LAURA ARTONI MÖLLER

**Interação celular na placenta de gestações de bovinos
clonados com especial ênfase às integrinas**

São Paulo

2009

LAURA ARTONI MÖLLER

**Interação celular na placenta de gestações de bovinos
clonados com especial ênfase às integrinas**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

Co-orientador:

Profa. Dra. Christiane Pfarrer

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2173
FMVZ

Möller, Laura Artoni

Interação celular na placenta de gestações de bovinos clonados com especial ênfase às integrinas / Laura Artoni Möller. – São Paulo : L. A. Möller, 2009.
197 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

Co-orientador: Profa. Dra. Christiane Pfarrer.

1. Placenta. 2. SCNT. 3. Integrinas. 4. ECM. 5. TIMPs. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Interação celular na placenta de gestações de bovinos clonados com especial ênfase às integrinas", protocolado sob o nº875/2006, utilizando 15 (quinze) bois, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Cell-cell interactions in the bovine placenta from pregnancies with cloned fetuses with special respect to integrins and their receptors", protocol number 875/2006, utilizing 15 (fifteen) bovines, under the responsibility of Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MÖLLER, Laura Artoni

Título: Interação celular na placenta de gestações de bovinos clonados com especial ênfase às integrinas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico esta tese de doutorado para toda a minha família e para todos os meus amigos. Cada página deste trabalho é o resultado do estímulo e da colaboração de cada um de vocês, obrigada pelo apoio e pela compreensão.

Muito obrigada a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Agradeço a todos os amigos, colegas, secretários e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Agradeço a todos os professores, amigos, colegas e funcionários da “Tierärztliche Hochschule Hannover” na Alemanha.

Agradeço a todos os professores, amigos, colegas e funcionários da “Frauenklinik - Universitätsklinikums Giessen” na Alemanha.

Agradeço a CAPES e ao DAAD pela bolsa de estudo concedida durante a realização do meu doutorado sanduíche na Alemanha.

RESUMO

MÖLLER, L. A. **Interação celular na placenta de gestações de bovinos clonados com especial ênfase às integrinas.** [Cell-cell interactions in the bovine placenta from pregnancies with cloned fetuses with special respect to integrins and their receptors]. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Integrinas são glicoproteínas transmembrânicas envolvidas na adesão célula-célula e célula-proteína da matriz extracelular (ECM) que participam da migração e fusão de células trofoblásticas gigantes (TGC) com células do epitélio materno no placentoma bovino e interagem com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), considerados importantes reguladores das metaloproteinases de matriz (MMPs), que são reconhecidas como passo limitante para ação de enzimas que atuam no remodelamento da ECM na implantação e na gestação. Uma vez que as integrinas são consideradas responsáveis pela manutenção da arquitetura tecidual e que as MMPs podem regular a degradação e a reconstituição da ECM necessária para a invasão do trofoblasto, temos como objetivo verificar uma possível relação das integrinas com alterações placentárias comumente observadas em gestações de animais clonados (SCNT). Para avaliar a funcionalidade placentária, a expressão do lactogênio placentário (PL) e do antígeno Ki-67 foram também verificadas. Placentomas bovinos foram coletados e divididos em 3 grupos: 1) início (n = 6) e 2) final (n = 3) da gestação de animais derivados de monta natural (n=9) e final da gestação de animais clonados (n=8), clones machos (n=4) e clones fêmeas (n=4). As proteínas foram localizadas por imuno-histoquímica indireta, exceto as subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ que foram localizadas por imunofluorescência. A especificidade dos anticorpos e expressão protéica foi confirmada por Western blot e a expressão do RNAm foi avaliada por meio de RT-PCR e PCR em tempo real quantitativo. As células positivas para a laminina, TIMP-2, Ki-67 e lactogênio placentário (PL) foram quantificadas e para comparação entre os grupos. A proteína das subunidades $\alpha 6$ do receptor de integrina e $\beta 1$ foi observada nos animais clonados e não clonados nos estromas materno e fetal e porção basal dos epitélios materno e fetal e foi co-localizada com a laminina. A proteína das subunidades αV e $\beta 3$ do receptor de integrina foi observado nos

estromas materno e fetal e foi co-localizado com a fibronectina. O TIMP-2 foi exclusivamente e especificamente localizado nas TGCs no início e final da gestação de animais clonados e não clonados, mas não houve diferença significativa em sua expressão. O PL apresentou a mesma localização do TIMP-2 em todos os grupos analisados. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre 270d e clones ao se comparar a expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$ e do lactogênio placentário e ao se comparar a expressão protéica por western blot da laminina e do TIMP-2. Foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo de animais clonados ao se quantificar o número de TGCs positivas para a laminina e para o lactogênio placentário. Apesar de algumas diferenças terem sido observadas na expressão de integrinas e de proteínas da ECM, sugere-se que a interação das integrinas com seus ligantes da ECM a termo não é um determinante da sobrevivência neonatal de bovinos clonados. Contudo, outros estudos são necessários para esclarecer se estas proteínas representam elementos chave na placentação de bovinos clonados em início de gestação. As diferenças observadas na expressão de integrinas e principalmente do PL entre clones fêmeas e machos sugerem possível influência de genes associados ao cromossomo sexual ou imprinting.

Palavras-chave: Placenta. SCNT. Integrinas. ECM. TIMPs.

ABSTRACT

MÖLLER, L. A. **Cell-cell interactions in the bovine placenta from pregnancies with cloned fetuses with special respect to integrins and their receptors.** [Interação celular na placenta de gestações de bovinos clonados com especial ênfase às integrinas]. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Integrins are transmembrane glycoproteins involved in cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) adhesion and signal transduction. They participate in the migration and fusion of trophoblast giant cells (TGC) with uterine epithelial cells in bovine placentomes, and interact with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), considered important regulators of matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are rate-limiting enzymes degrading ECM proteins during tissue remodeling around embryo implantation, pregnancy and parturition. Since integrins are considered to be responsible for the maintenance of the architecture within tissues and MMPs may also regulate degradation and reconstitution of ECM required for trophoblast invasion, we aimed to verify a potential relation of integrins with common placental alterations observed in cloned animals (SCNT). To verify the placental functionality, expression of placental lactogen (PL) and Ki-67 antigen was also assessed. Bovine placentomes were collected and divided into 3 groups: 1) early and 2) late gestation derived from natural mating (n=9) and 3) late gestational bovine clones (n=8), also divided into male clones (n=4) and female clones (n=4). All proteins were localized by indirect immunohistochemistry except for integrin subunits $\alpha 6$, $\beta 1$, αV and $\beta 3$ that were shown by immunofluorescence. The antibody specificity and protein expression were confirmed by Western blot. Expression of mRNA was evaluated using RT-PCR and quantitative Real Time PCR. Positive cells for laminin, TIMP-2, Ki-67 and placental lactogen were quantified for comparisons among groups. The protein of integrin receptor subunits $\alpha 6$ and $\beta 1$ was observed in both cloned and non-cloned animals in the fetal and maternal stroma and at the basal membrane of maternal and fetal epithelial cells, co-localized with laminin and with collagen IV. The integrin receptor subunits αV and $\beta 3$ were observed in the fetal and maternal stroma, co-localized with fibronectin. TIMP-2 was specifically and exclusively localized in TGC in the early and term gestation in both cloned and non-cloned animals. PL has shown

the same localization of TIMP-2 in all analyzed samples. Statistically significant differences ($p < 0,05$) between term gestation of non-cloned and cloned animals were observed comparing the mRNA expression of integrin $\beta 1$ subunit and placental lactogen and the protein expression of laminin and TIMP-2. There were also statistically significant differences ($p < 0,05$) between non-cloned and cloned animals in the number of laminin and placental lactogen positive cells. Despite some differences in integrin and ECM proteins expression, our results suggest that the interaction between integrins and their ECM ligands in term gestation is not a determinant for the survival rate of newborn cloned calves. However further studies are necessary to elucidate if integrins represent key elements in the early placentation of SCNT bovines. The differences found in the integrin and principally in the placental lactogen expression between female and male cloned calves suggests the influence of sex-chromosome associated genes or imprinting.

Keywords: Placenta. SCNT. Integrins. ECM. TIMPs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismos usados para alterar os níveis de sinalização entre integrinas e os receptores dos fatores de crescimento: a) modificação de receptor: alterações pós-tradução nos receptores de fatores de crescimento, como fosforilação e desfosforilação, que podem ocorrer por meio de associação com quinases e fosfatases após ligação com os receptores de integrina, sendo que as integrinas também podem ser fosforiladas em resposta à sinalização de fatores de crescimento; b) receptores: o número de receptores pode ser alterado por alterações na transcrição, tradução, reestruturação da membrana ou por mecanismos de degradação; c) localização do receptor: localização de integrinas em específicos micro domínios pode promover interação com receptores de fatores de crescimento e promover o início ou finalização da sinalização; d) forma do receptor: alterações na forma do receptor (ativação) causam alterações de afinidade de ligação e resultam em sinalização (Adaptado de: CONSTANT; COLOGNATO, 2004).....42
- Figura 2 - Sinalização da integrina, regulação do meio extracelular durante o desenvolvimento. Moléculas da matriz extracelular podem participar da ativação de integrinas por meio da alteração do equilíbrio entre integrinas ativadas e não-ativadas. A associação de integrinas com outras moléculas, bem como a sua localização na membrana celular controlam qual função irão mediar (Adaptado de: CONSTANT; COLOGNATO, 2004).....43
- Figura 3 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\alpha 6$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-fluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\alpha 6$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 μ m.....70
- Figura 4 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=7)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4),

clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 72

- Figura 5 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\beta 1$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 μm 74
- Figura 6 - Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$ por western blot, utilizando-se anticorpo policlonal anti integrina $\beta 1$ 76
- Figura 7 - A, expressão protéica individual da subunidade de integrina $\beta 1$ obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (números) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados (90d e 270d) e clonados (clones)*; C, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados (270d), clonados do sexo masculino (clones M) e clonados do sexo feminino (clones F)**. * Barras representam média +/- erro padrão (n = 4 e 8, respectivamente). ** Barras representam média +/- erro padrão (n = 4 / grupo). Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 76
- Figura 8 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 78
- Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina αV na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação

	em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina αV . A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia). Barra: 50 μm	80
Figura 10 -	Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina αV por western blot.....	82
Figura 11 -	A, expressão protéica individual da subunidade de integrina αV obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270 d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 4.2 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270 d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$	82
Figura 12 -	A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina αV em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$	84
Figura 13 -	Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\beta 3$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia). Barra: 50 μm	86
Figura 14 -	Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ por western blot.....	88

- Figura 15 - A, expressão protéica individual da subunidade de integrina $\beta 3$ obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270 d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 4.2 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 88
- Figura 16 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 90
- Figura 17 - Fotomicrografias da localização da proteína do colágeno tipo IV na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti colágeno tipo IV. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e nos capilares maternos e fetais (*). Barra: 100 μ m.....93
- Figura 18 - A, expressão relativa individual do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 95

Figura 19 - Fotomicrografias da localização da proteína da fibronectina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti fibronectina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e nos capilares maternos e fetais (*). Barra: 50 µm.....97

Figura 20 - A, expressão relativa individual do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 99

Figura 21 - Fotomicrografias da localização da proteína da laminina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti laminina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 100 µm..... 101

Figura 22 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pela laminina na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo policlonal anti laminina. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 103

Figura 23 -	Resultado da expressão individual da proteína da laminina por western blot.....	106
Figura 24 -	Expressão protéica individual da laminina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação (n=3) e aos 270d (n=4) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4 e clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação (bandas de 200 kDa em cor cheia, 205 kDa em cor pontilhada e 400 kDa em cor com riscos diagonais).....	106
Figura 25 -	Expressão protéica da laminina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; A, C e E, expressão protéica da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; B, D e F, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$	107
Figura 26 -	A, expressão relativa individual do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas penta, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=6)*; C, expressão relativa do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$	109
Figura 27 -	Fotomicrografias da localização da proteína da β -actina na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti β -actina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção apical dos epitélios maternos e fetais (ponta de seta vazia). Barra: 200 μ m.....	111
Figura 28 -	Resultado da expressão individual da proteína da β -actina por western blot.....	113

- Figura 29 - A, expressão protéica individual obtida por densitometria óptica utilizando-se anticorpo monoclonal anti β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 113
- Figura 30 - Fotomicrografias da localização da proteína da vimentina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti vimentina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia). Barra: 100 μ m..... 115
- Figura 31 - Resultado da expressão individual da proteína da vimentina por western blot..... 117
- Figura 32 - A, expressão protéica individual da vimentina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da vimentina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 117
- Figura 33 - Fotomicrografias da localização da proteína do TIMP-2 na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti TIMP-2. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação em TGCs (ponta da seta). Barra: 50 μ m 119

- Figura 34 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo TIMP-2 na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti TIMP-2. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 121
- Figura 35 - Resultado da expressão individual da proteína do TIMP-2 por western blot utilizando-se anticorpo monoclonal anti TIMP-2 123
- Figura 36 - A, expressão protéica individual do TIMP-2 obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 123
- Figura 37 - Presença do RNAm do TIMP-2 na placenta bovina aos e 270 dias de gestação de animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação de animais clonados 124
- Figura 38 - A, expressão relativa individual do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas indep e 42); B, expressão relativa do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=5)*; C, expressão relativa do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 126

- Figura 39 - Fotomicrografias da localização da proteína do Ki-67 na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti Ki-67. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), nos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 μ m..... 128
- Figura 40 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo Ki-67 na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti Ki-67. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 130
- Figura 41 - Fotomicrografias da localização da proteína do lactogênio placentário na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti lactogênio placentário. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 100 μ m..... 132
- Figura 42 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo lactogênio placentário na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti lactogênio placentário. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam

média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 134

Figura 43 - Presença do RNAm do lactogênio placentário na placenta bovina aos 270 dias de gestação de animais derivados e monta natural e aos 270 dias de gestação de animais clonados 135

Figura 44 - A, expressão relativa individual do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas indep e 42); B, expressão relativa do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias ($n=4$) e clonados (clones) aos 270 dias ($n=5$)*; C, expressão relativa do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias ($n=4$), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias ($n=3$) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias ($n=2$)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$ 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificidade de ligação dos receptores de integrina.....	40
Tabela 2 - Descrição do tipo e marca dos anticorpos primários utilizados	59
Tabela 3 - Descrição do tipo e marca dos anticorpos secundários utilizados	60
Tabela 5 - Concentração dos primers e amostras utilizadas para a reação de PCR em Tempo Real	64
Tabela 6 - Concentração dos primers e amostras utilizadas para a reação de RT-PCR.....	66
Tabela 7 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pela lamina.....	185
Tabela 9 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pelo Ki-67	186
Tabela 11 - Densitometria óptica da integrina $\beta 1$	187
Tabela 13 - Densitometria óptica da integrina $\beta 3$	188
Tabela 14 - Densitometria óptica da laminina	188
Tabela 15 - Densitometria óptica da β -actina.....	188
Tabela 16 - Densitometria óptica da vimentina	189
Tabela 17 - Densitometria óptica do TIMP-2.....	189
Tabela 18 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$	190
Tabela 19 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$	190
Tabela 20 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina αV	191
Tabela 21 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$	191
Tabela 22 - Expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV.....	192
Tabela 23 - Expressão relativa do RNAm da fibronectina	192
Tabela 24 - Expressão relativa do RNAm da laminina	193
Tabela 25 - Resultados dos testes estatísticos para as subunidades de integrina	194

Tabela 26 - Resultados dos testes estatísticos para as proteínas da ECM e citoesqueleto	195
Tabela 27 - Resultados dos testes estatísticos para a laminina e vimentina	196
Tabela 28 - Resultados dos testes estatísticos do TIMP-2, ki-67 e Lactogênio placentário.....	197

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Formulação da solução tampão citrato – Giessen - 2007	178
Quadro 2 -	Formulação da solução tampão fosfato - São Paulo - 2009.....	178
Quadro 3 -	Formulação da solução tampão de bloqueio – Giessen - 2007	179
Quadro 4 -	Formulação da solução tampão de lise – Giessen - 2007.....	179
Quadro 5 -	Formulação da solução tampão do gel de empacotamento – Giessen - 2007	180
Quadro 6 -	Formulação da solução tampão do gel de separação - Giessen - 2007	180
Quadro 7 -	Formulação da solução tampão Tris-Glicina – Giessen - 2007	181
Quadro 8 -	Formulação da solução Ponceau S – Giessen - 2007	182
Quadro 9 -	Formulação da solução tampão tris – Giessen - 2007	182
Quadro 11 -	Formulação do gel de empacotamento – Giessen - 2007	183
Quadro 12 -	Formulação do gel de separação 8% - Giessen - 2007	183
Quadro 13 -	Formulação do gel de separação 10% - Giessen - 2007	184
Quadro 14 -	Formulação do gel de separação 12% - Giessen - 2007	184

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
SCNT	transferência nuclear de células somáticas
IVP	fertilização <i>in vitro</i>
LOS	síndrome do feto gigante
TGC	célula trofoblástica gigante
TGCs	células trofoblásticas gigantes
ECM	matriz extracelular
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR2	receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial
FAK	quinase de adesão focal
PSP 60	proteína específica da gestação 60
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
MHC 1	complexo de histocompatibilidade de classe 1
TNF α	fator de necrose tumoral α
EGF	fator de crescimento epidermal
MMP	metaloproteinase de matriz
MMPs	metaloproteinases de matriz
MT-MMP	tipo membranoso de metaloproteinases de matriz
TIMP	inibidor teciduais de metaloproteinases
TIMPs	inibidores teciduais de metaloproteinases
PL	lactogênio placentário
bPL	lactogênio placentário bovino
oPL	lactogênio placentário ovino
cPL	lactogênio placentário caprino
GH	hormônio do crescimento
PRL	Prolactina
RGD	arginina-glicina-aspartica ácida

N-terminal	amino-terminal
C-terminal	carbóxi-terminal
PBS	solução tampão fosfato
TBS	solução tampão tris
TBS-T	solução tampão tris adicionada de Tween 20
ICH	imuno-histoquímica
IF	imuno-fluorescência
WB	western blot
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
DAB	Diaminobenzidina
BSA	soro albumina bovina
SDS	dodecil sulfato de sódio
kDa	unidade de massa atômica
RX	raio X
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
DNA	ácido desoxiribonucleico
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementar
PCR	reação de polimerase em cadeia
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa
RT	transcriptase reversa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
F	primer forward
R	primer reverse

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	REVISÃO DE LITERATURA	34
3.1	PLACENTAÇÃO DE BOVINOS	35
3.1.1	Placentação de bovinos derivados de monta natural.....	36
3.1.2	Placentação de bovinos derivados de transferência nuclear	37
3.2	INTEGRINAS	39
3.3	FUNÇÃO DAS INTEGRINAS NA PLACENTA.....	43
3.4	PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	45
3.5	INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES	47
3.6	LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO (PL).....	49
3.7	KI-67.....	50
4	MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1	IMUNO-HISTOQUÍMICA COM MÉTODO AEC®	53
4.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA COM MÉTODO ENVISION®	55
4.3	IMUNOFLOURESCÊNCIA EM CORTE CONGELADO	56
4.4	WESTERN BLOT	57
4.5	EXTRAÇÃO DE RNA	61
4.6	CONFEÇÃO DO CDNA.....	61
4.7	PCR EM TEMPO REAL	62
4.8	RT-PCR.....	64
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5	RESULTADOS	67
5.1	LOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA, QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA E EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAM DAS INTEGRINAS	69
5.1.1	Imunolocalização da subunidade de integrina $\alpha 6$.....	69
5.1.2	Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$.....	71
5.1.3	Imunolocalização da subunidade de integrina $\beta 1$.....	73
5.1.4	Quantificação da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$.....	75

5.1.5	Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$	77
5.1.6	Imunolocalização da subunidade de integrina αV	79
5.1.7	Quantificação da proteína da subunidade de integrina αV	81
5.1.8	Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina αV	83
5.1.9	Imunolocalização da subunidade de integrina $\beta 3$	85
5.1.10	Quantificação da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$	87
5.1.11	Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$	89
5.2	IMUNOLOCALIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA E EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO	91
5.2.1	Imunolocalização do colágeno tipo IV	92
5.2.2	Expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV	94
5.2.3	Imunolocalização da fibronectina.....	96
5.2.4	Expressão relativa do RNAm da fibronectina.....	98
5.2.5	Imunolocalização da laminina.....	100
5.2.6	Quantificação do número de TGCs coradas pela laminina	102
5.2.7	Quantificação da proteína da laminina.....	104
5.2.8	Expressão relativa do RNAm da laminina.....	108
5.2.9	Imunolocalização da proteína da β -actina	110
5.2.10	Quantificação da proteína da β -actina	112
5.2.11	Imunolocalização da vimentina	114
5.2.12	Quantificação da proteína da vimentina	116
5.3	EXPRESSÃO DO INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASES 2 (TIMP-2).....	118
5.3.1	Imunolocalização do TIMP-2	118
5.3.2	Quantificação do número de células coradas pelo TIMP-2	120
5.3.3	Quantificação da proteína do TIMP-2	122
5.3.4	Expressão relativa do RNAm do TIMP-2	124
5.3.5	Expressão relativa do RNAm do TIMP-2	124
5.4	IMUNOLOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO RNAm DO KI-67 E LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO	127
5.4.1	Imunolocalização do Ki-67	127

5.4.2	Quantificação do número de células positivas coradas pelo Ki-67	129
5.4.3	Imunolocalização do lactogênio placentário	131
5.4.4	Quantificação do número de células positivas coradas pelo Lactogênio placentário	133
5.4.5	Expressão do RNAm do lactogênio placentário.....	135
5.4.6	Expressão relativa do RNAm do Lactogênio Placentário.....	135
6	DISCUSSÃO	138
6.1	DISCUSSÃO DA METODOLOGIA.....	139
6.2	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	141
7	CONCLUSÕES	156
	REFERÊNCIAS	158
	APÊNDICE A	177

1 INTRODUÇÃO

A gestação é o resultado de uma série de eventos coordenados que tem origem na fertilização do oócito pelo espermatozóide, seguida pela aposição e adesão do embrião à parede uterina (implantação) e o desenvolvimento da placenta. A placenta foi descrita por Mossman (1937) como uma aposição entre um tecido parenteral (materno) a um tecido fetal com finalidades de trocas fisiológicas (WOODING; FLINT, 1994). Também é o órgão através do qual chegam nutrientes e detritos são eliminados (REYNOLDS; REDMER, 1995).

