

TRANSPORTE PLACENTÁRIO VIA CAVÉOLA NA PLACENTA DE BOVINOS CLONADOS E TRANSGÊNICOS

KENYA COSTA PERES

Zootecnista

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

TRANSPORTE PLACENTÁRIO VIA CAVÉOLA NA PLACENTA DE BOVINOS CLONADOS E TRANSGÊNICOS

Kenya Costa Peres

Orientadora: Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira

Dissertação apresentada ao Câmpus Experimental de Dracena – Unesp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Animal.

2014

P437t Peres, Kenya Costa.
Transporte placentário via cavéola na placenta de bovinos clonados e transgênicos/ Kenya Costa Peres. – Dracena : [s.n.], 2014.
44 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena/Campus de Ilha Solteira. Dracena/Ilha Solteira, SP, 2014.
Bibliografia.

1. Placenta. 2. Bovino - Reprodução. 3. Bovino – Inseminação artificial. I. Título.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Transporte placentário via cavéolas na placenta de bovinos clonados e transgênicos

AUTORA: KENYA COSTA PERES
ORIENTADORA: Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal , Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERECHIA PEREIRA
Coordenadoria Executiva / Unidade de Dracena

Profa. Dra. CRISTIANA ANDRIGHETTO
Campus Experimental de Dracena / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Profa. Dra. VANESSA GOMES UENO
Etec Engenheiro Herval Bellusci / Centro Estadual de Educacao Tecnologica Paula Souza

Data da realização: 26 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kenya Costa Peres - nascida em 06 de junho de 1986, na cidade de Catanduva/SP-Brasil, filha de Neusa da Costa Peres e José Valter Peres. Em julho de 2010 concluiu a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista ¨Júlio de Mesquita Filho¨- Câmpus Experimental de Dracena, UNESP – Brasil. Durante a graduação realizou experimentos na área de Forragicultura, também participou de projetos de extensão sendo bolsista Proex como professora de matemática do cursinho da UNESP e também do Projeto de Integração Social aos Idosos. Durante o ano de 2009 realizou treinamento técnico na área de histologia no Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião (L@mpe) da UNESP – Câmpus de Dracena. Durante os meses de novembro de 2010 a dezembro de 2011, prestou serviços no Zoológico Municipal de Catanduva e durante o ano de 2011 trabalhou como professora no Colégio Técnico Multipla Escolha na cidade de Catanduva. Em março de 2012 iniciou-se no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista ¨Júlio de Mesquita Filho¨- Programa Interunidades do Câmpus Experimental de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de Tecnologia de Ruminantes, como bolsista da CAPES, submetendo-se a banca em 26 de fevereiro de 2014.

.

Dedico

Primeiramente aos meus queridos pais, José Valter Peres e Neusa da Costa Peres, pois sem eles minha formação profissional não poderia ter sido concretizada, e que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus a força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

À minha irmã, Kesya Costa Peres, pelos maiores incentivos que já recebi, além do amor incondicional e da paciência pelas horas de desabafo ao telefone.

Às minhas melhores amigas, Fernanda Rinaldo Amaro e Fernanda Rita Sartorato, que mesmo longe se fazem tão perto de mim, nunca me deixando desamparada.

À minha irmã-amiga Luciana Pereira Hamaji, pelas risadas e pelo companheirismo do dia-a-dia, por dar total apoio acadêmico e na vida para a almejada formação integral.

E por último e não menos importante dedico a minha gatinha Nala que foi quase como um cachorro, ¨melhor amigo do homem".

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho expresso aqui a minha gratidão e o carinho.

Agradeço primeiramente a Deus por ter proporcionado o início da minha carreira acadêmica.

Ao incentivo da minha orientadora queridíssima, Professora Flávia Thomaz Verechia Pereira, para iniciar no mestrado. Pela compreensão, pela competência, pelo aprendizado, pelas orientações, pela dedicação e paciência e, sobretudo, pela nossa amizade que veio sendo construída desde o tempo da graduação onde tivemos o primeiro contato. Obrigada por ensinar à pessoa que sou hoje. Você sempre estará em meu coração.

Ao Grupo do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião "L@MPE", a técnica de laboratório Miriam Faria e os amigos colaboradores, Vitor Trinca, Luciana Pereira Hamaji, Fernanda Paes de Oliveira, por propiciar momentos de debates, trocas, conversas, que contribuíram significativamente para o início do acervo da literatura e do desenvolvimento da minha dissertação.

Ao pessoal da biblioteca, Fábio Sampaio Rosas, Fábio Henrique Gandolfi e Ligia Fernanda Colombo, pelo carinho, por ajudar com as pesquisas, além de ter se dedicado a ler e auxiliar na minha qualificação.

Aos meus amigos da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em especial, Paty Luz, Paty Andrade, Andréia Tieme, Janaíne, João Henrique, André e Tarcísio, por darem total apoio acadêmico e na vida para a almejada formação integral.

Aos meus amigos Lais Souza Franson, Jhonny Estefâny dos Santos, Fernanda Rinaldo Amaro, Fernanda Rita Sartoratto, pelo total apoio e carinho nas horas mais difíceis desses últimos anos.

Meus sinceros agradecimentos a Unesp e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal das unidades de Ilha-Solteira e Dracena, pela atenção, apoio e profissionalismo.

Meus agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro para a execução das minhas atividades acadêmicas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção deste conhecimento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO....1
2. REVISÃO DE LITERATURA....3
2.1 Placenta e Placentação....3
2.1.1. Membranas Fetais....6
2.1.2. Cavéola....7
2.1.3. Caveolina....11
2.1.4. Outras Aplicações....13
3. OBJETIVOS....14
4. MATERIAL E MÉTODOS....14
4.1. Obtenção das células expressando GFP....14
4.1.1. Produção de embriões recombinantes....15
4.2. Imuno-histoquímica....18
5. RESULTADOS....20
6. DISCUSSÃO....31
7. CONCLUSÃO....34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....35

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Campus de Dracena
Faculdade de Zootecnia

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão da proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de células de origem fetal em gestações de clones bovinos", protocolo nº 002/2006, sob a responsabilidade da Profa Dra Flávia Thomaz Verechia Pereira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Zootecnia da Unesp Dracena.

(We certify that the Project "Expression of the green fluorescent protein (GFP) how marker of the cells of fetal origin in cloned cattle gestation", protocol number 002/2006, under the responsibility of the Dr Flávia Thomaz Verechia Pereira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethics in Animal Research Committee of the Faculty of Zootecny of Unesp Dracena).

Dracena, 11 de abril de 2006

Fábio E Mingatto

Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto
Membro da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Flávia Thomaz Verechia Pereira

Profa Dra Flávia Thomaz Verechia Pereira
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
Unesp Dracena

Rod. Com. João Ribeiro de Barros (SP 294) km 651 - Dracena – SP CEP: 17900-000

PERES, K. C. Transporte Placentário Via Cavéolas na Placenta de Bovinos Clonados e Transgênicos. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Dracena, 2013.

RESUMO - A utilização da transgenia com a proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de células de origem fetal nas placentas de clones bovinos servirá de modelo inédito para estudo morfofisiológico e imunológico da interação materno-fetal, visto que possibilitará o seu mapeamento, diferenciando as células fetais das maternas. Tal modelo terá aplicação direta, principalmente porque estes são animais que apresentam problemas em relação ao seu desenvolvimento. Com o auxílio deste modelo, pretende-se verificar o transporte de substâncias entre a mãe e o feto via endocitose, pela imunolocalização das proteínas chamadas de caveolinas. Para tanto foram utilizados 06 bovinos clonados e 30 bovinos de inseminação artificial (IA) com idade até 90 dias de gestação, os quais tiveram seu desenvolvimento interrompido mediante abate humanitário das receptoras e ovariosalpingohisterectomia, com posterior recuperação do útero gestante. Foram coletados os placentônios e o cório. Uma parte das amostras foi recortada e fixada, por imersão, em solução de parafolmaldeído a 4% ou formoldeído a 10% em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M pH 7.4, solução de Zamboni (4% de paraformoldeído, 15% de ácido pícrico, em tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7.4), metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio, e 10% de ácido acético glacial), para verificação da morfologia e realização de imuno-histoquímica para as proteínas caveolinas -1 e -2 (CAV -1 e CAV-2). As caveolinas -1 foram localizadas nos vilos fetais e maternos, mas sua marcação mais forte foi observada no estroma endometrial. As caveolinas -2 tiveram marcação positiva no trofoblasto e membrana corioalantoide, e, especificamente em célula trofoblástica gigante binucleada. Sendo assim, os resultados mostram que a proteína CAV-1 teve uma maior expressão em relação a proteína CAV-2 e que as proteínas CAV-1 e -2 são parte da composição das cavéolas, sendo estruturas importantes e relacionadas com a transferência de moléculas para o feto, realizando a nutrição do mesmo mediante endocitose e pinocitose.

Palavras-chave: cavéola, caveolina, placentação, imunolocalização.

PERES, K. C. Placental transport through caveolae in cloned transgenic placenta cattle. 2013. Dissertation (Masters in Animal Science and Technology) – São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Dracena, 2013.

ABSTRACT - The transgenic application of green fluorecent protein (GFP) as fetal cell marker on cattle cloned placenta could provide an exclusive model for studying the morphologic and immunologic maternal-fetal interactions, providing information about its mapping, distinguishing the fetal from maternal cells. This model will have direct application, mainly because these are animals that present problems during its development. With this model's support, we intend to verify the substances transport between mother and fetus during endocytocis, through the immunolocalization of protein named caveolae. For these, we used 06 cloned bovine and 30 cattle samples of artificial insemination (AI) with 90 days of pregnancy, which had been their development interrupted by humanitarian slaughter of the recipient and recovery of the pregnant uterus. We collected the placentome and the chorion. A part of the samples will be cutted and fixed, by immersion, on a solution containing 4% of parafomaldehyde or 10% of formaldehyde on a sodium phosphate buffer (PBS) at 0,1M pH 7.4, Zamboni solution (4% of paraformaldehyde, 15% of picric acid, on sodium phosphate buffer 0,1M pH 7.4), metacarn (60% of metanol, 30% of chloroform, and 10% glacial acetic acid), for morphologic and immunohistochemistry verification for caveolinas proteins -1 and -2 (-1 CAV and CAV- 2). The caveolinas -1 were found in fetal and maternal villi , but its strongest staining was observed in the endometrial stroma . The caveolinas -2 had positive staining in trophoblast and chorioallantoic membrane , and specifically in giant trophoblastic binucleated cell . therefore the results were compared between cloned cattle and from AI or natural mating, for assisting on detection of the reason of many placental alterations, embryonic losses, spontaneous abortion, post-natal mortality and large offspring syndrome on laboratory-manipulated animals. The result suggests that the proteins caveolins -1 and -2 (CAV-1 and CAV-2) are part of the caveolae composition and important structures related to the molecule transfer to the fetus, nourish it through endocytosis and pinocytosis.

Keywords: caveolae, caveolin, placentation, immunolocalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As pregas amnióticas foram completamente fundidas, resultando na formação de uma camada dupla ao redor do embrião. A membrana interior é constituída por trofoderma e é chamada o âmnio. Cria-se a cavidade amniótica. O córion envolve completamente o concepto. O alantóide continua a expandir e começa a preencher os espaços da cavidade. O alantóide e o cório se fundirão formando o corioalantóide. O saco vitelino continua a regredir. (Adaptado de SENGER, 2003). 5

Figura 2. Cavéola: Definição morfológica e plasticidade. A- cavéola pode existir em diversas formas alternativas em relação às invaginações de membranas tradicionais. Elas podem ser encontradas em forma de vesículas ou agregações como “cachos de uva”, rosetas, e formas tubulares. De fato, as células endoteliais, alongadas em tubos podem, muitas vezes, alcançar a fase luminal criando um canal trans-celular. B- duas eletron micrograficas, um adipócito (mostrado à esquerda) e a célula endotelial (à direita). Aumento de 16.000X. Observe rosetas caveolares nos adipócitos e as invaginações caveolares associadas à membrana das células endoteliais, RBC: célula sanguínea vermelha. (adaptado de RAZANI et al., 2002). 9

Figura 3. Modelo esquemático de organização dos lipídeos e das cavéolas na membrana plasmática. A- representação da organização dos lipídeos de membrana em estado ordenado enriquecido com colesterol (amarelo), esfingolipídeo (laranja) e fosfolipídeos (verde). B- cavéola com aspecto invaginante e composta por caveolinas (rosa). (RAZANI et al, 2002). 10

Figura 4. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 53 dias de gestação, animal de gestação natural; interdigitações materno-fetais. A, B, C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). D: controle negativo sem marcação. Barra= 5µm. 22

Figura 5. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 60 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm.....23

Figura 6. Fotomicrografia Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 60 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). B e D: controles negativos sem marcação. Barra figura A= 20µm. Barra figura B= 20µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 100µm.....24

Figura 7 Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino (cabeça de seta). B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm. 25

Figura 8 Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A B e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*).D : controle negativo sem marcação. Barra figura A= 200µm. Barra figura B= 100µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 100µm.....26

Figura 9. Imuno-histoquímica para a caveolina 2 em cório (C). A, B: 30 dias de gestação, gestação natural. A imunomarcação foi positiva para a caveolina 2 na célula trofoblástica gigante binucleada (setas) e mesênquima (M). Vaso sanguíneo fetal (v). B: mesmo animal; controle negativo sem marcação. Barra= 10µm.....27

Figura 10. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C e D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A, B e C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) D: controle negativo sem marcação. Barra figura A= 100µm. Barra figura B= 50µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 20µm.....28

Figura 11 Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino. B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm. 29

Figura 12 Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A, B E C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) D: controles negativos sem marcação. Barra figura A= 200µm. Barra figura B= 100µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 200µm 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados para testes imuno-histoquímicos na interação materno-fetal de conceptos de gestação natural e clonados transgênicos em diferentes estágios de gestação. Dracena – SP, 2012.....18

Tabela 2. Relação de tamanhos dos embriões bovinos clonados transgênicos expressando a proteína fluorescente verde – GFP (cm) e idade fetal (dias). Dracena, 2007.....18

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados para testes imuno-histoquímicos na interação materno-fetal de conceptos de gestação natural e clonados transgênicos em diferentes estágios de gestação. Dracena – SP, 2012.....18

LISTA DE SIGLAS

CAV-1 = caveolina 1

CAV-2 = caveolina 2

CAV-3 = caveolina 3

CIV = co-cultivados

DAB = peroxidase substrato

FGF2 = fator de crescimento de fibroblasto

FIV = Fertilização In Vitro

FRS = fator de crescimento de fibroblasto de substrato

FZEA-USP = Faculdade de Zootecnia e Engenharia Ambiental da Universidade de São Paulo

Gb3Cer = globotriaosilceramida

GFP = proteína de fluorescência verde

GM1 = gangliosideo

HCl - acido clorídrico

IA = Inseminação artificial

IGg = Imunoglubulina G

L@MPE = Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião

LMMD = Laboratório Morfofisiologia Molecular de Desenvolvimento

MIV = Maturação In Vitro

mm = micrômetro

$NAHCO_3$ = carboidrato de sódio

nm = nanômetro

PBS = Tampão Fosfato

TE = Transferência de Embrião

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos das raças denominadas zebuínas apresentam-se como maioria na pecuária brasileira. Segundo Faria (2002), um dos principais grupamentos zebuínos é representado pela raça Nelore. Introduzida no Brasil a partir do século XIX, é a raça mais numerosa, destacando-se no cenário nacional pela sua utilização quase que exclusiva para a produção de carne (CUNHA, 2006), sua rusticidade, alto desempenho reprodutivo, grande adaptabilidade ao clima tropical, resistência e fácil manejo, tem feito desta espécie a mais difundida no país.

