento do concepto em mamíferos inequivocamente requer ação da progesterona e hormônios placentários sobre o útero, que regulam a função e diferenciação do endométrio, sinalização do reconhecimento materno, receptividade uterina para a implantação do blastocisto e interação concepto-útero. Hormônios do concepto atuam sobre o útero de forma parácrina para estabelecer e manter a gestação (SPENCER, 2004).

Considerando-se esta importância, é surpreendente como pouco destes processos fisiológicos são compreendidos. Em poucas espécies, um coerente modelo de como o embrião intervém sobre a extensão da vida útil do corpo lúteo emerge, porém as bases para a sua manutenção ao longo da gestação, permanecem incertas (ROBERTS, 1996). Em muitas espécies, a produção de progesterona ovariana é requerida ao longo da gestação e não simplesmente uma fonte única até complementação da progesterona placentária. Existe pouco conhecimento sobre como o embrião interfere no suprimento sanguíneo e estrutura endometrial nos estágios iniciais da gestação, possivelmente pela atuação de fatores de crescimento, que no entanto, também não atuam de forma única (AULETTA & FLINT, 1998).

O sucesso da manutenção da gestação depende de uma perfeita interação entre a unidade embrionária e o organismo materno (DUC-GOIRAN *et al.*, 1999). Após a fecundação do oócito pelo espermatozóide e o desenvolvimento do zigoto na tuba uterina, o embrião alcança o lúmen uterino onde promove o processo denominado “reconhecimento materno da gestação”.

O termo “reconhecimento da gestação” foi primeiramente empregado por Roger Short em 1969, definido como o processo fisiológico pelo qual os sinais do concepto, na presença do sistema materno, prolongam a vida útil do corpo lúteo (SPENCER, 2004). Adicionalmente, Hansen (1991) incluiu ainda como a sinalização endócrina, bioquímica e molecular entre o concepto (embrião e anexos) na presença da unidade materna, refletida na inibição da luteólise.

Durante o período inicial da gestação, a comunicação materno-embrionária é mediada pelo trofoblasto. A “janela de adesão” representa o período de máxima receptividade uterina para adesão do embrião no útero. Em resposta aos sinais do embrião, proteínas específicas da gestação são liberadas no sangue materno e uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e imunológicas ocorrem no ambiente uterino para receptividade do embrião (DUC-GOIRAN *et al.*, 1999).

Em mamíferos eutérios, a implantação marca um estágio de transição no processo de gestação, na qual o blastocisto assume uma posição fixa e inicia um

relacionamento de alterações fisiológicas com o útero. A primeira associação é frequentemente denominada de adesão, que pode ser subdividida em dois estágios, o primeiro aposicional, e o subsequente, de adesão (SCHLAFKE & ENDERS, 1975). O termo implantação se usa habitualmente para indicar a união do trofoblasto com a parede uterina, formando-se a placenta, mas este grau de união varia notadamente entre as espécies. Em bovinos, a implantação inicia-se entre os dias 28-32 e finaliza-se entre os dias 40-45 após a ovulação (BOWEN & BURGHARDT, 2000; NODEN & DE LAHUNTA, 1985).

Em cada ciclo estral o ambiente uterino é modificado morfo-funcionalmente para perfeita adequação a uma provável gestação. Durante o ciclo estral, o útero regula a função ovariana quanto ao período de permanência do corpo lúteo (CL), modulado pela ação da $PGF2\alpha$.

Durante a gestação, as funções do útero incluem o transporte, armazenamento e maturação do espermatozóide, reconhecimento e recepção dos embriões, garantia de um ambiente favorável ao conceito durante a gestação e expulsão do feto e placenta no momento do parto (BARTOL, 1999). Neste “status” fisiológico, a função uterina é regulada por esteróides de origem ovariana e moléculas embrionárias bioativas. Durante a gestação, um desequilíbrio na função uterina pode levar à mortalidade embrionária (BINELLI, 1999)

Binelli (2000a) definiu como “período crítico” o período compreendido entre os dias 15 e 17 do ciclo estral, no qual a vaca deve ajustar sua fisiologia apropriadamente, dependendo de estar ou não prenhe. A mudança do estado cíclico para o estado prenhe depende de um mecanismo efetivo de bloqueio da luteólise. O bloqueio da luteólise, e conseqüentemente a prenhez, somente estabelecer-se-á caso o conceito seja competente para enviar os sinais antiluteolíticos apropriados e o endométrio tiver a capacidade de responder a tais sinais, bloqueando a produção de $PGF2\alpha$. Tal comunicação entre as unidades do conceito e maternal frequentemente não são bem sucedidas, resultando na ocorrência da luteólise e, conseqüente, perda embrionária.

O principal hormônio implicado na manutenção da gestação é a progesterona, responsável pela estimulação de uma variedade de secreções endometriais, necessárias para o sucesso da manutenção do embrião (MANN & LAMMING, 2001; GEISERT *et al.*, 1992). Adicionalmente, muitos estudos revelam que a concentração de progesterona no plasma são menores em vacas inseminadas e não prenhes, quando comparadas às vacas prenhes (MANN & LAMMING, 2001).

O ambiente uterino deve estar previamente “primed” (sinalizado) pela progesterona, fornecendo as condições mais favoráveis para o desenvolvimento do concepto (BINELLI, 2000a). A ação da progesterona tem sua importância não apenas durante a gestação, mas também nos momentos que precedem a fecundação, preparando o ambiente uterino para o concepto.

Mann *et al.* (1998) constataram que embriões mal desenvolvidos, recuperados aos 16 dias após a inseminação, estão correlacionados às baixas concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteínica do ciclo estral.

A maioria das mortes embrionárias nos animais domésticos ocorre durante as primeiras semanas após a concepção e pode ser atribuída desde anormalidades no período inicial da embriogênese, que inclui a implantação, reconhecimento materno da gestação, até a completa formação da placenta (CROSS, 2001).

O mecanismo de reconhecimento materno da gestação em vacas é mediado pelo IFN τ , produzido pelas células trofoblásticas do embrião ao redor do 15^o - 18^o dia da gestação (THATCHER *et al.*, 1995, 1997; BINELLI, 1999, 2000a). Os efeitos antiluteolíticos do IFN τ têm sido examinados *in vitro* e *in vivo*. Infusões intrauterinas enriquecidas com bINF τ (HELMER *et al.*, 1989) ou bIFN τ recombinante (MEYER *et al.*, 1995) aumentaram a permanência do CL, comparado aos grupos controle. A secreção de PGF2 α em resposta à injeção de ocitocina foi suprimida no dia 17 quando vacas receberam infusão com bIFN τ , quando comparado aos grupos controle (MEYER *et al.*, 1995).

A liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelas células endometriais requer a presença de um sinal estimulatório e um útero responsivo. Em bovinos, a natureza deste sinal para produção de pulsos de $\text{PGF2}\alpha$ permanece incerta, já que existe a possibilidade de atuação do estradiol disponibilizando os receptores de ocitocina (BINELLI, 1999). Em ovinos, um mecanismo fechado de retroalimentação positiva estimula a secreção pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$, e a ocitocina desempenha um papel central neste processo (McCRAKEN *et al.*, 1984). A ocitocina proveniente da neurohipófise estimula a secreção de $\text{PGF2}\alpha$. A $\text{PGF2}\alpha$ estimula a secreção de ocitocina do CL, que por sua vez, estimula ainda mais a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo útero, num sistema fechado. Os pulsos de $\text{PGF2}\alpha$ coincidem em 96% com os pulsos de ocitocina (HOOPER *et al.*, 1986).

2.3.3 Influência placentária

A eficiência placentária tem sido descrita em diversas espécies animais como simplesmente a relação entre o peso do componente fetal, dividido pelo peso do componente placentário (KURZ *et al.*, 1999). No entanto, este conceito não leva em consideração, ou faz justiça, à complexidade e diversidade envolvidos na troca de nutrientes, gases e metabólitos entre o concepto e o sistema materno (WILSON, 2002). Talvez, o melhor exemplo de diminuição de função placentária em animais domésticos é visto em éguas com gestação gemelar, na qual a área total da superfície placentária é freqüentemente muito pequena para um ou ambos os gêmeos sobreviverem a termo (JONKER, 2004).

Em animais clonados, uma das principais causas de perda gestacional é a deficiência placentária, na qual 82% dos bovinos clonados por transferência nuclear (TN) não sobrevivem entre o trigésimo e nonagésimo dia da gestação. Essa viabilidade ineficiente é atribuída ao desenvolvimento rudimentar da membrana córioalantóide, bem como problemas associados aos fatores que promovem o crescimento placentário e vascular, e suas interações materno-fetais, tais como conexões placentárias e formação dos vilos coriônicos. A deficiência do

desenvolvimento vascular placentário pode ser evidenciada em bovinos por estruturas cotiledonares reduzidas ou ausentes (MIGLINO, 2004). Daniels *et al.* (2000) atribuíram a baixa eficiência de produção animal pela utilização da clonagem por transferência nuclear à uma incompleta reprogramação da célula doadora de núcleo, que leva a uma diminuição, ou expressão anormal de genes importantes para o desenvolvimento, ou ainda, à uma irregular expressão de genes marcados (“imprinting”) (YOUNG & FAIRBURN, 2000; JAENISCH & WILMUT, 2001). Adicionalmente, a comparação de blastocistos PIV, TN ou produzidos *in vivo*, por análises de “differential display”, revelaram que a maioria, mas não todos os RNAm dos embriões TN foram reprogramados (De SOUZA, 1999).

Para o sucesso do desenvolvimento de um embrião reconstituído, o núcleo transferido deve estar reprogramado para estabelecer um padrão de expressão temporal, espacial e quantitativo normal com relação ao desenvolvimento, pois a reprogramação nuclear está associada às alterações da atividade genômica, no entanto, o(s) mecanismo(s) acerca desta reprogramação permanece(m) desconhecido(s) até o presente momento, incluindo-se as modificações epigenéticas do DNA, configuração da cromatina e o “imprinting” genômico (WRENZYCKI *et al.*, 2001). Neste contexto, Wilmut *et al.* (2002) afirmaram que a clonagem por transferência nuclear a partir de células somáticas adultas é uma incrível demonstração de plasticidade, desempenhado pelo núcleo transferido ao citoplasma do oócito, que deve reger todas as alterações desde o controle do desenvolvimento até o momento do parto.

Patel *et al.* (2003), ao analisarem a expressão dos genes codificadores de proteína relacionada à prolactina-1 (PRP-1), lactogênio placentário (LP) e glicoproteína associada à gestação-1 e 9 (PAG-1 e PAG-9) em embriões bovinos produzidos por IA ou NT, no primeiro trimestre da gestação, constataram que os transcritos para LP e PAG-1 eram menores nas membranas fetais de animais TN, porém, sem haver diferença significativa na expressão de PRP-1, LP e PAG-1 no

placentônio e tecidos intercotiledonários, sugerindo haver um desbalanço na transcrição gênica específica nas células binucleadas de animais TN.

Miles *et al.* (2004), ao avaliarem a quantificação de RNAm e proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do ativador-proliferador do receptor gama da peroxisoma (PPAR γ - peroxisome proliferator-activated receptor-gama) em placentas bovinas, seja de animais produzidos *in vivo* ou por fertilização *in vitro*, não verificaram diferença na expressão nos cotilédones para estas duas proteínas, porém, as carúnculas dos animais PIV tiveram aumento da expressão de PPAR γ . Relataram ainda uma menor área da superfície endometrial, diminuição das vilosidades fetais e células binucleadas com menor volume, somados a um aumento na razão entre o volume de vasos sanguíneos e a área da superfície dos placentônios dos animais PIV, inferindo haver uma série de mecanismos compensatórios no leito vascular destes embriões.

De acordo com os diferentes sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos, Miles *et al.* (2005) não verificaram alteração na densidade volumétrica de vilos ou endométrio com placentônios, no entanto, houve uma maior concentração de células picnóticas nos placentônios de embriões produzidos com meio semidefinido, quando comparado aos grupos que utilizaram soro ou produzidos *in vivo*, afirmando que estes embriões exibem um maior potencial para desenvolvimento de formas anormais de placenta, nos estágios iniciais da gestação.

Relacionando os aspectos imunológicos e as perdas gestacionais, Hill *et al.* (2002) afirmaram que as elevadas perdas embrionárias precoces, envolvendo a gestação de embriões TN, representavam o maior impedimento ao aumento da eficiência da produção de clones, uma vez que existia uma expressão anormal do complexo maior de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I) no trofoblasto, e um maior acúmulo de linfócitos T no endométrio, sugerindo haver uma rejeição imunológica.