A clonagem animal a partir de células somáticas (SCNT) é atualmente utilizada como possibilidade de perpetuação genética de animais de alto valor zootécnico. No entanto, perdas gestacionais são freqüentes, o que faz da placentação de bovinos clonados foco de interesse de vários grupos de pesquisa, pois este processo não segue os mesmos padrões de uma gestação convencional e muitas anormalidades placentárias foram observadas até o momento, como consequência deste processo: hidroalantóide (CONSTANT et al., 2006), placentomas maiores (RAVELICH et al., 2006), hipertrofia e placentomegalia (TANAKA et al., 2001; CONSTANT et al., 2006; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006), atraso na formação do trofoblasto durante os primeiros estágios da gestação (HASHIZUME et al., 2002) e maior índice de mortalidade durante a gestação (HILL et al., 2001; CHAVATE-PALMER et al., 2002).

Integrinas são glicoproteínas de estrutura dimérica que fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos cátion-dependentes compostos por subunidades pareadas α e β . Promovem interação entre o citoplasma e a matriz extracelular, seu mecanismo de ação é complexo e de extrema importância para o sistema reprodutor. Sabe-se que as integrinas modulam a formação do trofoblasto, sugere-se a sua participação no controle da migração das células trofoblásticas gigantes, bem como controle do desenvolvimento placentário (BOWEN; HUNT, 2000; BOTELLALLUSIA, 2001; PFARRER et al., 2003). Integrinas podem estar também envolvidas na embriogênese, no processo de cicatrização e mesmo em metástases tumorais (LESSEY; CASTELBAUM, 2002).

Durante a gestação, enzimas proteolíticas extracelulares regulam a degradação da matriz extracelular (ECM) necessária para o desenvolvimento embrionário e remodelamento tecidual. Sugere-se que as principais enzimas proteolíticas que atuam nesta degradação sejam as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), uma família de enzimas dependentes do zinco e do cálcio (CHIRCO et al., 2006; WOESSNER, 1991), de ação altamente controlada por seus inibidores naturais, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (LAMBERT et al., 2004). Um balanço entre a expressão das metaloproteinases de matriz extracelular e de seus inibidores é de extrema importância para a adequada degradação da ECM necessária para o correto desenvolvimento da gestação (UEKITA et al., 2004).

Muitos aspectos relativos à placentação de bovinos clonados necessitam maiores esclarecimentos. Uma vez que as integrinas são polipeptídios versáteis que atuam como receptores de adesão, seu desempenho é extremamente controlado durante a gestação, de maneira que sua inadequada expressão pode ser um dos fatores relacionados às perdas gestacionais e neonatais observadas nos animais derivados de transferência nuclear.

2 OBJETIVOS

Partindo-se da hipótese de que a expressão das integrinas é diferente na placenta de bovinos clonados, objetiva-se avaliar e comparar a expressão das integrinas e de três componentes da matriz extracelular, de proteínas do citoesqueleto, inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2), lactogênio placentário (PL) e Ki-67 na placenta de bovinos clonados a de bovinos oriundos de monta natural. Para isso foram elaborados os seguintes objetivos específicos:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. verificar se os anticorpos disponíveis reconhecem as proteínas de interesse em tecidos bovinos
2. avaliar a localização tecidual das integrinas, proteínas da matriz extracelular, proteínas do citoesqueleto e TIMP-2 em placentas derivadas de gestações naturais e SCNT por meio de imuno-histoquímica
3. avaliar a expressão gênica e protéica das mesmas proteínas em placentas derivadas de gestações naturais e SCNT por meio de PCR e Western blot
4. avaliar a funcionalidade da placenta mediante expressão gênica e protéica de marcadores como o Ki-67 e o lactogênio placentário
5. Comparar a expressão gênica e protéica em placentas derivadas de SCNT de fetos machos e fêmeas
6. Correlacionar os achados do trabalho a diferenças morfofuncionais descritas para a placenta de animais derivados de SCNT.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O termo mais compreensivo sobre placenta foi usado por Mossman (1937), descrevendo-a como uma aposição entre um tecido parenteral (materno) e um tecido fetal com finalidades de trocas fisiológicas (WOODING; FLINT, 1994). A placenta é um órgão único, autônomo e transiente, o que assegura trocas materno-fetais, além de impedir o reconhecimento dos antígenos de origem paterna pela mãe. Os hormônios de origem placentária são necessários para o estabelecimento e manutenção da gestação, bem como adaptação do organismo materno ao estado gestacional e crescimento fetal (LALA et al., 1983; CONLEY; MASON, 1990; WOODING; FLINT, 1994; MALASSINE; FREND; EVAIN-BRION; MALASSINE, 2003). Entretanto, qualquer alteração que favoreça ou acarrete uma placentação anormal, pode resultar na perda do feto e/ou severas complicações para a mãe (ZHOU et al., 1993).

3.1 PLACENTAÇÃO DE BOVINOS

Em contraste com a placentação hemocorial observada em primatas e roedores, a placentação na fêmea bovina é caracterizada por restrita invasão, na qual as células trofoblásticas gigantes (TGCs) migram através do endométrio e se fundem às células epiteliais uterinas (WOODING, 1992; KLISCH et al., 1999), o que significa que a migração celular não atinge a membrana basal materna. O conhecimento das interações que acontecem entre as células da placenta bovina ainda é restrito e estudos ainda são necessários para a total compreensão da complexidade de fatores que interferem ou favorecem a gestação (ROBERTS et al., 1990; MACLAREN; WILDEMAN, 1995; MACINTYRE et al., 2002; PFARRER et al., 2003).

3.1.1 Placentação de bovinos derivados de monta natural

A placenta na maioria dos mamíferos é caracterizada pela presença de áreas de contato entre as partes materna e fetal, o que acontece a partir de interdigitações entre os dois tecidos de forma mais ou menos intensa, que pode variar de acordo com a espécie (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placenta bovina pode ser classificada como cotiledonária, caracterizada pela presença de regiões específicas de trocas, os chamados placentomas, compostos pela carúncula materna e pelo cotilédone fetal, e responsáveis por trocas respiratórias e de nutrientes. Entre essas estruturas denominadas placentomas, pode-se também observar áreas intercotiledonárias de córion liso. O crescimento e desenvolvimento normal dos placentomas são essenciais para o desenvolvimento e crescimento fetais (LAVEN; PETERS, 2001). O tipo de interdigitação observado nos bovinos é do tipo vilosa, composta pelo córion que forma vilos semelhantes a árvores, os quais penetram no tecido materno correspondente (LEISER; KAUFMANN, 1994). Em uma gestação bovina considerada normal, a placenta geralmente apresenta de 60 a 120 placentomas, os quais possuem formato de cogumelo e são amplamente distribuídos. Essas estruturas consistem em unidades de interface materno-fetais formadas por interdigitações micro vilosas entre os epitélios materno e fetal (MAYHEW; BURTON, 1997).

Quanto às camadas de membranas interhemais, a placenta bovina pode ser classificada como sinepteliocorial, semelhante à epiteliocorial, onde o córion fetal recoberto pelo trofoblasto está aderido à mucosa uterina, de maneira que seis barreiras teciduais podem ser observadas: endotélio materno, tecido conjuntivo, epitélio materno, epitélio fetal (também denominado trofoblasto), tecido conjuntivo e endotélio fetal (LEISER; KAUFMANN, 1994).

No bovino a placenta sinepteliocorial consiste na migração de algumas células trofoblásticas, que desenvolvem pseudopodes por meio de junções coriônicas o que favorece sua migração para o epitélio uterino e posterior fusão com as células mononucleadas deste epitélio o que termina com o surgimento de células híbridas ou trinucleadas, sem ultrapassar a membrana basal (WOODING, 1992). A migração

das TGCs (fenômeno invasivo) na placenta bovina pode ser interpretada como uma restrita invasão do trofoblasto, que pode ser mediada por integrinas (PFARRER et al., 2003).

Durante toda a gestação ocorre a formação e a migração das TGCs, entretanto quanto mais próximo o final da gestação, menor é o seu número e o período de vida (WOODING, 1992; GREEN et al., 2000; BERTOLINI, WALLACE, ANDERSON, 2006). As células trofoblásticas gigantes compreendem cerca de 20% da população de células trofoblásticas da placenta e são responsáveis pela produção de hormônios, lactogênio placentário (PL), glicoproteínas dentre outros produtos importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento fetal (SCHLAFFER et al., 2000; BERTOLINI, WALLACE, ANDERSON, 2006).

3.1.2 Placentação de bovinos derivados de transferência nuclear

Para o rebanho bovino, a chance de aumentar os índices produtivos e também gerar maior diversidade de material genético tem alcançado imensa atenção de pesquisadores, o que vem permitindo desenvolver biotecnologias ligadas principalmente à reprodução animal. A clonagem animal ganhou espaço e apresenta um crescente interesse que pode ser observado na comunidade científica e industrial, uma vez que se torna possível produção e multiplicação de animais idênticos geneticamente e com extrema capacidade produtiva (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004).

Apesar da clonagem já estar bem estabelecida e ter permitido o nascimento de vários animais a partir de transferência nuclear de células somáticas, este processo ainda é falho (2 a 10% de natalidade) e conta com um elevado número de abortos em diversas fases da gestação. Muito ainda falta ser esclarecido, uma vez que inúmeras anormalidades foram observadas nas gestações de animais após clonagem de células somáticas (CHAVATTE-PALMER et al., 2002).

Na bovinocultura, a clonagem vem se desenvolvendo com rapidez, o que permitiu observar que o número médio de placentomas em gestações derivadas de transferência nuclear foi de 62, quantidade inferior se comparada com gestações normais, o que pode prejudicar a eficiência placentária, a qual se mostrou diminuída no grupo manipulado tanto em função do peso da placenta, quanto em função da área de troca (LACERDA, 2006), além de hidroalantóide nas receptoras (CHAVATTE-PALMER et al., 2002), placentas mais pesadas, redução de superfície caruncular e vilosa e maior produção da proteína específica da gestação (Pregnancy specific protein 60 - PSP60), o que pode estar relacionado à hiperatividade das células trofoblásticas gigantes ao final da gestação (HILL et al., 2000; HILL et al., 2001; TAVERNE et al., 2002; ALLEN et al., 2003), distocia, morte pré e pós natal, patologias no sistema cardiopulmonar, na adrenal, distúrbios hipotalâmicos e do sistema urinário (HASHIZUME et al., 2002).

Expressão alterada de diferentes genes também tem sido relacionada à alteração placentária freqüentemente observada após a clonagem; dentre eles podem ser citados: leptina, proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP 2 e 3) e o complexo de histocompatibilidade de classe1 (MHC 1) (PATEL et al., 2004; RAVELICH et al., 2004a). Anormalidades conhecidas como “large offspring syndrome” (LOS, síndrome do feto gigante, ou gigantismo) são freqüentemente observadas em fetos em desenvolvimento, derivados da técnica de transferência nuclear, mas também são observadas em embriões produzidos a partir de cultivo *in vitro* (BERTOLINI; ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2002; FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004) e o peso ao nascimento é um sinalizador perinatal que quando elevado é apontado como uma das maiores causas de morte neonatal (FERRELL, 1991; BERTOLINI et al., 2004).

Todas essas alterações e a alta incidência de perdas gestacionais que acontecem no início e no final da gestação são conseqüências da manipulação genética, sendo principalmente observada em animais derivados de transferência nuclear (SCNT) e em menor número em embriões produzidos *in vitro* (IVP) (WELLS et al., 1999).

Para que a gestação evolua e se complete, processos como fertilização, implantação e placentação devem acontecer de maneira sincronizada, o que depende de uma

complexa comunicação entre células, que envolve muitos fatores, como as integrinas, uma ampla família de receptores transmembrânicos de adesão, que medeiam a migração, a invasão e controlam a função celular (BOWEN; HUNT, 2000).

3.2 INTEGRINAS

Mecanismos que envolvem interações entre células e os componentes protéicos da matriz extracelular (ECM) tornaram-se mais compreensíveis a partir do isolamento e caracterização de receptores de superfície celular dos componentes da ECM, as integrinas (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987).

Integrinas englobam uma grande família de receptores transmembrânicos heterodiméricos cátion-dependentes compostos por subunidades α (alfa) e β (beta) ligadas de maneira não-covalente (LONGHURST; JENNINGS, 1998; BOWEN; HUNT, 2000). Essas subunidades são o produto de dois genes diferentes e as duas subunidades são essenciais para que sua expressão na superfície celular aconteça. A subunidade α é formada por um domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico e um grande domínio extracelular, composto por aproximadamente 1000 aminoácidos. Este domínio extracelular é formado por sete unidades repetidas arranjadas uma após a outra, de aproximadamente 60 aminoácidos, que possuem três ou quatro locais de adesão de cátions bivalentes, as quais possuem homologia com estruturas de ligação com cálcio, presente em outras proteínas como a calmodulina e parvalbumina (LONGHURST; JENNINGS, 1998).

Integrinas são estruturalmente assimétricas e cada subunidade β possui em seus domínios citoplasmáticos, regiões compostas por quatro focos semelhantes à fibronectina e dois locais de derivação alternativa. Oito subunidades β são compostas por 750 aminoácidos com homologia de cerca de 40%, além de aproximadamente 200 aminoácidos semelhantes aos encontrados na subunidade α que apresentam locais de ligação com cátions bivalentes (LONGHURST; JENNINGS, 1998).

A família das integrinas inclui receptores de superfície para proteínas da ECM como a fibronectina, colágeno, laminina, osteopoetina, dentre outros e interage também com receptores para fatores de crescimento, como o bFGF (Fator de Crescimento Fibroblástico Básico), VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), EGF (Fator de Crescimento Epidermal), PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), TNF α (Fator de Necrose Tumoral α), interferons, entre outros (HEMLER, 1990; COOPER; TAMURA; QUARANTA, 1991; HYNES, 1992; BOWEN; HUNT, 2000). Múltiplas integrinas podem se ligar ao mesmo ligante (Tabela 1) (DAMSKY; FITZGERALD; FISHER, 1992; IVASKA; HEINO, 2000).

Tabela 1 - Especificidade de ligação dos receptores de integrina

Colágeno tipo IV	Fibronectina	Laminina	Vitronectina	VEGF	VEGFR2	IGF
$\alpha 1\beta 1$ (* •)	$[\alpha 3\beta 1]$ (*)	$[\alpha 1\beta 1]$ (* •)	$\alpha 8\beta 1$ (*)	$\alpha V\beta 3$ (§)	$\alpha V\beta 3$ (§)	$\alpha V\beta 5$ (§)
$\alpha 2\beta 1$ (* •)	$\alpha 4\beta 1$ (* •)	$[\alpha 2\beta 1]$ (* •)	$\alpha 9\beta 1$ (*)	$\alpha 3\beta 1$ (§)		
$\alpha 3\beta 1$ (*)	$\alpha 5\beta 1$ (* •)	$[\alpha 3\beta 1]$ (* •)	$\alpha V\beta 3$ (*)	$\alpha 9\beta 1$ (§)		
	$\alpha 8\beta 1$ (*)	$\alpha 6\beta 1$ (* •)	$\alpha V\beta 5$ (*)			
	$[\alpha V\beta 3]$ (*)					
	$\alpha V\beta 6$ (*)					

[ ] indicam baixa afinidade

(•DAMSKY; FITZGERALD; FISHER, 1992; * PFARRER et al., 2003; § SOMANATH; CIOCEA; BYZOVA, 2009)

Quando foram descobertas, as integrinas eram consideradas facilitadoras de ligações entre células vizinhas, pois não apresentam atividade quinase (IVASKA; HEINO, 2000). Atualmente integrinas são consideradas como receptores que interagem tanto com o exterior celular quanto com o interior e atuam como transdutores que recebem sinais externos que favorecem o controle do movimento celular e o crescimento. Integrinas podem também sofrer controle do interior das células e assim modular sua receptividade a diferentes ligantes, como componentes do citoesqueleto e fatores de crescimento, como descritos anteriormente (LONGHURST; JENNINGS, 1998; BOWEN; HUNT, 2000).

Normalmente as integrinas são encontradas em estado de baixa afinidade, ou seja, inativas e são ativadas a partir de estímulos elétrico-dependentes, denominados como sinalização “inside-out”, ou sinalização interna. Essa sinalização pode ser mediada por repostas do domínio citoplasmático a sinais intracelulares, iniciados

pelo estímulo de proteínas como a calreticulina, serina quinase e membros da família GTPase (LONGHURST; JENNINGS, 1998).

A principal função das integrinas é mediar a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular ao mesmo tempo em que modula um grande número de outras funções celulares (HYNES, 1992; CLARK; BRUGEE, 1995; HUMPHRIES, 1996; KIM; YAMADA, 1997): podem participar desde a embriogênese, agregação celular, até diferenciação em células tumorais, crescimento e metástase (HYNES, 1987, HUMPHRIES et al., 1988, SMITH; CHERESH, 1990).

Quando em contato com seus ligantes, as integrinas se movem lateralmente e passam a formar agrupamentos na membrana plasmática, chamados de locais de adesão, os quais são compostos por abundantes proteínas do citoesqueleto e moléculas de sinalização (LONGHURST; JENNINGS, 1998).

Integrinas estão intimamente relacionadas ao citoesqueleto através do domínio citoplasmático da subunidade β . O local específico de adesão é composto por numerosos heterodímeros de integrina acumulados na superfície celular (GILMORE; BURRIDGE, 1996). Os locais de ligação possuem complexos de sinalização envolvendo quinases, como a quinase de adesão local (FAK) e integrina ligada a quinase e serina/treonina proteína quinase (VOURI, 1998). A afinidade das integrinas a seus ligantes depende do tipo celular e da alteração no estado de ativação mediada por fosforilação do domínio citoplasmático (sinalização interna) e viabilidade dos ligantes (sinalização externa) (MIRANTI; BRUGGE, 2002; KIMMINS; LIM; MACLAREN, 2004) e aumenta na presença de fatores de crescimento (MAILE et al., 2002).

Estudos recentes apontaram que a angiogênese é dependente também da expressão da integrina $\alpha V\beta 3$, uma vez que a sua neutralização durante a implantação pode reduzir a sobrevivência embrionária pela redução da formação de novos vasos sanguíneos (BROOKS et al., 1994). Esse fato pode estar relacionado com a suspeita de que a fosforilação do VEGFR-2 aconteça após estímulo da integrina $\alpha V\beta 3$, sendo quinases e fosfatases mediadoras das alterações induzidas por integrinas durante a fosforilação de receptores dos fatores de crescimento. A

literatura sugere que fatores de crescimento podem regular a função das integrinas favorecendo sua ativação, que acontece a partir de alterações em sua forma. Esse aumento na expressão de integrinas corresponde à observação de que fatores de crescimento podem maximizar suas respostas em regiões esparsas de matriz extracelular (CONSTANT; COLOGNATO, 2004).

Interações entre integrinas e receptores dos fatores de crescimento podem ser divididas em duas categorias (Figura 1): 1; interações acontecem por meio de moléculas de sinalização comuns, que exigem absorção dos dois receptores de quinases específicos e assim atingem seu alvo; ou 2; interações mais próximas são observadas entre os dois receptores e envolvem alterações que acontecem em um dos receptores, que afeta diretamente a atividade do outro (CONSTANT; COLOGNATO, 2004).

Figura 1 - Mecanismos usados para alterar os níveis de sinalização entre integrinas e os receptores dos fatores de crescimento: a) modificação de receptor: alterações pós-tradução nos receptores de fatores de crescimento, como fosforilação e desfosforilação, que podem ocorrer por meio de associação com quinases e fosfatases após ligação com os receptores de integrina, sendo que as integrinas também podem ser fosforiladas em resposta à sinalização de fatores de crescimento; b) receptores: o número de receptores pode ser alterado por alterações na transcrição, tradução, reestruturação da membrana ou por mecanismos de degradação; c) localização do receptor: localização de integrinas em específicos micro domínios pode promover interação com receptores de fatores de crescimento e promover o início ou finalização da sinalização; d) forma do receptor: alterações na forma do receptor (ativação) causam alterações de afinidade de ligação e resultam em sinalização (Adaptado de: CONSTANT; COLOGNATO, 2004)

Integrinas reconhecem seqüências de aminoácidos de resíduo ácido em seus ligantes que são essenciais para a ligação com receptores. Um peptídeo comumente presente nos ligantes de integrinas é a Arginina-Glicina-Aspártica ácida (RGD) encontrada em fibronectinas (LONGHURST; JENNINGS, 1998). Sugere-se também que a ligação de integrinas a diferentes ligantes extracelulares pode resultar em respostas celulares apropriadas durante o desenvolvimento (Figura 2) (CONSTANT; COLOGNATO, 2004).

Figura 2 - Sinalização da integrina, regulação do meio extracelular durante o desenvolvimento. Moléculas da matriz extracelular podem participar da ativação de integrinas por meio da alteração do equilíbrio entre integrinas ativadas e não-ativadas. A associação de integrinas com outras moléculas, bem como a sua localização na membrana celular controlam qual função irão mediar (Adaptado de: CONSTANT; COLOGNATO, 2004)

3.3 FUNÇÃO DAS INTEGRINAS NA PLACENTA

Após a implantação, durante a placentação e ao longo da gestação uma sincronizada interação de várias integrinas com a ECM acontece no placentoma de bovinos (PFARRER et al., 2003). Durante o desenvolvimento da placenta, integrinas podem estar relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da arquitetura da placenta, assim como o desenvolvimento de novos vasos (angiogênese), migração das TGCs e possível participação durante o desenvolvimento embrionário (CROSS; WERB; FISHER, 1994, KIMMINS; MACLAREN, 1999, MACINTYRE et al., 2002). As integrinas podem também estar associadas à receptividade uterina e à correta

implantação do embrião (COUTIFARIS; OMIGBODUN; COUKOS, 1998, KIMBER; SPANSWICK, 2000).

Recentemente tem sido evidenciado que a correta expressão das integrinas é essencial para o sucesso da reprodução. A literatura já descreve algumas funções que as integrinas exercem durante a gestação de várias espécies, incluindo os bovinos, entretanto a maioria das informações publicadas se refere ao início da gestação, ainda durante a fase de implantação (BOWEN; HUNT, 2000).

Foi relatado que em camundongos, humanos, macacos e ovinos a co-expressão da integrina $\alpha V\beta 3$ e seu ligante osteopontina pode ser necessária para que aconteça a adesão do trofoblasto ao epitélio uterino (APPARAO et al., 2001, JOHNSON et al., 2001). Em estudos a partir da distribuição da integrina $\beta 1$, sugere-se que esta subunidade pode estar relacionada com a migração das TGCs e a sua fusão com células do epitélio materno na placenta bovina (PFARRER et al., 2003), devido à freqüente expressão de diferentes receptores de integrinas, incluindo $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ no epitélio uterino, que se ligam a uma ou mais proteínas da ECM como a laminina e o colágeno do tipo IV (COUTIFARIS et al., 1998, KIMBER; SPANSWICK, 2000). A presença da subunidade $\beta 1$ da integrina nas células trofoblásticas bovinas dão suporte a essa hipótese de que a migração das TGCs pode ser iniciada pela sua ligação com integrinas (MACLAREN; WILDEMANN, 1995, PFARRER et al., 2003).