Neste contexto, torna-se importante, tanto em machos, como em fêmeas, do completo conhecimento do ciclo reprodutivo dos bovinos que é totalmente ligado à sua morfologia, com finalidade de resolução de problemas observados tanto do ponto de vista econômico, como reprodutivo, podendo ser adequadamente, tratados e diagnosticados (ANUALPEC, 2013).

A placenta das diversas espécies de animais representa o veículo para trocas de nutrientes entre a mãe e o feto. Esta fonte de nutrientes pode ser hemotrófica, ou seja, diretamente dos capilares maternos, ou histiotrófica, cuja nutrição ocorre a partir de secreções das glândulas uterinas ricas em enzimas, citocinas, fatores de crescimento, íons, tais como o ferro, hormônios, glicose, proteínas de transporte e moléculas de adesão (GRAY et al., 2001a,b; CAZERTA, 2007).

Peter (2013) referiu-se a placenta bovina como um objeto para estudos. Ao mesmo tempo, utilizou termos para descrever o seu desenvolvimento, morfologia, componentes, função e patologia. Muitos dos termos utilizados são simples, alguns são difíceis de entender e usar, e outros são antiquados e não pode ser cientificamente precisos.

Durante várias décadas, diferentes grupos de pesquisa, buscando conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução e produção animal, bem como obter descendentes de animais geneticamente valiosos, estudaram a utilização de um conjunto de biotécnicas reprodutivas como ferramentas para a realização de tais objetivos. Seguindo esta temática, biotécnicas de última geração foram desenvolvidas, em especial, a transferência nuclear (TN) ou clonagem. O princípio da técnica reúne-se

em duas etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada (PEREIRA e FREITAS, 2009).

A clonagem animal representa sem dúvida um dos maiores avanços obtidos até hoje no campo da biotecnologia animal (MIGLINO, 2007).

Dentre as várias aplicações da técnica de clonagem, podem ser citadas aquelas que visam conhecer a interação núcleo-citoplasma na reprogramação nuclear. Além disso, a transferência nuclear atende a programas de melhoramento genético, pela multiplicação de animais com características genéticas desejáveis. A técnica também se apresenta como uma ferramenta para uso com técnicas de transgênese a partir da utilização de linhagens celulares que receberam genes específicos (BEHBOODI et al., 2002), tornando-se uma alternativa viável para a produção de animais transgênicos quando comparada aos métodos convencionais (ex.: microinjeção pró-nuclear (FREITAS et al., 2007a). Dessa forma, a transferência nuclear pode servir para a produção de animais transgênicos portadores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (FREITAS, 2006; FREITAS et al., 2007b).

Em nível microscópico, é via placentônio que a mãe e o feto se comunicam, utilizando mecanismos como a endocitose e a pinocitose para realizar a transferência de nutrientes. A endocitose e a pinocitose são realizadas mediante pequenas vesículas encontradas na membrana plasmática da célula, relatadas por Anderson (1998), que se caracterizam por invaginações na membrana plasmática, que são chamadas de cavéolas.

Uma leitura dos dados da literatura revela que muitos tipos celulares apresentam poucas cavéolas enquanto outros apresentam uma extraordinária abundância destas microorganelas (FREITAS, 2008).

As cavéolas apresentam duas principais famílias de proteínas, as cavinas e as caveolinas. A caveolina apresenta três isômeros, sendo, caveolina-1, -2 e -3. Essas são responsáveis pela estruturação e definição da morfologia da cavéola. A caveolina-1 faz parte do metabolismo de colesterol se ligando ao colesterol presente na cavéola e

ainda pode afetar o fluxo intracelular e extracelular do mesmo. a identificação de estruturas caveolares tem ocorrido em numerosos tecidos (TRINCA, 2013).

Dentro do contexto descrito acima, este trabalho visa analisar a marcação das proteínas caveolina-1, -2 envolvidas no transporte de substâncias transplacentárias, mediante imuno-histoquímica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Placenta e Placentação

A placenta é um órgão vital para a reprodução, o estudo de sua estrutura morfológica macroscópica e histológica assume grande importância prática, pois pesquisas nesta área podem fornecer subsídios para a intervenção mais eficaz em casos de patologias puerperais como: retenção de placenta, natimortos, abortamentos, distocias, falhas na implantação entre outras responsáveis pelo comprometimento do desempenho reprodutivo e da lucratividade. Tais alterações poderiam estar relacionadas a uma imperfeição da placenta durante seu desenvolvimento (OLIVEIRA, 2007).

A placenta é constituída por uma parte fetal e uma materna, sendo o único órgão formado por células de dois indivíduos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

A placenta de ruminantes é classificada como zonária, cotiledonária e sinepiteliocorial, devido à migração de células trofoblásticas gigantes binucleadas para o epitélio uterino (LEISER e KAUFMAN, 1994; CARVALHO et al., 2006; PEREIRA et al., 2010).

A avaliação da capacidade migratória de células trofoblásticas pode ser estudada com a utilização de animais transgênicos, no qual a expressão de um gene exógeno consegue marcar células de origens fetais que pode ser detectado em vários tecidos maternos (BRESSAN, 2011). Em bovinos clonados transgênicos ocorrem marcantes alterações tais como, anomalias acrossômicas, alocação anormal do número de células do botão embrionário e trofoectoderma e formação deficiente do fuso mitótico, que

provavelmente contribuem com suas baixas taxas de nascimento (em torno de 5%) (MIGLINO et al., 2007; MEIRELLES et al., 2010; BARRETO, 2011).

A placentação consiste na justaposição das vilosidades do cório fetal, denominada de porção fetal da placenta (*pars fetalis* da placenta), com as criptas da mucosa uterina (*pars uterina* da placenta) (GRUNERT e BIRGEL, 1989), o que acarreta alterações nas interfaces carunculares e cotiledonárias, resultando na placenta funcional e nos placentônios, unidades morfofuncionais formadas pelas carúnculas maternas e cotilédones fetais (KING E ATKINSON, 1987; LATSHAW, 1987; LEISER et al., 1997; PEREIRA, 2004; LACERDA, 2006).

Ramsey (1982) descreve o número de camadas teciduais que separam a circulação materna e fetal, os componentes fetais são: o endotélio, o mesênquima e o trofoblasto e os maternos são: o epitélio uterino, o tecido conjuntivo e o endotélio. No entanto Bjorkmam (1970) relata que esses tecidos não participam necessariamente da barreira física entre as duas circulações. Senger (2003) demonstra as estruturas distintas da placenta em desenvolvimento, as três estruturas possuem funções de órgãos de trocas entre o embrião em desenvolvimento e o endométrio uterino como demonstra a imagem abaixo (SENGER, 2003).

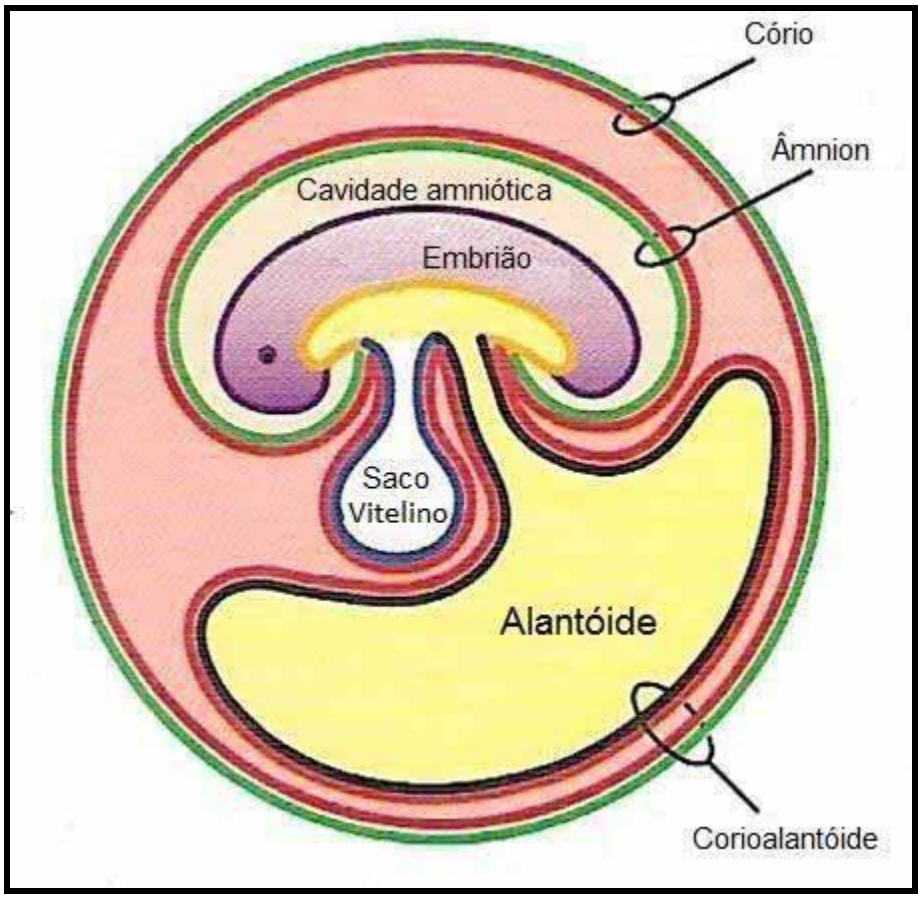


Figura 1. As pregas amnióticas foram completamente fundidas, resultando na formação de uma camada dupla ao redor do embrião. A membrana interior é constituída por trofoderma e é chamada o âmnio. Cria-se a cavidade amniótica. O cório envolve completamente o concepto. O alantoide continua a expandir e começa a preencher os espaços da cavidade. O alantoide e o cório se fundirão formando o corioalantoide. O saco vitelino continua a regredir. (Adaptado de SENGER, 2003).

A placenta foi descrita por Mossman (1987) como uma aposição entre o tecido parental (materno) a um tecido fetal com a finalidade de executar trocas fisiológicas. A placenta tem como função ótima nutrição em todas as fases do desenvolvimento fetal (GUDMUNDSSON et al., 2009; RIQUELME, 2009). Por isso pesquisadores há décadas vêm se preocupando com o transporte de moléculas da mãe para o feto, dentre vários pesquisadores (MALASSINE; FRENDO; EVAIN-BRION, 2003; WOODING; FLINT, 1994) descreveram que a placenta também apresenta funções como proteger o feto, geralmente alogênico, contra o sistema imune materno, bem como funções endócrinas, produzindo hormônios protéicos e esteroides essenciais no processo de comunicação materno-fetal durante o período de gestação, tais como os citados por Mossman

(1987); Leiser; Kaufmann (1994); Barreto (2011), estrógeno, progesterona e lactogenio placentário.

Além disso Leiser e Egloff (1990) observaram que a endocitose de material fluido (moléculas solúveis), pinocitose, é ultraestruturalmente evidente nas unidades de membrana basais e apicais de todas as barreiras placentárias epiteliais/endoteliais. As substâncias se tornam extremamente conectadas aos receptores (complexos ligantes-receptores) e então internalizam via invaginações da membrana da célula. A pinocitose é também muito comum na parte da célula apical do trofoblasto, sendo visível na placenta da gata no caso da ferritina ou pelo hemolisado existente naturalmente do hematoma placentário. O trofoblasto é capaz de realizar a eritrofagocitose, a qual permite que o embrião retire o ferro necessário dos hematomas placentários, como por exemplo, na placenta epitéliocorial da ovelha e cabra, sinepiteliocorial da búfala ou placenta endoteliocorial da gata (BURTON, 1986; SANTOS et al. 2003; PEREIRA, 2010; LEISER e EGLOFF, 1990).

Na placenta humana, uma grande quantidade de ferro é transferida rapidamente e unidirecionalmente da mãe para o feto, através da placenta e um dos primeiros eventos desta transferência é o que envolve a ligação do complexo transferrina-ferro materno na superfície da placenta e subseqüente transferência do ferro e liberação da transferrina novamente para a circulação materna. Por meio de marcação imunocitoquímica em microscopia eletrônica de transmissão foi detectada a presença de transferrina na superfície dos microvilos, bem como na superfície das invaginações pinocíticas (cavéola) da placenta humana (KING, 1976).

2.1.1. Membranas Fetais

De acordo com Peter (2013), a placenta é composta por membranas fetais: cório, âmnio, alantoide (juntos são denominados de membranas extra embrionárias), no qual três camadas são distintas de membranas justapostas e são observados: a camada externa representa o cório, a camada transparente ou intermédia representando o alantóide, e uma membrana fina, envolvendo o embrião, representando o âmnio. Com

funções de órgãos de trocas entre o embrião em desenvolvimento e o endométrio uterino (FABER e THORNBURG, 1983).