Dentre as mais comuns alterações placentárias em clones bovinos, MIGLINO (2004) relatou um número reduzido de placentônios (39 *versus* 120 em

gestações normais), maior diâmetro destas estruturas (21cm *versus* 11cm), ocorrência de áreas hemorrágicas aparentes sobre a superfície edemaciada, desorganização das “árvores vilosas” fetais (inseridas nas criptas endometriais), menor densidade de vilos nos chamados megacotilédones, deficiente ramificação vascular sobre as superfícies das “árvores vilosas”, bem como dilatações anormais das criptas endometriais onde esses vilos se inserem, capilares fetais com menor calibre (5-10 μ m *versus* 7-12 μ m, em gestações normais), a interface materno-fetal apresenta-se desorganizada e as células binucleadas trofoblásticas com alterações nucleares significativas.

2.4 Considerações sobre vascularização placentária e VEGF

Os estudos na área reprodutiva avançam para a era da clonagem e transgênese. O sucesso da progressão na fase de pré-implantação, durante o desenvolvimento embrionário é essencial para o estabelecimento da gestação (WATSON *et al.*,2000). A biologia comparativa revela muitas similaridades entre diferentes grupos de mamíferos. Com relação a estas diferenças, o propósito comum da função placentária é facilitar um aumento na quantidade de trocas entre as circulações materna e fetal. Em todos os tipos de placenta existe um crescimento de vasos sanguíneos de forma considerável, garantindo uma arquitetura de vasos capazes de promover uma potencialização nas trocas entre os organismos materno e fetal. Um dos mais potentes estimuladores da angiogênese é o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (CHARNOCK-JONES *et al.*,2001).

Mossman (1937) postulou que a placenta normal de mamíferos é a aposição ou fusão das membranas fetais à mucosa uterina para as trocas fisiológicas. Esta definição compreende três pontos cruciais: 1) aposição ou fusão indica íntimo contato da placenta; 2) este contato ocorre entre as membranas fetais (córioalantóide) e a mucosa uterina (endométrio) e 3) a troca fisiológica é o primeiro papel efetuado entre os tecidos materno e fetal (REYNOLDS & REDMER, 1995). Desta forma, a troca transplacentária supre a demanda metabólica para o

crescimento e desenvolvimento fetal, na qual a taxa de troca depende primariamente do fluxo sanguíneo uterino (placenta materna) e umbilical (placenta fetal). As taxas de fluxo sanguíneo placentário, por sua vez, são dependentes da taxa de vascularização placentária e, a angiogênese é, portanto, crítica para o desenvolvimento de fetos saudáveis e viáveis (REYNOLDS & REDMER, 2001). De fato, a redução da vascularização placentária tem sido associada à mortalidade embrionária precoce (HILL *et al.*, 2000; CHARNOCK-JONES & BURTON, 2000).

Ao longo da gestação, a angiogênese placentária está relacionada com o aumento do fluxo sanguíneo placentário, garantindo a disponibilização de nutrientes para o feto em desenvolvimento, regulação das trocas gasosas e metabólicas, regulados molecularmente por fatores angiogênicos como o VEGF (fator de crescimento vascular-endotelial), fator-2 de crescimento de fibroblastos (FGFB-2) e angiopoetinas, que atuam sobre células endoteliais, de forma diferenciada, conforme o desenvolvimento placentário (MILES *et al.*, 2005; REYNOLDS *et al.*, 2005).

A angiogênese da placenta fetal durante o desenvolvimento é caracterizada pela formação de uma rede neovascular anastomosada. Este processo de crescimento de vasos sanguíneos é altamente regulado pelo contínuo crescimento do leito capilar placentário, seguido pelo aumento da necessidade de fluxo sanguíneo feto-placentário para sustentar o crescimento do feto (CHEUNG *et al.*, 1995).

Em ruminantes, ao contrário de primatas, existe uma intensa vascularização do córion e do âmnion, e o aumento do crescimento destes vasos é concomitante ao desenvolvimento dos capilares cotiledonários. Embriologicamente, estes microvasos sobre as membranas fetais surgem a partir da vesícula amniótica e a artéria umbilical supre, não somente a placenta cotiledonária, mas também as membranas fetais (BRACE *et al.*, 1992).

Recentes estudos com análise morfométrica têm descrito uma extensa rede de vasos microscópicos no âmnion e córion de ruminantes. Esta rede, juntamente

com os vasos que perfundem a superfície da placenta fetal, constitui o maior componente de padrão de troca intramembranoso, envolvendo fluidos e solutos entre o compartimento amniótico e sangue fetal, representando, portanto o mecanismo primário de regulação do volume e composição do líquido amniótico. Desta forma, o crescimento e diferenciação dos microvasos do córion e âmnion podem ser essenciais para o desenvolvimento e função do padrão intramembranoso de troca. O estímulo para formação de novos vasos sanguíneos nas membranas fetais e placenta, ao longo da gestação, ainda é pouco descrito (CHEUNG *et al.*, 1995). Um possível mediador para angiogênese é o VEGF, um potente fator mitogênico de células endoteliais, na promoção de crescimento de vasos sanguíneos (FERRARA *et al.*, 1992).

Além da função angiogênica primária, o VEGF pode desempenhar outras funções biológicas como a regulação das funções das células trofoblásticas durante a gestação (BOJIC *et al.* 2000). Hill *et al.* (2000) analisando as falhas na gestação de bovinos clonados sugeriram que as pesquisas futuras devem focar os fatores que promovem o crescimento placentário e vascular, bem como nas interações materno-fetais que promovem a adesão placentária e a formação de vilosidades.

O VEGF é um regulador fundamental tanto na angiogênese normal quanto em condições patológicas. Recentes evidências indicam que esta proteína é essencial na angiogênese e vasculogênese embrionária, bem como na proliferação cíclica dos vasos sanguíneos do trato reprodutivo de fêmeas (FERRARA, 1999). A vasculogênese consiste no processo de diferenciação *in situ* de células mesenquimais em hemangioblastos, precursores das células endoteliais. Por outro lado, angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio pré-existente (ONG *et al.*, 2000).

Em células epiteliais, o VEGF é um fator altamente mitogênico (KAMAT *et al.*, 1995), capaz de promover o aumento da vasodilatação e da permeabilidade vascular (FAVIER & CORVOL, 2001). No ser humano, já foram identificadas cinco isoformas independentes, resultantes de um único gene, que diferem entre si pelo

peso molecular (STACKER & ACHEN, 1999). O VEGF é capaz de induzir a angiogênese, bem como a permeabilização dos vasos sanguíneos, controlando a vasculogênese, e a sua expressão anormal contribui para a formação de tumores, devido o estímulo da angiogênese, além de várias doenças caracterizadas por uma angiogênese anormal. Desta forma, sua inibição compromete o desenvolvimento de uma variedade de tumores (NEUFELD, 1999).

A ação do VEGF é regulada por dois receptores tirosina-quinase: receptor 1 para VEGF (VEGFR-1 ou Flt-1-Fms-like-tyrosine kinase receptor 1) e receptor 2 para VEGF (VEGFR-2 ou KDR- Kinase insert Domain containing Receptor). O VEGFR-3 é descrito em células endoteliais de vasos linfáticos (STACKER & ACHEN, 1999) e em células do sinciciotrofoblasto (HELSKE *et al.*, 2001). A expressão do receptor Flt-1 foi descrita em células endoteliais, células trofoblásticas, monócitos e células mesangiais renais, enquanto o receptor KDR, em células endoteliais, células tronco hematopoiéticas, megacariócitos e células retiniais progenitoras (NEUFELD, 1999).

A interação do VEGF com seus receptores ocorre por meio de dois domínios distintos da molécula de VEGF, localizados em terminações opostas do monômero de VEGF, fazendo com que esse arranjo espacial não permita que moléculas mutantes do sítio de ligação do VEGFR-1 liguem-se aos sítios de ligação do VEGFR-2 e vice-versa (KEYT *et al.*, 1996). A ativação do KDR pelo VEGF em células desprovidas de VEGFR-1 resulta em resposta mitogênica, enquanto a ativação do VEGFR-1 em células desprovidas de KDR não induz a proliferação celular. Porém, a ativação de VEGFR-1 pelo VEGF induz migração celular, resposta também verificada na ativação do KDR (ZIMMERMANN *et al.*, 2001).

Em bovinos, a expressão do sistema VEGF segue uma distribuição espaço-temporal ao longo da gestação. Nos estágios iniciais, existe uma maior expressão de receptores KDR, enquanto nos estágios finais há uma maior evidência de receptores Flt-1. Adicionalmente, células mesenquimais, precursoras de células endoteliais nas membranas fetais, são imuno-marcadas para KDR, mas não para

Flt-1, sugerindo, portanto, que a interação VEGF-KDR é o principal sinal durante a angiogênese placentária inicial, enquanto a interação VEGF-Flt-1 mostra-se mais importante na regulação e manutenção da integridade dos vasos, durante os estágios iniciais da gestação (DANTZER *et al.*, 2000).

Acerca da expressão do VEGF em placentas ovinas, Cheung *et al.* (1995) verificaram que o seu cDNA é altamente homólogo à sequência bovina, diferindo em apenas um aminoácido com relação à sequência humana. Cheung & Brace (1999) e Bogic *et al.* (2000; 2001) ao analisarem a expressão do VEGF e seus receptores na placenta ovina, córion e âmnion, ao longo da gestação e os correlacionarem com o padrão de vascularização e permeabilidade intramembranosa, verificaram que os níveis de RNAm do VEGF aumentaram significativamente a partir do 60º dia até o 140º dia da gestação, tendo o VEGF₁₆₄ como sendo a molécula mais expressa. Quanto aos receptores, estes autores relataram que o KDR foi primariamente expresso no âmnion e no córion, e o Flt-1 em menor nível, sugerindo que a expressão do VEGF e seus receptores, conforme o avanço da gestação, são importantes na vascularidade e permeabilidade e, desta forma, na capacidade de troca intramembranosa.

2.5 Considerações sobre o Lactogênio Placentário Bovino (bLP)

Muitas espécies secretam um hormônio protéico de origem placentária que possui homologia estrutural e funcional com o hormônio do crescimento e a prolactina. Inicialmente, foi denominado como somatotrofina coriônica, mas é comumente denominado de lactogênio placentário. Dentre suas funções, observa-se sua influência na mamogênese, lactogênese, esteroidogênese (ovariana e placentária) e alteração no metabolismo materno para acomodar o crescimento e desenvolvimento do feto (PATEL *et al.*, 1996; SPENCER *et al.*, 1999).

A secreção de promotores de crescimento pela placenta é regulada diferentemente a partir da produção de componentes similares, regulados pela interação materno-fetal. A duplicação gênica é um dos mecanismos que facilitaram a atividade endócrina placentária. A duplicação do gene codificador de

prolactina em ruminantes é resultado da formação de genes placentários específicos, relacionados à prolactina, incluindo o gene codificador de LP (GOOTWINE, 2004). Outros mecanismos que suportam a atividade endócrina específica da placenta são rearranjos alternativos (“splices”) do RNAm, levando à produção de elementos placentários regulatórios (CROSS et al., 2002), bem como o silenciamento de alelos maternos ou paternos, por meio de “imprinting” genômico (TILGHMAN, 1999).

Patel *et al.* (2004) verificaram que a expressão do gene codificador de LP apresentou-se de forma diferenciada conforme o estágio da gestação, demonstrando maior nível nas membranas fetais do que em regiões uterinas. Em ovinos, Kappes (1992) ao estudar a expressão, quantificação e localização celular do RNAm do LP durante a metade e final da gestação, observou um aumento no tecido cotiledonário de 15,4 pg/μg total de RNAm, no 60º dia, para 73 pg/μg, no 120º dia de gestação.

Durante o período de pré-implantação e implantação, várias alterações celulares e moleculares, promovidas geneticamente, garantem o alongamento da vesícula embrionária, contato célula-célula entre útero-embrião e placentação. Neste período, Ushizawa *et al.* (2004), analisando 1773 genes, informaram que a maioria dos genes possui uma maior expressão neste período, enfatizando que moléculas produzidas por células trofoblásticas, como LP, Interferon-tau (IFN τ) e moléculas de adesão, desempenham um papel fundamental na placentação, uma vez que suas expressões estejam intensificadas.

O LP, em ruminantes, pertence ao grupo das somatotropinas, transcritos por genes da família da prolactina, sintetizados e secretados pelas células binucleadas trofoblásticas no tecido materno. Sua estrutura possui maior identidade com a molécula de prolactina do que a somatotropina, embora tenha afinidade tanto por receptores lactogênicos, quanto somatogênicos. O peso molecular do LP ovino e caprino é de aproximadamente 23 kDa, enquanto o bovino é de 31kDa a 34kDa, devido a glicosilação, e sua concentração na circulação fetal diminui conforme o avanço da gestação, com seu pico máximo na

circulação materna no último terço, alcançando uma fase de platô (BYATT *et al.*, 1992).