A integrina $\alpha V\beta 3$ pode participar do remodelamento do epitélio uterino e também do trofoblasto durante o período de implantação de bovinos (KIMMINS; LIM; MACLAREN, 2004). Outras pesquisas descrevem que a integrina $\alpha 2\beta 1$ pode promover contato celular e assim favorecer a migração das TGCs e sugere-se também que o formato celular durante o desenvolvimento é caracterizado pela reorganização do citoesqueleto e está intimamente relacionado com a formação das estruturas de ancoragem celular (PFARRER et al., 2003; LANG et al., 2004).

Em estudo realizado com camundongos que apresentavam deficiência da integrina $\alpha 5$ foi possível observar defeitos na formação do mesoderma e morte no nono e décimo dias da gestação. Em camundongos “knockout” foi possível observar

importantes conseqüências da falta de algumas integrinas: a falta da integrina $\alpha 4$ resultou em alteração no desenvolvimento placentário, falha na fusão entre o córion e o alantóide; além de defeitos no embrião em desenvolvimento como falha no desenvolvimento do epicárdio e vasos coronarianos, o que resultou em hemorragia cardíaca (YANG; RAYBURN; HYNES, 1993).

Neste mesmo estudo observou-se que a falta da integrina $\beta 1$ resultou em severas alterações, o que favoreceu morte embrionária ainda no início da gestação. A ausência da integrina αV favoreceu a morte da maioria (80%) dos embriões ainda no início da gestação e os poucos que chegaram ao nascimento (20%) morreram por hemorragia cerebral e intestinal. E a falta da integrina $\alpha 5$ alterou o desenvolvimento embrionário; entretanto a falta da integrina $\alpha 5\beta 1$, pode resultar em aumento da expressão da integrina $\alpha V\beta 1$ e a sua ligação com a fibronectina, o que pode diminuir as alterações placentárias (YANG; RAYBURN; HYNES, 1993).

O mapeamento de integrinas pode prover uma nova perspectiva para o desenvolvimento de tecnologias contraceptivas, uma vez que a diminuição da expressão de integrinas pode resultar em diferentes graus de infertilidade, o que pode favorecer implantação ineficiente e reduzir a fertilidade (ILLERA et al., 2000). Estudar e conhecer o perfil fisiológico de expressão destas proteínas pode resultar em melhores índices reprodutivos.

3.4 PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular é uma rede de proteínas, que inclui os colágenos, proteoglicanas, fibronectinas e laminina, que formam uma barreira, promovem ancoragem estrutural e dão suporte aos tecidos. As proteínas da matriz extracelular possuem grande importância para que a manutenção da arquitetura do tecido conjuntivo, bem como das células mesenquimais seja preservada (HUMPHRIS, NEWHAM, 1998; FATA et al., 2004).

O remodelamento da ECM é essencial para as rápidas alterações morfológicas que acontecem durante o desenvolvimento embrionário e o desbalanço desta condição pode ser prejudicial para a migração e desenvolvimento celular que ocorre durante a embriogênese (BEHRENDTSEN, WERB, 1997).

Desde o início da embriogênese células estabelecem contato com as proteínas da matriz extracelular e a interação da ECM com específicos receptores, como as integrinas, pode regular mecanismos de transdução de sinal intracelular necessários em processos como a polarização, diferenciação, sobrevivência, proliferação e organização celular (HUMPHRICS, NEWHAM, 1998; FATA et al., 2004).

Dentre as proteínas da ECM, os colágenos, laminina e fibronectina foram observados no vilo coriônico de humanos (AMENTA et al., 1986; YAMADA et al., 1987; CHURCH; RICHARDS; APLIN, 1997; KORHONEN, VIRTANEN, 2001) e em placentomas bovinos ao longo da gestação (PFARRER et al., 2003).

Durante a fase proliferativa da gestação a fibronectina, vitronectina e colágeno do tipo III, IV e V são os principais componentes intersticiais. Conforme a invasão, restrita no caso dos bovinos, se inicia observa-se a degradação de alguns dos produtos da ECM (como a laminina) que pode estar de alguma forma relacionada com a capacidade migratória ou invasiva das TGCs (PFARRER et al., 2003; REDDY, MANGALE, 2003).

A fibronectina é importante para a reprodução porque ela participa do processo de reorganização da matriz extracelular, adesão, proliferação e também da migração celular (SCHUPPAN et al., 1994). A fibronectina pode também atuar na regulação do processo de implantação e na organização do tecido placentário (APLIN et al., 1999). A presença desta proteína pode acelerar o desenvolvimento embrionário e sugere-se que a sua ativação seja mediada pela sequência RGD, presente em integrinas (TAKAHASHI et al., 2005).

A laminina é considerada o maior componente da lamina basal das células da decidua e aumenta a sua expressão durante a diferenciação das células do estroma no endométrio (BRAR et al., 1995). Sugere-se um papel estrutural da laminina

durante a decidualização em humanos, uma vez que forte expressão desta proteína foi observada por imuno-histoquímica durante os primeiros estágios da gestação (MIZUNO et al., 1999; KAYISLI et al., 2005); esta proteína pode também favorecer a migração das TGCs juntamente com a subunidade $\beta 1$ da integrina na placenta bovina (PFARRER et al., 2003).

O colágeno do tipo IV é um dos principais constituintes da membrana basal, que esta localizado entre as células endoteliais dos capilares venosos fetais e a camada de células trofoblásticas (ARAI, NISHIYAMA, 2007). A placenta é um tecido rico em colágenos do tipo I e IV (CROUCH; SAGE; BORNSTEIN, 1985; PFARRER et al., 2003; ARAI, NISHIYAMA, 2007). Demonstrou-se que no início da gestação, a invasão do trofoblasto acontece por mediação do colágeno tipo IV (DAMSKY et al., 1994), e também foi relatado que a presença do embrião parece estimular a produção de colágeno pelas células do estroma uterino (WEWER al., 1986) e que o colágeno tipo IV parece exercer papel fundamental para a manutenção da gestação (FURUHASHI et al ., 1994).

3.5 INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES

Metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas proteolíticas dependentes do zinco e cálcio, juntamente com seus ativadores e inibidores (inibidores teciduais de metaloproteinases – TIMPs), são de extrema importância durante o desenvolvimento placentário, durante o parto e durante o processo de invasão do trofoblasto que é associado com a degradação da matriz extracelular, regulada por meio das MMPs (WALTER, BOOS, 2001; BAI et al., 2005).

MMPs são sintetizadas dentro das células, secretadas como precursores inativos que sofrem ativação no meio extracelular por várias enzimas, incluindo as próprias MMPs ou citocinas; sugere-se que esta ativação ocorra de forma autócrina ou parácrina e que TIMPs promovam uma “down” regulação (WALTER, BOOS, 2001).

Até este momento mais de vinte isoformas de MMP já foram identificadas. As MMPs se dividem de acordo com seu substrato principalmente em quatro grupos: gelatinases, collagenases, estromelinas e tipo membranosas de MMPs (MT-MMPs) (BAI et al., 2005; CHIRCO et al., 2006). Os tipos mais comuns e estudados na placenta bovina são a gelatinase A e B (conhecidas como MMP-2 e MMP-9 respectivamente) e possuem como função a degradação do colágeno, principalmente do tipo IV e outras proteínas da ECM como fibronectina e laminina. As MT-MMPs são compostas por seis isoformas, sendo a mais caracterizada a MT1-MMP ou MMP-14, que atuam como ativadoras de outras MMPs, como a já citada MMP-2, além de atuarem na degradação da fibronectina, lamina e colágenos (BAI et al., 2005).

Até agora quatro membros dos inibidores teciduais de metaloproteinases foram identificados e designados como: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 que são expressos por uma grande variedade de tipos celulares e tecidos do organismo. Os TIMPs são considerados os inibidores naturais das MMPs que inibem a ação destas a partir da formação de complexos estequiométricos não covalentes na proporção de 1:1, resistentes ao calor e a degradação proteolítica (GOMEZ et al., 1997; LAMBERT et al., 2004).

Todos os TIMPs inibem as atividades proteolíticas das MMPs, entretanto, os TIMPs diferem em vários aspectos, como na interação com pró-enzimas (pró-MMPs), e na solubilidade; enquanto os TIMPs 1, 2 e 4 estão presentes em forma solúvel o TIMP-3 se encontra aderido à ECM (LAMBERT et al., 2004).

TIMPs possuem dois domínios estruturais compostos por um amino-terminal (N-terminal) e por um carboxi-terminal (C-terminal), cada um deles, compostos por seis resíduos de cisteína que formam três pontes de dissulfeto (CHIRCO et al., 2006; MURPHY et al., 1991). O N-terminal contém a maior região de homologia entre os TIMPs e é capaz de inibir a ação das MMPs e pode interagir com o zinco ligado às MMPs ativas (HUANG et al., 1997; BLAVIER et al., 1999). O C-terminal é importante para as interações protéicas e podem se ligar às pró-MMPs, o que pode regular o processo de ativação das MMPs (LAMBERT et al., 2004).

TIMPs podem se ligar às MMPs ou então podem formar complexos com as pró-MMPs, o que favorece a regulação da atividade das MMPs (LAMBERT et al., 2004). Sugere-se uma ligação preferencial entre o TIMP-1 e a pró-MMP-9 (WILHELM et al., 1989) e do TIMP-2 com a pró-MMP-2, o que facilita a ativação enzimática (WARD et al., 1991). A expressão dos quatro TIMPs também é diferente, sendo o TIMP-1 induzido por estímulos externos, enquanto que o TIMP-2 é constitutivo (LAMBERT et al., 2004).

Um balanço entre os inibidores teciduais de metaloproteinases e as metaloproteinases de matriz extracelular é de extrema importância, uma vez que a atividade invasiva das células pode ser dependente desta proporção de expressão entre MMPs e TIMPs (SCHULTZ et al., 1988; UEKITA et al., 2004) e este equilíbrio é importante para a degradação da matriz extracelular durante a gestação.

3.6 LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO (PL)

O lactogênio placentário (PL) é um membro da família do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL) que é sintetizado pelas TGCs e secretado por seus grânulos secretórios (WOODING, 1992; GOOTWINE, 2004). Até o momento o controle da sua função e atividade secretória ainda não está totalmente esclarecido (ANTHONY et al., 1995; GERTLER, DJIANE, 2002).

O primeiro lactogênio placentário foi identificado na placenta de caprinos (BUTTLE et al., 1972; BECKA et al., 1977; CURRIE et al., 1990), em seguida foi descoberto na placenta de ovinos (CHAN, ROBERTSON, FRIESEN, 1976; WARREN et al., 1990) e somente depois foi observado na placenta bovina (BOLANDER, FELLOWS, 1976; MURTHY, SCHELLENBERG, FRIESEN, 1982). A seqüência de DNA do oPL tem 86% de similaridade com o lactogênio placentário caprino (cPL) e possui 67% de similaridade com o bPL (BYATT et al., 1992a). Diferentemente do oPL e cPL, o bPL é glicolisado (BYATT et al., 1990).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o PL tenha atividade somatogênica (semelhante ao GH) e lactogênica (semelhante à PRL), como a angiogênese placentária e a intermediação do metabolismo materno-fetal, bem como o desenvolvimento da glândula mamária e sua ação pode ainda variar de espécie para espécie (GOOTWINE, 2004; BERTOLINI, WALLACE, ANDERSON, 2006).

O lactogênio placentário bovino bPL é mais parecido com a prolactina do que com o hormônio do crescimento e pode ser secretado pelos compartimentos maternos e fetais (GOOTWINE, 2004) e pode também reconhecer receptores somatogênicos e lactogênicos homólogos e heterólogos, agindo em conjunto com o sistema IGF (ANTHONY et al., 1995; BERTOLINI, WALLACE, ANDERSON, 2006).

O bPL pode atuar na modulação do crescimento fetal e placentário (HOGGARD et al., 2001; RAVELICH et al., 2004b) e na modulação da fusão do trofoblasto ao endométrio (BYATT et al., 1992b). Sugere-se que a partir da segunda metade da gestação, as ações metabólicas do PL desenvolvam papel importante na separação dos nutrientes entre a receptora, feto e placenta, para assim assegurar um suprimento nutricional adequado para o feto e a sua utilização pelos tecidos fetais (RAVELICH et al., 2004b).

3.7 KI-67

Um subgrupo de proteínas associado aos cromossomos durante a mitose pode ser encontrado na região nuclear na fase de interfase (RATTNER, 1992), dentre essas proteínas pode ser encontrado o antígeno Ki-67 (GERDES et al., 1983; VERHEIJEN et al., 1989a; VERHEIJEN et al., 1989b).

A função destas proteínas ainda não está esclarecida, mas pode estar associada à condensação e descondensação dos cromossomos, na proteção e estabilização destes cromossomos ou na distribuição simétrica das proteínas nucleares entre as células filhas (STARBORG et al., 1996).

Segundo Yu, Woods e Levison (1992) os anticorpos para Ki-67 demonstram antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto as fases G0 e o início da fase G1 e é utilizado como marcador das células proliferativas.

4 MATERIAL E MÉTODO

Em nosso estudo três grupos foram utilizados para coleta de placentomas. O primeiro e o segundo grupos foram compostos de animais derivados de monta natural, com idade gestacional de 90 dias ($n = 6$), que foram adicionados ao trabalho como controle da expressão das proteínas estudadas durante a progressão gestação de animais não manipulados e de 270 dias ($n = 3$) respectivamente, cujos placentomas foram obtidos de animais abatidos em frigorífico e o segundo grupo foi considerado como grupo controle. O terceiro grupo foi composto de animais clonados (derivados de gestações obtidas após transferência nuclear de células somáticas com posterior fertilização *in vitro* e transferência de embriões) com idade gestacional de 270 dias ($n = 7$), e os placentomas foram obtidos após cesarianas realizadas no Hospital Veterinário de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Para as amostras provenientes de frigoríficos, a medida de “crow-rump” foi realizada para a avaliação da idade gestacional, garantindo assim a coleta de placentomas do início e do final da gestação.

Amostras de aproximadamente 1 cm³ dos placentomas foram coletadas e em seguida fixadas em formol tamponado ou então congeladas em nitrogênio líquido, as quais foram transferidas e armazenadas em um freezer -80°C após dois dias.

4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA COM MÉTODO AEC®

Amostras de placentoma de 1 cm³ foram perfundidas e fixadas em formol tamponado a 4% e após 24 horas foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e emblocadas rotineiramente em resina (Histosec® Merck, Alemanha). Cortes de aproximadamente 3 µm foram colocados sobre lâminas de vidro Superfrost, desparafinizados em xilol e rehidratados em uma série decrescente de álcoois. As lâminas foram em seguida lavadas em água destilada sob agitação por 5 minutos e em PBS por 5 minutos também sob agitação.

Para exposição do epítomos as lâminas foram tratadas com tampão citrato a 100°C sob agitação. Após o tratamento com tampão citrato, as lâminas foram submetidas a três lavagens consecutivas de 5 minutos cada em PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 1% H₂O₂ em Metanol previamente resfriado, por 30 minutos em agitação e em temperatura ambiente. Após o bloqueio as lâminas foram lavadas em PBS (2x5min).

Em seguida as lâminas foram lavadas com uma solução permeabilizadora por 5 minutos em agitação e foi feito o bloqueio da reação cruzada com soro equino da diluição de 1:20, em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após o bloqueio da reação cruzada as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS por 20 horas em câmara úmida a 4°C (Tabela 2), sendo que os cortes controle foram incubados apenas com PBS como substituinte do anticorpo primário. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS (3x5min) e em seguida incubadas com o anticorpo secundário universal (BA-1400 - Vector, Alemanha,) na diluição de 1:100 em câmara úmida por 35 minutos em temperatura ambiente (Tabela 3) e novamente lavadas em PBS (3x5min).

Para amplificação da reação as lâminas foram incubadas com o complexo avidina/biotina peroxidase (ABC – Vector, Alemanha) em câmara úmida por 45 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS (3x5min) e depois coradas com cromógeno 3-amino9-etilcarbazol (AEC - Biologo, Alemanha), por 10 a 15 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. Após a coloração as lâminas foram lavadas em água destilada (3x5min) e contracoradas com hematoxilina por 1 minuto. Uma última lavagem de dez minutos em água corrente foi realizada e as lâminas foram recobertas utilizando-se gelatina/glicerina (Merck, Alemanha). A análise dos resultados foi feita em microscópio Olympus (Estados Unidos) e Leica (Alemanha) com o aumento de 200 e 400 vezes. As imagens fotografadas em aumento de 200 e 400 vezes foram obtidas através do programa Analisis (laminina, vimentina e lactogênio placentário) e LM 500 (fibronectina, TIMP-2 e Ki-67), respectivamente. A intensidade da coloração foi avaliada de forma subjetiva e classificada como: forte (4), moderada (3), fraca (2) e ausente (1).

Este método foi utilizado para a pesquisa das seguintes proteínas: laminina, fibronectina, vimentina, TIMP-2, lactogênio placentário e Ki-67.

4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA COM MÉTODO ENVISION®

Amostras de placentoma de 1 cm³ foram perfundidas e fixadas em formol tamponado a 4% e após 24h foram lavadas com PBS e emblocadas rotineiramente em resina (Histosec® Merck, Alemanha). Cortes de aproximadamente 3 µm foram colocados sobre lâminas de vidro Superfrost, desparafinizados em xilol incubados em isopropanol por 2 minutos e rehidratados em uma série decrescente de alcoóis até o álcool 90%, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito junto com o álcool 80% (2% H₂O₂) por 30 minutos e a rehidratação continuou com a incubação das lâminas em álcool 70% por 5 minutos. As lâminas foram em seguida lavadas em PBS (3x5 min) sob agitação.

Para exposição do epítomos as lâminas foram tratadas com uma solução (pH 7,8) contendo 0,1% de tripsina, derivada do pâncreas suíno (Sigma, Estados Unidos) e 0,1% de cloreto de cálcio (Sigma, Estados Unidos) em uma estufa a 37°C por 30 minutos. Após o tratamento com a tripsina, as lâminas foram submetidas a três lavagens consecutivas de 5 minutos cada em PBS. O bloqueio da reação cruzada foi feito com soro de cabra na diluição de 1:5, em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente.

Após o bloqueio da reação cruzada as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS contendo 1% de BSA por 20 horas em câmara úmida a 4°C (Tabela 2), sendo que os cortes controle foram incubados apenas em PBS contendo 1% de BSA como substituinte do anticorpo primário. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS (3x5min) e em seguida incubadas com o anticorpo secundário EnVision (EnVision Kit, Dako, Alemanha) em câmara úmida por 45 minutos em temperatura ambiente (Tabela 3) e novamente lavadas em PBS (3x5min).

Para a revelação da reação as lâminas foram incubadas com o complexo DAB (EnVision Kit, Dako, Alemanha) em câmara úmida por exatamente 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS (3x5min) e depois contracoradas com hematoxilina por 1 minuto. Uma última lavagem de dez minutos em água corrente foi realizada e as lâminas seguiram por uma série de crescente de alcoóis e xilol e foram recobertas utilizando-se Eukitt (EMS, Estados Unidos). A análise dos resultados foi feita em microscópio Olympus (Estados Unidos) e BX-50 O (Estados Unidos) com o aumento de 200 e 400 vezes. As imagens fotografadas em aumento de 200 e 400 vezes foram obtidas através do programa Anisys (colágeno tipo IV) e Axio Vision (β -actina), respectivamente. A intensidade da coloração foi avaliada de forma subjetiva e classificada como: forte (4), moderada (3), fraca (2) e ausente (1).

Este método foi utilizado para a pesquisa das seguintes proteínas: β -actina (que foi utilizada apenas como controle interno) e colágeno tipo IV.

4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CORTE CONGELADO

Amostras de placentoma de 1 cm³ foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização. Cortes de aproximadamente 11 μ m foram colocados sobre lâminas de vidro Superfrost, e fixadas em Acetona P.A. por 10 minutos. Após a fixação as lâminas foram guardadas em freezer -20°C por 1 dia. Antes de iniciar o teste de imunofluorescência as lâminas foram secas por 20 minutos em temperatura ambiente dentro da capela, para evitar o agrupamento de poeira. Em seguida foi realizado o bloqueio da reação cruzada com soro eqüino na diluição de 1:20 em solução tampão tris (TBS) adicionada de 0,05% de Tween 20 (TBS-T) em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente.

Após o bloqueio da reação cruzada as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 20 horas em câmara úmida a 4°C (Tabela 2), sendo que os cortes controle foram incubados apenas com solução TBS como substituinte do anticorpo primário. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em TBS (3x10min) e em

seguida incubadas com o anticorpo secundário Alexa (Sigma, Estados Unidos) em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 3). Em seguida foram lavadas em TBS-T (3x10min) e coradas com Hoechst na cor azul (marcador do núcleo celular) na diluição de 1:10.000 por 3 minutos e lavadas em água destilada e em agitação (3x10min).

Após a última lavagem as lâminas foram recobertas utilizando-se cerca de 40 µl de ProLong® (Invitrogen, Estados Unidos). As lâminas foram armazenadas na posição horizontal e em temperatura ambiente, em caixas de papel para evitar a entrada de luz, por 20 horas e foram analisadas em microscópio óptico Zeiss (Alemanha) com o aumento de 200 e 400 vezes. As imagens fotografadas em aumento de 200 e 400 vezes foram obtidas através do programa AxioVision (Zeiss, Alemanha). A intensidade da coloração foi avaliada de forma subjetiva e classificada como: forte (4), moderada (3), fraca (2) e ausente (1).

Este método foi utilizado para a pesquisa das seguintes subunidades de integrina: $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$.

4.4 WESTERN BLOT

As proteínas totais dos placentomas foram extraídas com tampão de lise Boehringer a 0°C, utilizando um homogenizador Ultra Turrax (IKA, Estados Unidos). A concentração protéica foi mensurada através do ensaio de análise protéica de Lowry (Lowry Protein Assay, BioRad, Estados Unidos), utilizando-se 1 ml da solução A adicionada de 25 µl da solução S, o que resulta na solução A'. Para analisar a curva padrão, 20 µl da solução A', diferentes concentrações de BSA (0 µg a 7 µg) e 200 µl da solução B foram pipetados em diferentes poços de uma placa de cultura celular de 96 poços. Para a mensuração das amostras de interesse, o BSA foi substituído por 2 µl do sobrenadante das amostras, previamente transferido para um novo tubo. A concentração protéica das amostras foi avaliada em uma máquina ELISA (Multiskan EX - Thermo, Estados Unidos).