Assis Neto et. al (2009), demonstraram que embriões com idade aproximada entre 20 a 25 dias apresentam o cordão umbilical imperceptível ao olho nu, com o desenvolvimento embrionário aos 60 a 70 dias de gestação o cordão umbilical se apresenta mais aparente, com presença de vasos que se ramificam em direção as outras membranas.

O cório é o componente funcional de trocas do recente embrião, é derivado do trofoblasto, somatopleura e somato mesoderma, não é vascularizado. Esta estrutura está completa entre os 40 e 60 dias de gestação nos bovinos (PRESTES e ALVARENGA, 2006).

O alantóide começa a se desenvolver no 14° dia de gestação, derivado do intestino fetal, com aproximadamente 25 dias vasos sanguíneos ainda discretos visíveis aparecem no lado voltado para a parte ventral do embrião (PETER, 2013), fazendo contato com o cório para formar o alantocório vascularizado (SENGER, 2003; PRESTES e ALVARENGA, 2006).

Senger (2003), Geisert e Malayer (2004), ainda descrevem que o saco vitelino regride durante a segunda ou terceira semana de gestação à medida que o alantóide se expande para fusionar com o cório, formando a membrana corioalantoide.

2.1.2. Cavéola

Segundo Anderson (1998) a original intenção da palavra cavéola foi descrever invaginações da membrana na superfície da célula, mas as membranas com características morfológicas clássicas de cavéola não são encontradas em todas as células. Métodos de purificação, usando um marcador da proteína da cavéola, a caveolina, estabeleceram um novo critério para identificar essa membrana. Sua estrutura, função e composição molecular são dependentes das propriedades das membranas lipídicas. Todas as células possuem domínios de membrana plasmática com características biológicas de cavéola, mas somente um conjunto de membranas com tipo particular.

As cavéolas são micro estruturas encontradas de forma abundante na membrana plasmática de muitas células especializadas, incluindo células endoteliais, células epiteliais, e adipócitos (DÁVALOS et al., 2010). Com a microscopia atual, pode-se notar que há variedade morfológica destas estruturas de membranas, podendo assim estar dispostas em grupos denominados “rosetas” e/ou “cachos de uvas” (Figuras 2 e 3). Estes grupos podem estar próximos à membrana quanto dispersos no citoplasma em forma de vesículas. Ainda em função dessa variedade morfológica, são encontradas cavéolas também no formato de estruturas tubulares alongadas ou canais transcelulares que estão freqüentemente presentes em adipócitos e células endoteliais (RAZANI; WOODMAN; LISANTI, 2002).

As cavéolas atualmente são descritas como invaginações dispostas na forma de frasco ou de ômega, conectadas à membrana plasmática por finas estruturas pendiculares, é usado também o termo “vesículas lisas” ou “vesículas sem revestimento” para discriminar as vesículas recobertas de clatrina, proteína do citoesqueleto responsável pela endocitose, das vesículas caveolares, encontradas na superfície apical de várias células, inclusive no trofoblasto de macacos (ENDERS; HENDRICKX; SCHLAFKE, 1983), de búfalas (PEREIRA et al., 2010), do cervídeo *Capreolus capreolus* (AITKEN, 1974 e AITKEN 1975), da placenta humana (VIDRICAIRE; TREMBLAY, 2007). As cavéolas ainda estão envolvidas diretamente com a internalização de componentes de membranas (proteínas de ancoragem glicoesfingolipídicas e glicoesfingofosfatoidilinositol), ligantes extracelulares (ácido fólico, albumina, fatores de motilidade autócrina), toxinas de bactérias vírus não-envelopados. Ao contrário da endocitose mediada pela clatrina, a internalização através da cavéola é um evento deflagrado por complexa sinalização (PELKMANS; HELENIUS, 2002).

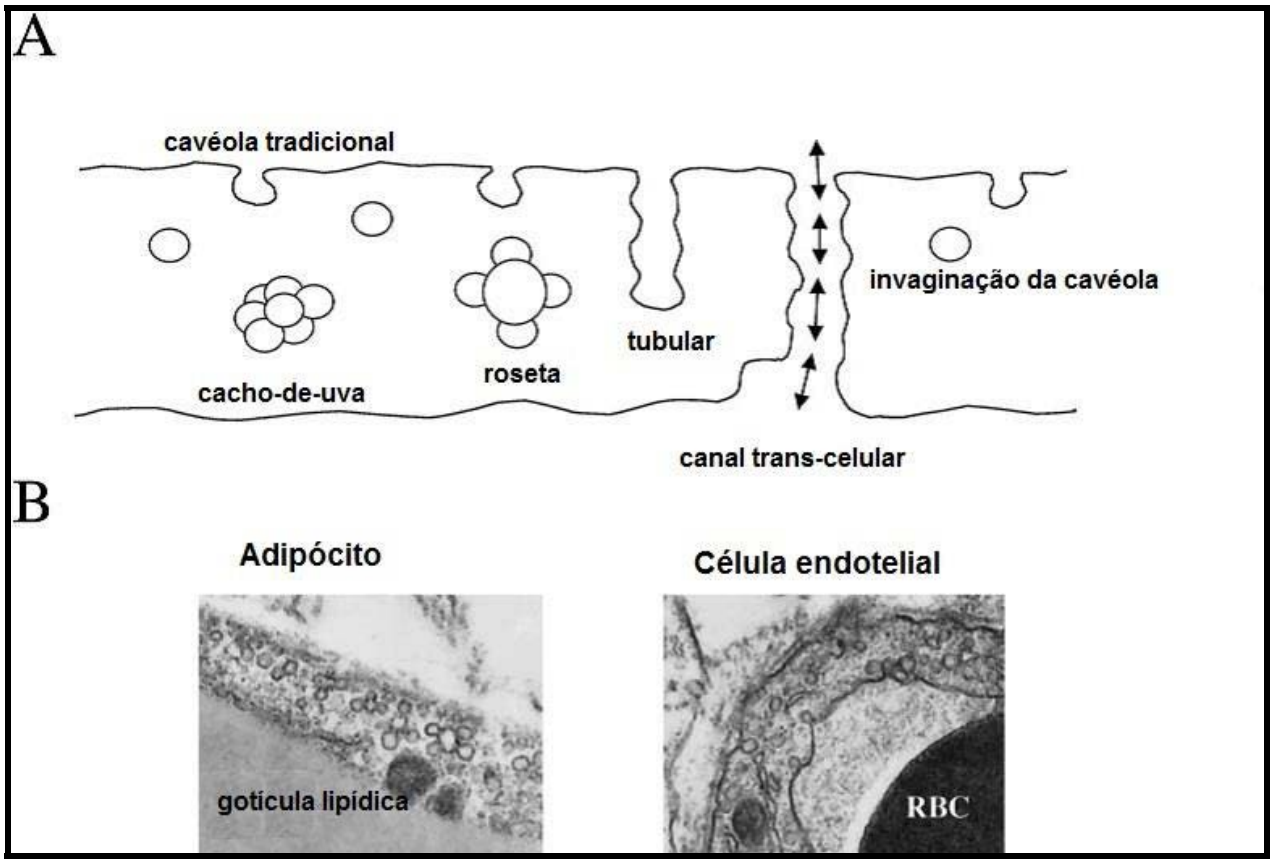


Figura 2. Cavéola: Definição morfológica e plasticidade. A- cavéola pode existir em diversas formas alternativas em relação às invaginações de membranas tradicionais. Elas podem ser encontradas em forma de vesículas ou agregações como “cachos de uva”, rosetas, e formas tubulares. De fato, as células endoteliais, alongadas em tubos podem, muitas vezes, alcançar a fase luminal criando um canal trans-celular. B- duas eletromicrografias, um adipócito (mostrado à esquerda) e a célula endotelial (à direita). Aumento de 16.000X. Observe rosetas caveolares nos adipócitos e as invaginações caveolares associadas à membrana das células endoteliais, RBC: célula sanguínea vermelha. (adaptado de RAZANI et al., 2002).

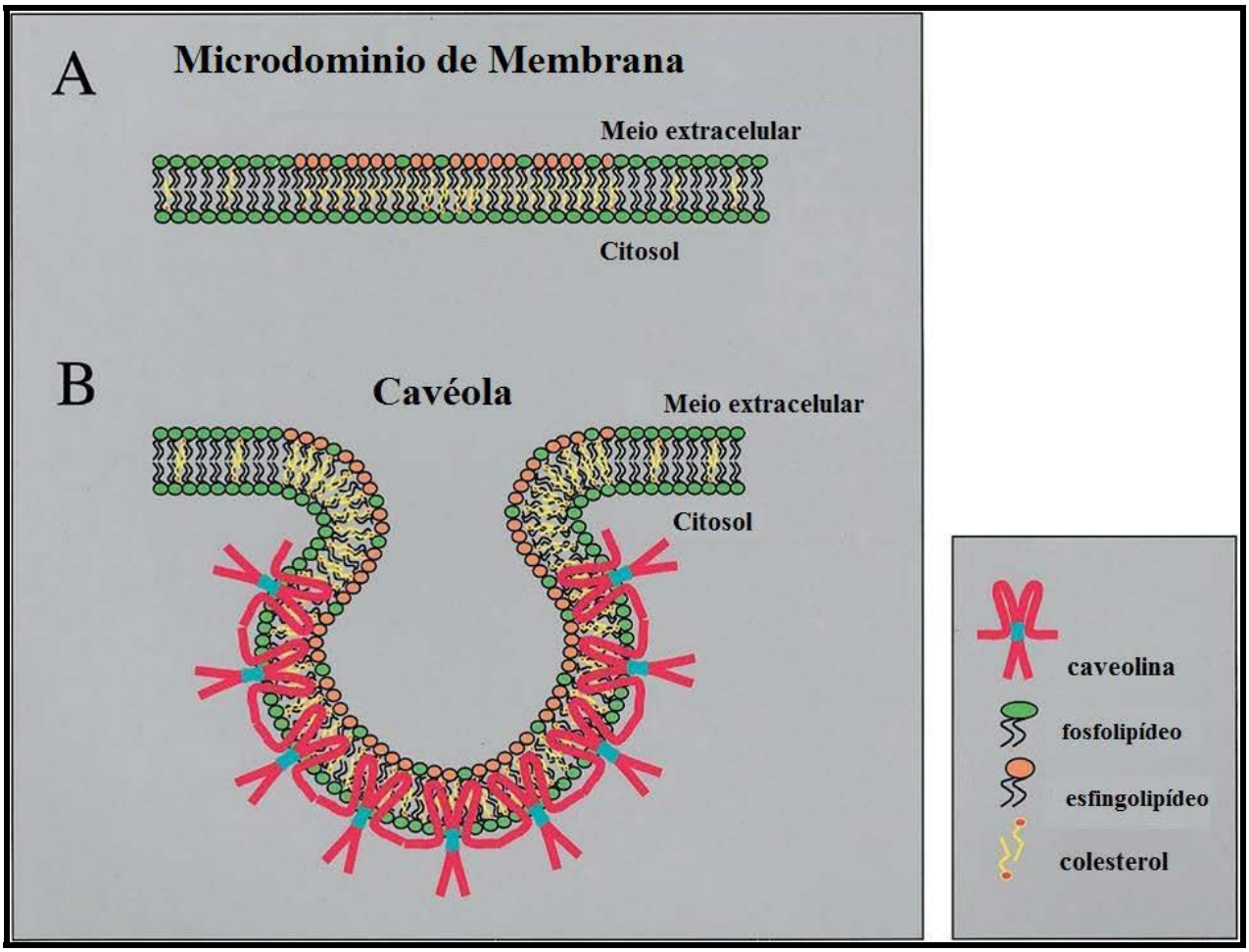


Figura 3. Modelo esquemático de organização dos lipídeos e das cavéolas na membrana plasmática. A- representação da organização dos lipídeos de membrana em estado ordenado enriquecido com colesterol (amarelo), esfingolipídeo (laranja) e fosfolipídeos (verde). B- cavéola com aspecto invaginante e composta por caveolinas (rosa). (RAZANI et al, 2002).

Nas células epiteliais a cavéola é imóvel e suporta o citoesqueleto da actina cortical da membrana plasmática. Sowa (2012), afirma que a caveolina, proteína existente na cavéola, influencia em diversos processos celulares interagindo com as sinalizações das moléculas e regulando o índice de colesterol dessas estruturas, e ainda que os colesterois e glicosfingolípidos são os principais componentes das cavéolas. Se o colesterol for removido da membrana plasmática, a cavéola desaparece (PELKMANS; HELENIUS, 2002; ROTHBERG et al., 1992; CHANG et al., 1994).

Cao et, al. (2012), demonstraram que elementos não contidos na cavéola como éter, ceramidas e esfingomielina também influenciam na formação e na estabilidade da

mesma, podendo causar alterações significativas na superfície citoplasmática da membrana celular chegando até em apoptose.

Considerando o conceito de fluidez da membrana plasmática, (SINGER e NICOLSON, 1972) e a ideia de dinamismo na morfologia das cavéolas, se torna improvável que as cavéolas sejam apenas pequenas bolsas estáticas presas à membrana plasmática, mas sim microrganelas capazes de assumir diferentes formas. Tal fato se deve em parte pela agregação ou fusão das vesículas caveolares que pode dar origem à formação de morfologias caveolares desconhecidas e diversas. As cavéolas também foram encontradas na superfície apical de várias células, inclusive no trofoblasto (ENDERS; HENDRICKS; SCHLAFKE, 1983), são responsáveis pela endocitose e sinalização celular.

Segundo Pereira et al. (2010) ao visualizar a superfície apical das células trofoblásticas de búfalas encontraram, por microscopia eletrônica de transmissão, as cavéolas, que são vesículas endocíticas que possuem uma proteína integral de membrana característica, a caveolina. No caso da placenta, as cavéolas realizam intercâmbio de moléculas da mãe para o feto, essas estruturas não são encontradas nas membranas de todas as células e foram também descritas por outros pesquisadores como Enders, Hendrickx e Schlafke (1983); Pelkmans e Helenius (2002) em outras espécies animais.