A molécula de LP é caracterizada por múltiplas isoformas, contendo nitrogênio e oxigênio ligados aos oligossacarídeos (BECKERS, *et al.*, 1998). Em estudos envolvendo a estrutura do gene codificador de LP, e os rearranjos alternativos dos transcritos, constatou-se substituições de nucleotídeos em onze posições diferentes. Dentre os cinco éxons que compõem o RNAm do LP, a deleção do éxon III não afetou a leitura da fita de RNA, mas gerou um novo grupo carboxila junto à terminação 5' do éxon IV, oferecendo à placenta bovina a capacidade de expressar mais de um tipo de LP, aumentando a possibilidade de hormônios com propriedades biológicas distintas (KESSLER & SCHULER, 1991).

A síntese do LP ocorre a partir de um pré-pró-hormônio de 236 aminoácidos, tendo como produto final uma molécula diferente dos hormônios pituitários, bem como o LP de primatas e roedores, apresentando 51% de similaridade com a sequência de aminoácidos da prolactina bovina e 2% com o LP humano (SCHULER *et al.*, 1988). Com relação ao seu modo de interação, as moléculas de LP atuam pela ativação de receptores de prolactina (PRLR) ou pela heterodimerização dos receptores do hormônio somatotrófico (GHR) e PRLR, sem perda do seu efeito biológico, pois a existência transitória do complexo heterodímero é suficiente para iniciar a transdução do sinal, de acordo com a sua meia-vida e o tempo de interação com o receptor (GERTLER & DJIANE, 2002).

A detecção do lactogênio placentário em ovinos foi verificada aos 16 dias de gestação, coincidindo com o aparecimento das células binucleadas trofoblásticas (confirmando a produção do LP pelas BNCs) e o início do processo de implantação. Em bovinos, a detecção do LP também coincide com o aparecimento das BNCs, no entanto, antes do início do processo de implantação, sugerindo pois, sua participação não somente no processo luteotrófico, mas também durante o início da implantação embrionária (FLINT *et al.*, 1979).

Em bovinos, a concentração plasmática do LP varia significativamente conforme os estágios da gestação, apresentando-se baixa nos dois primeiros

trimestres ($0,2 \pm 0,1$ ng/mL), aumentando rapidamente ($1,2 \pm 0,2$ ng/mL), atingindo seu pico entre os dias 200-220 da gestação, independentemente da fêmea possuir um ou dois bezerros (BYATT *et al.*, 1987; PATEL *et al.*, 1996).

O lactogênio placentário pode ser crítico na manutenção da gestação, pois influencia na esteroidogênese do CL, transporte de água pelas membranas placentárias, proliferação endometrial, expressão gênica do receptor de progesterona, síntese protéica e secreção pelo epitélio endometrial (SPENCER *et al.*, 1999).

Embora a ação biológica específica do LP seja incerta, supõe-se que esteja envolvido na regulação de processos fisiológicos maternos (função do corpo lúteo, esteroidogênese ovariana, desenvolvimento da glândula mamária e regulação do metabolismo intermediário) e fetais (crescimento e metabolismo fetal, modulação do metabolismo intermediário), contribuindo para os ajustes ao longo da gestação, facilitando o transporte de nutrientes e utilização pelo feto, pois ao ligar-se nos receptores de células do epitélio glandular uterino, promove o aumento das secreções constituintes do “leite uterino”, uma vez que o útero tenha sido previamente exposto às ações da progesterona e IFN τ (GALOSY *et al.*, 1991; PATEL, 1996; SOARES, 2004). Adicionalmente, Anthony *et al.* (1995) informaram a importância do LP na modificação do metabolismo intermediário não somente materno, mas também fetal, garantindo energia suficiente para o desenvolvimento fetal em ovinos, bem como, em bovinos, desempenhar uma ação luteotrópica e estímulo à mamogênese e lactogênese.

A expressão gênica e concentração protéica do LP mostra-se diferenciada em animais produzidos *in vitro* (PIV) ou por transferência nuclear (TN), em diferentes estruturas placentárias e estágios da gestação, quando comparados a animais produzidos *in vivo* (IA). A concentração do LP no plasma fetal e fluido alantóico apresenta-se elevada nos animais FIV ($23,4 \pm 12,8$ ng/mL) e TN ($17,9 \pm 3,2$ ng/mL) do que animais IA ($2,03 \pm 1,5$ ng/mL), principalmente nos estágios de pré-implantação e implantação, sugerindo que a manipulação *in vitro* acarreta em alterações na reprogramação gênica, padrão de expressão e migração celular

(principalmente nas BNCs), causando disfunções no metabolismo placentário e transferência de nutrientes ao feto, o que explica, em parte, a macrossomia placentária e fetal destes animais (BERTOLINI *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004a, 2004b; RAVELICH *et al.*, 2004).

Gregoraszczyk *et al.* (2000) avaliaram a atividade luteotrópica do LP ovino (oLP) em diferentes dias da gestação e verificaram um efeito direto do oLP entre os dias 45 e 70 da gestação, sinergismo entre o LP e prostaglandina E2 (PGE2) na produção de progesterona e um efeito luteoprotetor do oLP contra a ação luteolítica da PGF2 α entre os dias 70 e 95 da gestação.

Os efeitos do lactogênio placentário recombinante bovino (bLPr) sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos e CL foram testados em novilhas, e os resultados demonstraram a ocorrência de CLs maiores, bem como elevadas concentrações plasmáticas de progesterona, quando comparados aos animais do grupo controle (LUCY *et al.*, 1994). Desta forma, a avaliação dos principais produtos de secreção e a dinâmica das BNCs direcionam nossas hipóteses ao estudo do mecanismo de manutenção do CL, e portanto da progesterona, após a breve atuação do IFN τ (entre os dias 15 e 18), nos períodos iniciais da gestação.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a participação dos produtos de secreção de culturas enriquecidas com BNCs sobre a produção de prostaglandina F₂ α pelas células endometriais.
- Avaliar a expressão relativa dos genes codificadores de lactogênio placentário e VEGF em placentas de animais oriundos de fecundação *in vitro*, monta natural ou clonagem por transferência nuclear.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Avaliação da expressão relativa (frequência de RNAm) dos genes codificadores de LP e VEGF em placentas.

4.1.1 Amostras

O presente trabalho foi composto por 3 grupos (MN-monta natural/controle, n=9; FIV-fecundação *in vitro*, n=5; TN-clonagem por transferência nuclear, n=6). No terço final da gestação ou imediatamente após o parto, 3 placentônios de cada indivíduo, de cada grupo, foram assepticamente removidos, preservando-se a interface materno-fetal, acondicionados em criotubos previamente esterilizados e identificados, e mergulhados diretamente em recipiente contendo nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados em freezer -80°C , até o momento da extração do RNA.

As amostras das placentas oriundas de animais clonados pela técnica de TN foram gentilmente cedidas pelos Prof. Drs. Joaquim Mansano Garcia (FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP), José Antônio Visintin (FMVZ – USP, Câmpus São Paulo - SP) e Flávio Vieira Meirelles (FZEA – USP, Câmpus de Pirassununga - SP).

As amostras das placentas de animais FIV foram obtidas a partir de gestações oriundas de embriões produzidos no laboratório de FIV do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – FCAV UNESP.

As amostras das placentas provenientes de animais produzidos *in vivo* foram obtidas em Frigorífico, situado no município de Taquaritinga-SP.

A avaliação da expressão gênica foi realizada pelo método de PCR em tempo real, uma vez que a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase representa uma poderosa ferramenta para detecção e quantificação de RNAm (PFAFFL *et al.*, 2002). O método empregado para determinação da expressão relativa foi baseado na razão entre a expressão do gene-alvo (LP e/ou

VEGF) e o gene de referência, ou controle endógeno (GAPDH), expresso pela seguinte equação, descrita por Pfaffl *et al.* (2001):

$$\text{Equação 1: } Raz\tilde{a}o(R) = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Ct_{alvo}(\text{controle-amostra})}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}(\text{controle-amostra})}},$$

onde E= eficiência da reação; Ct= ponto de cruzamento na curva de amplificação pela linha de threshold (linha arbitrária situada na fase exponencial); Δ= diferença entre amostra desconhecida *versus* o controle.

4.1.2 Extração do RNA total (Apêndice 1)

A extração do RNA foi desenvolvida a partir do método fenol-clorofórmio, utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o RNA obtido foi ressuspendido em 50μL de água tratada com DEPC, encubado a 60°C por 5 minutos e quantificado em biofotômetro (Eppendorf Biophotometer 6231, Germany) - absorvância a 260nm/280nm, anterior à reação da transcrição reversa.

4.1.3 Síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT-PCR)

Uma alíquota de 3μL de RNA total foi utilizada na síntese do DNA complementar (cDNA). A síntese foi promovida pela enzima transcriptase reversa ImProm II[®] (Promega, USA), utilizando-se como primer um oligonucleotídeo poli-T (Oligo dT primer, Invitrogen, USA).

Em tubos plásticos de 200μL, uma mistura contendo 3μL de RNA total, 1μL de água-DEPC e 1μL de oligo dT (0,5 μg/μL) foram incubadas a 70°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado o segundo mix da reação contendo 4μL de tampão 5X, 2,4μL de MgCl₂ (1,2mM), 1μL (40 U/μL) de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen, USA), 1μL de dNTPs (25mM), 1μL (200 U/μL) de enzima transcriptase reversa. As amostras foram então transferidas ao termociclador (MJ PTC-100, MJ Research Inc, USA) permanecendo por 4°C / 5 minutos; 25°C / 5

minutos; 42°C / 60 minutos e 70°C / 15 minutos. Ao final, as amostras de cDNA foram armazenadas em congelador a -20°C, anterior à reação de PCR, específica para cada gene.

4.1.4 Caracterização da expressão dos genes com PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 e tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems). O desenho dos primers e das sondas utilizados (Apêndice 3) foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Marcelo Bertolini (Universidade da Califórnia, Davis, EUA) (Apêndice 3). Para quantificação do VEGF, procedeu-se uma reação do tipo “singleplex”, enquanto para o LP e GAPDH, otimizou-se em uma reação do tipo “multiplex”. Todas as reações foram preparadas utilizando-se TaqMan® PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 2,5mM dNTPs, 0,625U AmpliTaq Gold DNA polymerase por reação, 0,25U AmpErase UNG por reação, 1,8µM de cada primer, 0,5µM de cada sonda e 1µL de cDNA diluído (equivalente a 600ng/µL de cDNA) e água q.s.p. 10µL. As condições de amplificação foram: estágio 1 → 50°C/2min. (1 ciclo); estágio 2 → 95°C/10min. (1 ciclo); estágio 3 → 95°C/15seg. e 60°C/1min. (45 ciclos). A quantificação final foi realizada utilizando o método de comparação de C_t, baseando-se na equação 1, descrita por Pfaffl *et al.* (2001), que considera as diferentes eficiências de reação para cada gene. A eficiência (E) das reações para cada um dos genes foi calculada mediante a reação de triplicatas para cada uma das diluições do cDNA (1; 1:10 e 1:100), utilizando-se a equação 2:

$$\text{Equação 2: } E = 10^{(-s)^{-1}}, \text{ onde } s = \text{inclinação da reta.}$$

Para confirmação da amplificação, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

4.1.4.1 Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram comparadas a partir de um teste não paramétrico de modo pareado fixo de relocação ao acaso (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]), descrito por Pfaffl *et al.*(2002), considerando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

4.2. Radioimunoensaio para dosagem de PGF2 α em meio de cultura.

Baseado na metodologia descrita por BERTAN (2004), células BEND foram mantidas em cultivo em meio completo HAM F-12 (40%) e 40% de Minimum Essential Medium (MEM, Sigma M0643), suplementado com 10% v/v de Soro Fetal Bovino (FBS, Gibco Life, 10270-106); 10% v/v de Soro Equino (Nutricel); 1% v/v de solução antibiótica e antimicótica (Sigma A7292) e 200UI de insulina/L (I5500), mantidas em incubadoras contendo 5% de CO₂ em ar, a 38°C e umidade saturada.

Uma suspensão de 2×10^5 células foi semeada em poços de placas de poliestireno até a atingirem confluência de 90%. Em seguida as células foram mantidas em meio sem soro por 24 horas, lavadas no mesmo meio duas vezes e incubadas por 6 horas em 1mL de meio condicionado, obtido a partir de culturas de células BNCs, mantidas em cultivo por 15 dias, conforme protocolo descrito por Landim Jr. (2002).

Para anular o efeito de uma provável interação entre os diferentes meios de cultura utilizados (DMEM 10%SFB – BNCs e HAM F-12 suplementado – BEND) procedeu-se uma centrifugação tanto do meio condicionado quanto do meio não condicionado em um aparato de Centricom 20[®] a 3000 x g durante 45 minutos a 4°C e, novamente, a 1500 x g durante 2 minutos a 4°C para recuperação do material retido na membrana, o qual foi ressuscitado em mesmo volume inicial com meio HAM F-12 completo, sem soro (MCSS).