As amostras foram separadas em diferentes concentrações de 20 a 40 µg (Tabela 4) e dissolvidas em tampão de lise Boehringer, contendo apenas tampão 4x SDS para as amostras não reduzidas (de acordo com a recomendação de uso do anticorpo) e tampão 4x SDS (Invitrogen, Estados Unidos) adicionado de Betamercaptoetanol na proporção de 1:20 para as amostras reduzidas. Em seguida as amostras foram aquecidas a 96°C por 5 minutos em agitação e submetidas a um gel SDS-PAGE, ou armazenadas em freezer -20°C.

Para a separação das proteínas foi utilizado o sistema descontínuo de dois géis contíguos, em diferentes concentrações, que utiliza um gel de empacotamento e um gel de separação (Tabela 4) (Laemmli, 1970). Durante a eletroforese foi utilizado tampão Tris-Glicina, com voltagem inicial de 40V até ocorrer o empacotamento das amostras e depois 100V, até a total separação protéica. Em cada gel foram pipetadas as amostras de interesse na concentração desejada e marcadores (padrão de proteínas com o peso molecular previamente conhecido), para a correta localização protéica.

Decorrida a eletroforese, os géis foram retirados do suporte e colocados entre papéis filtro contendo uma membrana de nitrocelulose, para onde as proteínas separadas foram transferidas a partir de dois métodos: método semi-seco (X-Cell Sure Lock, Invitrogen, Estados Unidos) para as proteínas maiores (400 kDa) e método tradicional (Mini Protean Tetra Cell, BioRad, Estados Unidos) para as proteínas menores (32 – 120 kDa) por 1 hora, ambos utilizando um tampão de transferência, sob corrente constante de 100V (X-Cell) e 30V (Tetra Cell) por 1 hora.

Após a transferência as membranas foram lavadas com água destilada e coradas com o corante Ponceau S para avaliação da qualidade da transferência. As membranas foram lavadas com TBS-T e bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente com 3% BSA em TBS-T e em seguida as membranas foram incubadas com os anticorpos primários por 20 horas a 4°C com agitação (Tabela 2). Após a incubação as membranas foram lavadas em TBS-T (3x10min) e em seguida as membranas incubadas com anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina (Tabela 3) anti-camundongo ou anti-coelho (Sigma, Estados Unidos) na diluição de

1:35.000 por uma hora em temperatura ambiente e em agitação. As membranas foram novamente lavadas (3x10min) com TBS-T e 2 vezes de 5 minutos em TBS.

A quimioluminescência foi detectada através da exposição do reagente LumiPhos (Thermo, Estados Unidos) por 3 minutos, seguida de auto radiografia, onde as membranas foram expostas a um filme de RX (Hyperfilm, Amersham, Reino Unido) por 1 a 15 minutos em temperatura ambiente e em uma câmera escura.

Este método foi utilizado para a pesquisa das subunidades de integrina: $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$; proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo IV, fibronectina e laminina); beta actina (como controle interno), vimentina e TIMP-2.

Tabela 2 - Descrição do tipo e marca dos anticorpos primários utilizados

Anticorpos	Clone (isotipo)	Hospedeiro	Diluição		Cat. nº
			IHC	IF	
Integrina $\alpha 6$	policlonal	Coelho	---	1:250	Chemicon (MAB 1378)
Integrina αV	policlonal	Coelho	---	1:200	Chemicon (AB 1930)
Integrina $\beta 1$	policlonal	Coelho	---	1:150	Chemicon (MAB 1951)
Integrina $\beta 3$	policlonal	Coelho	---	1:500	Chemicon (AB1932)
β -actina	AC-15	Camundongo	1:500	---	Sigma (A 1978)
Collageno IV	CIV-22 (IgG1)	Camundongo	1:100	---	Calbiochem (CP 56)
Fibronectina	IST-3 (IgG1)	Camundongo	1:250	---	Sigma (F0791)
Ki-67	MIB-1	Camundongo	1:100	---	Dako (M 7240)
Laminina	policlonal	Coelho	1:50	---	Abcam (ab 11576)
PL	monoclonal	Camundongo	1:10000	---	Prof. Dr. Jean Pierre
TIMP-2	67-4H11	Camundongo	1:3000	---	Chemicon (MAB 3310)
Vimentina	V9	Camundongo	1:250	---	Dako (M 0725)

Legenda: ICH, imuno-histoquímica; IF, imunofluorescência; PL, lactogênio placentário e TIMP-2, inibidor tecidual das metaloproteínases de matriz. O anticorpo anti-lactogênio placentário foi doado pelo Professor Dr. Jean Pierre do INRA, Jouy-en-Josas, França.

Tabela 3 - Descrição do tipo e marca dos anticorpos secundários utilizados

Anticorpos	(isotipo)	Hospedeiro	Diluição			Cat. nº
			IHC	IF	WB	
Anti-camundongo /anti-coelho (biotinilado)	IgG (H+L)	Cavalo	1:100	---	---	Vector (BA-1400)
Dako-EnVision camundongo System HRP (DAB)	policlonal	Cabra	Pronto para o uso	---	---	Dako (K4006)
Anti-camundongo (Fosfatase alcalina)	IgG (whole molecule)	Cabra	---	---	1:35000	Sigma (A 3562)
Anti-coelho (Fosfatase alcalina)	IgG (whole molecule)	Cabra	---	---	1:35000	Sigma (A 3687)
Anti-coelho Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Cabra	---	1:2000	---	Invitrogen (A 11008)
Anti-rato Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Cabra	---	1:2000	---	Invitrogen (A 11006)

Legenda: ICH, imuno-histoquímica; IF, imunofluorescência; WB, western blot.

Tabela 4 - Descrição da concentração protéica e concentração dos géis de separação para cada proteína pesquisada

Anticorpos	Concentração de proteína	Reduzida ou não reduzida	SDS-gel	Diluição anticorpo	Cat nº
Integrina α V	40 μ g	Não reduzida	8%	1:2000	Chemicon (AB 1930)
Integrina β 1	40 μ g	Não reduzida	8%	1:1500	Chemicon (MAB 1951)
Integrina β 3	40 μ g	Não reduzida	8%	1:1500	Chemicon (AB 1932)
β -actina	20 μ g	Reduzida	10%	1:7500	Sigma (A 1978)
Laminina	25 μ g	Não reduzida	4% (Invitrogen - EC60552 BOX)	1:400	Abcam (ab 11576)
Vimentina	20 μ g	Reduzida	10%	1:1000	Dako (M 0725)
TIMP-2	25 μ g	Reduzida	12%	1:5000	Chemicon (MAB 3310)

As indicações do gel de empacotamento e do gel de separação encontram-se no apêndice A.

Legenda: TIMP-2, inibidor tecidual de metaloproteínases.

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA

Pequenos pedaços de aproximadamente 100 mg de cada placentoma foram transferidos para um tubo de fundo chato de 15 ml contendo 1,5 ml de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) e homogeneizados com o auxílio do homogenizador Polytron (Kinematica, Suíça); em seguida 200 µl de clorofórmio foram adicionados e o tubo agitado por 15 segundos, permanecendo em repouso por 2 minutos. Os tubos foram centrifugados a 11000 rpm por 15 minutos para possibilitar a retirada do sobrenadante e transferência para um novo tubo.

Posteriormente 500 µl de 2-isopropanol foram adicionados e os tubos homogeneizados. Estes permaneceram em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente e os tubos foram centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos e invertidos por completo para escorrer todo o conteúdo. Logo em seguida 1 ml de etanol 75% foi adicionado e os tubos novamente centrifugados a 7500 rpm por 5 minutos. Para finalizar, escorreu-se todo o conteúdo e 20 µl de água (Gibco, Estados Unidos) foram utilizadas para a eluição do RNA. Todo o RNA extraído foi submetido à análise em biofotômetro (Eppendorf, Alemanha) para avaliação da qualidade e exclusão da possibilidade de contaminação com proteína ou DNA.

4.6 CONFECÇÃO DO CDNA

Para a transcrição reversa foram adicionados 1 µg de RNA, 1 µl de tampão DNase® e 1 µl de DNase® por eppendorf, que permaneceram em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 1 µl de EDTA e os tubos foram imediatamente levados ao termociclador a 65°C por 10 minutos. Em seguida, 3 µl de água, 1 µl de DNTp e 1 µl de oligoDT foram adicionados e os tubos levados ao termociclador por 6 minutos a 65°C. Logo após, 4 µl de RT buffer®, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNase OUT/Inh®, 1 µl de Superscript SSIII® foram adicionados e os tubos levados ao termociclador a 50°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C por 2 minutos. Ao final os tubos contendo o cDNA foram armazenados em freezer, com

temperatura de -20°C até a sua utilização. Todos os produtos utilizados foram adquiridos junto à Invitrogen (Estados Unidos).

4.7 PCR EM TEMPO REAL

Para realização de PCR em tempo real as concentrações de primers e amostras foram otimizadas. Para se testar a concentração de cada primer, utilizou-se amostra de um animal derivado de monta natural, diluída 1:4 (0,250 µg de RNA) e diluições seriadas (300, 600 e 900 nM) de cada primer “forward” e “reverse”. Após escolhida a concentração de cada primer (Tabela 5) e para a realização do cálculo da eficiência dos primers, bem como para testar a diluição de cada integrina, amostras do mesmo animal foram diluídas: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, contendo (0,250 µg, 0,125 µg, 0,0625 µg e 0,03152 µg de cDNA respectivamente).

Após escolhida a concentração de amostra ser a utilizada (Tabela 5), as outras amostras foram preparadas na mesma diluição e em cada reação foi adicionado 12,5 µl de tampão Sybr green (composto por 3 mM MgCl₂, 200 AM de dATP, dCTP e dGTP, 400 AM dUTP, 1,25 U AmpliTaq GoldR DNA polimerase e 0,5 U AmpEraseR uracila-N-glicosilase (UNG), Applied Biosystems, Estados Unidos); 2,5 µl de primers “forward” e 2,5 µl de primer “reverse” em diferentes concentrações de acordo com a prévia otimização; 2,5 µl de água e 5 µl de amostra diluída em diferentes concentrações também de acordo com a prévia otimização, para um volume final de 25 µl.

A placa foi fechada com adesivo óptico MicroAmp (Applied Biosystems, Estados Unidos), seguida da completa mistura dos reagentes. Neste experimento as condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e corridos por 40 ciclos por 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto e para a curva de dissociação 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C.

Todas as reações foram realizadas em um Gene Amp® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Estados Unidos) e as amostras foram avaliadas em

duplicata, utilizando um programa de detecção Sequence Detector V 1.6 (Applied Biosystems, Estados Unidos). O ΔRn e C_t foram médias de valores obtidos em cada reação. Para a quantificação relativa, o gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno e a quantidade relativa do RNAm das citadas integrinas foi calculada de acordo com a fórmula de Pfaffl (2001) descrita a seguir:

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\text{DCP gene alvo (calibrador - amostra)}}}{(E_{\text{gene ref.}})^{\text{DCP gene ref. (calibrador - amostra)}}$$

Onde, “E” é a eficiência do primer, calculada a partir do slope obtidos após diluição seriada de uma mesma amostra; “DCP” é o resultado da subtração do valor do calibrador pelo valor da amostra e calibrador é o resultado da média dos valores do gene alvo menos os valores do gene de referência dos animais do grupo controle.

Tabela 5 - Concentração dos primers e amostras utilizadas para a reação de PCR em Tempo Real

Gene	Diluição da amostra	Primer Forward e Reverse	Seqüência do primer	Concentração do primer
Integrina $\alpha 6$	0,0625 μ g	F	GTGGAGCGGTGGTTTTGC	600 nM
		R	CAAATATGTGCTCAGGGAGAAGGT	
Integrina αV	0,125 μ g	F	CCAGCGCGTCTTCGATGT	800 nM
		R	GCTGGGTAGTGTTTGCTTTGG	
Integrina $\beta 1$	0,0625 μ g	F	CCAGGTGACACTGTCCATCATT	900 nM
		R	AGGCAGCTCACCAGTGACTACA	
Integrina $\beta 3$	0,500 μ g	F	AGAAGATTGGCTGGAGGAATGA	800 nM
		R	GGTCTTGGCATCAGTGGTAAACA	
Colágeno IV	0,0625 μ g	F	TGGAATGGCTTTTAAGGGTGAA	900 nM
		R	CTGGGAGACCTGGCAAACC	
Fibronectina	0,0625 μ g	F	ACTCCGCCCGCAGGTT	900 nM
		R	TGAGACGGTGAGGCAACTTG	
Laminina	0,250 μ g	F	CCCTCGCATCCTCAACCTT	900 nM
		R	CCGCAGGTCCATTGG	

F, primer forward e R, primer reverse.

4.8 RT-PCR

Para excluir amplificação de DNA genômico, todas as amostras incluindo as controle sofreram ação de enzimas. A fim de evitar erros de leitura por contaminação dos tubos e tampões, um controle negativo com água ao invés de cDNA foi adicionado à análise.

Para a realização do RT-PCR, utilizou-se um máster-mix com a seguinte composição: 13,875 μ l de água, 5 μ l de 5X tampão para PCR (GoTaq Green, Promega, Estados Unidos), 1,5 μ l de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 25 mM (Promega,

Estados Unidos), 0,5 µl de trifosfato deoxinucleoside (dNTP) 25 mM (Promega, Estados Unidos), 1,5 µl primer “forward” (10 pmol), 1,5 µl primer “reverse” (10 pmol) para o lactogênio placentário e TIMP-2 (Tabela 5) e 0.125 µl GoTaq- Polymerase 5 U/µl (Promega, Estados Unidos). Deste mix, 24 µl foram pipetados em um tubo (de 0,2 ml) e 1 µl da amostra de cDNA.

Em seguida as amostras foram levadas para um termociclador (Eppendorf, Alemanha) e sofreram para o lactogênio placentário: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pela repetição de 30 vezes a 95°C (desnaturação) por 30 segundos, 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por (extensão) 1 minuto e ao final 72°C por 5 minutos e em seguida imediatamente resfriadas a 4°C; e para o TIMP-2: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida pela repetição de 28 vezes a 94°C (desnaturação) por 30 segundos, 68°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por (extensão) 1 minuto e ao final 72°C por 5 minutos e em seguida imediatamente resfriadas a 4°C

Em seguida o 15 µl de cada tubo foram retirados e fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo em um ambiente constante de 70V. Para avaliar o comprimento dos produtos, um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Fermentas, Alemanha) foi fracionado no mesmo gel. Todas as amostras foram submetidas à eletroforese concomitantemente para evitar variações. O gel com brometo de etídio foi analisado através de um programa de imagem (Image Master VDS, Pharmacia, Freiburg, Alemanha).

Tabela 6 - Concentração dos primers e amostras utilizadas para a reação de RT-PCR

Gene	Diluição da	Primer Forward e	Seqüência do primer	Concentração do primer
TIMP-2	pura	F	CCTCATGCTGCTGGGGACGCTGC	10 pmol
		R	AGTCCTGGTGGCCTGCTTACGGG	
Lactogênio placentário	pura	F	TGCTCCACTCGTGGGATGAA	10 pmol
		R	CGCACATCCTCATCGTCTGC	

F, primer forward e R, primer reverse.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados foi feita comparando-se o grupo controle (bovinos não clonados) com o grupo de bovinos clonados (machos e fêmeas juntos) de mesma idade gestacional; bem como o grupo controle com o grupo de bovinos clonados do sexo masculino e bovinos clonados do sexo feminino, utilizando-se o software Minitab 13 para Windows. Em cada uma das análises foi realizado o teste de normalidade e de variância, para a determinação do teste utilizado, sendo o teste t de Student para amostras dentro da normalidade e Mann-Whitney para amostras fora da normalidade. Os grupos de animais derivados de monta natural aos 90 e 270 dias de gestação também foram comparados e para cada uma das análises foi realizado o teste de normalidade e de variância, para a determinação do teste utilizado, sendo o teste t de Student para amostras dentro da normalidade e Mann-Whitney para amostras fora da normalidade. Foi considerada diferença estatística significativa quando p foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Avaliou-se através de imuno-histoquímica com método AEC a expressão das seguintes proteínas de matriz extracelular: fibronectina, laminina e vimentina, além do Ki-67, lactogênio placentário e TIMP-2. A β -actina e o colágeno tipo IV foram detectados por imuno-histoquímica com o método EnVision. As subunidades de integrina $\alpha 6$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$ foram detectadas por imunofluorescência. O western blot foi usado para avaliar a especificidade dos anticorpos para a β -actina, laminina, vimentina, TIMP-2 e para as subunidades de integrina αV , $\beta 1$ e $\beta 3$. Todos os testes foram realizados em animais com gestações derivadas de monta natural com 90 e 270 dias e em gestações derivadas de transferência nuclear de células somáticas com idade gestacional de 270 dias.

Avaliou-se por PCR em tempo real a expressão relativa do RNAm das subunidades de integrina $\alpha 6$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina; além do gene “housekeeping” GAPDH. A expressão do RNAm do TIMP-2 e do lactogênio placentário foi detectada por RT-PCR.

Após quantificação dos resultados obtidos por imuno-histoquímica, imunofluorescência, western blot, PCR em tempo real e RT-PCR, a expressão média das subunidades de integrina $\alpha 6$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$, das proteínas de matriz extracelular (β -actina, fibronectina, laminina, vimentina e colágeno tipo IV), do Ki-67, lactogênio placentário e TIMP-2 foram comparadas entre os grupos: animais aos 90 dias de gestação foram comparados aos animais derivados de monta natural aos 270 dias de gestação e estes por sua vez foram comparados com animais clonados na mesma idade gestacional.

5.1 LOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA, QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA E EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAM DAS INTEGRINAS

O teste de imunofluorescência permitiu localizar com especificidade as proteínas das subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$. A avaliação por meio de western blot foi usada para confirmar a especificidade dos anticorpos escolhidos e também para a quantificação da expressão das subunidades de integrina $\beta 1$, αV e $\beta 3$ e não foi possível otimizar a reação do western blot para a subunidade de integrina $\alpha 6$. O PCR em tempo real foi utilizado para se avaliar a expressão relativa do RNAm das subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$.

5.1.1 Imunolocalização da subunidade de integrina $\alpha 6$

A proteína da subunidade de integrina $\alpha 6$ foi observada nos estromas maternos e fetais, na porção basal dos epitélios maternos e fetais e em algumas células trofoblásticas gigantes da placenta bovina de todos os grupos analisados e foi co-localizada com a subunidade de integrina $\beta 1$ e a laminina. Considerando os animais do grupo 1, (placentomas de 90 dias provenientes de animais oriundos de monta natural) foi possível observar que o estroma fetal, a porção basal dos epitélios materno e fetal e o estroma materno apresentaram reação positiva moderada e que houve reação positiva fraca em TGCs (Figura 3 A). Nos animais do grupo 2 (placentomas de 270 dias provenientes de animais oriundos de monta natural), foi possível observar que o estroma fetal, o estroma materno e as TGCs apresentaram reação positiva fraca e que a porção basal dos epitélios materno e fetal apresentou reação positiva moderada (Figura 3 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3 (placentomas de 270 dias provenientes de animais oriundos de transferência nuclear de células somáticas) apresentaram reação semelhante ao grupo 2, onde houve reação fraca nas TGCs e nos estromas materno e fetal e reação moderada na porção basal dos epitélios materno e fetal (Figura 3 C).

Figura 3 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\alpha 6$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-fluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\alpha 6$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 μ m

5.1.2 Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$

O valor da expressão relativa individual da subunidade de integrina $\alpha 6$ não apresentou variações evidentes (Figura 4 A). Ao se comparar o grupo controle com o de clones, foi possível observar que o grupo de animais clonados apresentou maior expressão, mas não houve diferença estatística ($p = 0,440$, Figura 4 B).

Entretanto quando o grupo de clones machos foi comparado com o grupo de clones fêmeas, o de fêmeas apresentou maior expressão e houve diferença estatística significativa ($p = 0,0001$); quando o grupo controle foi comparado com clones machos, o grupo composto por clones machos apresentou menor expressão que não foi estatisticamente significativa ($p = 0,104$) e o grupo controle quando comparado com o grupo de clones fêmeas, sendo que no grupo de clones fêmeas a expressão foi maior e houve diferença estatística significativa ($p = 0,005$, Figura 4 C).

A expressão relativa do RNAm da integrina $\alpha 6$ no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 18 (apêndice A).

Figura 4 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=7)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\alpha 6$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.3 Imunolocalização da subunidade de integrina $\beta 1$

A proteína da subunidade de integrina $\beta 1$ foi localizada nos estromas maternos e fetais, na porção basal dos epitélios maternos e fetais e em algumas células trofoblásticas gigantes da placenta bovina de todos os grupos analisados e foi co-localizada com a subunidade de integrina $\alpha 6$ e a laminina. Considerando os animais do grupo 1, foi possível observar que houve reação positiva fraca em TGCs e nas células do estroma fetal, no estroma materno a reação foi forte e houve reação moderada na membrana basal das células dos epitélios materno e fetal para a proteína da integrina $\beta 1$ (Figura 5 A). Nos animais do grupo 2 houve fraca reação positiva em TGCs e foi possível observar que a reação foi fraca no estroma fetal e moderada no estroma materno e na porção basal dos epitélios materno e fetal (Figura 5 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3 apresentaram a mesma reação dos animais do grupo 2 (Figura 5 C).

Figura 5 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\beta 1$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 μm

5.1.4 Quantificação da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da subunidade de integrina $\beta 1$, foi possível observar que houve variação individual (Figura 6), os valores individuais obtidos por densitometria óptica também indicaram variação individual (Figura 7 A). Quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram maior expressão da subunidade de integrina $\beta 1$, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,286$). E ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, apesar do grupo de animais clonados apresentar maior expressão que o grupo controle, a expressão também não foi estatisticamente significativa ($p = 0,102$, Figura 7 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, houve diferença estatística significativa e as fêmeas apresentaram maior expressão, $p = 0,0304$. Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve maior expressão no grupo de clones machos, mas sem diferença significativa ($p = 0,356$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, as fêmeas, apresentaram expressão maior e houve diferença estatística significativa ($p = 0,008$, Figura 7 C).

Figura 6 - Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina $\beta 1$ por western blot, utilizando-se anticorpo policlonal anti integrina $\beta 1$

Figura 7 - A, expressão protéica individual da subunidade de integrina $\beta 1$ obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (números) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados (90d e 270d) e clonados (clones)*; C, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados (270d), clonados do sexo masculino (clones M) e clonados do sexo feminino (clones F)**. * Barras representam média $\pm$ erro padrão ($n = 4$ e 8, respectivamente). ** Barras representam média $\pm$ erro padrão ($n = 4$ / grupo). Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.5 Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$

Ao se analisar os resultados obtidos da integrina $\beta 1$, foi possível observar que a variação individual foi pouco acentuada, exceto o grupo de clones machos que apresentou maior variação (Figura 8 A). Foi possível observar também que houve aumento dos valores relativos de RNAm no placentoma de bovinos clonados quando comparados ao grupo de animais controle e houve diferença estatística significativa ($p = 0,030$, Figura 8 B).