2.1.3. Caveolina

Após os estudos clássicos realizados por Singer e Nicolson (1972) ficou estabelecido na literatura o modelo do mosaico fluido para descrever a natureza fisico-química da bicamada lipídica que forma a membrana plasmática celular. Essa natureza confere à membrana um estado desordenado, onde os fosfolipideos são capazes de realizar rapidamente difusões laterais. Atualmente, se aceita a existência de um estado líquido ordenado para a membrana plasmática onde a bicamada lipídica se mostra mais rígida e os movimentos dos fosfolipídeos mais restrito (FREITAS, 2008).

Tradicionalmente, as cavéolas são consideradas um tipo especializado de microdomínio de membrana, que se destaca primordialmente por sua forma invaginante

e/ou vesicular e pela presença de uma proteína chamada caveolina. A expressão da caveolina-1 nas células está relacionada com o aspecto da cavéola invaginada, bem como a presença de material estriado em seu envoltório. Dávalos (2010) afirma que a caveolina-1 (Cav-1) é a principal proteína de revestimento essencial para a formação de cavéola. Desde essa descoberta, considerável atenção tem sido dedicada à família de proteínas caveolina composto de CAV1, caveolina-2 (CAV2) e caveolina-3 (CAV3). Cavéola e as caveolinas foram implicadas numa ampla variedade de atividades celulares, incluindo: a endocitose, vias de sinalização, a regulação lipídica (COHEN et al., 2004; THOMAS e SMART 2008), crescimento e apoptose celular (WANG et al, 2008).

Segundo Deurs (2003), Thomas e Smart (2008) e Hansen e Nichols (2010) a caveolina-1 é expressa dentro da maioria das células que possuem adipócitos, músculo liso, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos sendo necessária para a estruturação da cavéola. A caveolina-1 e 3 pode dar forma a cavéolas invaginantes, já a caveolina-2 só apresenta forma invaginando quando em presença com a caveolina-1, caso contrário, o Complexo de Golgi irá degradá-lo. A caveolina-3 é específica do tecido muscular, encontrada nos músculos esquelético, cardíaco e liso. Ainda, Orsalino (2010) descreve em estudos com os músculos *longuíssimus dorsi* e rombóide que, quanto maior a quantidade de tecido adiposo entremeado ao musculo maior será a quantidade de colesterol (músculo rombóide), tendo assim maior expressão da marcação positiva de caveolina -1, por este tipo de proteína estar relacionada com a síntese de colesterol e posterior deposição de gordura na carcaça, já os cortes provenientes do músculo *longuíssimus dorsi* mostraram uma expressão significativa de caveolina -1, porém maior de caveolina -3, por estar relacionada a formação de músculo esquelético.

Feng et al. (2012) trabalharam com a hipótese que a caveolina-1 desempenha um papel crucial na regulação do controle do fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2), ativado na sinalização da angiogênese placentária.

Feng (2012) demonstrou que o receptor 1 do fator de crescimento fibroblástico FGF R2 alpha está fisicamente associada ao FGF R1, e ambos são direcionados para a cavéola via interação com a caveolina-1 de células endoteliais de artérias feto-placentárias em ovinos, sendo assim o trabalho conclui que a caveolina -1, a mais

importante proteína estrutural caveolar, interage com o FGF R1 e paradoxalmente na sinalização de moléculas implicadas na coordenação e regulação da angiogênese placentárias.

Trinca e Pereira (2013) também em análise de imuno-histoquímica, demonstraram que em placentas de búfalas a CAV-1 foi expressa em todas as amostras coletadas e não apresentaram alterações na expressão durante o desenvolvimento da gestação. CAV- 1 foi mais evidente no estroma endometrial em relação à expressão do epitélio. Já na parte fetal, foi localizada a presença de CAV -1 e apresentaram reação positiva no músculo epitelial e liso dos vasos sanguíneos, enquanto nas células binucleadas trofoblásticas gigantes tiveram menos marcações expressadas. No entanto, a proteína de CAV- 2 tinha um sinal fraco no epitélio do trofoblasto (10 meses de gestação).

Essas proteínas caveolares foram expressas em altos níveis no endotélio de capilares sanguineos de placentas humanas e em células musculares lisas do endotélio, segundo estudo apresentado por (LYDEN; ANDERSON; ROBINSON, 2002).

2.1.4. Outras Aplicações

Guan et, al. (2013) mostrou em estudos que em ratos com diabetes tipo 1 que existe uma base para o desenvolvimento de interferência renal segmentada com CAV-1/cavéola como uma nova abordagem para o tratamento da nefropatia diabética.

Em estudos recentes, Hackett et al. (2013) sugeriram investigar se a perda de caveolina-1 contribui para a disfunção da barreira epitelial na asma. Os dados dessa investigação demonstraram um papel crucial para caveolina-1 na adesão célula-célula epitelial, com consequências importantes para a função de barreira epitelial e para a promoção de respostas Th2 na asma.

Como se pode observar existem vários estudos sobre as proteínas caveolinas, mostrando a importância das mesmas, porém, o tema ainda não é bem compreendido bem como a pesquisa com placenta de conceptos bovinos manipulados nem laboratório, servindo de modelo de estudo nessa área biotecnológica em expansão.

3. OBJETIVOS

Observar a função e marcação das proteínas caveolina-1, -2 na placenta de bovinos clonados e transgênicos, que estão envolvidas no transporte de substâncias transplacentárias e internalização celular destas, mediante a técnica de imuno-histoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das células expressando GFP

As células utilizadas neste experimento são fibroblastos fetais bovinos. A linhagem é oriunda de feto da raça Nelore, macho, com 55 dias de gestação e portador de marcador mitocondrial de origem *indicus* (marcador citoplasmático). O motivo para utilizar fetos machos é devido à presença do cromossomo Y, que é o cromossomo mamífero melhor caracterizado, é consideravelmente menor que os outros e capaz de codificar proteínas machos-específicas (LAHN; PAGE 1997), facilitando a diferenciação das proteínas codificadas da progenitora, que possui apenas cromossomo X. As células foram transportadas em cultivo e/ou congeladas em nitrogênio líquido ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular com a colaboração com os Profs. Drs. José Eduardo Krieger e Bryan Strauss, além de seus orientados, para a inserção do gene codificador para a GFP nos fibroblastos bovinos através de uma infecção viral, protocolo já bem estabelecido, rotineiro e que vem apresentado resultados satisfatórios no laboratório supracitado.

O vírus utilizado foi um lentivírus (FUGW) que contém, além da região codificadora da GFP, promotor para ubiquitina. Tal vírus não apresenta regiões de replicação, proporcionando a segurança necessária para sua manipulação.

As amostras utilizadas neste trabalho são provenientes do Projeto Jovem Pesquisador FAPESP, processo número 2005/52676-1, sob responsabilidade da Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira, do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta

e Embrião – L@mpe, Unesp Dracena, SP, protocolo CEUA 002/2006 da Unesp Dracena.

Fibroblastos fetais bovinos na terceira passagem foram colocadas em cultivo em placas de 60mm e depois de sua confluência, distribuídas em poços em uma placa de 96 poços. Após um dia de cultivo, foram analisados quais os poços que apresentaram células com aspecto saudável e confluência desejável (cerca de 80%) para a transfecção. Uma solução contendo o lentivírus (titulação e concentração previamente definidos), meio DMEM e polibreno (substância utilizada para facilitar o encontro do vírus com a célula) foi adicionada ao poço escolhido e deixada por cerca de doze horas. A solução contendo o vetor viral foi substituída pelo meio DMEM e a cultura celular continuou até atingir número de células compatível com a tripsinização, repique para posterior congelação e análise.

4.1.1. Produção de embriões recombinantes

Os embriões recombinantes foram produzidos no Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD), chefiado pelo Prof Dr Flávio Vieira Meirelles da FZEA-USP mediante transferência nuclear. Os ovários bovinos foram colhidos em abatedouro e transportados em recipiente térmico. No laboratório, foram aspirados os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm. O sedimento do líquido folicular foi colocado em placa de Petri (90mm) para recuperação dos oócitos e posterior seleção e maturação in vitro (MIV).

Os oócitos foram maturados em TCM 199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO3 suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL), 0,5µg de FSH/mL, 50µg de LH/mL e 1µg de estradiol/mL em microgotas de 100µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral (30 oócitos por gota). A incubação foi feita sob temperatura de 38,5oC, atmosfera gasosa de 5% CO2 em ar e máxima umidade, durante 22 a 24 horas.

A metodologia empregada para a enucleação dos oócitos foi descrita por Pereira et al. (2013).

Após a Transferência de Embriões (TE) de bovinos clonados transgênicos, as 06 gestações produzidas foram acompanhadas por ultra-som e divididas em grupo, conforme demonstrados nas tabelas 01 e 02. Aos 28 e 34 dias, as gestações foram interrompidas por abate humanitário, e aos 60 e 90 dias, por ovariosalpingohisterectomia. Após esses procedimentos, os úteros gestantes foram transportados em gelo para o laboratório, onde foi realizada uma incisão na linha anti-mesometrial do perimétrio e miométrio no terço médio do corno uterino gestante expondo membranas, endométrio e o concepto.

Sendo assim, o cório e os placentônios, foram recortados e fixados, como descrito abaixo. Foram coletadas também, 32 amostras de bovinos de inseminação artificial (IA) em abatedouros frigoríficos da região de Dracena, SP para controle, que tiveram o mesmo procedimento de coleta que as amostras dos clones.

Tabela 1 - Idade gestacional e grupos dos bovinos de inseminação artificial (IA)

Animal	Medida	Dias de Gestação	
A1	0,3 cm	20	
A2	0,5 cm	21	
A3	0,6 cm	21	
A4	0,7 cm	22	
A5	0,7 cm	22	
A6	1,2 cm	24	
A7	1,4 cm	25	
A8	1,8 cm	30	**Grupo 1: até 30 dias**
A9	2,4 cm	35	
A10	2,7 cm	40	
A11	2,8 cm	42	
A12	2,8 cm	42	
A13	3,6 cm	45	
A14	3,6 cm	45	
A15	3,7 cm	46	
A16	3,9 cm	47	
A17	3,9 cm	47	
A18	4,3 cm	48	
A19	4,3 cm	48	
A20	4,5 cm	49	
A21	5,0 cm	51	
A22	5,2 cm	53	
A23	5,6 cm	54	
A24	6,0 cm	56	
A25	6,3 cm	57	
A26	6,6 cm	59	
A27	6,7 cm	59	
A28	7 cm	60	**Grupo 2: de31 a 60 dias**
A29	7,3 cm	61	
A30	7,5 cm	63	
A31	7,6 cm	68	
A32	7,6 cm	68	
A33	7,9 cm	69	
A34	8,7 cm	70	
A35	9,2 cm	70	
A36	9,5 cm	72	
A37	10,3 cm	77	
A38	10,4 cm	78	
A39	12 cm	80	
A40	12,7 cm	86	**Grupo 3: de 61 a 90 dias**

Tabela 2 – Relação de tamanhos dos embriões bovinos clonados transgênicos expressando a proteína fluorescente verde – GFP (cm) e idade fetal (dias). Dracena, 2007.

Animal Clonado Transgênico	**Medida – CR (cm)**	**até 45 dias gestação**
GFP3.*1	1,1 cm	34
GFP3.*2	0,65cm	34
GFP4	1,0cm	28
Animal Clonado Transgênico	**Medida – CR (cm)**	**61-75 dias gestação**
GFP5	5,5cm	60
GFP6	5,5cm	60
GFP7	5,66	60
Animal Clonado Transgênico	**Medida CR (cm)**	**76 – 90 dias gestação**
GFP8	16,0cm	90

*GFP 3 são fetos de gestação gemelar

4.2. Imuno-histoquímica

Para as reações imuno-histoquímicas deste trabalho foram utilizados os anticorpos primários e secundários listados na tabela 03.

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados para testes imuno-histoquímicos na interação materno-fetal de conceptos de gestação natural e clonados transgênicos em diferentes estágios de gestação. Dracena – SP, 2012.

Anticorpo primário	**Clone (isotipo)**	**Hospedeiro**	**Diluição**	**Fornecedor**
Caveolina 1	Policlonal	Coelho	1:400	SCBT (sc-894)
Caveolina 2	Policlonal	Coelho	1:200	SCBT (sc-7942)
Anticorpo secundário anti-camundongo anti-coelho/anti-ovino (biotinilado)				Kit LSAB, Dako® (K0690)

(Adaptado de ARTONI et al., 2007).

As secções de cório e placentônio 4-5µm foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de etanol. O desmascaramento antigênico foi realizado pelo aquecimento dos cortes em tampão citrato (0,384g de ácido cítrico mono-hidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico di-hidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) por 15 minutos em forno de microondas. A atividade de peroxidase tecidual endógena foi bloqueada pela incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5 (TBS, 60,57g de Tris para 500mL de água ultrapura) por 30 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados

com soro de cabra a 10% em TBS por 30 minutos. O anticorpo primário foi diluído em tampão TBS contendo 1% de soro de cabra e incubado “overnight” a 4°C em câmara úmida. Paralelamente, outras secções foram incubadas na mesma concentração com anticorpo para o controle de isotipo (IgG).

Após incubação com o anticorpo primário e todas as lavagens dos cortes foram realizadas com TBS contendo 1% de soro de cabra. A reação foi visualizada por meio do kit polivalente Dako-advance HRP Link (cat. # K4069, Dako, EUA.) ou Kit LSAB-Dako® (K0690) de acordo com a recomendação do fabricante. A reação foi revelada por precipitação de 3,3’-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3’-diaminobenzidine, cat. # SK-4100). Para finalizar, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e as lâminas permanentes foram montadas com Entellan® (Merck) para análise dos placentônios sob microscopia de luz.

5. RESULTADOS

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas para a verificação da expressão das proteínas caveolina-1 e caveolina-2 em conceptos bovinos transgênicos clonados GFP positivos aos 60 e 90 dias de gestação. E para animais de gestação de monta natural aos 30 dias e 53 dias de gestação.

Quando realizada a reação para o anticorpo anti-caveolina 1, houve marcação positiva da proteína tanto nos vilos fetais como nos vilos maternos, sendo mais pronunciada no estroma endometrial (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Não foi possível observar alterações da expressão da proteína caveolina 1 entre o concepto provenientes de IA (figura 4) e os conceptos GFP positivos (GFP+) (figuras 5, 6, 7 e 8).