Em cada poço da placa de cultivo de células BEND os tratamentos foram dispostos aleatoriamente, na presença ou ausência de estimulador de síntese de PGF2 α , PDBu, para cada uma das diluições do meio condicionado.

A	○	○	○	⊗	⊗	⊗
B	○	○	○	⊗	⊗	⊗
C	○	○	○	⊗	⊗	⊗
D	○	○	○	⊗	⊗	⊗

Figura 3. Disposição dos tratamentos na placa de cultivo de células BEND (Linha A: meio de cultura sem soro, com e sem estimulador PDBu – X; Linha B: meio condicionado com e sem estimulador, diluído 1:25; Linha C: meio condicionado com e sem estimulador, diluído 1:50; Linha D: meio condicionado com e sem estimulador, diluído 1:100).

Após o período de incubação, as amostras foram retiradas e armazenadas em congelador a -20°C para posterior mensuração das concentrações de PGF2 α (Apêndice 2), de acordo com o procedimento descrito por Danet-Desnoyers; Wetzels & Thatcher (1994).

4.2.1 Análise estatística

Foi considerada variável dependente a produção de PGF2 α (pg/mL), realizando-se a análise da interação tipo de meio (condicionado / não condicionado), presença ou ausência de PDBu e diluições (1:25, 1:50 e 1:100) entre as médias de cada tratamento, dentre os diferentes grupos. Para atender às premissas normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $p < 0,01$) e homogeneidade das variâncias (Teste F, $p < 0,01$), os dados foram transformados por raiz quadrada e reanalisados por ANOVA (SAS System v.8.2).

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da reta padrão e cálculo das eficiências das reações.

Anterior à quantificação relativa da expressão gênica, necessita-se a determinação da eficiência da reação para cada gene, a qual foi determinada a partir de reações compostas por três diferentes diluições (1x, 0,1x e 0,01x), dispostas em duplicata (Figuras 4 e 6). Finalizada as reações, elaborou-se uma regressão linear composta pelos C_t s obtidos (Tabela 1) e o logaritmo das diluições. O valor absoluto da inclinação da reta é aplicado na Equação 2 para cálculo das eficiências (Figuras 5 e 7).

5.1.1 Reta padrão e eficiência do VEGF (reação singleplex).

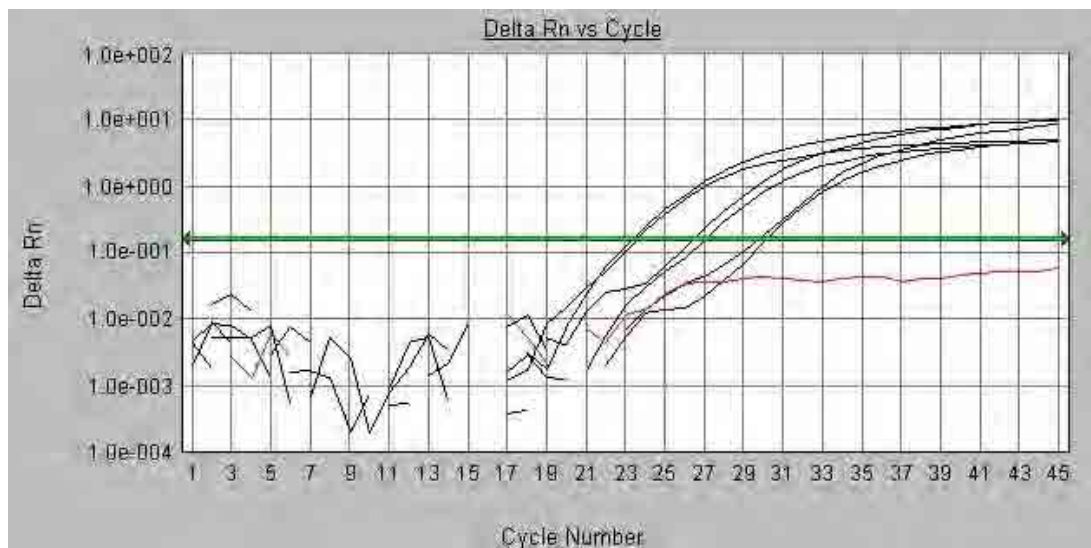


Figura 4. Curva de amplificação em PCR tempo real correspondente ao gene codificador de VEGF em três diferentes diluições.

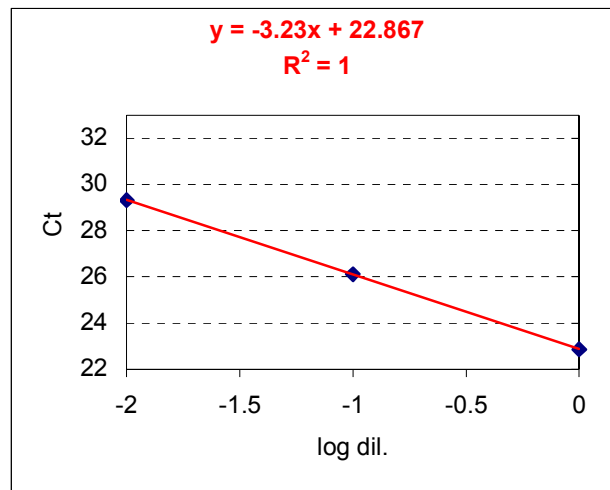


Figura 5. Curva de regressão correspondente à amplificação do VEGF em três diferentes diluições (1; 0,1 e 0,01), apresentando uma inclinação absoluta de 3,23.

$$E_{\text{VEGF}} = 10^{(-s)^{-1}} \rightarrow E_{\text{VEGF}} = 10^{(3,23)^{-1}} \rightarrow E_{\text{VEGF}} = 2,03$$

5.1.2 Retas padrão e eficiências do GAPDH e LP (reação multiplex).

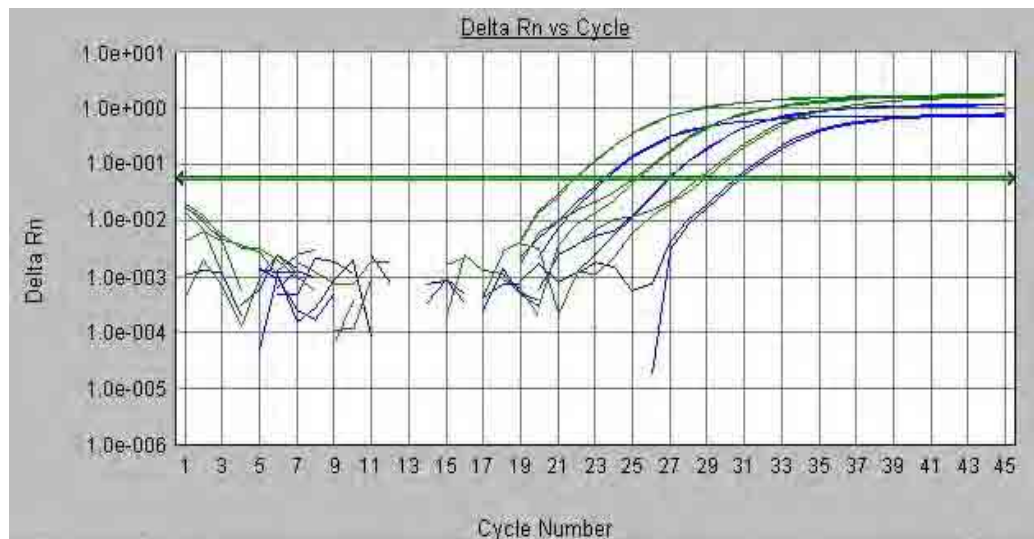


Figura 6. Curva de amplificação em PCR tempo real correspondente ao gene codificador de GAPDH (curva azul) e LP (curva verde) em três diferentes diluições.

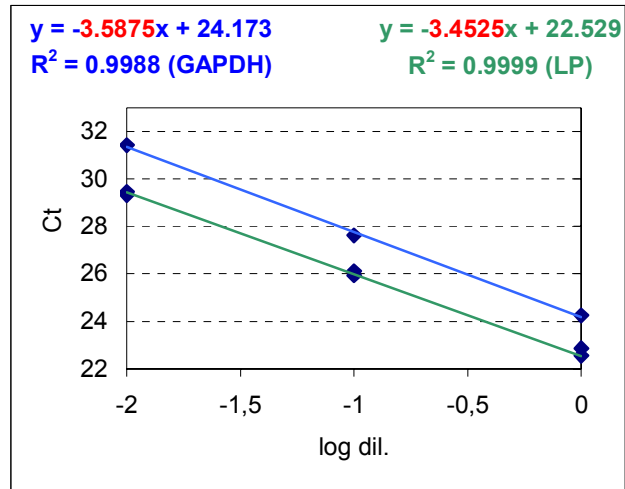


Figura 7. Curva de regressão correspondente à amplificação do GAPDH (azul) e LP (verde) em três diferentes diluições (1; 0,1 e 0,01), apresentando as inclinações absolutas de 3,58 e 3,45, respectivamente para GAPDH e LP.

$$E_{GAPDH} = 10^{(-s)^{-1}} \rightarrow E_{GAPDH} = 10^{(3,58)^{-1}} \rightarrow E_{GAPDH} = 1,90$$

$$E_{LP} = 10^{(-s)^{-1}} \rightarrow E_{LP} = 10^{(3,45)^{-1}} \rightarrow E_{LP} = 1,94$$

5.1.3 Validação dos experimentos para cálculo da expressão relativa.

Mediante a diferença (ΔC_t) dos C_t s obtidos na regressão entre o gene alvo (LP e/ou VEGF) e o controle endógeno (GAPDH), estabeleceu-se uma regressão logarítmica, na qual o valor absoluto do “slope” (inclinação da reta) deve ser $<0,1$; que indica a não diferença entre as eficiências das reações e possibilita a utilização do método $\Delta\Delta C_t$ para o cálculo da quantificação relativa.

Tabela 1. Apresentação dos valores de C_t s para cada um dos genes em suas diferentes diluições, bem como a diferença entre gene-alvo e controle endógeno (ΔC_t)

Diluição	C_t LP	C_t VEGF	C_t GAPDH	ΔC_t LP	ΔC_t VEGF
1x	22,52	22,86	24,31	-1,79	-1,45
0,1x	26,02	24,32	27,71	-1,69	-1,60
0,01x	29,52	26,11	31,52	-2,00	-7,20

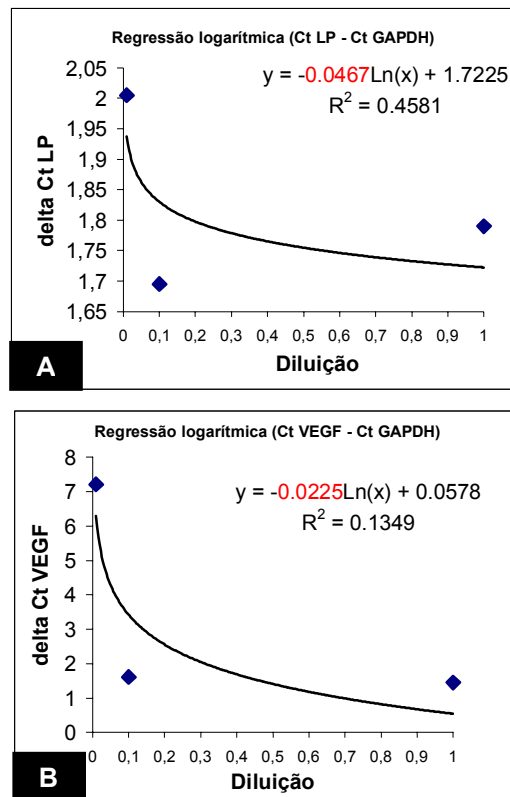


Figura 8 A e B. Representação esquemática das regressões logarítmicas das diferenças entre $Ct_{LP} - Ct_{GAPDH}$ (ΔC_t LP) e $Ct_{VEGF} - Ct_{GAPDH}$ (ΔC_t VEGF) em função da diluição da amostra, indicando os valores absolutos de inclinação da reta $<0,1$ (0,04 para LP e 0,02 para VEGF).

5.1.4 Apresentação dos valores de Cts referentes às amostras analisadas.

Após o cálculo das eficiências das reações de amplificação, bem como sua validação, as amostras dos indivíduos de cada grupo (MN, FIV e TN) foram submetidas à reação de PCR em tempo real para cada um dos genes (GAPDH, LP e VEGF). Finalizadas as reações, determinou-se os cálculos dos C_t s médios, apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente para os grupos MN (n=8), FIV (n=5) e TN (n=6). Em seguida, os cálculos da expressão gênica relativa foram executados a partir dos C_t s médios, considerando-se os diferentes valores de eficiência (E), utilizando-se o método REST[®] (Relative Expression Software Toll), desenvolvido por Pfaffl *et al.* (2002).