Ao se comparar grupo de clones machos com o de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram menor expressão, mas a diferença não foi estatisticamente diferente ($p = 0,156$). Entretanto quando o grupo de clones machos foi comparado ao grupo controle, os clones machos apresentaram maior expressão e houve diferença estatística significativa ($p = 0,0136$). E ao se comparar o grupo de clones fêmeas ao grupo controle, as fêmeas também apresentaram maior expressão que o grupo controle e diferença estatística significativa ($p = 0,054$, Figura 8 C).

A expressão relativa da integrina $\beta 1$ no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 19 (apêndice A).

Figura 8 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias ($n=4$) e clonados (clones) aos 270 dias ($n=8$)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 1$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias ($n=4$), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias ($n=4$) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias ($n=4$)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.6 Imunolocalização da subunidade de integrina αV

A proteína da subunidade de integrina αV foi observada apenas nos estromas maternos e fetais da placenta bovina ao longo da gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestações de clones bovinos e co-localizada com a subunidade de integrina $\beta 3$ e a fibronectina. Os animais do grupo 1 apresentaram no estroma fetal reação fraca e no estroma materno reação moderada para a proteína da integrina αV . Nos epitélios maternos e fetais a reação foi negativa (Figura 9 A). No grupo 2, foi possível observar reação fraca no estroma fetal, reação moderada no estroma materno e reação negativa em ambos os epitélios (Figura 9 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3 apresentaram reação semelhante aos outros dois grupos (Figura 9 C).

Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina αV na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina αV . A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia). Barra: 50 μm

5.1.7 Quantificação da proteína da subunidade de integrina αV

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da subunidade de integrina αV , foi possível observar que houve variação individual (Figura 10), com os valores individuais obtidos por densitometria óptica, também foi possível observar variação individual, principalmente no grupo formado por animais não manipulados aos 90 dias de gestação (Figura 11 A). Quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram maior expressão da subunidade de integrina αV , entretanto não houve diferença estatística significativa ($p = 0,286$). E ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou menor expressão que o grupo controle e também não houve diferença estatística significativa, $p = 0,102$ (Figura 11 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram menor expressão e houve diferença estatisticamente significativa, $p = 0,0304$. Entretanto ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos, mas não houve diferença estatística significativa ($p = 0,356$). Já ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, a expressão foi menor no grupo de clones fêmeas e houve diferença estatisticamente significativa, $p = 0,008$ (Figura 11 C).

Figura 10 - Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina αV por western blot

Figura 11 - A, expressão protéica individual da subunidade de integrina αV obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270 d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270 d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.8 Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina αV

Houve grande variação individual na expressão relativa da subunidade de integrina αV (Figura 12 A). Ao se comparar a expressão do grupo controle com o dois grupos de clones juntos, observou-se que apesar da expressão da integrina αV ter sido maior no grupo clonado, não houve diferença estatística significativa, $p = 0,109$ (Figura 12 B).

Entretanto ao se comparar a expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina αV entre os indivíduos do grupo representados pelos clones machos com os indivíduos representados pelas clones fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão e diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0009$). Mas ao se comparar a expressão do grupo controle com os indivíduos do grupo representados pelos clones machos a expressão dos dois grupos foi semelhante e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,787$ e quando o grupo controle foi comparado com o grupo de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram expressão maior e diferença estatisticamente significativa, $p = 0,003$ (Figura 12 C).

A expressão relativa da integrina αV no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 20 (apêndice A).

Figura 12 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina αV em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina αV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.9 Imunolocalização da subunidade de integrina $\beta 3$

A proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ foi observada apenas nos estromas maternos e fetais da placenta bovina ao longo da gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação de animais clonados e co-localizada com a subunidade de integrina αV e a fibronectina. Quando a proteína da integrina $\beta 3$ foi analisada, os animais do grupo 1 apresentaram reação fraca no estroma fetal e reação forte para o estroma materno, enquanto que nos epitélios materno e fetal a reação foi negativa (Figura 13 A). Nos animais do grupo 2 foi possível observar que o estroma materno apresentou reação moderada, o estroma fetal apresentou reação fraca e ambos os epitélios apresentaram reação negativa (Figura 13 B). No grupo 3 reação semelhante ao grupo 2 foi observada, sendo reação moderada no estroma materno e reação fraca no estroma fetal, tanto para machos quanto para fêmeas (Figura 13 C).

Figura 13 - Fotomicrografias da localização da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunofluorescência utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\beta 3$. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia). Barra: 50 μm

5.1.10 Quantificação da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da subunidade de integrina $\beta 3$, foi possível observar que houve variação individual (Figura 14 e Figura 15 A). Ao se comparar os animais não manipulados do grupo de 90 com os animais de 270 dias de gestação, houve menor expressão da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ no grupo de 90 dias de gestação e houve diferença estatística significativa, $p = 0,045$. O grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) quando comparado ao grupo composto por animais clonados, apresentou menor expressão que o grupo clonado, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,435$ (Figura 15 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, a expressão foi semelhante e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,785$. O mesmo foi observado ao se comparar o grupo controle com o de clones machos: foi possível observar que a expressão no grupo controle foi um pouco menor, sem diferença estatística significativa ($p = 0,610$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, a expressão também foi um pouco menor no grupo controle, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,174$, Figura 15 C).

Figura 14 - Resultado da expressão individual da proteína da subunidade de integrina $\beta 3$ por western blot

Figura 15 - A, expressão protéica individual da subunidade de integrina $\beta 3$ obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270 d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.1.11 Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$

Ao se analisar a expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$ foi possível observar que houve pouca variação individual (Figura 16 A). Ao se comparar a expressão do grupo controle com grupo de animais clonados, não foi possível observar diferenças estatísticas significativas, $p = 0,5635$ (Figura 16 B).

E quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão e houve diferença estatística significativa, $p = 0,0406$; entretanto ao se comparar o grupo controle ao grupo de clones machos a expressão foi ligeiramente maior no grupo controle e não houve diferença estatística significativa ($p = 0,7132$) e o mesmo foi observado quando o grupo controle foi comparado ao grupo de clones fêmeas, onde apesar da expressão ser maior no grupo de clones fêmeas a diferença não foi estatisticamente diferente, $p = 0,1036$ (Figura 16 C).

A expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 21 (apêndice A).

Figura 16 - A, expressão relativa individual do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270 d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da integrina $\beta 3$ em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2 IMUNOLocalização, QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA E EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E DE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

O teste de imunohistoquímica permitiu localizar com especificidade as seguintes proteínas da matriz extracelular: colágeno tipo IV, fibronectina e laminina e das proteínas do citoesqueleto: β -actina e vimentina. A avaliação por meio de western blot foi usada para confirmar a especificidade dos anticorpos escolhidos e também para a quantificação da expressão da laminina e de proteínas do citoesqueleto: β -actina e vimentina e não foi possível realizar o teste de western blot para o colágeno tipo IV e para a fibronectina. E o PCR em tempo real foi utilizado para se avaliar a expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV, fibronectina e laminina.

5.2.1 Imunolocalização do colágeno tipo IV

A proteína do colágeno tipo IV foi observada na porção basal dos epitélios materno e fetal, estroma materno, estroma fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais da placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação de animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação de animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Considerando os animais do grupo 1, foi possível observar que o houve reação moderada nas paredes dos capilares maternos e fetais, na membrana basal do compartimento fetal, no estroma e na membrana basal do compartimento materno, já no estroma fetal a reação foi forte e no epitélio fetal e no epitélio materno a reação foi negativa (Figura 17 A). Nos animais do grupo 2, a membrana basal da porção fetal, o estroma materno, a porção basal do epitélio materno e as paredes dos capilares dos compartimentos maternos e fetais apresentaram reação moderada e já no estroma fetal a reação foi forte e nos epitélios materno e fetal a reação foi negativa (Figura 17 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3, assim como os animais do grupo anterior apresentaram reação moderada para o estroma fetal, membrana basal da parte fetal, estroma materno, porção basal do epitélio materno e capilares maternos e fetais e houve reação negativa no epitélio fetal e no epitélio materno (Figura 17 C).

Figura 17 - Fotomicrografias da localização da proteína do colágeno tipo IV na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti colágeno tipo IV. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e nos capilares maternos e fetais (*). Barra: 100 μ m

5.2.2 Expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV

Ao se analisar a expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV foi possível observar que houve diferença individual, principalmente nos grupos de clones machos e fêmeas (Figura 18 A). Ao se comparar a expressão do grupo controle com o dois grupos de clones juntos, o grupo composto pelos clones apresentou expressão maior e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,406$ (Figura 18 B).

Entretanto ao se comparar o grupo de clones machos com o de clones fêmeas, este apresentou expressão menor que o grupo de clones machos e houve diferença estatisticamente significativa, $p = 0,034$. E quando o grupo controle foi comparado ao de clones machos, a expressão do grupo controle foi menor e também houve diferença estatística significativa, $p = 0,044$, mas ao se comparar o grupo controle com o de fêmeas a expressão foi semelhante e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,7132$ (Figura 18 C).

A expressão relativa da fibronectina no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 22 (apêndice A).

Figura 18 - A, expressão relativa individual do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.3 Imunolocalização da fibronectina

A proteína da fibronectina foi observada nos estromas maternos e fetais, na porção basal de ambos os epitélios e na parede dos capilares maternos e fetais da placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação de clones bovinos. Os animais do grupo 1 apresentaram reação moderada no estroma fetal, na membrana basal do compartimento fetal e do compartimento materno, no estroma materno e nos vasos dos capilares maternos e fetais, já os epitélios materno e fetal apresentaram reação negativa (Figura 19 A). Os animais do grupo 2 apresentaram reação moderada na parte fetal: estroma fetal e membrana basal do compartimento fetal e do compartimento materno, estroma materno e nos capilares do compartimento materno e fetal. E como observado para os animais do grupo anterior os epitélios materno e fetal também apresentaram reação negativa (Figura 19 B). O grupo 3 apresentou reação moderada nos capilares maternos e fetais, no estroma materno, na membrana basal do compartimento materno, no estroma fetal e na membrana basal do compartimento fetal. Nos epitélios materno e fetal a reação foi negativa tanto para clones machos quanto para fêmeas (Figura 19 C).

Figura 19 - Fotomicrografias da localização da proteína da fibronectina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti fibronectina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e nos capilares maternos e fetais (*). Barra: 50 µm

5.2.4 Expressão relativa do RNAm da fibronectina

Ao se analisar a expressão relativa do RNAm da fibronectina, foi possível observar que houve grande variação individual, principalmente no grupo controle e de clones machos (Figura 20 A) Ao se comparar a expressão do grupo controle com o grupo de animais clonados a expressão dos dois grupos foi semelhante e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,763$ (Figura 20 B).

Entretanto quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão, a diferença foi estatisticamente diferente, $p = 0,0001$. Ao se comparar grupo controle ao de clones machos, o grupo controle apresentou expressão maior e houve diferença estatística significativa, $p = 0,002$, mas quando o grupo controle foi comparado ao de clones fêmeas, apesar da maior expressão relativa do RNAm da fibronectina no grupo composto por clones fêmeas, não houve diferença estatística significativa, $p = 0,1036$ (Figura 20 C).

A expressão relativa da fibronectina no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 23 (apêndice A).

Figura 20 - A, expressão relativa individual do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6; clones fêmeas penta, bela, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=8)*; C, expressão relativa do RNAm da fibronectina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=4)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.5 Imunolocalização da laminina

A proteína da laminina foi localizada na porção basal dos epitélios materno e fetal, nas células trofoblásticas gigantes, no estroma materno e nas paredes dos capilares dos compartimentos maternos e fetais da placenta bovina em todos os grupos analisados. Os animais do grupo 1 apresentaram reação negativa nas células do estroma fetal, na membrana basal do compartimento fetal, nas células mononucleares do epitélio fetal, nas células do epitélio materno e no estroma materno; houve reação moderada nas TGCs; reação forte na membrana basal do compartimento materno e reação fraca na parede dos capilares maternos e fetais (Figura 21 A).

Os animais do grupo 2 apresentaram reação negativa no estroma fetal, nas células mononucleares do epitélio fetal, no epitélio materno e na porção basal do compartimento fetal; houve reação fraca no estroma materno, na porção basal da parte materna e na parede dos capilares de ambos os compartimentos e houve reação moderada nas TGCs (Figura 21 B).

O grupo 3 apresentou reação fraca na porção basal do compartimento fetal, no estroma materno e nas paredes dos capilares maternos e fetais; houve reação moderada nas TGCs e na porção basal do compartimento materno; a reação foi negativa nas células mononucleadas do epitélio fetal, no estroma fetal e no epitélio materno, tanto para clones machos, quanto para clones fêmeas (Figura 21 C).

Figura 21 - Fotomicrografias da localização da proteína da laminina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti laminina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 100 µm

5.2.6 Quantificação do número de TGCs coradas pela laminina

Após o teste de imuno-histoquímica verificou-se que as células trofoblásticas gigantes foram também coradas pela laminina. Estas células foram contadas em aumento de 20x e pode-se observar que houve bastante diferença individual (Figura 22 A). Ao se analisar todos os grupos separadamente, foi possível observar que quando o grupo de animais aos 90 dias foi comparado ao de 270 dias de gestação, o número de células positivas foi semelhante e não houve diferença estatística significativa, $p = 0,599$ e ao se comparar o grupo controle (animais de 270 dias de gestação derivados de monta natural) com o grupo composto por animais clonados, observou-se que este último apresentou menor expressão e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,005$ (Figura 22 B).

Ao se comparar o grupo de clones machos com o de clones fêmeas, o de fêmeas apresentou menor expressão e houve diferença estatística significativa, $p = 0,015$. Quando o grupo controle foi comparado ao de clones machos, os clones machos apresentaram menor expressão e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,008$ e ao se comparar o grupo controle com o de clones fêmeas, o grupo de clones fêmeas apresentou expressão ainda menor e a diferença também foi estatisticamente significativa, $p = 0,0001$ (Figura 22 C).

Figura 22 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pela laminina na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo policlonal anti laminina. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.7 Quantificação da proteína da laminina

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da laminina foi possível observar três bandas distintas, sendo uma banda de 200 kDa e as outras duas entre 300 e 400 kDa; foi possível observar também que houve variação individual em todas as três bandas analisadas (Figura 23 e Figura 24). Ao se analisar a expressão das bandas de 400 kDa, foi possível observar que quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, houve menor expressão da laminina nos animais ao final de gestação, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,118$. E ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou menor expressão que o grupo controle e também não houve diferença estatística significativa, $p = 0,503$ (Figura 25 A).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão e houve diferença estatística significativa, $p = 0,0304$. Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos e também houve diferença estatística significativa ($p = 0,080$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, estas apresentaram expressão pouco maior mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,817$ (Figura 25 B).

Ao se analisar a expressão das bandas de aproximadamente 300 kDa, foi possível observar que quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram menor expressão da laminina, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,654$. Ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou menor expressão que o grupo controle, mas não houve diferença estatística significativa, $p = 0,667$ (Figura 25 C).

Quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, foi possível observar que expressão foi semelhante apesar do grande variação no grupo composto por machos e a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa, $p = 0,914$. Ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones machos, os clones machos apresentaram menor expressão que o grupo controle, e a diferença também não foi estatisticamente significativa ($p = 0,768$). E ao se comparar o grupo controle com o de clones fêmeas, estas apresentaram expressão ainda menor, mas também não houve diferença estatística significativa, $p = 0,484$ (Figura 25 D).

Na análise da banda de 200 kDa, quando o grupo composto de animais derivados de monta natural aos 90 foi comparado com o de 270 dias, foi possível observar que houve maior expressão no grupo constituído de animais aos 270 dias de gestação e que a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,043$ e quando os animais controle foram comparados aos animais clonados, os animais clonados apresentaram menor expressão e também houve diferença estatística significativa, $p = 0,019$ (Figura 25 E).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão, mas não houve diferença estatística significativa ($p = 0,356$). Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos e que houve diferença estatística significativa ($p = 0,005$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, estas apresentaram expressão menor e a diferença também foi estatisticamente significativa, $p = 0,040$ (Figura 25 F).

Figura 23 - Resultado da expressão individual da proteína da laminina por western blot

Figura 24 - Expressão protéica individual da laminina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação (n=3) e aos 270d (n=4) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4 e clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação (bandas de 200 kDa em cor cheia, 205 kDa em cor pontilhada e 400 kDa em cor com riscos diagonais)

Figura 25 - Expressão protéica da laminina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; A, C e E, expressão protéica da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; B, D e F, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.8 Expressão relativa do RNAm da laminina

Ao se analisar os resultados obtidos para laminina, foi possível observar que houve acentuada variação individual na expressão relativa do RNAm da laminina, principalmente nos grupos de animais clonados (Figura 26 A). Ao se comparar a expressão relativa do grupo controle com o grupo composto por animais clonados, foi possível observar que houve expressão pouco maior no grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,908$ (Figura 26 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão e houve diferença estatística significativa, $p = 0,001$ e ao se comparar o grupo controle ao grupo de clones machos, a expressão no grupo controle foi maior e houve diferença estatística significativa, $p = 0,037$ e quando o grupo controle foi comparado ao de clones fêmeas, houve maior expressão no grupo de clones fêmeas e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,035$ (Figura 26 C).

A expressão relativa da laminina no placentoma de bovinos derivados de monta natural e de transferência nuclear está apresentada na Tabela 24 (apêndice A).

Figura 26 - A, expressão relativa individual do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas penta, indep e morta); B, expressão relativa do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=6)*; C, expressão relativa do RNAm da laminina em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.9 Imunolocalização da proteína da β -actina

A proteína da β -actina, nosso controle interno, foi observada nos estromas materno e fetal e na porção apical do epitélio materno e apical do epitélio fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais da placenta bovina em todos os grupos analisados. O citoplasma das células dos epitélios materno e fetal apresentou reação negativa. Nos animais do grupo 1 a reação foi forte nos estromas materno e fetal e na porção apical do epitélio materno e apical do epitélio fetal (Figura 27 A). No grupo 2, a reação foi forte nos estromas materno e fetal e também na porção apical do epitélio materno e apical do epitélio fetal (Figura 27 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3 apresentaram reação semelhante aos outros dois grupos, onde os estromas e a porção apical do epitélio materno e apical do epitélio fetal apresentaram reação forte (Figura 27 C).

Figura 27 - Fotomicrografias da localização da proteína da β -actina na placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti β -actina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção apical dos epitélios maternos e fetais (ponta de seta vazia). Barra: 200 μ m

5.2.10 Quantificação da proteína da β -actina

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da β -actina, foi possível observar que houve variação individual (Figura 28), os valores individuais obtidos por densitometria óptica, também indicaram variação individual (Figura 29 A). Quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram maior expressão da β -actina, mas não houve diferença estatística significativa, $p = 0,211$. Ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou menor expressão que o grupo controle, mas também não houve diferença estatisticamente significativa, $p = 0,262$ (Figura 29 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram expressão maior e houve diferença estatística significativa, $p = 0,035$. Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos, mas não houve diferença estatisticamente significativa, $p = 0,154$ e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, estas apresentaram expressão pouco menor e também não houve diferença estatística significativa, $p = 0,468$ (Figura 29 C).

Figura 28 - Resultado da expressão individual da proteína da β -actina por western blot

Figura 29 - A, expressão protéica individual obtida por densitometria óptica utilizando-se anticorpo monoclonal anti β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica da β -actina em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.2.11 Imunolocalização da vimentina

A proteína da vimentina foi observada nos estromas materno e fetal e na porção basal de ambos os epitélios e nas paredes dos capilares maternos e fetais da placenta bovina em todos os grupos analisados. Nos animais do grupo 1 a reação foi forte nos estromas materno e fetal e também na porção basal dos epitélios maternos e fetais. Na parede dos capilares maternos e fetais a reação foi moderada (Figura 30 A). No grupo 2, a reação foi forte nos estromas materno e fetal e na porção basal de ambos os epitélios. As paredes dos capilares apresentaram reação moderada (Figura 30 B). Os animais machos e fêmeas do grupo 3 apresentaram reação semelhante aos outros dois grupos, onde os estromas e a porção basal dos epitélios maternos e fetais apresentaram reação forte e houve reação moderada nas paredes dos capilares de ambos os compartimentos (Figura 30 C).

Figura 30 - Fotomicrografias da localização da proteína da vimentina na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti vimentina. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), na porção basal dos epitélios maternos e fetais (seta cheia). Barra: 100 µm

5.2.12 Quantificação da proteína da vimentina

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot da vimentina foi possível observar também que houve intensa variação individual (Figura 31), os valores individuais obtidos por densitometria óptica, também indicaram intensa variação individual (Figura 32 A). Quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram maior expressão vimentina, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,312$. E ao se comparar o grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou menor expressão que o grupo controle, mas não houve diferença estatística significativa, $p = 0,403$ (Figura 32 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram menor expressão mas também não houve diferença estatística significativa, $p = 0,334$. Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,714$ e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, estas apresentaram expressão ainda menor, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,182$ (Figura 32 C).

Figura 31 - Resultado da expressão individual da proteína da vimentina por western blot

Figura 32 - A, expressão protéica individual da vimentina obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica da vimentina em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.3 EXPRESSÃO DO INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASES 2 (TIMP-2)

O teste de imunohistoquímica permitiu localizar e quantificar com especificidade a proteína do TIMP-2. A avaliação por meio de western blot foi usada para confirmar a especificidade do anticorpo escolhido e também para a quantificação da sua expressão. O RT-PCR foi utilizado para se avaliar a presença do RNAm do TIMP-2 na placenta bovina em animais clonados e não clonados.

5.3.1 Imunolocalização do TIMP-2

A proteína do TIMP-2 foi especificamente e exclusivamente localizada nas células trofoblásticas gigantes da placenta bovina em todos os grupos analisados (Figura 33 A, B e C). As células positivas foram contadas e a sua expressão foi comparada entre os grupos.

Figura 33 - Fotomicrografias da localização da proteína do TIMP-2 na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti TIMP-2. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação em TGCs (ponta da seta). Barra: 50 µm

5.3.2 Quantificação do número de células coradas pelo TIMP-2

Após o teste de imuno-histoquímica, as células trofoblásticas gigantes foram contadas em aumento de 20x e foi possível observar que houve diferença individual, entre os animais analisados (Figura 34 A). Ao se analisar todos os grupos separadamente, foi possível observar que quando o grupo de animais aos 90 dias foi comparado ao de 270 dias de gestação, o número de células positivas foi menor no grupo aos 270 dias de gestação e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,025$ e ao se comparar o grupo controle com o grupo de animais clonados, observou-se que o grupo composto de animais clonados apresentou maior expressão, mas não houve diferença estatística significativa, apenas tendência ($p = 0,058$, Figura 34 B).