A expressão da proteína caveolina 1 não alterou com a evolução da gestação, ressaltando que as figuras de conceptos GFP positivos 5 e 6 são de animais de 60 dias de gestação e as figuras GFP positivo 7 e 8 são de animais de 90 dias de gestação.

Para o anticorpo anti-caveolina 1, houve marcação específica de células trofoblásticas gigantes binucleadas, como podem ser analisadas nas figuras 6A.

Já para o anticorpo anti-caveolina 2, obteve-se marcação positiva no trofoblasto da membrana córioalantóide nas figuras 9, 10, 11 e 12.

Nas figuras 9A, 10C E 12C é possível observar a marcação específica em células trofoblásticas gigantes binucleadas.

Além disso, houve marcação positiva no placentônio de concepto GFP positivos de 90 dias de gestação, sendo que, a marcação foi mais pronunciada nas figuras 11A, 12A, 12B e 12C em relação à figura 11C, o que pode ser explicado pela padronização da diluição do anticorpo, que nas primeiras figuras a concentração era maior 1:200 e na figura 11C a concentração era menor 1:300.

Foi possível notar nas figuras 6C e 9B presença de vasos sanguíneos, considerando o cório um tecido ricamente vascularizado.

Assim como nas figuras com marcação positiva para caveolina -1, as marcações para caveolina -2 também não tiveram diferenças entre as idades dos conceptos

bovinos, sendo a figura 9 concepto bovino de 30 dias de gestação, a figura 10 concepto bovino de 60 dias de gestação e as figuras 11 e 12 conceptos bovinos de 90 dias de gestação.

Foi possível notar que as amostras com reação para anticorpo anti-caveolina 1, apresentaram maior marcação em relação às de caveolina 2.

Foi possível observar as células cuboidais do trofoblasto nas placentas dos bovinos em toda a evolução das gestações, nas idades 30, 60 e 90 dias.

Ainda no trofoblasto da membrana corioalantoide foram observadas poucas cavéolas, e no placentônio nas fases iniciais da gestação estudadas, mas em grande quantidade no endotélio dos capilares sangüíneos da membrana corioalantoide.

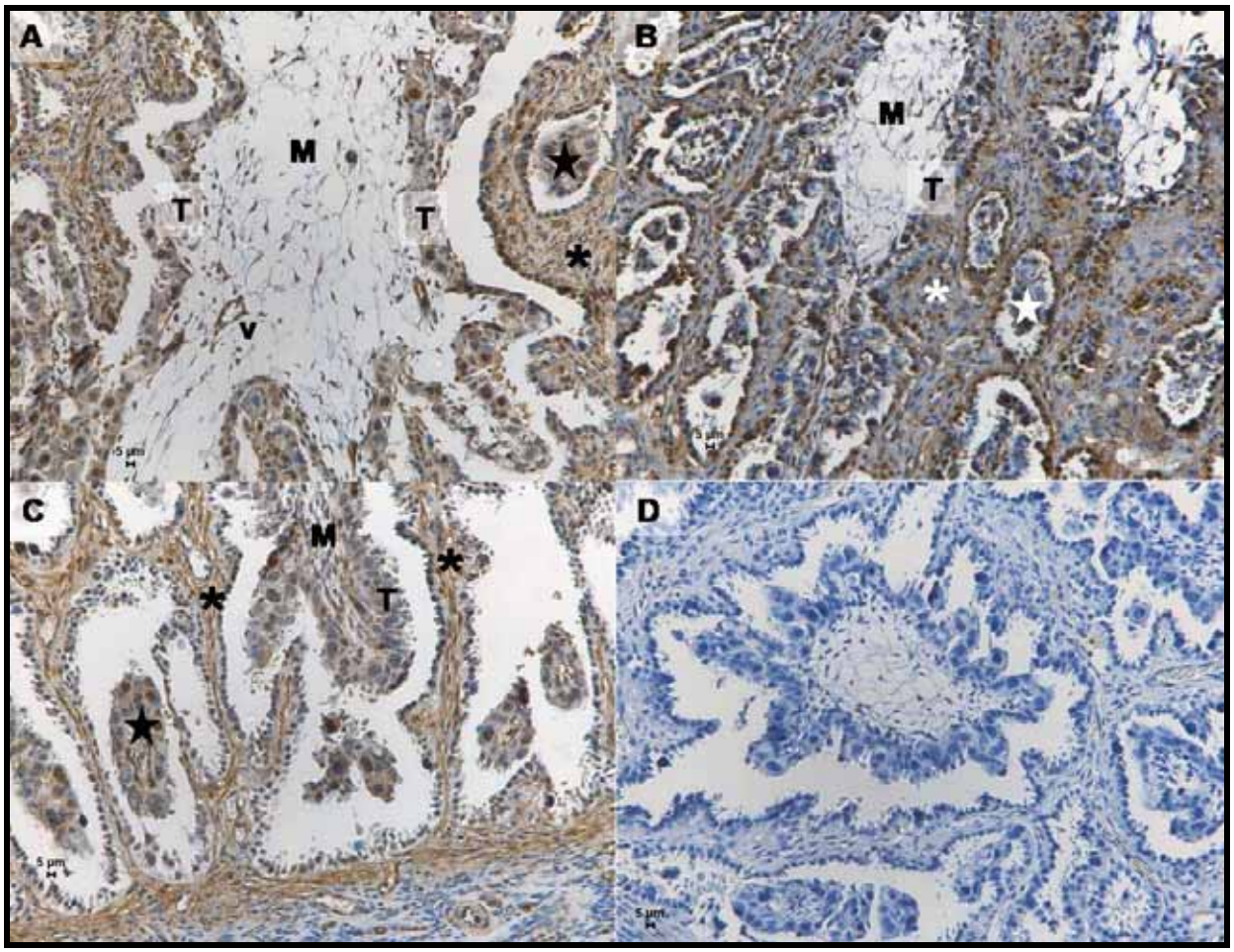


Figura 4. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 53 dias de gestação, animal de gestação natural; interdigitações materno-fetais. A, B, C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). D: controle negativo sem marcação. Barra= 5µm.

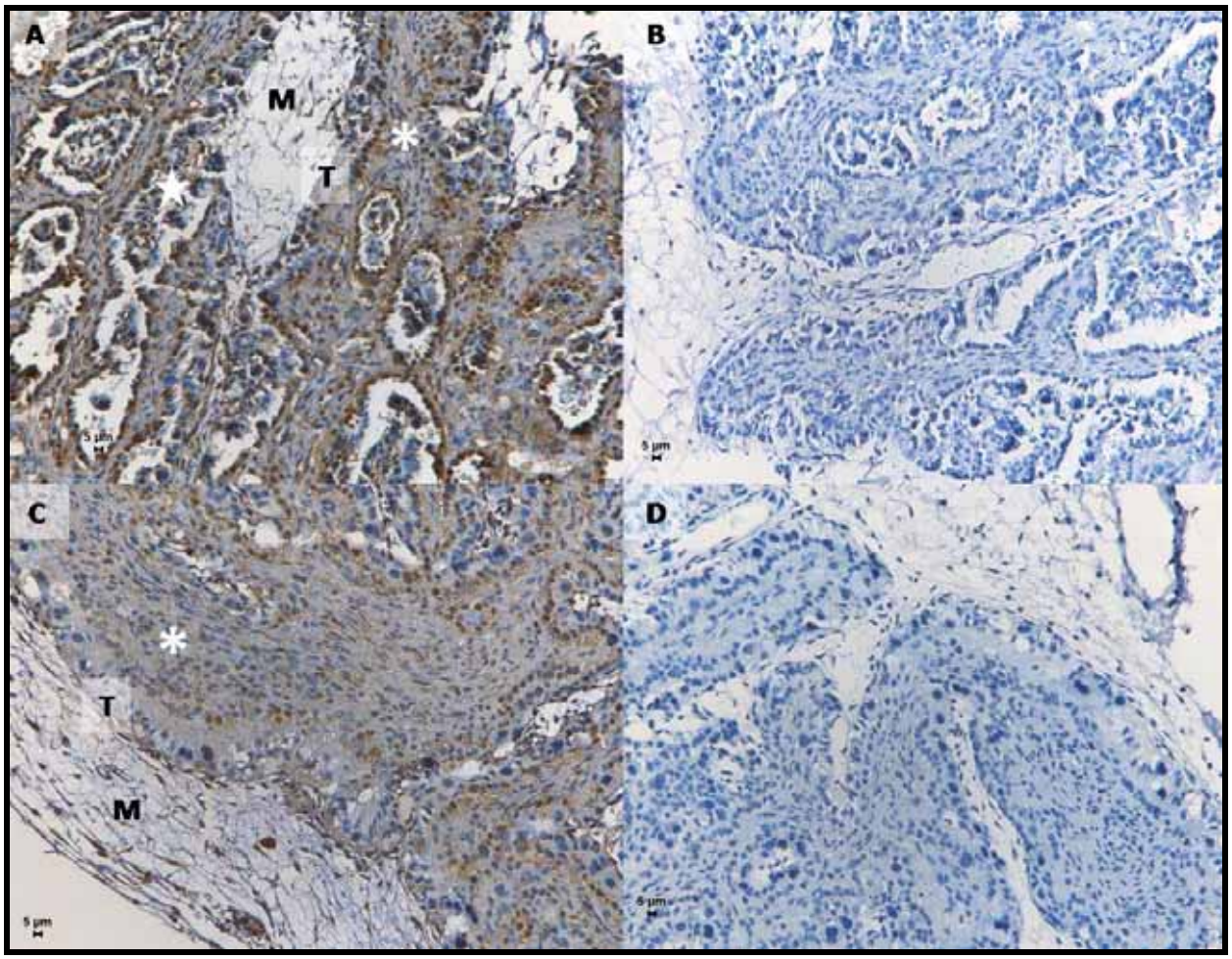


Figura 5. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 60 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm.

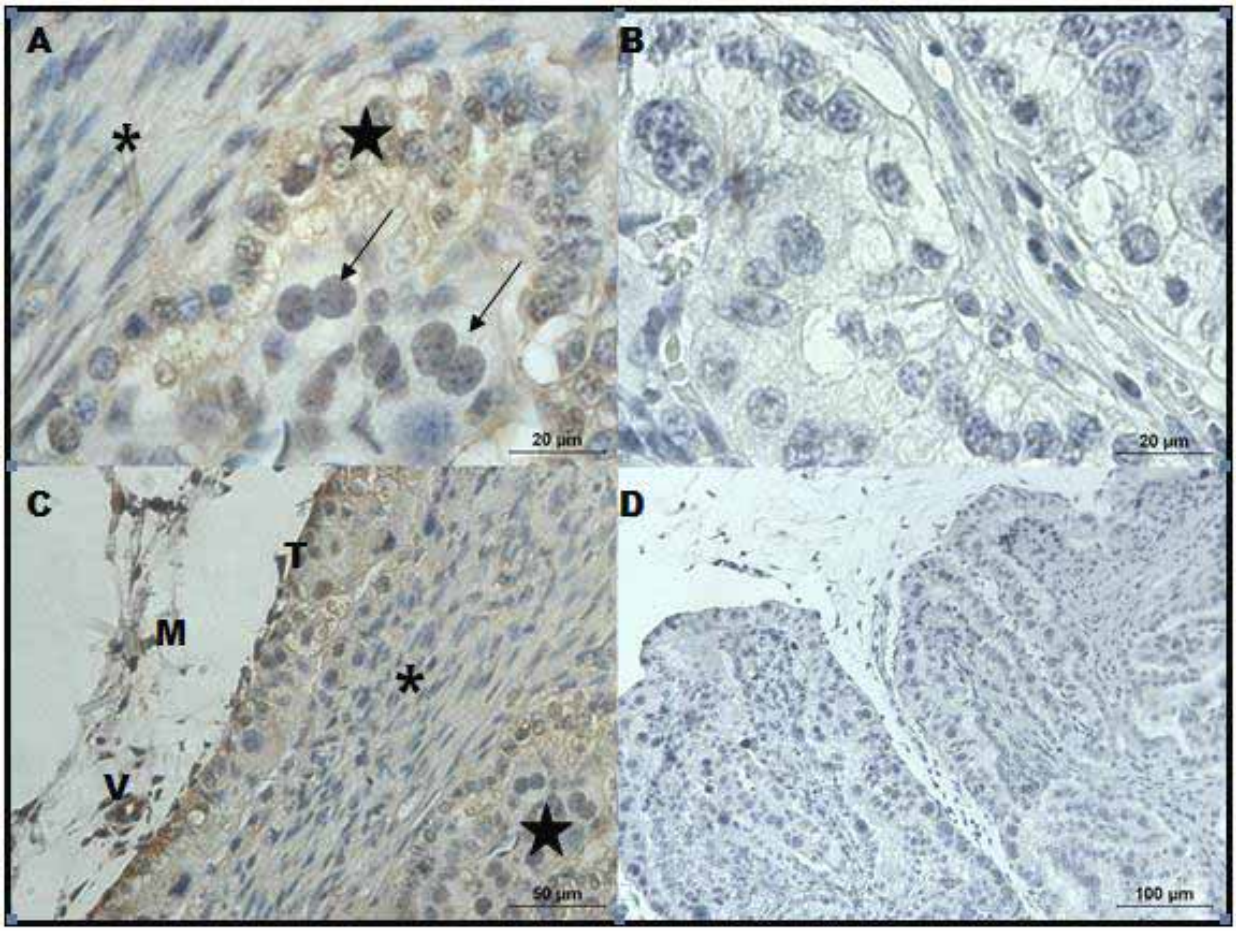


Figura 6. **F**otomicrografia Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 60 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*), células trofoblasticas gigantes binucleadas (seta), vasos sanguineos (v). B e D: controles negativos sem marcação. Barra figura A= 20µm. Barra figura B= 20µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 100µm.