Tabela 2. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de MN (grupo controle).

Amostra	Ct GAPDH	Ct VEGF	Ct LP
1	24.71	25.82	22.29
2	22.61	21.25	19.76
3	25.08	25.25	21.64
4	23.15	21.83	19.95
5	25.26	23.60	22.54
6	24.26	22.37	17.59
7	28.45	23.66	18.09
8	28.10	23.24	16.37

Tabela 3. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de FIV.

Amostra	Ct GAPDH	Ct VEGF	Ct LP
1	21.36	20.28	20.08
2	19.08	22.44	18.89
3	23.06	22.11	20.15
4	24.78	23.24	23.21
5	22.16	21.98	19.71

Tabela 4. Valores médios de Cts correspondentes das amostras oriundas de placentas de TN.

Amostra	Ct GAPDH	Ct VEGF	Ct LP
1	21.03	20.72	16.78
2	21.51	22.43	16.86
3	23.90	23.76	18.72
4	19.16	20.90	14.63
5	23.95	25.41	17.76
6	23.90	23.72	18.06

5.1.5 Expressão relativa de LP e VEGF nas placentas de animais FIV e TN.

Segundo o método descrito por Pfaffl (2002) , que considera as diferentes eficiências entre as reações, bem como a normalização com um gene de expressão constitutiva (GAPDH), a expressão gênica do VEGF é sub expressa na razão de $-1,415 (\pm 1,03)$ e $-0,720 (\pm 1,28)$, respectivamente nas placentas de clones e FIV, em relação à placenta de animais MN. Com relação ao gene

codificador de LP, observou-se uma expressão superior nas placentas de animais clonados ($0,111; \pm 0,5$) e inferior nos placentas de animais FIV ($-3,182; \pm 0,20$) (Figuras 9 e 10). Embora tais diferenças tenham sido observadas, não se verificou significância estatística, considerando-se a análise por meio de teste não paramétrico de modo pareado fixo de relocação randômica (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]), considerando-se $p < 0,05$.

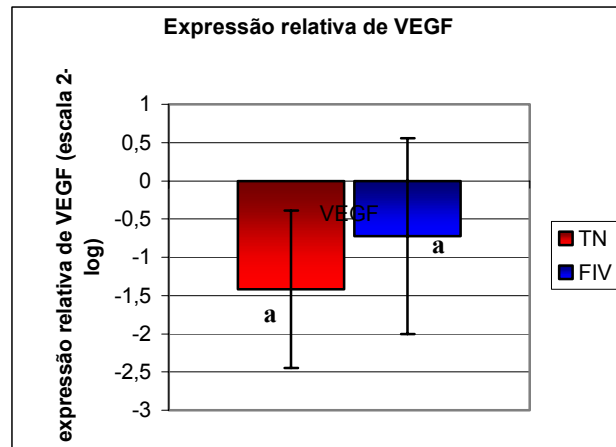


Figura 9. Expressão de VEGF nas placentas de animais NT ($-1,415; \pm 1,03$) e FIV ($-0,720; \pm 1,28$), em relação às placentas de animais MN ($p > 0,05$).

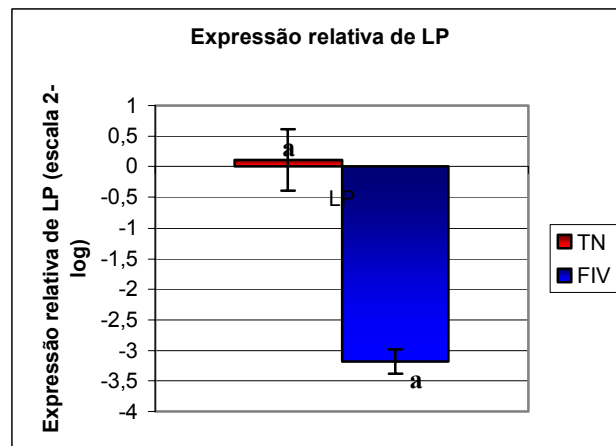


Figura 10. Expressão de LP nas placentas de animais FIV ($-3,182; \pm 0,20$) e TN ($0,111; \pm 0,50$), em relação às placentas de animais MN ($p > 0,05$).

5.2 Dosagem de PGF2 α em meio de cultura condicionado.

Após incubação dos meios (nos diferentes tratamentos e diluições) na cultura de células BEND verificou-se a existência de diferença estatística ($p < 0,05$) entre o meio condicionado e não condicionado, considerando-se a produção de PGF2 α , mediante a análise da interação entre as diferentes condições (presença/ausência de PDBu, meio condicionado/não condicionado, diluições). A Tabela 5 e a Figura 11 ilustram que o meio de cultura condicionado, na presença de PDBu, determinou o aumento da produção de PGF2 α , quando comparado ao meio controle (Meio HAM F12 Completo Sem Soro – MCSS, ANOVA, teste de Duncan, $p > 0,05$) e o meio não condicionado. No entanto, o meio de cultura condicionado sem PDBu apresentou uma produção de PGF2 α semelhante à produção basal, determinada pelo meio controle (MCSS), mesmo nas diferentes diluições, ratificando a influência do PDBu como potencializador dos produtos secretados pelas BNCs na produção de PGF2 α .

Tabela 5. Produção média de PGF2 α (pg/mL) pelas células BEND mediante a presença de meio de cultura exposto às BNCs (condicionado) durante 15 dias de cultivo, em diferentes diluições, ou somente meio de cultura (DMEM 10%SFB, não condicionado), na presença de estimulador (PDBu) ou ausência (\emptyset).

Meio de Cultura	MCSS		Dil. 1:25		Dil. 1:50		Dil. 1:100	
	\emptyset	PDBu	\emptyset	PDBu	\emptyset	PDBu	\emptyset	PDBu
Condicionado	19,01 ^{A, a}	435,84 ^{A, b}	15,08 ^{A, a}	1323,94 ^{A, b}	16,83 ^a	1128,67 ^b	23,10 ^{A, a}	880,88 ^{A, b}
Não condicionado	25,60 ^{A, a}	161,11 ^{B, ab}	5,21 ^{B, a}	157,64 ^{B, a}	-	-	11,72 ^{A, a}	209,92 ^{B, b}

Letras maiúsculas diferentes entre colunas e letras minúsculas diferentes entre linhas condicionam diferença estatística ($p < 0,05$)

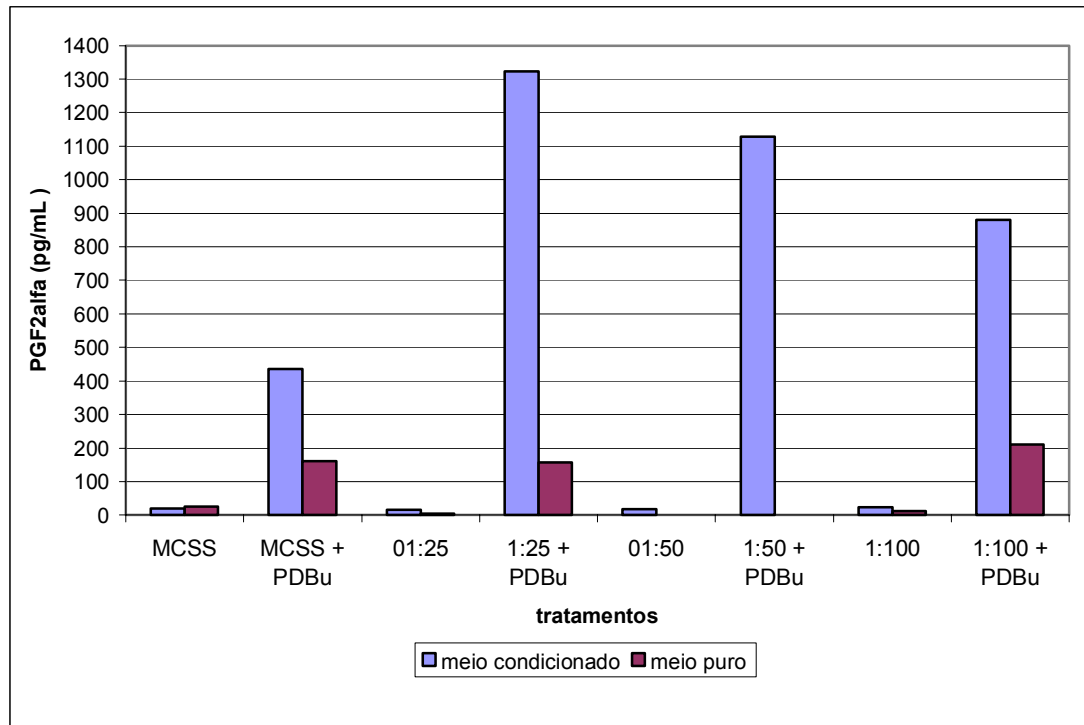


Figura 11. Representação esquemática da produção de PGF₂α de acordo com os diferentes meios de cultura (condicionado ou puro), sob a presença ou ausência de PDBu, em três diferentes diluições (1:25, 1:50 e 1:100).

6.DICUSSÃO

6.1 Expressão gênica relativa de VEGF em placentas.

Baseado no PCR em tempo real, os resultados apresentados na Figura 9, mesmo sem haver diferença estatística, demonstraram uma menor expressão de VEGF em placentas de animais FIV ($-0.720; \pm 1,28$) e, ainda menor em placentas de animais TN ($-1,415; \pm 1,03$), relativo às placentas de animais MN. Esta similaridade na expressão de VEGF confirma os resultados apresentados por Miles (2004); Farin *et al.* (2004b) e Hoffert *et al.* (2004).

A afirmação de Hill *et al.* (2002) suporta a necessidade de maiores estudos quanto à influência da vascularização placentária na manutenção da gestação, principalmente pela elevada ocorrência de perdas em animais clonados, associado a um desenvolvimento vascular deficiente, bem como a ocorrência de regiões cotiledonárias rudimentares (STICE *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 2000; De SOUSA *et al.*, 2001). A formação dos vasos sanguíneos é iniciada pela vasculogênese e, posteriormente, controlada pela angiogênese, e a regulação molecular destes eventos é dirigida por fatores como o VEGF (ZYGUMUNT *et al.*, 2003; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004).

O padrão de expressão do VEGF pode apresentar modificações, muitas vezes, influenciado pelas técnicas de produção *in vitro* de embriões, comprovado no estudo desenvolvido por Miles (2004) ao verificar discrepâncias na expressão de RNAm de VEGF em gestações de 40 dias, de acordo com o meio de cultura utilizado (SOF ou G1.2/G2.2).

A maioria dos trabalhos sobre expressão de VEGF em placentas foi realizada nos estágios iniciais de gestação e/ou terço médio, fase em que a vasculogênese é maior, evidente pela formação de uma rede vascular anastomosada (CHEUNG *et al.*, 1995), proporcional às necessidades do desenvolvimento fetal (REYNOLDS & REDMER, 2001), evidenciando uma diminuição da expressão de VEGF em embriões produzidos *in vitro*, quando

comparados aos produzidos *in vivo* (MILES, 2004). Neste sentido, as falhas gestacionais determinadas por uma deficiência vascular, verificada principalmente em animais clonados, provavelmente estejam atribuídas a outros fatores angiogênicos, como o FGF e angiopoetinas, e não exclusivamente à expressão do VEGF e/ou seus receptores KDR e Flt-1.

Com relação à ocorrência da síndrome do bezerro gigante e hidropsias, os dados deste trabalho não puderam inferir quanto à participação do VEGF, uma vez que estas manifestações estão associadas às anormalidades placentárias, principalmente quanto ao padrão de troca intramembranoso (área de contato materno-fetal), evidenciado pelo número e tamanho dos placentônios em animais FIV e, mais pronunciadamente em clones (CHAVETE-PALMER *et al.*, 2002). Desta forma, as causas não estão relacionadas simplesmente à vascularização placentária, mas também ao padrão de expressão de genes “imprinting” ligados ao desenvolvimento placentário e fetal (YOUNG *et al.*, 2001; BERTOLINI & ANDERSON, 2002) e assincronia no desenvolvimento de órgãos (FARIN & FARIN, 1995; HILL *et al.*, 1999), comprovado principalmente nos animais clonados devido à alterações na reprogramação celular, promovidas pelo procedimento de transferência nuclear e não pelo meio de cultura utilizado (CHAVETE-PALMER *et al.*, 2002).

Portanto, as anormalidades vasculares são atribuídas a um balanço diferenciado na expressão de fatores de crescimento, angiogênicos e mitogênicos entre mãe e feto, uma vez que o organismo materno apresenta mecanismos compensatórios para adequar e sustentar a gestação.