Ao se comparar o grupo de clones machos com o de clones fêmeas, o de fêmeas apresentou menor expressão e houve diferença estatística significativa, $p = 0,050$. Quando o grupo controle foi comparado ao de clones machos, os clones machos apresentaram maior expressão e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,004$ e ao se comparar o grupo controle com o de clones fêmeas, o grupo de clones fêmeas apresentou expressão pouco maior, mas não houve diferença estatística significativa, $p = 0,190$ (Figura 34 C).

Figura 34 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo TIMP-2 na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti TIMP-2. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.3.3 Quantificação da proteína do TIMP-2

Ao se analisar a expressão protéica por Western blot do TIMP-2 foi possível observar que houve variação individual, principalmente no grupo de animais clonados (Figura 35 e Figura 36 A). Quando os animais não manipulados do grupo de 90 dias de gestação foram comparados aos de 270 dias de gestação, foi possível observar que os animais ao final de gestação apresentaram menor expressão do TIMP-2, mas não houve diferença estatística significativa ($p = 0,078$). E ao se comparar o grupo controle ao grupo composto por animais clonados, o grupo de animais clonados apresentou expressão menor que o grupo controle e houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,009$, Figura 36 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado ao de clones fêmeas, as fêmeas apresentaram expressão menor e a diferença foi estatisticamente significativa, $p = 0,0304$. Ao se comparar o grupo controle com o de clones machos, foi possível observar que houve menor expressão no grupo de clones machos e que houve diferença estatística significativa, $p = 0,009$ e ao se comparar o grupo controle com o grupo de clones fêmeas, as fêmeas, apresentaram expressão ainda menor e também houve diferença estatística significativa ($p = 0,0304$, Figura 36 C).

Figura 35 - Resultado da expressão individual da proteína do TIMP-2 por western blot utilizando-se anticorpo monoclonal anti TIMP-2

Figura 36 - A, expressão protéica individual do TIMP-2 obtida por densitometria óptica em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e ao final da gestação (270d) e em animais clonados (clones machos 3.3 e 3.4; clones fêmeas 42 e 5.8) aos 270 dias de gestação; B, expressão protéica do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=3) e aos 270d (n=4) e clonados (clones) aos 270d (n=4)*; C, expressão protéica do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=2) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.3.4 Expressão relativa do RNAm do TIMP-2

Foi possível observar a presença do RNA mensageiro do TIMP-2 na placenta bovina aos 270 dias de gestação de animais derivados de monta natural e foi possível também observar a sua presença em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas aos 270 dias de gestação, o que caracteriza gestação de clones bovinos (Figura 37).

Figura 37 - Presença do RNAm do TIMP-2 na placenta bovina aos e 270 dias de gestação de animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação de animais clonados

5.3.5 Expressão relativa do RNAm do TIMP-2

Ao se analisar os resultados obtidos para o TIMP-2, foi possível observar que houve acentuada variação individual na expressão relativa do RNAm do TIMP-2, principalmente nos grupos de animais não manipulados aos 270 dias de gestação e animais clonados aos 270 dias de gestação (Figura 38 A). Ao se comparar a expressão relativa do grupo controle (animais não manipulados aos 270 dias de gestação) com o grupo composto por animais clonados (aos 270 dias de gestação), foi possível observar que houve expressão menor no grupo de animais clonados, mas não houve diferença estatística ($p = 0,561$, Figura 38 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão e houve diferença estatística significativa ($p = 0,0122$); ao se comparar o grupo controle ao grupo de clones machos a expressão no grupo controle foi maior e foi possível observar diferença estatística significativa ($p = 0,009$) e quando o grupo controle foi comparado ao de clones fêmeas, houve maior expressão no grupo de clones fêmeas, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, $p = 0,276$ (Figura 38 C).

Figura 38 - A, expressão relativa individual do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas indep e 42); B, expressão relativa do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=5)*; C, expressão relativa do RNAm do TIMP-2 em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO RNAM DO KI-67 E LACTOGÊNIO PLACENTÁRIO

O teste de imunohistoquímica permitiu localizar e quantificar com especificidade a proteína do Ki-67 e do Lactogênio placentário. Não foi possível a avaliação por meio de western blot para o lactogênio placentário. O RT-PCR foi utilizado para se avaliar a presença do RNAm do Lactogênio placentário na placenta bovina em animais clonados e não clonados.

5.4.1 Imunolocalização do Ki-67

A localização do antígeno Ki-67 foi exclusivamente nuclear e foi observada nos núcleos de células em atividade proliferativa do estroma materno, estroma fetal, do epitélio materno, do epitélio fetal e em TGCs da placenta bovina em todos os grupos analisados (Figura 39 A, B e C). As células positivas foram contadas e a sua expressão foi comparada entre os grupos.

Figura 39 - Fotomicrografias da localização da proteína do Ki-67 na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti Ki-67. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação nos estromas maternos e fetais (seta vazia), nos epitélios maternos e fetais (seta cheia) e em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 50 µm

5.4.2 Quantificação do número de células positivas coradas pelo Ki-67

Após o teste de imuno-histoquímica, as células trofoblásticas gigantes foram contadas em aumento de 20x e foi possível observar que houve diferença individual (Figura 40 A). Ao se analisar todos os grupos separadamente, foi possível observar que quando o grupo de animais aos 90 dias foi comparado ao de 270 dias de gestação, o número de células positivas foi muito menor no grupo aos 270 dias de gestação e a diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0051$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de animais clonados, observou-se que o número de células positivas foi pouco menor no grupo controle e não houve diferença estatística significativa ($p = 0,3785$, Figura 40 B).

Ao se comparar o grupo de clones machos com o de clones fêmeas, o de fêmeas apresentou menor expressão, que foi estatisticamente significativa ($p = 0,0051$). Quando o grupo controle foi comparado ao de clones machos, os clones machos apresentaram maior expressão, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,3785$) e ao se comparar o grupo controle com o de clones fêmeas, o grupo de clones fêmeas apresentou expressão menor e a expressão foi estatisticamente significativa, $p = 0,0051$ (Figura 40 C).

Figura 40 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo Ki-67 na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti Ki-67. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.4.3 Imunolocalização do lactogênio placentário

A proteína do lactogênio placentário foi especificamente e exclusivamente localizada nas células trofoblásticas gigantes da placenta bovina aos 90 e 270 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais machos e fêmeas derivados de gestações após transferência nuclear de células somáticas (Figura 41 A., B e C), assim como observado para o TIMP-2. As células positivas foram contadas e a sua expressão foi comparada entre os grupos.

Figura 41 - Fotomicrografias da localização da proteína do lactogênio placentário na placenta bovina aos 90 dias de gestação em animais derivados de monta natural e aos 270 dias de gestação em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti lactogênio placentário. A: animais aos 90 dias de gestação; B: animais aos 270 dias de gestação; C: animais clonados aos 270 dias de gestação; D: controle negativo. Observar a reação em TGCs (ponta de seta cheia). Barra: 100 µm

5.4.4 Quantificação do número de células positivas coradas pelo Lactogênio placentário

Após o teste de imuno-histoquímica, as células trofoblásticas gigantes foram contadas em aumento de 20x e foi possível observar que houve bastante diferença individual nos animais analisados (Figura 42 A). Ao se analisar todos os grupos separadamente, foi possível observar que quando o grupo de animais aos 90 dias foi comparado ao de 270 dias de gestação, o número de células positivas foi menor no grupo aos 270 dias de gestação mas não houve diferença estatística significativa ($p = 0,647$) e ao se comparar o grupo controle com o grupo de animais clonados, observou-se que o grupo composto de animais clonados apresentou menor expressão, que foi estatisticamente significativa ($p = 0,0298$, Figura 42 B).

Ao se comparar o grupo de clones machos com o de clones fêmeas, o de fêmeas apresentou menor expressão e a diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0022$). Quando o grupo controle foi comparado ao de clones machos, os clones machos apresentaram expressão pouco maior, e a diferença também foi estatisticamente significativa ($p = 0,035$); ao se comparar o grupo controle com o de clones fêmeas, o grupo de clones fêmeas apresentou expressão menor, que também foi estatisticamente significativa ($p = 0,0022$, Figura 42 C).

Figura 42 - Número de células trofoblásticas gigantes coradas pelo lactogênio placentário na placenta bovina, obtidas por fotomicrografias pós-teste de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti lactogênio placentário. A, contagem individual de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90 dias de gestação e aos 270 dias de gestação e clonados (clones machos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 e clones fêmeas Indep, 2.1 e 42); B, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 90d (n=6) e aos 270d (n=3) e clonados (clones) aos 270 dias de gestação (n=7)*; C, contagem do número médio de TGCs em placentomas de animais não manipulados aos 270d (n=3), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270d (n=4) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270d (n=3)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

5.4.5 Expressão do RNAm do lactogênio placentário

Foi possível observar a presença do RNA mensageiro do lactogênio placentário na placenta bovina 270 dias de gestação de animais derivados de monta natural e foi possível também observar a sua presença em animais derivados de transferência nuclear de células somáticas aos 270 dias de gestação (Figura 43).

Figura 43 - Presença do RNAm do lactogênio placentário na placenta bovina aos 270 dias de gestação de animais derivados e monta natural e aos 270 dias de gestação de animais clonados

5.4.6 Expressão relativa do RNAm do Lactogênio Placentário

Ao se analisar os resultados obtidos para o lactogênio placentário, foi possível observar que houve acentuada variação individual na expressão relativa do RNAm do lactogênio placentário na placenta dos animais clonados (Figura 44 A). Ao se comparar a expressão relativa do grupo controle (composto por animais não manipulados aos 270 dias de gestação) com o grupo composto por animais clonados (também aos 270 dias de gestação), foi possível observar que houve expressão menor no grupo de animais clonados, houve uma tendência a diferença, mas que não foi estatisticamente significativa ($p = 0,076$, Figura 44 B).

Quando o grupo de clones machos foi comparado com o de fêmeas, as fêmeas apresentaram maior expressão, mas não houve diferença estatística significativa ($p = 0,137$); ao se comparar o grupo controle ao grupo de clones machos a expressão no grupo controle foi muito maior e houve diferença estatística significativa ($p = 0,002$); e quando o grupo controle foi comparado ao de clones fêmeas, também houve maior expressão no grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,6761$, Figura 44 C).

Figura 44 - A, expressão relativa individual do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados ao final da gestação (270d) e clonados (clones machos 3.3, 3.4 e 3.5; clones fêmeas indep e 42); B, expressão relativa do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4) e clonados (clones) aos 270 dias (n=5)*; C, expressão relativa do RNAm do lactogênio placentário em placentomas de animais não manipulados aos 270 dias (n=4), clonados do sexo masculino (clones M) aos 270 dias (n=3) e clonados do sexo feminino (clones F) aos 270 dias (n=2)*. * Barras representam média +/- erro padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas, $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras possibilidades e vantagens da transferência nuclear de células somáticas, a eficiência desta técnica ainda é muito baixa. Entretanto a clonagem é mais eficiente na espécie bovina do que em qualquer espécie testada até o momento (BAUERSACHS et al., 2009). Os resultados obtidos após SCNT durante os últimos cinco anos no Brasil, Argentina e Estados Unidos revelam que apenas 9% dos embriões obtidos e transferidos para uma receptora resultaram no nascimento de bezerros vivos (PANARACE et al., 2007). No presente estudo, foram utilizados oito animais derivados de transferência nuclear de células somáticas, destes, apenas 3 sobreviveram (3.3, 3.4 e bela), 2 nasceram mortos (3.5 e morta) e 3 sobreviveram por pouco tempo (3.6, penta e independência); apesar da clonagem permitir que a gestação a venha a termo, a taxa de sobrevivência dos animais de nosso estudo foi baixa (cerca de 36%), contribuindo para os fatores limitantes para uso desta técnica em larga escala. Outros estudos relatam diversas alterações morfológicas na placenta de bovinos clonados, como maior peso da placenta e feto e desordens vasculares (HILL et al., 2000; CONSTANT et al., 2006; MIGLINO et al., 2007), bem como alterações no cordão umbilical dos bezerros recém-nascidos e aumento da espessura do vaso devido a intenso edema (MIGLINO et al., 2006).

6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA

Após ser consultada a literatura, verificou-se que este é o primeiro trabalho a descrever a localização espacial e expressão das subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ bem como de proteínas da matriz extracelular na placenta bovina derivada de animais clonados aos 270 dias de gestação. Foram utilizadas diversas abordagens metodológicas visando maior confiabilidade dos resultados apresentados. Para a localização das subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ este trabalho se baseou em trabalhos realizados por MacLaren e Wildeman (1995), Pfarrer et al. (2003); Kimmins; Lim e MacLaren (2004); Zeiler (2006), os quais utilizaram a técnica de imunofluorescência. A técnica de imuno-histoquímica para

detectar o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina foi utilizada com base em trabalhos anteriores realizados por Berry, Howard e Akers (2003) e Pfarrer et al (2003); a publicação de Pfarrer (2006) nos direcionou na localização da vimentina e Walter; Boos, 2001 para a localização do TIMP-2.

Amostras de placenta foram submetidas ao teste de western blot para a pesquisa da proteína da subunidade de integrina $\alpha 6$, o colágeno tipo IV e fibronectina, mas a sua detecção não foi possível. Em um trabalho realizado por Barraud-Lange et al. (2007), foi possível observar a proteína da integrina $\alpha 6$ no fluido espermático de camundongos e em um trabalho realizado por Woodward et al. (2001), foi possível observar a proteína do colágeno tipo IV e da fibronectina na glândula mamária de camundongos utilizando-se a técnica de western blot. A diferença na qualidade dos resultados pode estar relacionada ao anticorpo utilizado, apesar da escolha dos anticorpos anti colágeno tipo IV, $\alpha 6$ e fibronectina ter se baseado na confirmada reação cruzada deste anticorpo para a espécie bovina por imunohistoquímica (PFARRER et al., 2003). Como a literatura descreve que a laminina possui 3 diferentes cadeias: α (alfa), β (beta) e γ (gama) e até o presente momento estão descritas 5 cadeias α , 3 cadeias β e 3 cadeias γ . Dentre estas, as cadeias $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\gamma 3$ podem ser formas de “splice” alternativo (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000; GALLIANO et al., 1995). O anticorpo utilizado neste presente estudo reconhece todas as cadeias que aparecem em diferentes bandas de 200 a 400 kDa, o que provavelmente gerou o padrão pouco específico encontrado no Western blot e não teve reflexo negativo na análise por imuno-histoquímica.

Ao se analisar a expressão das integrinas $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ observamos diferenças entre a expressão protéica e a expressão do RNAm. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato das proteínas possuírem controle pós-transcricional e controle da meia-vida diferente do RNA (GYGI et al., 1999) o que pode resultar em alta quantidade de proteína e pouca expressão de RNA ou vice versa.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Integrinas são proteínas heterodiméricas que promovem interação célula-célula e célula-ECM e facilitam processos celulares envolvidos no remodelamento tecidual como a adesão e a migração celular (VAN DER FLIER; SONNENBERG, 2001; KIMMINS; LIM; MACLAREN, 2004). O heterodímero $\alpha 6\beta 1$ é um importante mediador da receptividade uterina durante a implantação (LESSEY et al., 1994) e a literatura descreve a sua presença na placenta bovina *in vitro* (ZEILER et al., 2007) e *in vivo* (PFARRER et al., 2003). Observamos que no presente estudo as subunidades de integrina $\alpha 6$ e $\beta 1$ foram observadas no estroma materno, no estroma fetal, na porção basal do epitélio materno e na porção basal do epitélio fetal e em algumas células trofoblásticas gigantes em todos os grupos analisados. A localização das subunidades de integrina se manteve igual na placenta bovina derivada de animais não manipulados e na placenta bovina de animais clonados e está de acordo com trabalhos anteriores, que utilizaram amostras da placenta bovina de animais não manipulados, ao longo de toda a gestação e observaram estas proteínas no estroma materno, no estroma fetal, na porção basal do epitélio materno e do epitélio fetal e também em TGCs utilizando o anticorpo policlonal anti integrina $\alpha 6$ (MAB 1378, Chemicon, Estados Unidos) por apresentar reação cruzada para a espécie bovina (PFARRER et al., 2003; ZEILER et al., 2007) ou utilizando-se a técnica de imunofluorescência em cortes congelados para a integrina $\beta 1$ (MACLAREN; WILDEMAN, 1995, PFARRER et al., 2003, ZEILER et al., 2007).

A expressão do RNAm das subunidades de integrina $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ já havia sido observada de forma qualitativa na placenta bovina aos 120, 190 e 230 dias de gestação utilizando-se a técnica de RT-PCR (ZEILER et al., 2007). Neste presente estudo o RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$ foi observado na placenta bovina derivada de animais não manipulados e em gestações de bovinos clonados aos 270 dias de gestação, utilizando-se a técnica de Real Time PCR. Ao se analisar a expressão do RNAm e protéica das subunidades de integrina, foi possível observar que as subunidades $\alpha 6$, $\beta 1$, αV e $\beta 3$ de integrina, apresentaram maior ou menor expressão em animais clonados do que o grupo controle. A expressão entre clones machos e clones fêmeas apresentou variação de expressão protéica e de RNAm,

sendo a expressão do RNAm significativamente maior em clones do sexo feminino para a subunidade de integrina $\alpha 6$, αV e $\beta 3$ ($p < 0,05$); nos clones machos a expressão protéica variou menos entre do que a de RNAm.. A expressão de mRNA da $\alpha 6$ foi significativamente menor e a $\beta 1$ foi significativamente maior ($p < 0,05$). Como subunidade de integrina $\alpha 6$ pode se heterodimerizar com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 4$ para formar receptores da laminina (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000), que no caso do receptor $\alpha 6\beta 1$ favorece a migração das TGCs na placenta bovina (PFARRER et al., 2003), pode-se supor que em placentas de clones machos a atividade migratória das TGCs esteja menos prejudicada do que em fêmeas. A presença da subunidade de integrina $\beta 1$ em células trofoblásticas de embriões bovinos com 21 dias e em TGCs aos 24 dias de gestação também está relacionada com a atividade migratória das TGCs (MACLAREN; WILDEMAN, 1995). Na placenta humana a difusa distribuição da $\beta 1$ está associada formação de heterodímeros com diferentes subunidades α de integrinas, como o receptor de laminina $\alpha 6\beta 1$ e o receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1$ e estas ligações influenciam processos de adesão, implantação, invasão e migração celular (DAMSKY et al., 1992, MACLAREN; WILDEMAN, 1995, PFARRER et al., 2003). Estes heterodímeros formados constituem receptores para o colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, vitronectina, VEGF (REDDY, MANGALE, 2003) e osteopontina (JOHNSON et al., 2001) por reconhecerem a seqüência de peptídeo tripla (RGD) presente nestas proteínas da matriz extracelular. A viabilidade de ligantes pode estimular a sinalização externa de integrinas (MIRANTI; BRUGGE, 2002) e assim estimular ou desestimular a proliferação, ancoragem e migração celular, processos que podem estar comprometidos em placenta de bovinos derivados de SCNT de acordo com as diferenças de expressão observadas.

O heterodímero de integrina $\alpha V\beta 3$ está presente em uma grande gama de tecidos que inclui o endométrio, endotélio, osteoblastos e fibroblastos e pode se ligar com uma série de proteínas como a vitronectina, fibronectina e o fator von Willebrand (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987; BOSMAN, 1993). Este heterodímero é considerado um marcador da receptividade uterina durante a implantação (SUTHERLAND; CALARCO; DAMSKY, 1993; BOWEN et al., 1996; LESSEY et al., 1996). A co-expressão da integrina $\alpha v\beta 3$ e proteínas da matriz extracelular, como a

fibronectina e vitronectina pode estar relacionada com a proliferação e diferenciação celular no estroma materno (FAZLEABAS et al., 1997; KIMMINS; MACLAREN, 1999; KIMMINS et al., 2004; PFARRER et al., 2003). No presente estudo foi possível localizar as proteínas das subunidades de integrina αV e $\beta 3$ na placenta bovina derivada de animais não manipulados aos 90 e 270 dias de gestação e em gestações de bovinos clonados aos 270 dias de gestação no estroma materno e no estroma fetal. A localização da de ambas está de acordo com trabalhos realizados por Pfarrer et al. (2003); Zeiler et al. (2007) que observaram expressão na placenta e no endométrio bovino bem como no estroma materno e no estroma fetal ao longo da gestação (PFARRER et al., 2003; KIMMINS; LIM; MACLAREN, 2004; ZEILER, 2006). A localização do receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ está de acordo com outros trabalhos que descrevem a presença do heterodímero de integrina $\alpha V\beta 3$ no estroma materno e no estroma fetal na placenta caprina (GARCIA et al., 2004) e bovina, locais de co-expressão com seus principais ligantes fibronectina e vitronectina (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987; PFARRER et al., 2003).

A integrina $\alpha V\beta 3$ está presente em grandes quantidades no estroma materno e em um trabalho realizado por Pfarrer et al. (2003) sua expressão foi particularmente forte no estroma materno ao final da gestação e devido ao seu sinal concentrado no estroma materno, os autores sugerem aumento da habilidade de diferenciação e proliferação das células do estroma, uma vez que este heterodímero de integrina tem sido associado com a atividade migratória e invasiva de tumores (GLADSON; CHERESH, 1991). A literatura descreve que o heterodímero de integrina $\alpha V\beta 3$ pode envolver-se em diversos processos biológicos e exercem um importante papel durante a proliferação e migração celular ao longo do período de implantação de caprinos (GARCIA et al., 2004). Entretanto, estudos futuros são necessários para identificar outros possíveis ligantes do receptor de integrina $\alpha V\beta 3$, co-localizados na placenta bovina, uma vez que a ampla possibilidade de ligação deste heterodímero está relacionada ao reconhecimento da sequência de peptídeo tripla (RGD) presente em várias proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina (REDDY, MANGALE, 2003). A maior expressão da subunidade de integrina αV e $\beta 3$ nos animais clonados pode estar relacionada à participação do receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ no processo de angiogênese junto ao VEGF e seu receptor VEGFR-2 (SOMANATH et al., 2009),

uma vez foi que relatada maior expressão do VEGF na placenta de clones em trabalho publicado por Arnold et al. (2007). A literatura sugere que o VEGF pode regular outras funções além da permeabilidade vascular da placenta bovina, como a migração das células trofoblásticas gigantes através de regulação autócrina (PFARRER et al., 2006).