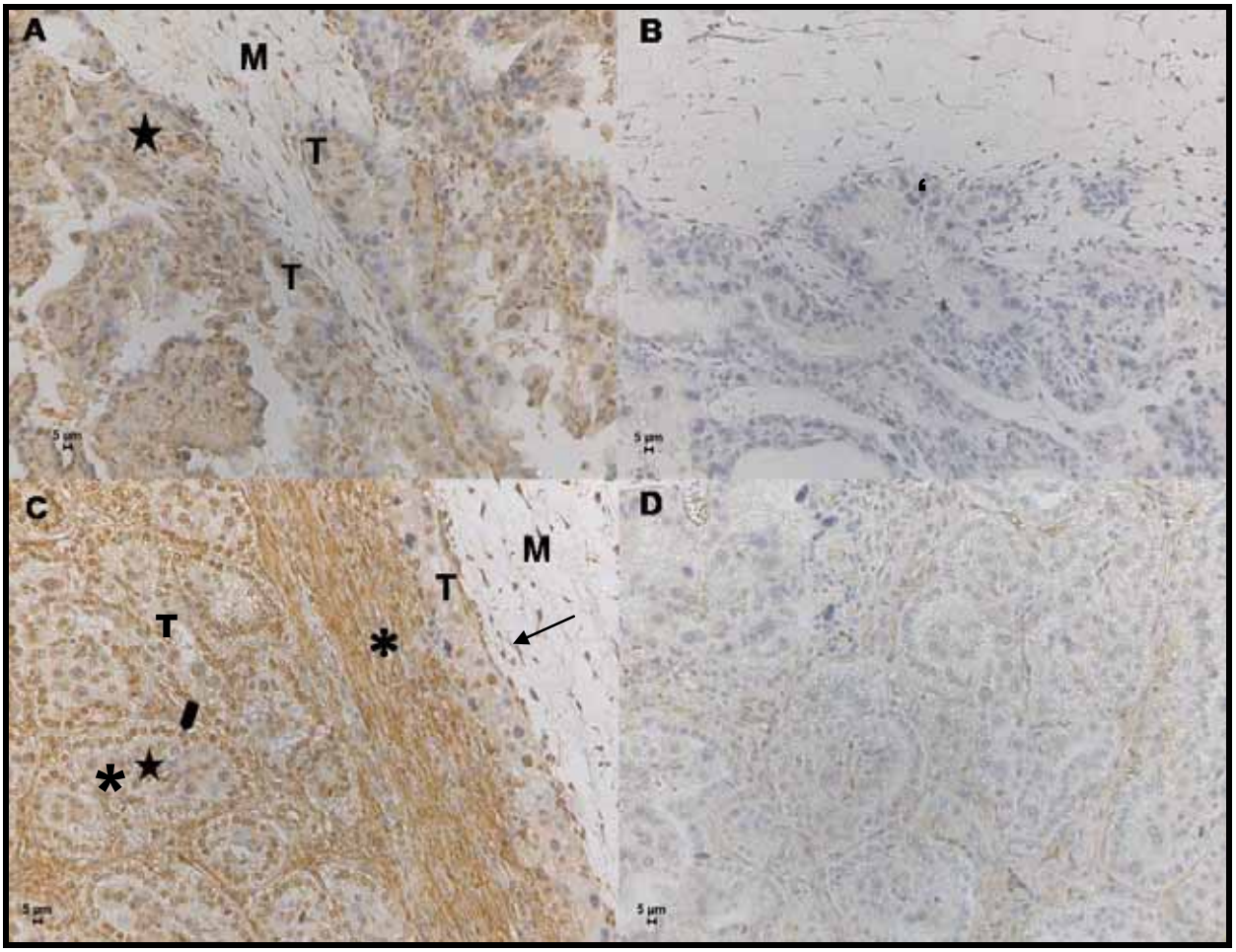


Figura 7 Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino (cabeça de seta). B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm.

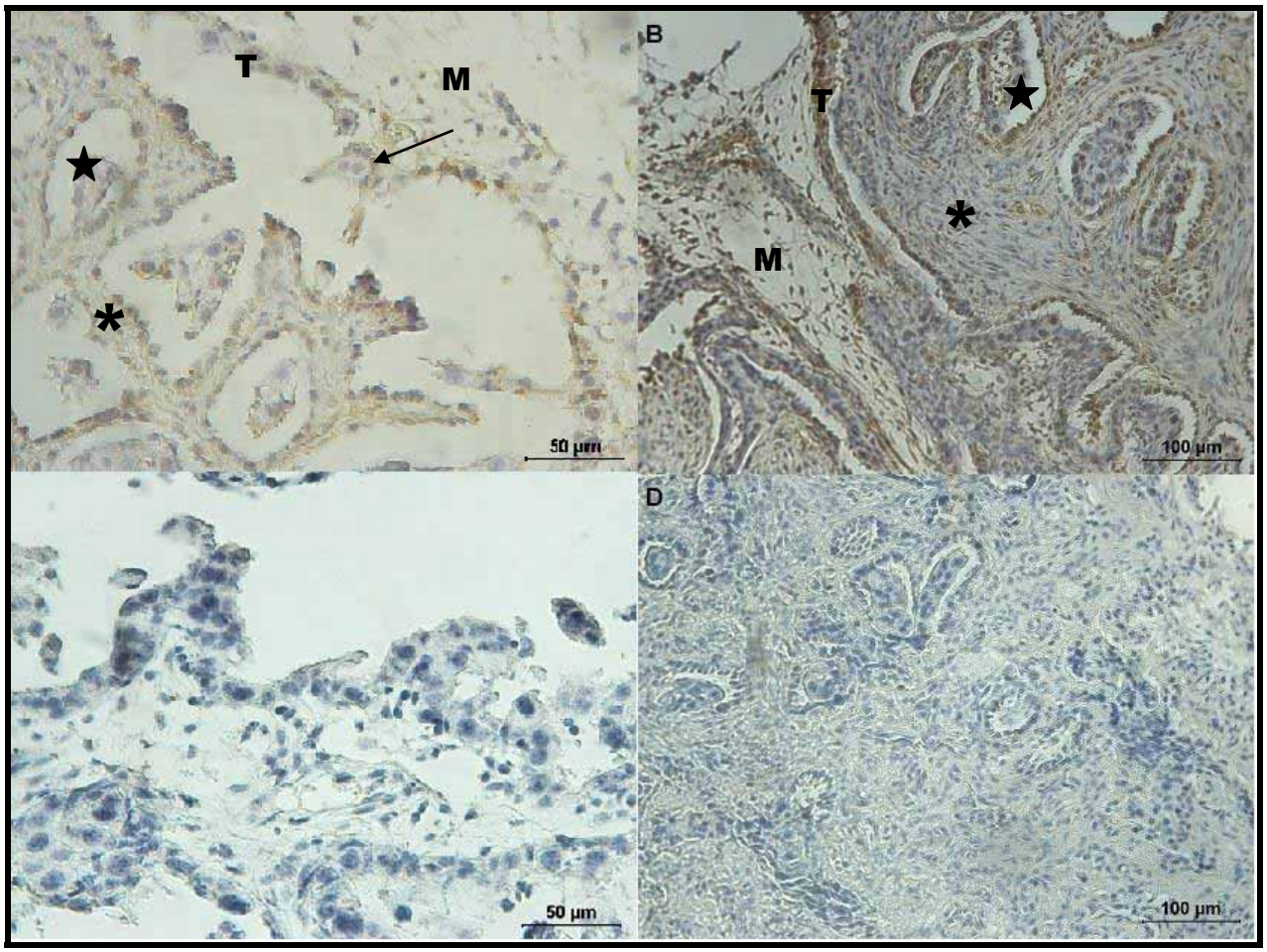


Figura 8 Imuno-histoquímica para a caveolina 1. A, B: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A B e C: imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela), vilos maternos (*), células trofoblásticas gigantes binucleadas (seta).D : controle negativo sem marcação. Barra figura A= 200µm. Barra figura B= 100µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 100µm.

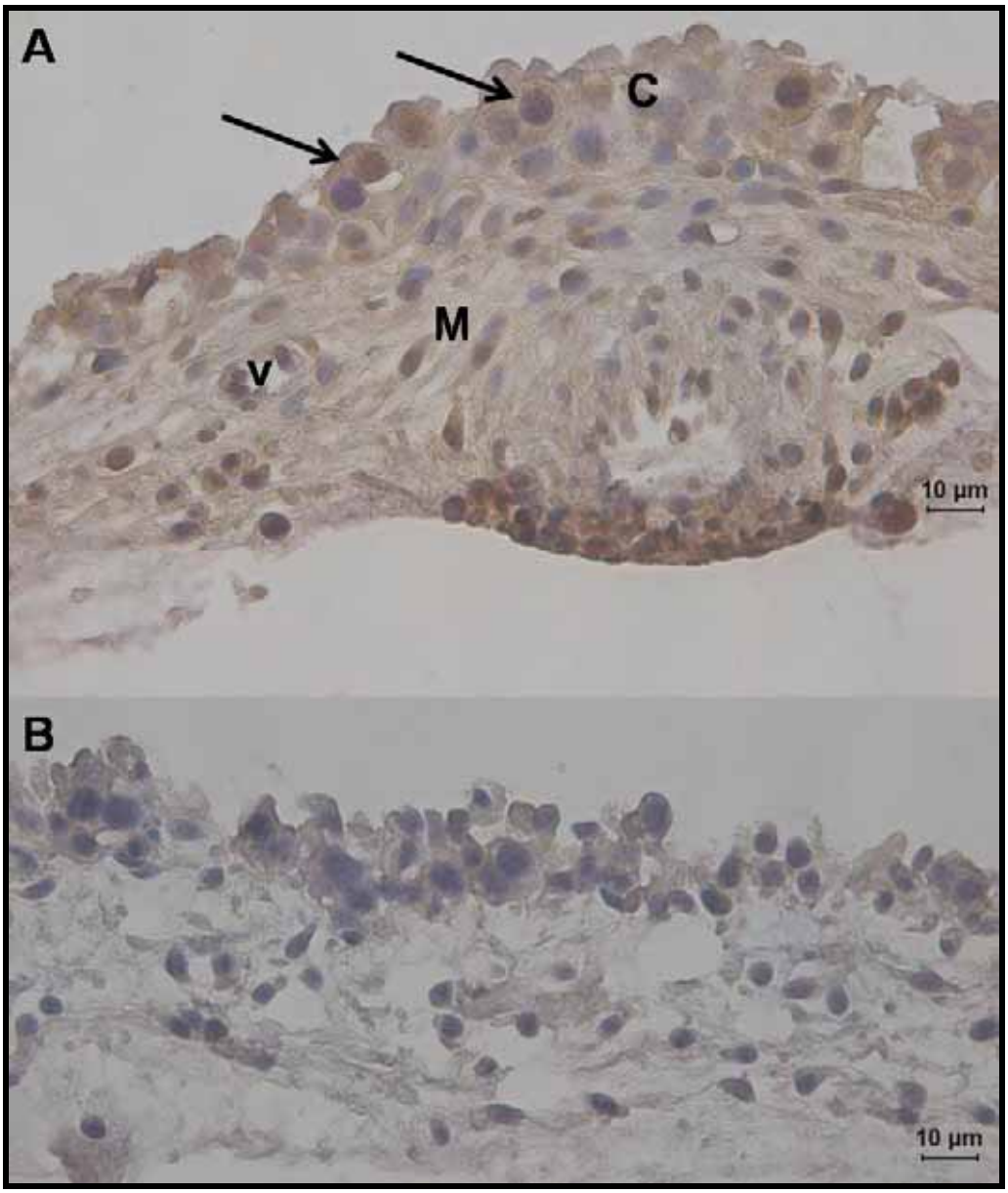


Figura 9. Imuno-histoquímica para a caveolina 2 em cório (C). A, B: 30 dias de gestação, IA. A imunomarcação foi positiva para a caveolina 2 na célula trofoblástica gigante binucleada (setas) e mesênquima (M). Vaso sanguíneo fetal (v). B: mesmo animal; controle negativo sem marcação. Barra= 10µm.

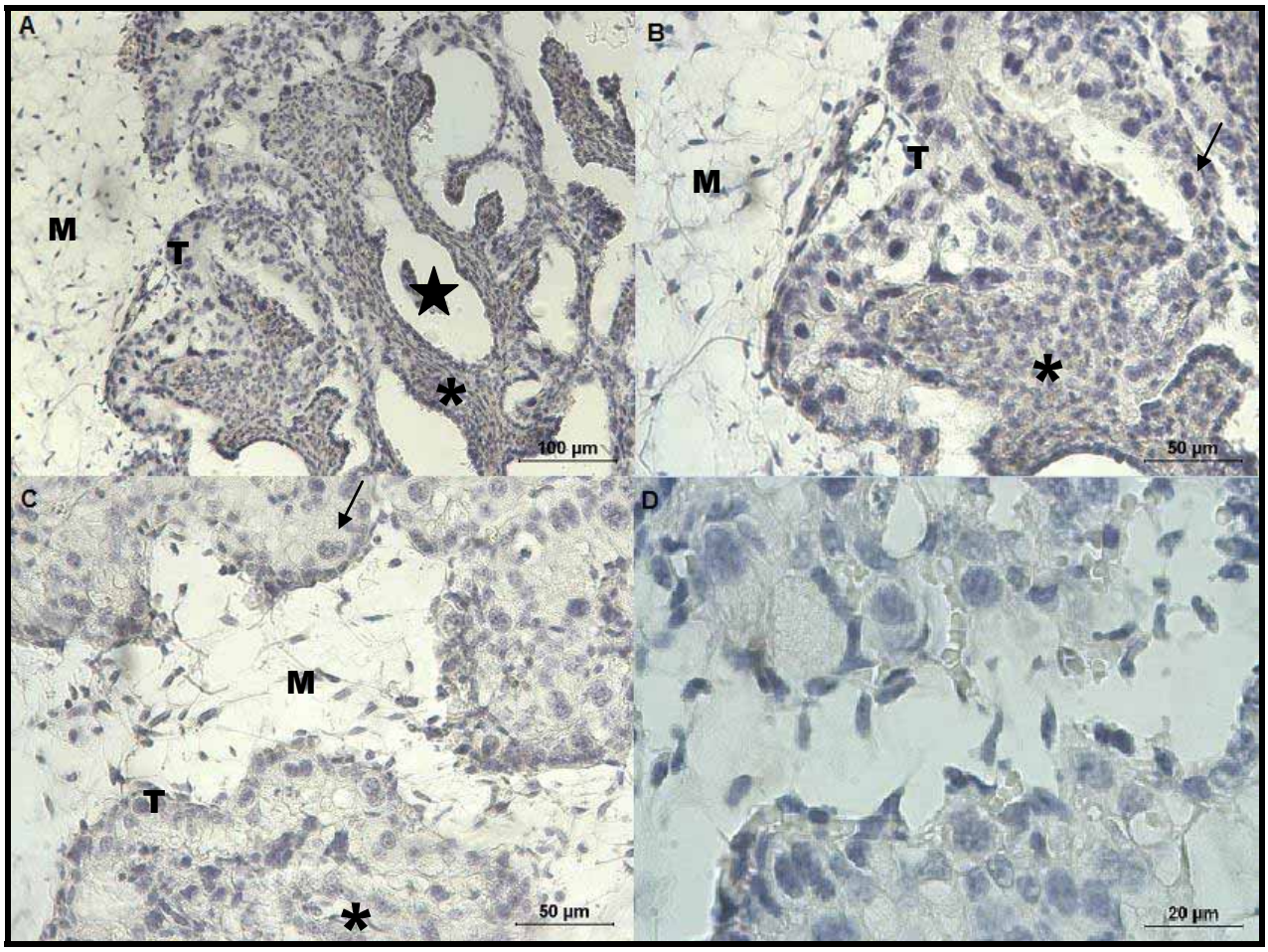


Figura 10. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C e D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A, B e C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) D: controle negativo sem marcação. Barra figura A= 100µm. Barra figura B= 50µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 20µm.