6.2 Expressão gênica relativa de LP em placentas

Várias são as funções desempenhadas pelo LP durante a gestação como a influência na esteroidogênese, transporte de fluidos transplacentários, proliferação endometrial, secreção uterina, desenvolvimento da glândula mamária, regulação do metabolismo intermediário materno e fetal (GALOSY *et al.*, 1991; SPENCER *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004), e a sua expressão modifica-se conforme o

período gestacional, dependente de uma intermodulação entre mãe e feto (PATEL *et al.*, 1996).

Conforme apresentado na Figura 10, a expressão gênica relativa de LP, mesmo sem apresentar diferença estatística, revela uma tendência de maior expressão no grupo de animais clonados ($0,111 \pm 0,50$) e uma menor expressão no grupo de animais FIV ($-3,182 \pm 0,20$), quando comparado ao grupo controle (MN), similar aos resultados apresentados por Patel *et al.* (2004), que relataram uma expressão de LP estatisticamente superior ($p < 0,05$) na placenta de animais TN, em relação aos animais MN, aos 100 dias de gestação, principalmente em regiões cotiledonares, o que representa, na literatura, os dois únicos trabalhos mencionando a expressão gênica de LP em placentas.

Neste trabalho foi excluído um indivíduo pertencente ao grupo TN devido à discrepância dos resultados, o que comprometeria a análise da expressão do grupo. O valor do C_t médio do grupo foi de 17 e, deste indivíduo, 28, ou seja, uma diferença de aproximadamente 10 ciclos, o que indica uma menor quantidade de RNAm. Curiosamente, a média de peso ao nascimento do grupo foi de 41kg, enquanto deste indivíduo 57kg. Os valores de C_t para os outros genes analisados também tiveram a mesma proporção, comparada aos demais indivíduos do grupo. Provavelmente, a extração de RNA ou o estado da amostra no momento da colheita apresentaram algum comprometimento para que os valores assumissem tal valor. Em outra situação, este indivíduo apresenta um padrão de expressão gênica particular, uma vez que os animais clonados podem apresentar-se semelhantes a animais não clonados ou de forma discrepante (Meirelles, 2005, comunicação pessoal)

A concentração plasmática de LP no sangue materno mostra-se diferenciada ao longo da gestação, sendo baixa no primeiro semestre ($0,2 \pm 0,1$ ng/mL), aumentando rapidamente ($1,2 \pm 0,2$ ng/mL) e atingindo seu pico entre os dias 200-220 da gestação independentemente da fêmea possuir um ou dois bezerros (BYATT *et al.*, 1987; PATEL *et al.*, 1996). Na circulação fetal, a concentração máxima é atingida na metade da gestação (5-25ng/mL), seguida por

um platô e/ou declínio gradual até o parto (BOLANDER *et al.*, 1976; BYATT *et al.*, 1990), o que foi verificado também em ovinos (KAPPES *et al.*, 1992), sugerindo que a secreção de LP na circulação fetal e materna seja regulada separadamente, podendo ser resultante de BNCs que não migraram até a interface materno-fetal do placentônio.

Assim como os dados apresentados por Patel *et al.* (2004), os dados do presente trabalho sugerem que uma alteração na proliferação e diferenciação das células trofoblásticas, especificamente as BNCs em placentas de animais TN (MIGLINO, 2004), podem resultar em modificações na regulação transcricional dos genes codificadores de LP. Recentemente, Ravelich *et al.* (2004b) reportaram um aumento no número de células BNCs em placentônios de animais TN, bem como no aumento da expressão de LP. Uma vez que o LP é detectado a partir da adesão do embrião, distúrbios durante este estágio e migração das células BNCs podem resultar em uma menor eficiência de secreção dos seus produtos no tecido materno, explicando as diferenças na concentração de LP em fluidos de fetos TN, FIV e/ou MN, bem como a sua expressão gênica, uma vez que o LP é resultado de mecanismos de duplicação e rearranjos gênicos alternativos, entre os genes da família da prolactina (KESSLER & SCHULER, 1991; CROSS *et al.*, 2002).

Devido à ocorrência de resultados diferentes na expressão de LP nos grupos FIV e TN (Figura 10), pode-se inferir que o padrão de expressão deste gene não sofre interferência pela utilização de SFB, uma vez que os dois sistemas de produção *in vitro* de embriões utilizaram a suplementação com SFB. Provavelmente, os resultados observados nestes grupos estejam relacionados à técnica de transferência nuclear, somado à alteração na reprogramação celular e modificações epigenéticas.

Desta forma, processos artificiais para produção de embriões (FIV e/ou TN) têm-se mostrado estar relacionados a uma significativa supra ou infra-regulação, indução *de novo*, ou silenciamento de genes críticos para o desenvolvimento normal de fetos, determinados por modificações epigenéticas, como metilação do

DNA e modificação nas histonas, traduzindo-se em anormalidades placentárias e/ou somáticas (WRENYCKI *et al.*, 2005).

6.3 Efeito dos produtos secretados pelas BNCs na produção de PGF₂ α pelas células BEND

Ainda são desconhecidos os fatores responsáveis pela manutenção do CL após a atuação do IFN τ no início da gestação. Findado o processo de reconhecimento materno da gestação, a manutenção do CL é promovida por fatores luteotrópicos e/ou antiluteolíticos, ainda desconhecidos, bem como suas modulações. Em razão da coincidência entre o período de surgimento das BNCs e a atuação do IFN τ , pode-se hipotetizar sobre uma provável participação dos produtos produzidos e secretados pelas BNCs na manutenção do CL de maneira luteotrópica e/ou antiluteolítica. No entanto, os dados deste trabalho (Tabela 5 e Figura 11) revelaram que o meio de cultura condicionado pelas BNCs determinou o aumento da produção de PGF₂ α na presença do PDBu.

A avaliação dos produtos secretados pelas BNCs, realizados neste trabalho, apresenta-se inédito diante da literatura consultada. O efeito de uma provável interação entre os dois meios de cultura utilizados (DMEM 10%SFB – BNCs e HAM F-12 suplementado – BEND) foi anulado (conforme a metodologia descrita no item material e métodos) e o que se percebeu foi o efeito exclusivo do meio de cultura condicionado, comprovando a participação dos produtos secretados pelas BNCs, uma vez que o meio não condicionado apresentou uma produção de PGF₂ α semelhante ao meio controle (MCSS – produção basal).

Conforme apresentado por Bertan (2004), Da Cunha (2004), Binelli *et al.* (2000), o efeito potencializador do PDBu na síntese de PGF₂ α é rápido, condizente com uma ação não genômica e, sugere, a partir dos resultados deste trabalho, uma provável atuação de moléculas não esteroidais, descartando a ação de hormônios esteróides.

Considerando-se os resultados observados, pode-se inferir que os produtos secretados pelas BNCs sejam potencializados pela ação do PDBu, provavelmente, na etapa de ativação da enzima PKC, uma vez que o PDBu mimetiza a ação do DAG (diacil glicerol), porém associado a um maior período de tempo (NISHIZUKA *et al.*, 1984), o que leva a um aumento de RNAm e expressão de COX-2 nas células BEND (XIAO *et al.*, 1999; BINELLI *et al.*, 2000), modulando a produção de PGF2 α .

Assim como reportado por Da Cunha (2004), o aumento da produção de PGF2 α pode estar associado à técnica de isolamento das BNCs na medida em que haja uma maior disponibilização de ácido araquidônico, molécula precursora de PGF2 α .

O ácido araquidônico é convertido em PGH₂ pela enzima COX 1 e 2, o qual é convertido em diferentes tipos de prostaglandinas, como a PGE₂ (luteotrópica, luteostática ou luteoprotetora) e PGF2 α (luteolítica), de acordo com PG sintases específicas (BANU *et al.*, 2005). Uma vez que o PDBu propicia o aumento de RNAm e expressão de COX-2 nas células BEND (BINELLI *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 1999), e as BNCs são responsáveis pela produção de esteróides e modulação de síntese de prostaglandinas (KLISCH *et al.*, 2000), pode-se inferir que neste trabalho, os produtos secretados pelas BNCs, de acordo com o estímulo apropriado, podem modular a síntese de PGE₂, haja visto sua capacidade de aumento de produção de PGF2 α , estimulado pelo PDBu.

Tanto a manutenção da gestação, como a do CL dependem da interação entre moléculas secretadas pela unidade materna e fetal (BECKERS *et al.*, 1998). Neste sentido, experimentos realizados *in vitro*, mesmo propiciando o estudo isolado de um processo fisiológico e minimizando variações individuais, limitam o grau de interação e modulação existentes entre os organismos, quanto à presença de fatores que condicionem uma resposta luteolítica e/ou luteotrópica.

É sabido que o principal produto sintetizado pela BNC é o lactogênio placentário (NAKANO *et al.*, 2002) e que este possui atividade luteotrópica *in vitro*, confirmado por Gregoraszczyk *et al.* (2000), em células luteínicas de ovelhas,

conforme o aumento da capacidade de síntese de progesterona, principalmente quando suplementadas com PGE₂, e, *in vivo*, por Lucy *et al.* (1994) ao verificarem, em novilhas, a ocorrência de CLs maiores após infusão intra-uterina com lactogênio placentário recombinante.

7. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados e resultados obtidos, suportados pela análise estatística e a literatura consultada, pode-se concluir que:

- 1) A expressão gênica relativa de VEGF em placentas de animais clonados não difere de animais do grupo controle (monta natural), embora haja uma tendência numérica negativa (down regulation);
- 2) A expressão gênica relativa de VEGF em placentas de animais FIV não difere de animais do grupo controle (monta natural), embora haja uma tendência numérica negativa (down regulation);
- 3) A expressão gênica relativa de LP em placentas de animais clonados não difere de animais do grupo controle (monta natural), embora haja uma tendência numérica positiva (up regulation);
- 4) A expressão gênica relativa de LP em placentas de animais FIV não difere de animais do grupo controle (monta natural), embora haja uma tendência numérica negativa (down regulation),
- 5) O meio de cultura condicionado pelas BNCs, por intermédio de seus produtos de secreção, potencializados pelo PDBu, determina aumento de síntese de $PGF2\alpha$ pelas células BEND.

8. REFERÊNCIAS *

ANTHONY, R.V.; LIANG, R.; KAYL, E.P.; PRATT, S.L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 83-95, 1995.

AULETTA, F.J.; FLINT, A.P.F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates and women, specially in relation to the time of luteolysis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 9, p. 88-105, 1988.

BANU, S.K.; AROSH, J.A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M.A. Expression of prostaglandin transporter in the bovine uterus and fetal membranes during pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, p. 230-236, 2005.

BARTOL, F.F. Uterus, non-human. In: Knobil, E., Neill, J.D. (eds), **Encyclopedia of Reproduction**, v. 4. San Diego: Academic Press, 1999, p. 950-60.

BECKERS, J.F.; ZARROUK, A.; BATALHA, E.S.; GARBAYO, J.M.; MESTER, L.; SZENCI, O. Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropin and pregnancy-associated glycoproteins: review. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 46, n. 2, p. 175-189, 1998.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F2 no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

* ABNT NBR 6023 ago/02.

BERTOLINI, M.; WALLACE, C.R.; ANDERSON, G.B. Bovine placental lactogen (bPL) and bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) as indirect measures of placental function in *in vitro*-derived bovine pregnancies. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 16, n. 2, p. 204, 2004.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G.B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, p. 181-187, 2002.

BINELLI, M. **Maternal-embryonic interactions during early pregnancy in cattle**. 1999. 291f. Tese (PhD) - University of Florida, Florida, 1999.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: SIMPÓSIO CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL DE RUMINANTES, 1., 2000. São Paulo, Anais... 2000. p.99-114.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, J.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Interferon- τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of ciclooxigenase-2 and phospholipase A2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 417-24, 2000b.

BJÖRKMAN, N. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of Ultrastructural Research**, New York, v. 24, p. 249-58, 1968.

BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

BOGIC, L.V.; BRACE, R.A.; CHEUNG, C.Y. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. **Placenta**, London, v. 21, p. 203-209, 2000.

BOGIC, L.V.; BRACE, R.A.; CHEUNG, C.Y. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. **Placenta**, London, v. 22, p. 265-275, 2001.

BOLANDER, F.F.; ULBERG, L.C.; FELLOWS, R.E. Circulating placental lactogen levels in dairy and beef cattle. **Endocrinology**, Baltimore, v. 99, p. 1273-1278, 1976.

BOWEN, J.A.; BURGHARDT, R.C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 11, p. 93-104, 2000.

BRACE, R.A.; GILBERT, W.M.; THORNBURG, K.L. Vascularization of the ovine amnion and chorion: a morphometric characterization of the surface area of the intramembranous pathway. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 167, p. 1747-1755, 1992.