A placenta como é um tecido rico em proteínas da matriz extracelular como os colágenos, laminina e fibronectina (CROUCH et al., 1985; PFARRER et al., 2003; ARAI, NISHIYAMA, 2007) sendo as trocas fisiológicas entre a receptora e o concepto (WODDING; FLINT, 1994) o suporte para a sustentação celular, a regulação da forma, do crescimento, da diferenciação e a proliferação celular suas principais funções (YAMADA et al., 2002). O colágeno tipo IV exerce importante papel para a manutenção da gestação (FURUHASHI et al., 1994), e na formação de uma rede de sustentação (VAN DER REST; GARRONE, 1991; YAMADA et al., 2002) e a presença do embrião estimula a produção de colágeno pelas células do estroma uterino (WEWER et al., 1986). O colágeno do tipo IV foi observado em associação com a membrana basal do trofoblasto da placenta humana (Amenta et al., 1986), bem como no estroma viloso, assim como vasos de origem fetal ao longo de toda a gestação (CHEN, APLIN, 2003). Neste estudo foi possível localizar a proteína do colágeno tipo IV na placenta bovina derivada de animais não manipulados aos 90 e 270 dias de gestação e de animais clonados aos 270 dias de gestação nos seguintes compartimentos: estroma materno, estroma fetal, porção basal do epitélio materno e porção basal do epitélio fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os achados de um trabalho realizado por Pfarrer et al. (2003), que apesar de ter usado a técnica de imunohistoquímica em corte congelado, localizou a proteína do colágeno IV nos estromas materno e fetal, porção basal dos epitélios materno e fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais.

A expressão do RNAm do colágeno tipo IV foi maior em clones machos ao se comparar com o grupo controle e pode sugerir resposta a hipóxia, uma vez que em um estudo realizado por Chen e Aplin (2003) foi possível observar que as células aumentaram a deposição de colágeno do tipo IV em resposta a hipóxia em cultura celular. A maior expressão do colágeno IV no estroma fetal do grupo controle e a

maior expressão do RNAm nas gestações de animais clonados, principalmente nos clones do sexo masculino, pode estar relacionada com a regulação da expressão protéica por mecanismos pós-transcricionais, uma vez que a expressão de proteínas relacionadas ao citoesqueleto e proteínas da matriz extracelular apresentaram diferente expressão entre animais derivados de SCNT e não manipulados (KIM et al., 2005). Alterações de expressão desta proteína também podem resultar na perda do feto e/ou severas complicações para a mãe (ZHOU et al., 1993), o que de fato ocorreu com alguns dos animais derivados de SCNT deste estudo. Em um estudo realizado por Ribeiro et al. (2008), foi constatado que a arvore vilosa fetal e as criptas uterinas na camada epitelial da placenta apresentavam menor organização na placenta derivada de animais clonados. Os achados de Ribeiro et al. (2008) somados aos achados deste presente estudo podem indicar que a comunicação célula-célula e célula-ECM pode estar comprometida na gestação de bovinos clonados.

A fibronectina é uma proteína da matriz extracelular com grande importância na reprodução por ser considerada fonte de substrato para a organização da matriz, adesão, proliferação e migração celular (SCHUPPAN et al., 1994). Esta proteína expressa o peptídeo triplo RGD (TAKAHASHI et al., 2005), e desta forma pode se ligar a diferentes heterodímeros de integrina: $\alpha 3\beta 1$; $\alpha 4\beta 1$; $\alpha 6\beta 1$; $\alpha 8\beta 1$; $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 6$ (PFARRER et al., 2003). Segundo Aplin et al (1999) dois tipos de fibronectina já foram caracterizados: o primeiro tipo seria a fibronectina materna e o outro seria a fibronectina oncofetal derivada do trofoblasto e ambos os tipos participam da mediação da adesão do conceito ao endométrio em humanos. Assim como no trabalho realizado por Pfarrer et al (2003), o anticorpo usado neste trabalho não distingue a fibronectina de origem materna ou oncofetal. E segundo estes mesmos autores, a sua localização exclusiva no mesênquima fetal e tecido conjuntivo materno, sugere também a sua participação no processo de adesão celular.

Em estudos anteriores na placenta humana a proteína da fibronectina foi observada no estroma uterino (APLIN et al., 1999), neste presente estudo a proteína da fibronectina foi observada na placenta bovina derivada de animais não manipulados aos (90 e 270 dias de gestação) e de animais clonados (aos 270 dias de gestação) nos seguintes compartimentos: no estroma materno, estroma fetal, porção basal do

epitélio materno e do epitélio fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais. A descrição da localização da fibronectina está de acordo com outro trabalho para a placenta bovina de animais não manipulados (PFARRER et al., 2003). Neste presente estudo, assim como no estudo realizado por Pfarrer et al (2003) foi possível observar que apesar da localização do colágeno tipo IV e laminina nas membranas basais, a proteína de matriz extracelular com maior intensidade no compartimento fetal da placenta bovina foi a fibronectina, reiterando seu papel de substrato para a organização da matriz, adesão, proliferação e migração celular (SCHUPPAN et al., 1994).

A laminina é o maior componente da membrana basal que participa dos processos de adesão, crescimento, diferenciação e migração celular (KLEINMANN et al. 1985; KORGUN et al., 2007) e pode se ligar a receptores de integrina como o heterodímero $\alpha 6 \beta 4$ e o $\alpha 6 \beta 1$. Esta proteína pode aumentar a sua expressão durante a implantação para acompanhar o processo de diferenciação celular (KORGUN et al., 2007) e pode ser encontrada em associação com a fibronectina e fatores de crescimento (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000). A literatura descreve que a atividade migratória celular pode ser estimulada pela laminina, uma vez que células tumorais migram a partir da utilização da matriz de laminina durante o processo de metástase (SCHUPPAN et al., 1994). Foi possível observar a presença da laminina neste estudo na placenta bovina derivada de animais não manipulados aos 90 e 270 dias e de animais clonados aos 270 dias de gestação nas células trofoblásticas gigantes, na porção basal do epitélio materno e do epitélio fetal (em menor proporção), no estroma materno e nas paredes dos capilares maternos e fetais. A descrição da localização da laminina está de acordo com um trabalho anterior realizado por Pfarrer et al. (2003) e segundo Chen e Aplin (2003) a expressão da laminina é maior no início da gestação e depois conforme a gestação progride, esta expressão diminui, o que está de acordo com os achados deste presente estudo, uma vez que a porção basal do epitélio apresentou maior expressão aos 90 dias de gestação na placenta bovina derivada de animais não manipulados do que animais não manipulados e clonados aos 270 dias de gestação.

A proteína da matriz extracelular laminina apresenta expressão menor nos animais derivados de SCNT, mas em nível de mRNA esta expressão é maior em fêmeas e

menor em machos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Expressão menor nos machos também foi observada para a fibronectina. A menor expressão da laminina em clones pode estar relacionada à diminuição da migração das TGCs uma vez que em um estudo realizado por Ravelich et al. (2004 b), os autores verificaram maior número de células trofobásticas gigantes em animais clonados do que o observado em animais derivados de inseminação artificial ou fertilização *in vitro* e observaram número significativamente maior de células maternas e fetais nos placentomas de animais clonados. Segundo os autores, o maior número de células pode estar associado à maior formação de TGCs nos clones ou diminuição da migração das TGCs através da interface materno fetal, o que pode ser estimulado pela diminuição da expressão da laminina, fibronectina, bem como de proteínas do citoesqueleto como a vimentina, encontradas neste presente estudo.

Sugere-se que o heterodímero de integrina $\alpha 6 \beta 1$ e a proteína da laminina interajam com a matriz extracelular para ajudar na ancoragem entre células e substrato, a partir da sinalização externa, uma vez que as TGCs da placenta bovina utilizam sua matriz de laminina para migrar e se fundir com as células do epitélio materno (PFARRER et al., 2003; PFARRER, 2006; ZEILER et al., 2007). Em placentações mais invasivas, os receptores de integrina $\alpha 1 \beta 1$ e $\alpha 7 \beta 1$ podem se ligar à laminina e ao colágeno e junto com o receptor $\alpha 6 \beta 1$ podem participar do processo de invasão do epitélio e ainda facilitar a sua migração para o estroma (REDDY, MANGALE, 2003). Placentomas maiores observados em SCNT (MIGLINO et al., 2007) podem estar relacionados a maior expressão das subunidades de integrina, conforme descrito na placenta de animais clonados por este presente estudo.

A migração celular dependente também do citoesqueleto de actina tanto para modificações no formato e na motilidade celular quanto para reorganização do citoesqueleto (SMALL et al., 1999; PFARRER, 2006). A literatura descreve que a ativação de integrinas pode causar o acúmulo de diversas moléculas associadas ao citoesqueleto, como a vinculina, talina e α -actinina, que levam a alterações conformacionais no citoesqueleto de actina e mesmo a transdução de sinais ao núcleo das células e transcrição alterada de alguns genes (MIYAMOTO et al., 1995; PFARRER, 2006). Na placenta bovina a vimentina é usada como marcador do tecido de origem mesenquimal: tecido conjuntivo e células endoteliais (PFARRER, 2006).

No presente estudo foi possível observar a presença da proteína da vimentina na placenta bovina derivada de animais não manipulados aos 90 e 270 dias de gestação e derivada de animais clonados aos 270 dias de gestação, utilizando-se a técnica de imunohistoquímica no estroma materno, no estroma fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais. A localização da vimentina está de acordo com um trabalho realizado por Pfarrer (2006) que descreveu a presença desta proteína no estroma materno, estroma fetal e nas paredes dos capilares maternos e fetais da placenta bovina no final da gestação.

A expressão protéica da vimentina foi menor na placenta de animais clonados e não clonados. Em um trabalho realizado por Kim et al. (2005) que utilizaram a técnica de eletroforese em gel bidimensional em amostras da placenta bovina derivada de animais clonados e derivada de inseminação artificial (obtidas após o nascimento), houve diminuição da proteína da vimentina na placenta de animais clonados e observaram também a diminuição de proteínas relacionadas com a proteção, citoesqueleto, transdução de sinal, sistema imunológico, metabolismo, proteínas da matriz extracelular, estrutura e diferenciação celular na placenta de SCNT. Estas diferenças de expressão estão parcialmente de acordo com os achados deste presente estudo, uma vez que houve diminuição da expressão laminina, bem como da fibronectina e da vimentina nos animais clonados, o que pode contribuir com a falta de organização da árvore vilosa fetal e das criptas uterinas observadas na placenta de animais clonados (RIBEIRO et al., 2008).

Células trofoblásticas invasivas da placenta humana (PING et al., 2001) em camundongos (WHITESIDE et al., 2001) e no macaco rhesus (WANG et al., 2001) produzem TIMP-2. Na placenta bovina e caprina em trabalhos realizados por Walter e Boos, em 2001, e Uekita et al (2004), o TIMP-2 foi exclusivamente localizado em TGCs. Neste presente estudo a proteína do TIMP-2 foi exclusivamente localizada nas TGCs em animais não manipulados aos 90 e 270 dias de gestação e em animais clonados aos 270 dias de gestação corroborando os achados acima mencionados que descreveram a expressão do TIMP-2 exclusivamente nas TGCs.

O TIMP-2 faz parte de uma família de inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz, que são de extrema importância durante o desenvolvimento placentário,

durante o parto e durante o processo de invasão do trofoblasto por estar associada com a degradação da matriz extracelular, regulada por meio das MMPs (WALTER, BOOS, 2001; BAI et al., 2005). No presente estudo ao se contar o número de células positivas para o TIMP-2 observou-se maior expressão na placenta derivada de SCNT ($p < 0,05$), ao se comparar animais aos 90 dias com animais aos 270 dias, pode-se observar menor número de TGCs positivas no grupo controle ($p < 0,05$). Em um estudo realizado por Takagi et al. (2007) relatou menor expressão do TIMP-2 na carúncula ao final da gestação e maior expressão no cotilédone. O autor sugere que o TIMP-2 é importante para a manutenção da gestação, prevenindo o descolamento da membrana fetal da carúncula e para o descolamento da placenta após o parto. Ele descreve também que a diminuição da expressão do TIMP-2 ao final da gestação, como uma das alterações necessárias para o parto e para a liberação da placenta e que o aumento do TIMP-2 pode estar relado a retenção da placenta em bovinos. Em um trabalho realizado por Water; Boos (2001) observou-se a proteína do TIMP-2 ao longo da gestação e em animais que apresentaram retenção de placenta, mas nenhuma diferença significativa foi observada na sua expressão. Um trabalho realizado por Williams et al. (1987) reportou que a diminuição no número de TGCs na placenta é considerada um mecanismo de controle da separação das membranas fetais e em seus estudos relatou aumento do número de TGCs na placenta bovina em animais com retenção de placenta pode resultar em inibição da atividade proteolítica do MMP2 na degradação da matriz celular, fundamental para o parto (WALTER; BOOS, 2001; KIM et al., 2005). Nos animais clonados é comum observar problemas na sinalização do parto, atribuídos principalmente a diminuição dos níveis séricos de cortisol e do sistema IGF (MATSUZAKI; SHIGA, 2002). Sugerimos que a sinalização defeituosa também possa estar relacionada à diferente expressão do TIMP-2 encontrada.

Um achado diferente neste presente estudo foi a expressão protéica e de RNAm do TIMP-2, em geral menor nos animais clonados ($p < 0,05$). Ao se analisar a expressão do RNAm, a expressão do TIMP-2 foi significativamente menor em clones machos. Ao se analisar a expressão protéica, a expressão nos clones foi significativamente menor ($p < 0,05$), ao se analisar clones machos e fêmeas separadamente, ambos apresentaram diminuição da expressão em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e no

grupo de clones fêmeas a expressão foi menor do que no grupo composto por machos ($p < 0,05$). Entretanto em um trabalho realizado por Kim et al. (2005) que utilizou a técnica de eletroforese em gel bidimensional em amostras da placenta bovina derivada de animais clonados e derivada de inseminação artificial (obtidas após o nascimento) descreveram que houve aumento da expressão do TIMP-2 na placenta de animais clonados. Em um trabalho mais recente, este mesmo grupo pesquisou a expressão de diferentes proteínas na placenta bovina de animais clonados e observaram maior expressão da proteína do TIMP-2 na placenta derivada de animais clonados e que pode favorecer a inibição da atividade proteolítica via maior expressão do TIMP-2, e conseqüentemente levar a alterações placentárias freqüentemente observadas nestes animais (KIM et al., 2009). Quando feita a contagem de TGCs coradas para TIMP-2, verificamos que placenta de clones machos apresentam maior expressão desta proteína, conforme descrito por Kim et al. (2009). Entretanto Uekita et al. (2004) sugerem que apesar da perda gradual de células binucleadas na placenta a termo poder colaborar com a diminuição da secreção do TIMP-2, a presença do MT-MMP 1 pode favorecer o aumento da expressão do TIMP-2. Elementos que coordenam e regulam a expressão do TIMP-2 e de MMPs ainda precisam ser elucidados bem como seu papel funcional na placenta de animais derivados de SCNT.

O Ki-67 é um conhecido e eficiente marcador da atividade proliferativa celular, expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em fase G0 e o início da fase G1 (YU; WOODS; LEVISON, 1992). No presente estudo o antígeno Ki-67 foi observado na placenta derivada de animais não manipulados aos 90 e 270 dias de gestação e em animais clonados aos 270 dias de gestação, no núcleo de células do epitélio materno, epitélio fetal, estroma materno e estroma fetal. A localização do Ki-67 está de acordo com trabalhos realizados anteriormente na espécie bovina (HOFFMANN; SCHULER, 2002; BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003) e também na espécie bubalina (ARTONI et al., 2007).

A quantificação do número de células para o Ki-67 foi significativamente maior aos 90 dias ($p < 0,05$) e diminuiu no grupo controle e SCNT. Estes achados estão de acordo com a literatura que descreve que o tecido uterino de ratas gestantes apresenta seu desenvolvimento máximo com doze dias de gestação, com intensa

atividade proliferativa e diminui a partir do décimo quarto dia, acompanhada pela diminuição da atividade proliferativa, que persiste até o final da gestação (WELSH; ENDERS, 1985; WELSH; ENDERS, 1991). Na espécie bovina, Boos; Janssen; Mülling (2003) descreveram que o antígeno Ki-67 pode ser localizado na maioria das células do epitélio materno e epitélio fetal da placenta e que a sua expressão diminui ao término da gestação. Na placenta bubalina Artoni (2005) e Artoni et al. (2007) descreveram que a expressão deste marcador de proliferação celular diminui gradativamente entre o início (101 dias) e o término (300 dias) da gestação. Entretanto, Hoffmann e Schuler (2002) observaram que a expressão do antígeno Ki-67 nas células da placenta bovina não diminui ao final da gestação, mas apontam diminuição da expressão do antígeno Ki-67 nas células do epitélio fetal aos 220 dias, seguido por intenso aumento até o período próximo ao parto.

Ainda, o grupo de clones fêmeas apresentou menor expressão do Ki-67 em relação aos controles e ao grupo de clones macho. Segundo Boos; Janssen e Mülling (2003), a imunoreatividade ao antígeno Ki-67 nas células do epitélio fetal e materno da placenta de bovinos indica que a proliferação celular é fundamental para a manutenção da gestação e conforme o avanço da gestação, esta expressão se torna muito mais presente na porção materna que na fetal. Esta observação pode refletir o maior insucesso da clonagem em fêmeas, uma vez que nos clones de sexo feminino a taxa de sobrevivência foi significativamente menor ($p < 0,05$) que em clones do sexo masculino (MIGLINO et al., 2007), assim como a expressão do Ki-67. A alta expressão do antígeno Ki-67 pelas células do epitélio materno da placenta bovina pode indicar que a proliferação elevada pode estar relacionada à nutrição do feto (BJÖRKMAN, 1954; BJÖRKMAN, 1969; BOOS; JANSSEN; MÜLLING, 2003; HOFFMANN; SCHULER, 2002). E segundo Björkman (1954); Björkman (1969); Ferrell (1991); Laven; Peters (2001); Prior; Laster (1979) o compartimento materno apresenta maior capacidade de crescimento que o fetal; como observado por Artoni et al. (2007) na placenta bubalina. No presente estudo também foi possível observar a maior expressão do antígeno Ki-67 no epitélio materno da placenta bovina de animais não manipulados (aos 90 e 270 dias de gestação), bem como em animais clonados aos 270 dias de gestação.

O lactogênio placentário (PL) é um membro da família do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL), é sintetizado pelas TGCs na placenta bovina e secretado por seus grânulos secretórios (WOODING, 1992; GOOTWINE, 2004). A literatura descreve a presença do PL na placenta de ovinos (WARREN et al., 1990), de caprinos (CURRIE et al., 1990), de bovinos (RAVELICH et al., 2004; BERTOLI et al., 2006) e de búfalos (CARVALHO et al., 2006). No presente estudo a proteína do PL foi observada na placenta bovina derivada de animais não manipulados (aos 90 e 270 dias de gestação) e em animais clonados (aos 270 dias de gestação) exclusivamente nas células trofoblásticas gigantes. A localização do LP está de acordo com um trabalho realizado por Ravelich et al. (2004) que observou a presença do lactogênio placentário nas células trofoblásticas em bovinos derivados de inseminação artificial, fertilização *in vitro* e derivados de transferência nuclear de células somáticas da placenta bovina e com outro trabalho realizado por Carvalho et al. (2006) que localizou o PL exclusivamente em TGCs na placenta de bubalinos.

Ao se contar o número de células positivas corados pelo lactogênio placentário, pode-se observar que sua expressão diminuiu ao longo da gestação ($p < 0,05$) e foi ainda menor no grupo SCNT ($p < 0,05$). Ao se analisar clones machos e fêmeas separadamente, maior expressão nos clones machos ($p < 0,05$) e menor expressão nas fêmeas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Ao se analisar a expressão do RNAm, a expressão foi menor nos clones machos ($p < 0,05$). Em um estudo realizado por Ravelich et al. (2004b) que utilizou animais derivados de inseminação artificial, fertilização *in vitro* e clones, verificou que animais clonados apresentaram maior expressão do PL que os outros dois grupos aos dias 50, 100 e 150 da gestação. Segundo Patel et al. (1996) a maior expressão do lactogênio placentário no terceiro trimestre da gestação estaria associado ao maior crescimento fetal. Bertolini; Wallace; Anderson, 2006 e Ravelich et al. (2004b) verificaram que nos clones e em embriões derivados de fertilização o crescimento exponencial do feto ocorre com cerca de 220 dias. Em gestações a termo derivadas de fertilização *in vitro* houve maior concentração plasmática do lactogênio placentário e de frutose, com que estar associadas ao maior peso observado ao nascimento nestes animais (Bertolini et al., 2002; Bertolini et al., 2004) e também em bovinos clonados.

Segundo Byatt et al. (1992b) e Ravelich et al. (2004b) a detecção do lactogênio placentário é detectada na circulação somente após o contato de células trofoblásticas com o epitélio uterino. Essa observação pode estar associada a diferentes números de TGCs observadas na placenta de clones, como consequência da migração deste tipo celular que pode ser ineficiente nos clones (RAVELICH et al., 2004a; RAVELICH et al., 2004b). Uma vez que foi descrito que na metade da gestação a secreção do lactogênio placentário acontece principalmente na circulação fetal e tem como principal função promover o crescimento fetal, no período em que o crescimento fetal é exponencial (HANDWERGER, 1991), em bovinos não manipulados o crescimento fetal acontece durante os dias de forma exponencial no início e atinge seu platô entre 190 e 250 dias de gestação (FERREL, 1991; CONSTATNT et al., 2006). Já no final da gestação as ações metabólicas do lactogênio placentário na receptora e no feto têm como principal função a partição de nutrientes entre a receptora, feto e placenta, para que o feto possa receber quantidades adequadas de nutrientes (HANDWERGER, 1991). Apesar de a literatura ter descrito maior expressão desta proteína em clones (RAVELICH et al., 2004b); a alta expressão do lactogênio placentário foi observada em animais clonados aos 50, 100 e 150 dias de gestação e nosso estudo abordou placenta de animais a termo. Segundo Constant et al. (2006) diferentes protocolos de transferência nuclear de células somáticas, bem como diferentes doadores, pode resultar em diferentes achados na placenta bovina. Neste presente estudo foi observada diminuição da expressão do lactogênio placentário que pode estar relacionada com a inapropriada utilização de nutrientes o que pode comprometer a eficiência da SCNT e assim refletir a baixa taxa de natalidade de sobrevivência.