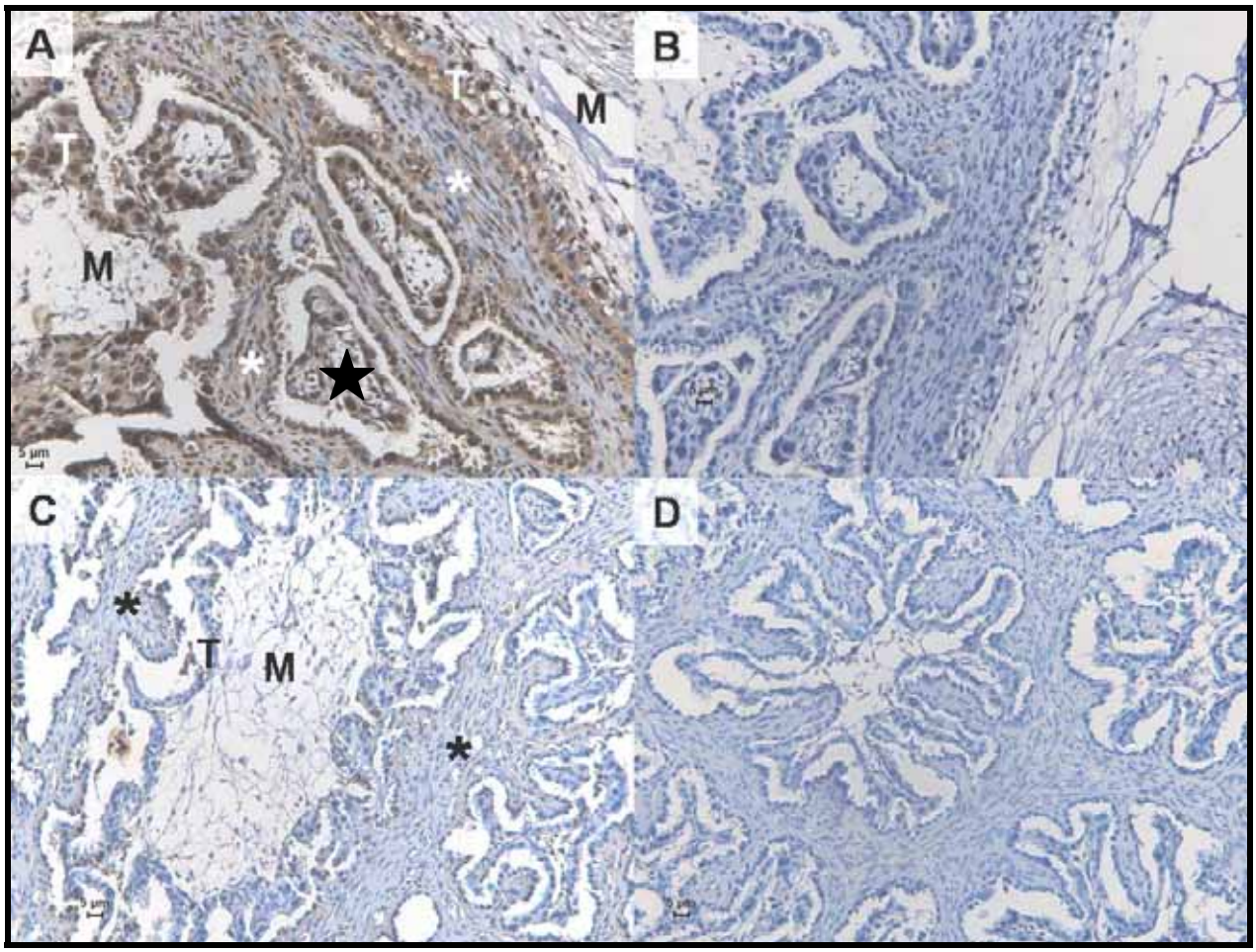


Figura 11. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP ; interdigitações materno-fetais. A e C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino. B e D: controles negativos sem marcação. Barra= 5µm.

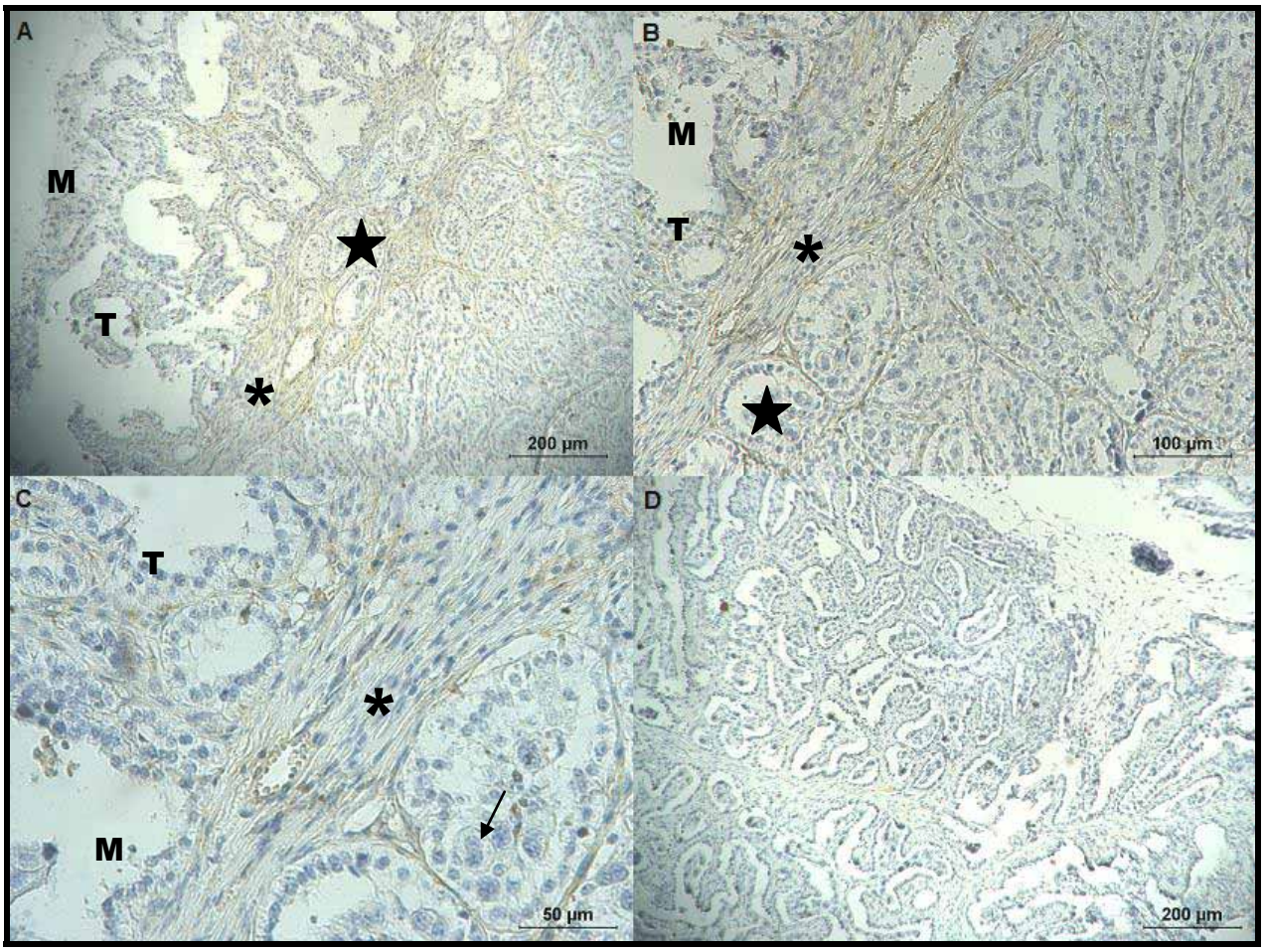


Figura 12. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. A, B, C, D: 90 dias de gestação, concepto GFP + ; interdigitações materno-fetais. A, B E C: imunomarcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela), vilos maternos (*) células trofoblásticas gigantes binucleadas (seta) D: controles negativos sem marcação. Barra figura A= 200µm. Barra figura B= 100µm. Barra figura C= 50µm. Barra figura D= 200µm

6. DISCUSSÃO

Devido à escassez de trabalho nessa área, o presente trabalho poderá contribuir com descrição da localização e expressão das proteínas caveolinas-1 e -2 na placenta de conceptos bovinos clonados transgênicos com idade de 60 e 90 dias de gestação e de conceptos de IA nos períodos de 30 e 53 dias de gestação, mediante imuno-histoquímica.

Foi observado no trabalho que as mesmas células presentes na placenta de conceptos bovinos de gestação natural aos 30 e 53 dias de gestação se encontram também nas placentas de conceptos clonados transgênicos de 60 e 90 dias de gestação, concordando com Oliveira et al. (2010), que observou que as estruturas como células gigantes binucleadas, vasos sanguíneos presentes no cório e células epiteliais, que formam a placenta de conceptos bovinos providos de gestação natural no inicio da gestação, estão presentes em todas as fases até o final desta e que de fato, as características histológicas das placentas nas diferentes fases da gestação são muito semelhantes, fato também relatado por Miglino et al (2007) comparando a placenta de bovinos providos de gestações normais com a de bovinos clonados.

Para uma especificidade maior, a região da placenta de bovinos estudada nesse trabalho foram as regiões dos placentônios, caracterizada pela presença de áreas especializadas de trocas metabólicas, os quase estão separados por áreas intercotiledonárias de cório liso, assim como as estudadas por Pereira (2000), em búfalas.

Assis Neto et, al. (2009), demonstraram o desenvolvimento inicial da placentação bovina (*Bos indicus*) do ponto de vista do alantoide e âmnio, que compõe as membranas fetais. Essas células são sustentadas por uma fina membrana basal e o mesênquima extraembrionário, mesma região que obteve marcação positiva para as proteínas caveolinas -1 e -2, em nas amostras.

O trofoblasto é um tecido que em seu desenvolvimento apresenta-se extremamente vascularizado, corroborando com nossos resultados em relação à presença de grande quantidade de vasos sanguíneos, visualmente observados no presente trabalho, Ford; Reynolds; Ferrell (1984); Hard e Anderson (1982), afirmam que o fluxo uterino sanguíneo aumenta acentuadamente a partir dos 20 dias de gestação

até o nascimento, assim os vasos sanguineos presentes são importantes para a vascularização do sincício trofoblástico, por possuírem paredes finas não apresentam nenhuma resistência ao fluxo sanguíneo.

A constituição do trofoblasto é caracterizada por uma única camada de células cuboidais a colunar alto, trabalhos descritos anteriormente relataram tal semelhança entre (GREENSTEIN; MURRAY; FOLEY, 1958; KING et al. 1979; KING et al. 1980) placentas bovinas (SHARMA et al. 1983; PEREIRA, 2000) e placentas bubalinas.

No trabalho foram observadas células trofoblásticas gigantes binucleadas, o mesmo também foi descrito por Bosch (2006), como células trofoblásticas arredondadas ou esféricas, de diferentes tamanhos que evoluem para células trofoblásticas gigantes binucleadas, também observado por Pinto et, al. (2008), que afirma que a fusão de algumas células epiteliais uterinas é um evento característico da placenta de bovinos, que a classifica como sinepiteliocorial. Foram encontradas células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos, e o número de núcleos está relacionado com o número de células envolvidas nesse processo de fusão. De acordo com Carvalho (2004), a formação e a migração das células trofoblásticas binucleadas ocorrem de maneira progressiva na placenta de búfalas. A princípio aparece de forma dispersa no epitélio coriônico sendo raras ou inexistentes no epitélio uterino. A partir de 21^{o} dia ocorre o aumento gradual das células trofoblásticas binucleadas, chegando a representar 20% das células coriônicas, concordando com Bosch (2006), que afirma um maior aumento das células trofoblásticas gigantes binucleadas e trinucleadas no último terço de gestação dos bovinos.

Ainda no trofoblasto da membrana córioalantóide foram observadas poucas cavéolas, e no placentônio nas fases de gestações estudadas, mas em grande quantidade no endotélio dos capilares sangüíneos da membrana córioalantóide, o que não implica em que possam ser encontradas no trofoblasto da membrana córioalantóide no final da gestação em maior quantidade, como o observado em búfalas por PEREIRA et al., (2010).

Foi possível confirmar a presença das proteínas caveolinas -1 e -2 nos placentônios de conceptos bovinos, mediante a técnica de imuno-histoquímica demonstrando a importância das mesmas no processo de nutrição fetal por endocitose,

inclusive nos epitélios, endotélio e musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Esses dados corroboram com Trinca e Pereira (2013), que também realizaram imuno-histoquímica para caveolinas -1, mas em placenta de búfalas, evidenciando a afirmação de Thomas e Smarth (2008).