BYATT, J.C.; WALLACE, C.R.; BREMEL, R.D.; COLLIER, R.J.; BOLT, D.J. The concentration of bovine placental lactogen and the incidence of different forms in fetal cotyledons and in fetal serum. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 4, n. 4, p. 231-241, 1987.

BYATT, J.C.; WELPLY, J.K.; LEIMGRUBER, R.M.; COLLIER, R.J. Characterization of glycosylated bovine placental lactogen and the effect of enzymatic deglycosylation on receptor binding and biological activity. **Endocrinology**, Baltimore, v. 127, p. 1041-1049, 1990.

BYATT, J.C.; WARREN, W.C.; EPPARD, P.J.; STATEN, N.R.; KRIVI, G.G.; COLLIER, R.J. Ruminant placental lactogens: structure and biology. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 2911-2923, 1992.

CARVALHO, A.F. **Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalus bubalis bubalis* – Linnaeus 1758)**. 2000. 110f. Tese (Doutorado em Anatomia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

CHARNOCK-JONES, D.S.; BURTON, G.J. Placental vascular morphogenesis. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 14, n. 6, p. 953-968, 2000.

CHARNOCK-JONES, D.S.; CLARK, D.E.; LICENCE, D.; DAY, K.; WOODING, F.B.P.; SMITH, K. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, p. 753-60, 2001.

CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. **Placenta**, London, v. 25, p. 103-113, 2004.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 1596-1603, 2002.

CHEUNG, C.Y.; SINGH, M.; EBAUGH, M.J.; BRACE, R.A. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v. 173, n. 3, p. 753-759, 1995.

CHEUNG, C.Y.; BRACE, R.A. Developmental expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in ovine placenta and fetal membranes. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, New York, v.6, p.179-185, 1999.

CROSS, J.C.; ANSON-CARTWRIGHT, L.; SCOTT, I.C. Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 57, p. 221-234, 2002.

CROSS, J.C. Genes regulating embryonic and fetal survival. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 193-207, 2001.

Da CUNHA, P.M. **O estímulo do estradiol na produção de PGF 2α endometrial é dependente da síntese de proteínas?** 2004. 146f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DANET-DESNOYERS, G.; WETZELS, C.; THATCHER, W.W. Natural and recombinant interferon- τ regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F 2α and E 2 by epithelial cells and estromal cells in endometrium. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 6, p. 193-2002, 1994.

DANIELS, R.; HALL, V.; TROUNSON, A.O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 1034-1040, 2000.

DANTZER, V. Epiteliochorial Placentation. In: Knobil, E.; Neil, J.D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, v.1, p.18-28, 1989.

DANTZER, V.; LEACH, L.; LEISER, R. Angiogenesis and placental vasculature – a workshop report. **Placenta**, London, v. 21, suppl. A, p. S69-S70, 2000.

De SOUSA, P.A.; WINGER, Q.; HILL, J.R.; JONES, K.; WATSON, A. J.; WESTHUSIN, M.E. Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. **Cloning**, Larchmont, v. 1, p. 63-69, 1999.

De SOUSA, P.A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L.E.; WALKER, S.W.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 23-30, 2001.

DUC-GOIRAN, P.; MIGNOT, T.M.; BOURGEOIS, C.; FERRÉ, F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. **European Journal of Obstetric & Gynecologic and Reproduction Biology**, Asterdam, v. 83, p. 85-100, 1999.

DUELLO, T.M.; BYATT, J.C.; BREMEL, R.D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 119, n. 3, p. 1351-55, 1986.

FARIN, P.W.; STOCKBURGER, E.M.; RODRIGUEZ, K.F.; CROSIER, A.E.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Placental morphology is altered following transfer of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, p. 474-, 2000.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 55, p. 151-170, 2001.

FARIN, P.W.; MILES, J.; FARIN, C.E. Pregnancy loss associated with embryo technologies in cattle. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Farinsimple.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2005.

FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Developmental of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, supl. E, p. E53-E62, 2004b.

FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 676-682, 1995.

FAVIER, J.; CORVOL, P. Physiological angiogenesis. **Therapie**, Paris, v.5, n.56, p.455-463, 2001.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 77, n. 7, p. 527-543, 1999.

FLINT, A.P.F.; HENVILLE, A.; CHRISTIE, W.B. Presence of placental lactogen in bovine conceptuses before attachment. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, p. 305-308, 1979.

FLOOD, P.F. The development of conceptus and its relationship to the uterus *In*: CUPPS, P.T. (Ed.) **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic Press, 1991, p. 315-56.

GALOSY, S.S.; GERTLER, A.; ELBERG, G.; LAIRD, D.M. Distinct placental lactogen and prolactin (lactogen) receptors in bovine endometrium. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 78, p. 229-236, 1991.

GEISERT, R.D.; MORGAN, G.L.; SHORT, E.C.; ZAVY, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 4, p. 301-305, 1992.

GERTLER, A.; DJIANE, J. Mechanism of ruminant placental action: molecular and in vivo studies. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 75, p. 189-201, 2002.

GOOTWINE, E. Placental hormones and fetal-placental development. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 551-566, 2004.

GREENSTEIN, J.S.; MURRAY, R.W.; FOLEY, R.C. Observations of the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, New York, v. 132, p. 321-25, 1958.

GREGORASZCZUK, E.L.; ZIBA, D.; WIERZCHO, E.; MURAWZKI, M.; GERTLER, A. Placental lactogen as a regulator of luteal cells function during pregnancy in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, n. 4, p. 877-885, 2000.

GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 38, p. 1027-34, 1988.

HANSEN, P.J. Rescue of the corpus luteum from luteolysis by bovine trophoblast protein-1: an example of maternal recognition of pregnancy. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 3, /supl. 1/, p. 42-65, 1991.

HELMER, S.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; JOHNSON, J.W.; BAZER, F.W. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 87, p. 89-101, 1989.

HELSKE, S.; VUORELA, P.; CARPÉN, O.; HORNING, C.; WEICH, H.; HALMESMAKI, E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 205-210, 2001.

HERRLER, A.; RANGO, U.V.; BEIER, H.M. Embryo-maternal signaling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 244-256, 2003.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LeBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 6-13, 2002.

HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J.R.; SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine

pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 55-63, 2002.

HILL, J.R.; ROUSSEL, A.J.; CIBELLI, J.B.; EDWARDS, J.F.; HOOPER, N.L.; MILLER, M.W.; THOMPSON, J.A.; LOONEY, C.R.; WESTHUSIN, M.E.; ROBL, J.M.; STICE, S.L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

HOFFERT, K.A.; BATCHELDER, C.A.; BERTOLINI, M.; MOYER, A.L.; ANDERSON G.B. Angiogenesis in cloned and IVF-derived bovine pregnancies at Day 30 of gestation. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 16, p. 143, 2004.

HOOPER, S.B.; WATKINS, W.B.; THORBURN, G.D. Oxitocyn, oxitocyn-associated neurophysin and prostaglandin F₂ α concentrations in the utero-ovarian vein of pregnant and non-pregnant sheep. **Endocrinology**, Baltimore, v. 119, p. 2590-97, 1986.

HORIKOSHI, T.; SAKAKIBARA, M. Quantification of relative mRNA expression in the rat brain using simple RT-PCR and ethidium bromide staining. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 99, p. 45-51, 2000.

JAENISCH, R.; WILMUT, I. Developmental biology. Don't clone humans! **Science**, Washington, v. 291, p. 2552, 2001.

JONKER, F.H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 415-430, 2004.

KAMAT, B.R.; BROWN, L.F.; MANSEAU, E.J.; SENGER, 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. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 146, n. 1, p. 157-165, 1995.

KAPPES, S.M.; WARREN, W.C.; PRATT, S.L.; LIANG, R.; ANTHONY, R.V. Quantification and cellular localization of ovine placental lactogen messenger ribonucleic acid expression during mid- and late gestation. **Endocrinology**, Baltimore, v. 131, n. 6, p. 2829-2838, 1992.

KESSLER, M.A.; DUELLO, T.M.; SCHULER, L.A. Expression of prolactin-related hormones in the early bovine conceptus, and potential for paracrine effect on the endometrium. **Endocrinology**, Baltimore, v. 129, p. 1885-1895, 1991.

KESSLER, M.A.; SCHULER, L.A. Structure of the bovine placental lactogen gene and alternative splicing of transcripts. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 10, n. 2, p. 93-104, 1991.

KEYT, F. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and Flt-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 10, p. 5638-5646, 1996.

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 200, p. 229-37, 1999.

KLISCH, K.; SCHULER, G.; MIGLINO, M.A.; LEISER, R. Genome multiplication in trophoblast giant cells of sheep, goat, water buffalo and deer: an image cytometric study. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 35, p. 145-48, 2000.

KRUIP, T.A.M.; DEN DAS, J.H.G. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p. 43-52, 1997.

KURZ, H.; ZECHNER, U.; ORTH, A.; FUNDELE, R. Lack of correlation between placenta and offspring size in mouse interspecific crosses. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 200, p. 335-343, 1999.

LANDIM Jr., L.P. **Isolamento caracterização e cultivo *in vitro* de células binucleadas trofoblásticas de placentônios bovinos**. 2002. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

LEE, R.S.; PETERSON, A.J.; DONNISON, M.J.; RAVELICH, S.; LEDGARD, A.M.; LI, N.; OLIVER, J.E.; MILLER, A.L.; TUCKER, F.C.; BREIER, B.; WELLS, D.N. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, p. 1-11, 2004.

LUCY, M.C.; BYATT, J.C.; CURRAN, T.L.; CURRAN, R.J.; COOLIER, R.J. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 50, n. 5, p. 1136-1144, 1994.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 175-1780, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; FISHER, P.A. Progesterone control of interferon- τ production during early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series**, Cambridge, v. 21, abst. 37, 1998.

MATAMOROS, R.A.; CAAMANO, L.; LAMB, S.V.; REIMERS, T.J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, p. 486-92, 1994.

McCRAKEN, J.A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF 2α from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 7, p. 31-55, 1984.

McEVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 38, p. 268-275, 2003.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, J.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F 2α of cows in response to recombinant interferon- τ . **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 1921-31, 1995.

MIGLINO, M.A. Clonagem animal e placentação. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 31-33, 2004.

MILES, J.R.; FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, p. 1919-1926, 2004.

MILES, J.R.; FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. **Biology of Reproduction**. 2005. Disponível em <<http://www.bioreprod.org/cgi/content/abstract/bioreprod.105.040808v1>> acesso em: 17 jul. 2005.

MILOSAVLJEVIC, M.; DUELLO, T.M.; SCHULER, L.A. *In situ* localization of two prolactin-related messenger RNAs to binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 125, n. 2, p. 883-9, 1989.

MORAIS-PINTO, L. **Estrutura e função das células binucleadas de placenta de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*, L.1758)**. 2000. 45f. Tese (Doutorado em Anatomia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MORGAN, G.; WOODING, F.B.P.; BECKERS, J.F.; FRIESEN, H.G. An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 86, n. 2, p. 745-52, 1989.

NAKANO, H.; SHIMADA, A.; IMAI, K.; TAKEZAWA, T.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. Bovine trophoblastic cell differentiation on collagen substrata: formation of binucleate cells expressing placental lactogen. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 307, n. 2, p. 225-235, 2002.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, p. 9-22, 1999.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W.A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v. 4, p. 29-38, 2002.

NISHIZUKA, Y.; TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; KIKKAWA, U.; KAIBUSH, K. Phospholipid turnover in hormone action. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 40, p. 301-345, 1984.

NODEN, D.M.; De LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1985, 274p.

ONG, S. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 14, n. 6, p. 969-980, 2000.

PATEL, O.V.; HIRAKO, M.; TAKAHASHI, T.; SASAKI, N.; DOMEKI, I. Plasma bovine placental lactogen concentration throughout pregnancy in the cow; relationship to stage of pregnancy, fetal mass, number and postpartum milk yield. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 13, n. 4, p. 351-9, 1996.

PATEL, O.V.; YAMADA, O.; KIZAKI, K.; TODOROKI, J.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; SCHULER, L.A.; HASHIZUME, K. Temporospacial expression of placental lactogen and prolactin-related protein-1 genes in the bovine placenta and uterus during pregnancy. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 69, p. 146-152, 2004a.

PATEL, O.V.; YAMADA, O.; KIZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; TAKAHASHI, S.; IZAIKE, Y.; SCHULER, L.A.; TAKEZAWA, T.; HASHIZUME, K. Expression of

trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-clone bovine pregnancies. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, p. 1114-1120, 2004b.

PATEL, O.V.; YAMADA, O.; KIZAKI, K.; TAKASHI, T.; IMAI, K.; TAKAHASHI, S.; IZAIKE, Y.; SCHULER, L.A.; TAKEZAWA, T.; HASHIZUME, K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy related genes in somatic cell cloned bovine pregnancies. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1114-1120, 2003.