Justificando a maior concentração para a expressão da caveolina -1 em relação a caveolina -2, Deurs et al., 2003; Dávalos et al., 2010; Hansen e Nichols, 2010 afirmam que a expressão das caveolina -1, a principal proteína de revestimento da cavéola, é necessária para a estruturação da cavéola, em células não musculares, já a caveolina -3 faz parte da biogênese da cavéola presente na musculatura cardíaca e esquelética à medida que somente a presença da caveolina -2 não induz a sua formação. Ainda é fundamental a presença da proteína caveolina -1 na cavéola para que a proteína caveolina -2 seja enviada do complexo de Golgi para a mesma, caso contrário a caveolina -2 seriam degradadas no próprio complexo de Golgi, a expressão da proteína caveolina -3 é específica do músculo, (OKAMOTO et al., 1998; RAZANI et al., 2001).

Os dados deste revelam imunomarcação intensa para as proteínas cav -1 e -2 localizadas no placentônio, visto que essas proteínas são importantes para manter a aparência morfológica da cavéola e estão envolvidos no metabolismo lipídico, crescimento e apoptose celular (WANG et, al. 2008), eventos importantíssimos para o ótimo desenvolvimento dos conceptos e saúde materna, e o entendimento desses mecanismos nos auxiliam a entender as razões de tantas perdas gestacionais e anormalidades placentárias, tanto em gestações naturais, como em manipuladas em laboratório.

A realização da marcação das proteínas caveolinas -1 e -2 servirá de auxilio para futuros estudos relacionados com desenvolvimento placentário e transporte via placenta.

7. CONCLUSÃO

As proteínas caveolinas -1 e -2 foram verificadas tanto em placenta de conceptos bovinos oriundos de gestação natural, como as de clonados transgênicos em idades distintas, 30 e 53 dias de gestação e 60 e 90 dias de gestação, sendo que a caveolina -1 teve maior expressão em relação a caveolina -2, principalmente no compartimento fetal da placenta. Já nas células gigantes trofoblásticas binucleadas observamos expressão de ambas as proteínas CAV-1 e -2 igualmente por análise visual ao microscópio de luz, fato muito relevante, pois a função dessas células ainda não está bem elucidada, então pode-se agregar um conhecimento novo aos estudos de placenta e placentação, visto que essas células não expressam certas proteínas e receptores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, K. Y.; NISHIYAMA, T. Developmental changes in extracellular matrix messenger RNAs in the mouse placenta during the second half of pregnancy: possible factors involved in the regulation of placental extracellular matrix expression. **Biology of reproduction,** v. 77, p. 923-933, 2007

AITKEN, R. J. Delayed implantation in the roe deer (*Capreolus capreolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 225-233, 1974.

AITKEN, R. J. Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. **Journal of Anatomy**, v. 119, n. 2, p. 369-384, 1975.

ANDERSON, R. G. W. The caveolae membrane system. **Annu. Rev. Biochem**., v. 67, p. 199-225, 1998.

ARTONI, L.P. et al. Fator de crescimento fibroblástico básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.3, p.605-613, 2007.

ASSIS NETO, A. C. et al. Initial Development of Bovine Placentation (Bos indicus) from the Point of View of the Allantois and Amnion. **Anat. Histol. Embryol**. 38, 341–347 (2009)

BARRETO, R.S.N. **Ocorrência e mecanismos do microquimerismo fetal em gestações bovinas**. 2011. 68f. (Dissertação Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BEHBOODI, E. Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In: CIBELLI J. et al. (Ed.). **Principles of cloning.** New York: Academic Press, 2002. p.459-472

BJÖRKMAN, N. Na Atlas of placental fine structure. London: Bailière Tindall & Cassel, 1970. 96p.

BOSH, R. V. **Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

BRESSAN, F.F. et al. Improved production of genetically modified fetuses with homogeneous trasngene expression after transgene integration site analysis and recloning in castle. **Cell Reprogram,** v.13, n.1, p.29-39, 2011.

BURTON G. J. Scanning electron microscopy of intervillous connections in the mature human placenta. **J. Ana**., v.147, p. 245-254, 1986.

CAO, K. et al. Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v.22, p.1731–1733, 2012

CARVALHO, A. F. et al. E.Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. **Journal of Morphology**, v.267, n.1, p.50-56, 2006.

CARVALHO, I. **Expressão e distribuição da conexina 43 nas células trofoblasticas gigantes bovinas em três fases gestacionais**. 2004. 106 f. Dissertação (mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

CAZERTA, S. M. M. et al. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.27, n.6, p.229-235, jun. 2007.

CHANG, W. J. et al. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. **J. Cell. Biol.**, v. 126, n. 1, p. 127-138, Jul. 1994.

COHEN, A. W. et al. Role of caveolae and caveolins in health and disease. **Physiol. Rev.**, v.84, p. 1341–1379, 2004.

CROUCH, E.; SAGE, H.; BORNSTEIN, P. Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV procollagen contains two distinct chains. **Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 745-749, 1980. 1985.

CUNHA, E.E. et al. Simulação de dados para avaliação genética de rebanhos de gado de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,** v.58, n.3, p. 381-387, 2006.

DÁVALOS, A. et al. Quantitative Proteomics of Caveolin-1-regulated Proteins. **Mol Cell Proteomics**, v.9, n.10, p.2109–2124, out. 2010

DEURS, B. V. et al. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. **Trends In Cell Biology**, v. 13, n. 02, p.93-100, 2003.

ENDERS, A. C.; HENDRICKX, A. G.; SCHLAFKE, S. Implantation in the rhesus monkey: initial penetration endometrium. **American Journal of Anatomy**, v. 167, p. 275-298, 1983.

FABER, J. J.; THORNBURG, K. L. **Placental Physiology:** structure and function of fetomaternal exchange. New York: Raven Press; 1983.

FARIA, F. J. C. **Estrutura genética das populações zebuínas brasileiras registradas.** 2002. 177f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

FENG, L. et al. Compartmentalizing proximal FGFR1 signaling in ovine placental artery endothelial cell caveolae. **Biology of Reproduction**, v.87, n. 240, ago. 2012.

FENG, L. et al. Caveolin-1 Orchestrates Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Control of Angiogenesis in Placental Artery Endothelial Cell Caveolae. **Journal of Cellular Physiology,** v.227, n.6, p.2480–2491, jun. 2012.

FREITAS R. C. C. **Papel da caveolina-1 no Desenvolvimento da retina de pinto**. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FREITAS V. J. F. Transgênese em caprinos. In: FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. Fortaleza: Multicor, 2006. p.61-70.

FREITAS V. J. F. et al. Production of transgenic goat (Capra hircus) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.,** v.79, p.585-592, 2007a.

FREITAS V. J. F. et al. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos e clonados. **Acta Sci. Vet.,** v.35, p.899-904, 2007b

FORD, S. P.; REYNOLDS, L. P. FERRELL, C. L. Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 59 p. 1085-1091, 1984.

GEISERT, R. D., MALAYER, J.R. Implantação. In: HAFEZ, E. S. E. (ed). **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004.

GRAY C.A. et al. Endometrial glands are required for preimplantation conceptuselongation and survival. **Biol. Reprod.,** v.64, p.1608-1613, 2001a.

GRAY C. A. et al. Developmental biology of uterine glands. **Biol. Reprod.,** v.65, p.1311-1323, 2001b.

GREENSTEIN, J. S., MURRAY, R. W., FOLEY, R. C. Observations on the morphogenesis and histochemisty of the bovine pre – attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, v. 132, p. 321-341, 1958.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Abortamento provocado ou terapêutico**: obstetrícia veterinária. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1989. p.101-103.

GUAN, T. H. et al. Caveolin-1 deficiency protects against mesangial matrix expansion in a mouse model of type 1 diabetic nephropathy. **Diabetologia,** jun. 2013 [Epub ahead of print]

GUDMUNDSSON, S. DUBIEL, M. SLADKEVICIUS, P. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. **Semin Perinatol**, v.33, p.270-280, 2009.

HACKETT, T. L. et al. Caveolin-1 Controls Airway Epithelial Barrier Function: Implications for Asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol,** jun. 2013. [Epub ahead of print]

HANSEN, C. G., NICHOLS, B. J. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. **Cell Press**, Grã-Bretanha, v. 20, p. 177-186, 2010.

HARD, D. L.; ANDERSON, L. L. Interaction of maternal blood volume and uterine blood flow with porcine fetal development. Biology of Reproduction. **Champaign**, v. 27, p. 79-90. 1982.

HŮLKOVÁ, H. et al. Glycosphingolipid profile of the apical pole of human placental capillaries: the relevancy of the observed data to Fabry disease**. Glycobiology** v.22, n.5, p.725–732, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 433p.

KING, G. J., ATKINSON, B. A., ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. **J. Reprod. Fertil,** v.55, n.1, p.173-180, jan. 1979.

KING, G. J., ATKINSON, B. A., ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **Journal of reproduction and fertility.** V.59 p.95-100, 1980.

KING, G. J., ATKINSON, B. A. The Bovine Intercaruncular Placenta Throughout Gestation. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.241-254, 1987.

LACERDA, P. M. O. **Asperctos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

LAHN, B. PAGE, D. C. Functional coherence of the human Y chromosome. **Science**. v. 278 , p. 675-680, 1997.

LATSHAW, W. K. **Veterinary developmental anatomy**: a clinically oriented approach. [S.l.]: B.C. Decker, 1987. 283p.

LEISER, R. et al. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v.191, p.517-527, 1997.

LEISER, R.; EGLOFF, T. Ultrastructura correlates of placental substance transfer a state-of-art-review. **Placental communication biochemical, morphological and cellular aspects,** v.199 p.219-238, 1990.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.

LYDEN, T.W.; ANDERSON, C.L.; ROBINSON, J.M. The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. **Placenta,** v.23, p.640-652, 2002.

MALASSINE, A.; FRENDO, J. L.; EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 531-539, 2003.

MANNINEN, A. et al. Caveolin-1 is not essential for biosynthetic apical membrane transport**. Mol. Cell Biol.,** v.25, p. 10087–10096, 2005.

MEIRELLES, F. V. et al. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reprod. Fertil**., v. 22, p.88–97, 2010.

MIGLINO, M. A. et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology,** v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.

MOHANTY, S. ANDERSON , C. L. ROBINSON, J.M. The expression of caveolin-1 and the distribution of caveolae in the murine placenta and yolk sac: Parallels to the human placenta. **Placenta,** v.31, p.144–150, 2010.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate Fetal Membranes.** New Brunswisk: Rutgers University Press, 1987, v. 1. 383 p.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contributions to Embryology**, Washington, v.26, n. 158, p. 129-146, 1937.

OKAMOTO, T. et al. Caveolins, a family of scaffoldinh proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane., **The journal biological chemistry**, p. 5419-5422, 1998.

OLIVEIRA, C. M. **Aspectos anatômicos e histológicos da placenta de zebuínos criados na Amazônia Oriental**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína.

OLIVEIRA, C. M. Caracterização histológica da placenta de zebuínos criados na amazônia oriental. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.2, p.100-104, 2010.

ORSALINO, T. R. G. et al. Presença das caveolinas -1 e -3 nos músculos longuíssimo do dorso e rombóide de bovinos *(bos taurus indicus).* In: SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS DA UNESP, 6., 2010. **Anais...** Dracena: [s.n.], 2010.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, v. 3, p. 311-320, 2002.

PEREIRA, A. F. FREITAS V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Rev Bras Reprod Anim,** Belo Horizonte, v.33, n.3, p.118-128, jul./set. 2009.

PEREIRA, F. T. V. **Desenvolvimento do placentônio em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945).** 2000. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, F. T. V. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945).** 2004. 102f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, F. T. et al. Transplacental Transfer of Iron in the Water Buffalo (Bubalus bubalis): Uteroferrin and Erythrophagocytosis. **Reproduction in Domestics Animals**, v. 45, n. 5, p. 907-914, 2010.

PEREIRA, F. T. V. et al. Fetal-Maternal Interactions in the Synepitheliochorial Placenta Using the eGFP Cloned Cattle Model. **PLoS ONE,** v.8, n.5, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0064399

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v.80, p.693–705, 2013.

PFARRER, C. et al. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentome. **Placenta,** v. 24, p. 588-597, 2003.

PINTO, L. M. et al. Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (Bos indicus -Linnaeus, 1758). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.110-121. 2008.

PRESTES, N. C.; ALVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia Veterinária**. Editores da Série Roberto Calderon Gonçalves, Luiz Carlos Vulcano. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RAMSEY, E.M. **The placenta**: human and animal. New York: Praeger, 1982.187p.

RAZANI, B. WOODMAN, S.E.; LISANTI, M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacol Rev**., v.54, n.3, p.431-467, 2002.

RAZANI, B. et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. **J. Biol. Chem.,** v.276, p. 38121–38138, 2001.

RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, v.30, p.659-669, 2009.

ROTHBERG, K. G. et al. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell.**, v. 68, n. 4, p. 673-682, Feb. 1992.

SANTOS, R. L. et al. Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. **Theriogenology,** v.46, p.1077-1063, 1996

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Current Conceptions: Pullman, WA, 2003.

SHARMA, R. D. Histomorphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. **Indian journal animal science**, v.53, n.9, p. 964-967, 1983.

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, n.23, p.720-731, 1972.

SOWA, G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights**. Front. Physiol**., v.2, 2012.

THOMAS, C.M., SMART, E.J. 2008. Caveolae structure and function. **J. Cell. Mol. Med**., v.12, n.3, p.796-809, 2008.

TRINCA, V., PEREIRA, F.T.V. Localization and characterization by immunohistochemistry of the protein caveolins-1 and -2 in water buffalo placenta (*Bubalus bubalis bubalis*, Simpson, 1945). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 50., 2013, Campinas. **Anais…** Campinas: [s.n.], 2013. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/>. Acesso em: 03 set. 2013.

VIDRICAIRE, G; TREMBLAY, M.J. A clathrin, caveolae, and dynamin-independent endocytic pathway requiring free membrane cholesterol drives hiv-1 internalization and infection in polarized trophoblastic cells. **J. Mol. Biol.**, v. 368, p. 1267–1283, 2007.

WANG, C. et al.. Molecular characterization and expression analysis of caveolin-1 in pig tissues. **Sci. China Ser. c-life Sci.**, v.51, p.655-661, 2008.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall`s physiology of reproduction**. 4 ed. London: Chapman and Hall, 1994. V. 3., pt 1, p. 233-460.

WOODING, F. B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**. v. 13, n. 2, p. 101-113. 1992.