PEREIRA, F.T.V. **Desenvolvimento do placentônio em búfalos (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758)**. 2000, 76f. Dissertação (Mestrado em Anatomia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.

RAVELICH, S.R.; SHELLING, A.N.; RAMACHANDRAN, A.; REDDY, S.; KEELAN, J.A.; WELLS, D.N.; PETERSON, A.J.; LEE, R.S.F.; BREIER, B.H. Altered placental lactogen and leptin expression in placentomes from bovine nuclear transfer pregnancies. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, p. 1862-1869, 2004.

REIMERS, T.J.; ULLMANN, M.B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 33, p. 1227-36, 1985.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; VONNAHME, K.A.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; CATON, J.S. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. **Journal of Physiology**, Paris, v. 565, n. 1, p. 43-58, 2005.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, p. 1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 1839-1851, 1995.

ROBERTS, R.M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 54, p. 294-302, 1996.

SANTOS, R.L.; MARQUES JR, A.P.; BARRETO FILHO, J.B. Proporção volumétrica dos componentes estruturais do placentônio de vacas leiteiras com liberação normal e retenção de placenta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 3, p. 317-24, 1996.

SCHLAFKE, S.; ENDERS, A.C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 12, p. 41-65, 1975.

SCHULER, L.A.; SHIMOMURA, K.; KESSLER, M.A.; ZIELER, C.G.; BREMEL, R.D. Bovine placental lactogen: molecular cloning and protein structure. **Biochemistry**, New York, v. 27, p. 8443-8448, 1988.

SOARES, M.J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p. 51-66, 2004.

SPENCER, T.E.; GRAY, A.; JOHNSON, G.A.; TAYLOR, K.M.; GERTLER, A.; GOOTWINE, E.; OTT, T.L.; BAZER, F.L. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, p. 1409-18, 1999.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W., Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p. 49-63, 2004.

STACKER, S.A.; ACHEN, M.G. The vascular endothelial growth factor family: signalling for vascular development. **Growth Factors**, New York, v. 17, p. 1-11, 1999.

STEVEN, D.H.; MALLON, K.A.; NATHANIELSZ, P.W. Sheep trophoblast in monolayer cell culture. **Placenta**, London, v. 1, n. 3, p. 209-21, 1980.

STICE, S.L.; STRELCHENKO, N.S.; KEEFER, C.L.; MATHEWS, L. Pluripotent bovine embryonic development following nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 54, p. 100-110, 1996.

TAVERNE, M.A.M.; BREUKELMAN, S.P.; PERÉNYI, Z.; DIELEMAN, S.J.; VOS, P.L.A.M.; JONKER, H.H.; RUIGH, L.; LEEUW, J.M.W.; BECKERS, J.F. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. **Reproduction Nutrition Developpment**, Paris, v. 42, p. 613-624, 2002.

THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, p. 131-40, 1997.

THATCHER, W.W.; MEYER, M.D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 15-28, 1995.

TILGHMAN, S.M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. **Cell**, Cambridge, v. 96, p. 185-193, 1999.

USHIZAWA, K.; HERATH, C.B.; HANEYAMA, K.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; OCHIAI, K.; TOKUNAG, T.; TSUNODA, Y.; TSUJIMOTO, G.; HASHIZUME, K. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p. 77-92, 2004.

WANGO, E.O.; WOODING, F.B.P.; HEAP, R.B. The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. **Journal of Anatomy**, London, v. 171, p. 241-57, 1990.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, p. 355-364, 2000.

WILMUT, I.; BEAUJEAUN, N.; de SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, London, v. 419, p. 583-586, 2002.

WILSON, M.E. Role of placental function in mediating conceptus growth and survival. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, suppl. 2, p. E195-E201, 2002.

WINSATT, A.W. Observations on the morphogenesis, histochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 159, n. 2, p. 209-43, 1980.

WOODING, F.B.P.; WATHES, D.C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 59, p. 425, 1980.

WOODING, F.B.P. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, suppl. 31, p. 31-9, 1982.

WOODING, F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, London, v. 13, p. 101-13, 1992.

WOODING, F.B.P.; HOBBS, T.; MORGAN, G.; HEAP, R.B.; FLINT, A.P. Cellular dynamics of growth in sheep and goat synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 98, p. 275-83, 1993.

WOODING, F.B.P. & FLINT, A.P.F. Placentation, in G.E. Laming (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction, Part I*, v. 3, Chapman and Hall, London, 1994, p.233-60.

WOODING, F.B.P.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R.B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence of two populations of

fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, London, v. 17, p. 75-86, 1996.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 17, n. 2, p. 23-35, 2005.

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 309-317, 2001.

XIAO, C.W.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 115, p. 101-109, 1999.

YOUNG, L.E.; FAIRBURN, H.R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, p. 627-648, 2000.

YOUNG, L.E.; FERNADES, K.; McEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CARLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WIMUT, I.; SINCLAIR, K. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, New York, v. 27, p. 153-154, 2001.

ZIMMERMANN, R.C.; HARTMAN, T.; BOHLEN, P.; SAUER, M.V.; KITAJEWSKI, J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. **Microvascular Research**, San Diego, v. 1, n. 62, p. 15-25, 2001.

ZOLI, A.P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J.F.; REZNIK, M.; BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 46, p. 623-9, 1992.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MUNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O.D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 110, suppl. 1, p. S10-S18, 2003.

9. APÊNDICES

Apêndice 1. Extração de RNA total de tecidos

01. Homogeneizar as amostras de tecido em um cadinho, com auxílio de um pistilo. Caso necessário, utilizar nitrogênio líquido até a amostra congelar-se e, em seguida, com a utilização do pistilo, triturar a amostra, obtendo um material mais homogêneo;
02. Acondicionar 100mg do tecido homogeneizado em um tubo contendo 1mL de reagente Trizol^{®1} (Invitrogen, USA) e agitar vigorosamente com auxílio de vórtex;
03. Incubar os tubos em temperatura ambiente durante 5 minutos e, em seguida, adicionar 0,2mL de clorofórmio e agitar vigorosamente com auxílio de vórtex;
04. Incubar os tubos em temperatura ambiente durante 3 minutos e, em seguida, centrifugar a 2000 x g por 15 minutos a 2-8°C;
05. Após a centrifugação forma-se um gradiente contendo uma fase inferior (vermelha), uma fase intermediária (branca) e uma fase superior (aquosa e incolor), contendo as moléculas de RNA;
06. Transferir cuidadosamente a fase incolor para um novo tubo e precipitar o RNA com 0,5ml de álcool isopropílico, incubando-o por 10 minutos em temperatura ambiente;
07. Centrifugar os tubos a 12000 x g por 10 minutos a 2-8°C;
08. Remover o sobrenadante e lavar o RNA precipitado (semelhante a um gel esbranquiçado) com 1mL de solução de etanol 75%, homogeneizando suavemente;
09. Centrifugar a 7500 x g por 5 minutos a 2-8°C, retirar o sobrenadante e deixar secar (não completamente) o RNA precipitado no interior de fluxo laminar;

10. Adicionar 50 μ L de água DEPC, homogeneizar e incubar por 10 minutos a 55-60°C, e, em seguida, armazenar as amostras a -80°C.

Apêndice 2. Técnica de Radioimunoensaio para dosagem de PGF2 α em meio de cultura.

A técnica de mensuração de PGF2 α usando o radioisótopo Trício (^3H) foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi feito o ensaio propriamente dito onde a curva padrão e as amostras foram pipetadas e colocadas em tubos, posteriormente acrescidos de solução tampão Tris-HCl 0.05M (Fisher BB153-1) com pH 7,5, anticorpos e antígeno marcado com ^3H , incubados por 12 a 16 horas, a 4°C. A segunda etapa constitui da separação do antígeno ligado do não-ligado aos anticorpos, utilizando-se uma solução de carvão (Sigma C334) e Dextran (Sigma D4751), seguido pela adição de líquido de cintilação. As contagens foram realizadas em um contador de partículas beta.

Para validação da técnica, preparou-se uma curva padrão contendo tampão Tris-HCl 0.05M pH 7,5 adicionado de quantidades conhecidas de PGF2 α não radioativa (15.1; 31.2; 62.5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000 pg/mL).

Os ensaios foram realizados em tubos de vidro 12 x 75mm (Fisher 14-961-26), identificados de acordo com as amostras a serem analisadas, sendo que, por ensaio, o número máximo de tubos é de 198.

Pipetou-se 280 μL de Tris-HCl nos tubos referentes ao NSB (1 a 3), TC (4 a 6) e Bo (7 a 9). Em seguida, nos tubos referentes à curva padrão (10 a 29), pipetou-se 100 μL das diferentes diluições de PGF2 α , em duplicata. As soluções de referência de PGF2 α foram pipetadas em duplicata: 250pg/mL (30 e 31), 1000pg/mL (32 e 33), 3500pg/mL (34 e 35) e em seguida pipetou-se as amostras a serem mensuradas (36 a 192). Finalmente, pipetou-se as soluções referência de PGF2 α 250pg/mL, 1000pg/mL e 3500pg/mL, em duplicata, nos seis últimos tubos do ensaio.

Adicionou-se 20 μL de meio Ham F10 (Sigma N6635) aos tubos NSB (1 a 3), Bo (7 a 9), nos referentes à curva padrão (10 a 29) e referências (30 a 35 e 6 últimos tubos), e 80 μL de Tris-HCl nos tubos referentes à curva, referências e às amostras.

Em seguida preparou-se uma solução de anticorpo para PGF2 α cuja diluição atingisse uma porcentagem de ligação de aproximadamente 30% com a PGF2 α , baseando-se na seguinte fórmula: Volume Inicial (quantidade de solução de Ac 1/100 a ser colocada na solução) x Concentração Inicial (1/100) = Volume Final (quantidade de solução contendo Ac que deverá ser preparada para todo o ensaio) x Concentração Final (1/4000).

Uma solução de PGF2 α marcada com ^3H foi preparada numa concentração tal que os tubos TC apresentassem uma contagem radioativa de aproximadamente 15000 DPM (desintegrações por minuto).

Pipetou-se 100 μL de solução de anticorpo previamente preparada em todos os tubos, exceto nos NSB e TC (tubos 1 a 6). Logo após, adicionou-se 100 μL de solução de PGF2 α marcada em todos os tubos, agitando-se por 1 minuto, incubando-os em temperatura ambiente por 30 minutos e a 4°C por 12 a 16 horas.

Após o período de incubação (2º dia), separou-se e acondicionou-se os tubos TC a 4°C e adicionou-se 500 μL de uma solução de Carvão-Dextran (0.25g de carvão ativado, 0,025g de dextran e 100mL de solução tampão Tris-HCl) nos tubos remanescentes. Centrifugou-se os tubos a 2900 x g durante 15 minutos a 4°C e, em seguida, adicionou-se 500 μL de solução tampão nos tubos TC.

Finalizada a centrifugação, o conteúdo dos tubos de vidro foi vertido em tubos plásticos próprios para contagem (Sarstedt 58536), previamente identificados. Adicionou-se 4mL de líquido de cintilação (OPTIPHASE "HI SAFE" 3, Wallac®), que foram fechados com tampas apropriadas (Sarstedt 65802), agitados para homogeneizar os reagentes e acomodados em estantes para serem levados ao contador de Radiação beta (Wallac®, modelo 1409-11) para leitura.

Após a leitura da radiação de cada tubo pelo contador, os resultados foram transferidos para uma planilha do programa "Quatro Pro", que monta uma curva padrão, utilizada pra transformar os dados em DPM para pg/mL de PGF2 α . A partir dos dados da curva padrão elaborou-se uma equação de regressão que relacionou as quantidades de ligante com as contagens radioativas obtidas. A

concentração de ligante nas amostras foi obtida substituindo-se o valor da contagem na equação de regressão.

Apêndice 3.

Descrição dos primers e sondas utilizados para estudo da expressão gênica relativa pelo sistema TaqMan[®] de detecção.

GAPDH

Primer F (5' – 3') AAG GCC ATC ACC ATC TTC CA

Primer R (5' – 3') CCA CTA CAT ACT CAG CAC CAG CAT

Sonda(5' – 3') AGC GAG ATC CTG CCA ACA TCA AGT GGT (FAM)

LP

Primer F (5' – 3') GTG GAA ATG ATA CAA AAA AGG GTT CAT

Primer R (5' – 3') CAT CCT CAT CGT CTG CTG TCA

Sonda (5' – 3') AGA ACG AGC CCT ATC CAG TGT GGT CAG A (VIC)

VEGF

Primer F (5' – 3') GCA GAT TAT GCG GAT CAA ACC T

Primer R (5' – 3') TTC TTT GGT CTG CAT TCA CAT TTG T

Sonda (5' – 3') ACC AAA GCC AGC ACA TAG GAG AGA TGA GCT (VIC)