Para que o desenvolvimento de feto derivado de transferência nuclear aconteça com sucesso, o núcleo da célula deve ser reprogramado para que a expressão gênica possa acontecer normalmente, entretanto, a reprogramação nuclear exige remodelamento estrutural, o que pode favorecer alteração da atividade genômica, no entanto os mecanismos que regulam a reprogramação celular ainda não são totalmente compreendidos (CEZAR et al., 2003). A expressão gênica na placenta pode sofrer influência da metilação do DNA e inadequada reprogramação do DNA o que pode resultar na alteração da expressão gênica placentária (DINDOT et al.,

2004). Genes “imprinted” podem sofrer regulação pela metilação do DNA e sugere-se que a reprogramação epigenética incorreta pode favorecer fenótipos anormais, como por exemplo, a elevada expressão do IGF2 e alteração na expressão do receptor 2 de IGF podem estar associadas a algumas alterações placentárias (CEZAR et al., 2003) como a síndrome da placenta gigante sugerida por Constant et al., 2006 em animais clonados. A sinalização externa dos receptores de integrina, geralmente acontece por estímulo de seus ligantes presentes em diferentes concentrações, é tecido dependente e levam a ativação das mesmas, que passam a exercer sua função na adesão célula-célula, proliferação e migração celular (MIRANTI; BRUGGE, 2002; KIMMINS; LIM; MACLAREN, 2004). A maior expressão das subunidades de integrinas bem como a menor expressão das proteínas da ECM sugere que a sinalização externa possa estar de alguma forma comprometida na placenta bovina de animais clonados, por mecanismos ainda não conhecidos, mas de alguma forma relacionados a influência de genes associados ao cromossomo sexual ou imprinted. Um trabalho realizado por Paranace et al. (2007) descreveu que em bovinos clonados é comum observar bezerros que nascem com problemas como aumento dos vasos do umbigo, problemas respiratórios, demora na recuperação pós-parto e tendões flexores contraídos. As alterações na expressão de integrinas e proteínas da ECM observadas nos animais derivados de SCNT deste presente estudo podem estar associadas também com a sua expressão alterada no feto, o que pode contribuir para a menor taxa de sobrevivência observada na SCNT.

A literatura sugere que o maior crescimento da placenta e de fetos após a SCNT pode ser o resultado cumulativo da desregulação de vários genes imprinted, uma vez que o efeito de um único gene pode ser insuficiente para causar alterações no crescimento. Mesmo clones aparentemente normais podem ter sofrido alterações na expressão destes genes,, o que sugere que na clonagem existem mecanismos ainda desconhecidos que permitem erros substanciais de imprinting (HUMPHERYS et al., 2001). O presente trabalho aponta diferenças de expressão de todos os 9 genes estudados nos grupos de animais clonados em relação ao controle e ainda diferenças de expressão entre placentas de clones machos e fêmeas, o que indica regulação diferencial desta expressão gênica.

Este trabalho demonstrou que apesar da localização tecidual das integrinas e seus ligantes permanecerem inalteradas em placentas de termo de animais derivados de SCNT, sua expressão gênica e protéica variou, aumentando ou diminuindo, o que pode ter contribuído para fenótipos alterados descritos para placenta de animais SCNT. Mesmo tendo alcançado o final da gestação, a maioria dos animais clonados não sobreviveu. As proteínas estudadas, diretamente relacionadas à estrutura placentária, podem ter influenciado tanto a capacidade migratória das TGCs, como a adesão do compartimento fetal ao materno, a estrutura da árvore vilosa, o arranjo celular dentro do tecido, e consequentemente a capacidade de transporte de nutrientes deste órgão. Indicadores de funcionalidade placentária, como o antígeno Ki-67 e o lactogênio placentário, apresentaram-se alterados, corroborando para explicar as deficiências apontadas para placentas de animais clonados. Um padrão heterogêneo de expressão gênica e protéica foi observado entre as placentas derivadas de SCNT no caso dos fetos serem machos ou fêmeas, o que também contribui para o entendimento das alterações epigenéticas descritas para estes animais.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

1. Os anticorpos utilizados foram capazes de reconhecer com especificidade as proteínas pesquisadas na espécie bovina.
2. A técnica de clonagem (SCNT) não modifica a localização das proteínas estudadas no tecido placentário bovino.
3. A expressão dos genes das integrinas, das proteínas da matriz extracelular e das demais proteínas estudadas foi alterada pela técnica de SCNT, o que não necessariamente se refletiu em alteração da expressão protéica.
4. A funcionalidade da placenta de animais derivados de SCNT não está preservada completamente, mesmo com as gestações tendo chegado a termo.
5. As diferenças de expressão de integrinas e proteínas da matriz extracelular em animais clonados podem ser um dos motivos das diferenças estruturais relatadas para placentas bovinas de SCNT.
6. Mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação da expressão gênica das integrinas e demais proteínas estudadas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R.; CARTER, A. M.; CHAVATTE-PALMER, P.; DANTZER, V.; ENDERS, A. C.; FREYER, C.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Comparative placentation: a workshop report. **Placenta**, v. 24, p. S100-S103, 2003.
- AMENTA, P. S.; GAY, S.; VAHERI, A.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. The extracellular matrix is an integrated unit: ultrastructural localization of collagen I, III, IV, VI, fibronectin, and laminin in human term placenta. **Collagen and Related Research**, 6, 125–152, 1986.
- ANTHONY, R.V.; PRATT, S. L.; LIANG, R.; HOLLAND, M. D. Placental-fetal interactions: impact on fetal growth. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1861-1871, 1995.
- APLIN, J. D.; HAIGH, T.; JONES, C. J. P.; CHURCH, H. J.; VICOVAC, L. Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin $\alpha 5 \beta 1$. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 828– 838, 1999.
- APPARAO, K. B.; MURRAY, M. J.; FRITZ, M. A.; MEYER, W. R.; CHAMBERS, A. F.; TRUONG, P. R.; LESSEY, B. A. Osteopontin and its receptor $\alpha v \beta 3$ integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4991-5000, 2001.
- 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.
- ARNOLD, D. R.; BORDIGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproduction**, v. 132, p. 279-290, 2006.
- ARTONI, L. P. **FGF básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ARTONI, L. P.; MOURA, C. E. B.; BARBOSA JR, E. M.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T. V.; PAPA, P. C. Fator de crescimento fibroblástico básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.605-613, 2007.

BAI, S. X.; WANG, Y. L.; QIN, L.; XIAO, Z. J.; HERVA, R.; PIAO, Y. S. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy.

Reproduction, v. 129, n. 1, p. 103-113, 2005.

BARRAUD-LANGE, V.; NAUD-BARRIANT, N.; SAFFAR, L.; GATTEGNO, L.; DUCOT, B.; DRILLET, A. S.; BOMSEL, M.; WOLF, J. P.; ZIYYAT, A. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization.

BMC Developmental Biology, v. 12, n. 7, p. 102, 2007.

BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; ZAKHARTCHENKO, V.; MINTEN, M.; REICHENBACH, M.; REICHENBACH, H-D.; BLUM, H.; SPENCER, T. E.; WOLF, E. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, p. 5681-5686, 2009.

BECKA, S.; BILEK, J.; SLABA, J.; SKARDA, J.; MIKULAS, I. Some properties of the goat placental lactogen. **Experientia**, v. 33, p. 771-772, 1977.

BEHRENDTSEN, O.; WERB, Z. Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos. **Developmental Dynamics**, v. 208, n. 2, p.255-265, 1997.

BERRY, S. D.; HOWARD, R. D.; AKERS, R. M. Mammary localization and abundance of laminin, fibronectin, and collagen IV proteins in prepubertal heifers.

Journal of Dairy Sciences, v. 86, n. 9, p. 2864-2874, 2003.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 181-187, 2002.

BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; BEAM, S. W.; CARNEIRO, G. F.; SWEEN, M. L.; KOMINEK, D. J.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973-994, 2002.

BERTOLINI, M.; MOYER, A. L.; MASON, J. B.; BATCHELDER, C. A.; HOFFERT, K. A.; BERTOLINI, L. R.; CARNEIRO, G. F.; CARGILL, S. L.; FAMULA, T. R.; CALVERT, C. C.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 341-354, 2004.

BERTOLINI, M.; WALLACE, C. R.; ANDERSON, G. B. Expression profile and protein levels of placental products as indirect measures of placental function in in vitro-derived bovine pregnancies. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 163-173, 2006.

BJÖRKMAN, N. In: WILMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Textbook of Veterinary Histology**, Editora, Local, 1976. p. 351-369.

- BJÖRKMAN, N. H. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta Anatomica**, v.22, p. 1-91, 1954.
- BLAVIER, L.; HENRIET, P.; IMREN, S.; DECLERCK, Y. A. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. **Annals of the New York Academy**, v. 30, n. 878, p. 108-119, 1999.
- BOLANDER, F. F. J.; FELLOWS, R. E. Purification and characterization of bovine placental lactogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p.2703-2708, 1976.
- BOOS, A.; STELLJES, A. Immunohistochemical detection of collagen types I, III and IV in the bovine uterus during pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 174–175, 2000.
- BOOS; A.; JANSSEN; V.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v. 126, p. 469-480, 2003.
- BOSMAN, F. T Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. **Histochemistry Journal**, v. 25, p. 469–477, 1993.
- BOTELLA-LLUSIA, J. Integrins and reproduction. **Anales de La Real Academia Nacional de Medicina**, v. 118, n. 1, p. 173-185, 2001.
- BOWEN, J. A., BAZER, F. W., BURGHARDT, R. C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1098–1106, 1996.
- BOWEN, J. A.; HUNT, J. S. The role of integrins in reproduction. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 223, p. 331-343, 2000.
- BRAR, A. K; FRANK, G. R.; RICHARDS, R. G.; MEYER, A. J.; KESSLER, C. A.; CEDARS, M. I.; KLEIN, D. J.; HANDWERGER, S. Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**; v. 163, p. 30–7, 1995.
- BROOKS, P. C.; MONTGOMERY, A. M.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R. A.; HU, T.; KLIER, G.; CHERESH, D. A. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 30, n. 7, p. 1157-1164, 1994.
- BUTTLE, H. L.; FORSYTH, I. A.; KNAGGS, G. S. Plasma prolactin measured by radioimmunoassay and bioassay in pregnant and lactating goats and the occurrence of a placental lactogen. **Journal of Endocrinology**, v. 53, p. 483-491, 1972.

- 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 Animals Endocrinology**, v. 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**, v. 127, p. 1041-10419, 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 Sciences**, v. 70, n. 9, p. 2911-2923, 1992a.
- BYATT, J. C.; EPPARD, P. J.; VEENHUIZEN, J. J.; SORBET, R. H.; BUONOMO, F. C.; CURRAN, D. F.; COLLIER, R. J. Serum half-life and in-vivo actions of recombinant bovine placental lactogen in the dairy cow. **Journal of Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 185-193, 1992b.
- CARVALHO, A. F.; KLISCH, K.; MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T.; BEVILACQUA, E. Binucleate trophoblast giant cells in the water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta. **Journal of Morphology**, v. 267, n. 1, p. 50-56, 2006.
- CEZAR, G. G.; BARTOLOMEI, M. S.; FORSBERG, E. J.; FIRST, N. L.; BISHOP, M. D.; EILERTSEN, K. J. Genome-Wide Epigenetic Alterations in Cloned Bovine Fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1009-1014, 2003.
- CHAN, J. S. D.; ROBERTSON, H. A.; FRIESEN, H. G. The purification and characterization of ovine placental lactogen. **Endocrinology**, v. 98, p. 65-76, 1978.
- 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**, v. 66, p. 1596-1603, 2002.
- CHEN, C. P.; APLIN, J. D. Placental Extracellular Matrix: Gene Expression, Deposition by Placental Fibroblasts and the Effect of Oxygen. **Placenta**, v. 24, p. 316-325, 2003.
- CHIRCO, R.; LIU, X. W.; JUNG, K. K.; KIM, H. R. C. Novel functions of TIMPs in cell signaling. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 99-113, 2006.
- CHURCH, H. J.; RICHARDS, A. J.; APLIN, J. D. Laminins in decidua, placenta and choriocarcinoma cells. **Trophoblast Research**, v. 10, p. 143-162, 1997.

- CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken, **Science**, v. 268, p. 233-240, 1995.
- COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, v. 218, n. 2, p. 213-234, 2000.
- CONLEY, A.J.; MASON, J. I. Placental steroid hormones. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 249-72, 1990.
- CONSTANT, C.; COLOGNATO, H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 12, p. 678-686, 2004.
- CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HETMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 122-130, 2006.
- COOPER, H. M.; TAMURA, R. N.; QUARANTA, V. The major laminin receptor of mouse embryonic stem cell is a novel isoform of the $\alpha 6 \beta 1$ integrin. **Journal of Cell Biology**, v. 115, p. 843-850, 1991.
- COUTIFARIS, C.; OMIGBODUN, A.; COUKOS, G. Integrins, endometrial maturation & human embryo implantation. **Seminars on Reproduction and Endocrinology**, V.16, n. 3, p. 219-229 1998
- CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, p. 1508-1518, 1994.
- CROUCH, E.; SAGE, H.; BORNSTEIN, P. Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV procollagen contains two distinct chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 745-749, 1980. 1985
- CURRIE, W. B.; CARD, C. E.; MICHEL, F. J.; IGNOT, G. Purification, partial characterization and development of a specific radioimmunoassay for goat placental lactogen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 25-36, 1990.
- DAMSKY, C. H.; FITZGERALD, M. L.; FISHER, S. J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 1, p. 210-222, 1992.
- DAMSKY, C. H.; LIBRACH, C.; LIM, K. H.; FITZGERALD, M. L.; MCMASTER, M. T.; JANATPOUR, M.; ZHOU, Y.; LOGAN, S. K.; FISHER, S. J. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. **Development**, v. 120, p. 3657-3666, 1994.

- DINDOT, S. V.; FARIN, P. W.; FARIN, C. E.; ROMANO, J.; WALKER, S.; LONG, C.; PIEDRAHITA, J. A. Epigenetic and Genomic Imprinting Analysis in Nuclear Transfer Derived *Bos gaurus*/*Bos taurus* Hybrid Fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 470-478, 2004.
- EVAIN-BRION, D.; MALASSINE, A. Human placenta as an endocrine organ. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 13, p. S34-S37, 2003.
- FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science Supplement**, v. 82, p. E53-E62, 2004.
- FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Erros in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.
- FATA, J. E.; WERB, Z.; BISSELL, M. J. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 1-11, 2004.
- FAZLEABAS, A. T.; BELL, S. C.; FLEMING, S.; SUN, J.; LESSEY, B. A. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 348-356, 1997.
- FERRELL, C. L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow. I. Growth of the tissues of the gravid uterus. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1945-1953, 1991.
- FURUHASHI, N.; KIMURA, H.; NAGAE, H.; YAJIMA, A.; KIMURA, C.; SAITO, T. Serum collagen IV and laminin levels in preeclampsia. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 37, n. 4, p.250-3, 1994.
- GALLIANO, M.F.; ABERDAM, D.; AGUZZI, A.; ORTONNE, J. P.; MENEGUZZI, G. Cloning and complete primary structure of the mouse laminin alpha 3 chain. Distinct expression pattern of the laminin alpha 3A and alpha 3B chain isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 21820-21826, 1995.
- GARCIA, P.; NIETO, A.; SÁNCHEZ, M. A.; PIZARRO, M.; FLORES, J. M. Expression of alphav, alpha4, alpha5 and beta3 integrin subunits, fibronectin and vitronectin in goat peri-implantation. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 1-2, p. 91-100, 2004.
- GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, p. 13-20, 1983.

GERTLER, A.; DJIANE, J. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and in vivo studies. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 75, n. 3, p. 189-201, 2002.

GILMORE, A. P.; BURRIDGE, K. Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. **Structure**, v. 4, p. 647-651, 1996.

GLADSON, C. L.; CHERESH, D. A. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 1924-1932, 1991.

GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **European Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. 111-122, 1997.

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

GREEN, J.A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1624-1631, 2000.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HANDWERGER, S. Clinical counterpoint: the physiology of placental lactogen in human pregnancy. **Endocrinology Reviews**, v. 12, p. 329-336, 1991.

HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KIZAKI, K.; YAMADA, O.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O. V.; AKAGI, S.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, S.; KATSUMA, S.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TSUJIMOTO, G.; TODOROKI, J.; IZAIKE, Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. **Cloning Stem Cells**, v. 4, n. 3, p. 197-209, 2002.

HEMLER, M. E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 365-400, 1990.

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**, v. 63, n. 6, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; EDWARDS, J. F.; SAWYER, N.; BLACKWELL, C.; CIBELLI, J. B. Placental anomalies in a viable cloned calf. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2001.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, Springfield, v. 23, n. 1-2, p. 309-320, 2002.

HOGGARD, N.; HAGGARTY, P.; THOMAS, L.; LEA, R. G. Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 57-63, 2001.

HUANG, W.; MENG, Q.; SUZUKI, K.; NAGASE, H.; BREW, K. Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 35, p. 22086-22091, 1997.

HUMPHRICS, M. J.; NEWHAM, P. The structure of cell-adhesion molecules. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 78-83, 1998.

HUMPHRIES, M. F. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 632-640, 1996.

HUMPHREYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M. 3rd.; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, v. 293, n. 5527, p. 95-97, 2001.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549-554, 1987.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

ILLERA, M. J.; CULLINAN, E.; GUI, Y.; YUAN, L.; BEYLER, S. A.; LESSEY, B. A. Blockade of the $\alpha V\beta 3$ integrin adversely affects implantation in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 62, 1285-1290, 2000.

IVASKA, J.; HEINO, J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 1, p. 16-24, 2000.

JOHNSON, G.A.; BAZER, F. W.; JAEGER, L. A.; KA, H.; GARLOW, J. E.; PFARRER, C.; SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 820-828, 2001.

JONES, J. C.; HOPKINSON, S. B.; GOLDFINGER, L. Structure and assembly of hemidesmosomes. **Bioessays**, v. 20, p. 488–494, 1998.

KAYISLI, U A; KORGUN, E T; AKKOYUNLU, G; ARICI, A.; DEMIR, R. Expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 4$ and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 173 - 185, 2005.

KIM, H. R.; KANG, J. K.; YOON, J. T.; SEONG, H. H.; JUNG, J. K.; LEE, H. M.; SIK-PARK, C.; JIN, D. I. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer. **Proteomics**, v. 5, n. 16, p. 4264-4273, 2005.

KIM, H. R.; NARUSE, K.; LEE, H. R.; HAN, R. X.; PARK, C. S.; JIN, D. I. Abnormal Expression of TIMP-2, SOD, Vimentin and PAI Proteins in Cloned Bovine Placentae. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 714-717, 2009.

KIM, L. T.; YAMADA, K. M. The regulation of expression of integrin receptors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 214, p. 123-131, 1997.

KIMBER, S. J.; SPANSWICK, C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. **Seminars in Cell & Developmental Biology**; v. 11, p. 77–92, 2000.

KIMMINS, S.; LIM, H. C.; MACLAREN, L. A. Immunohistochemical localization of integrin $\alpha V\beta 3$ and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2:19, 2004.

KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Cyclic modulation of integrin expression in the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1267-1274, 1999.

KLEINMANN, H. K.; CANNON, F. B.; LAURIE, G. W. Biological activities of laminin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 27, p. 317-325, 1985.

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. **Anatomy and Embryology**, v. 200, n. 2, p. 229-237, 1999.

KORGUN, E. T.; CAYLI, S.; ASAR, M.; DEMIR, R. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. **Journal of Molecular Histology**, v. 38, p. 253–260, 2007.

KORHONEN, M.; VIRTANEN, I. Immunohistochemical localization of laminin and fibronectin isoforms in human placental villi. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, p. 313–322, 2001.

- LACERDA, P. M. O. **Aspéctos esteriológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LALA, P. K.; CHATTERJEE, H. S.; KEARNS, M.; MONTGOMERY, B.; COLAVICENZO, V. Immunobiology of the fetalmaternal interface. **Immunological Reviews**, v. 75, p. 87-116, 1983.
- LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRÈRE, E. TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 49, n. 3, p. 187-198, 2004.
- LANG, C. Y.; HALLACK, S.; LEISER, R.; PFARRER, C. Cytoskeletal filaments and associated proteins during restricted trophoblast invasion in bovine placentomes: light and transmission electron microscopy and RT-PCR. **Cell and Tissue Research**, v. 315, n. 3, p. 339-48, 2004.
- LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, n. 6, p. 289-296, 2001.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.
- LESSEY, B. A.; CASTELBAUM, A. J. Integrins and implantation in the human. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 3, p. 107-117, 2002.
- LESSEY, B. A.; CASTELBAUM, A. J.; BUCK, C.A.; LEI, Y.; YOWELL, C.W.; SUN, J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 497-506, 1994.
- LESSEY, B. A.; ILESANMI, A. O.; SUN, J.; LESSEY, M. A.; HARRIS, J.; CHWALISZ, K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implication for implantation, contraception and infertility. *American Journal of Reproduction and Immunology*, v. 35, p. 195- 204, 1996.
- LONGHURST, C. M.; JENNINGS, L. K. Integrin-mediated signal transduction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, n. 6, p. 514-526, 1998.
- MACINTYRE, D. M.; LIM, H. C.; RYAN, K.; KIMMINS, S.; SMALL, J. A.; MACLAREN, L. A. Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1430-1436, 2002.

MACLAREN LA, WILDEMAN AG. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin subunits in bovine trophoblast. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 1, p. 153-165, 1995.

MAILE, L. A.; IMAI, Y.; CLARKE, J. B.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factor I increases alpha V beta 3 affinity by increasing the amount of integrin-associated protein that is associated with non-raft domains of the cellular membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 3, p. 1800-1805, 2002.

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

MATSUZAKI, M.; SHIGA, K. Endocrine characteristics of cloned calves. **Cloning Stem Cells**, v. 4, p. 261-267, 2002.

MAYHEW, T. M.; BURTON, G. J. Sterology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. **Microscopic Research and Technology**, v. 38, p. 195-205, 1997.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F.T.V.; VISINTIN, J.A.; GARCIA, J.M.; MEIRELLES, F.V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C.E.; PAPA, P.C.; SANTOS, T.C.; CARVALHO, A.F.; LEISER, R.; CARTER, A.M. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.

MIRANTI, C. K.; BRUGGE, J. S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 4, p. E83-E90, 2002.

MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; COSO, O. A.; GUTKIND, J. S.; BURBELO, P. D.; AKIYAMA, S. K.; YAMADA, K. M. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. **Journal of Cell Biology**, v. 131, p. 791-805, 1995.

MIZUNO, K.; TANAKA, T.; UMESAKI, N.; OGITA, S. Inhibition of cAMP-mediated decidualization in human endometrial stromal cells by IL-1 β and laminin. **Hormone and Metabolic Research**, v. 31p. 307-10, 1999.

MORISHIMA, N. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. **Genes to Cells**, v. 4, p. 401-414, 1999.

MOSSMAN, H. M. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie Institute Contributions to Embryology**, v. 26, p. 129-246, 1937.

MURPHY, G.; HOUBRECHTS, A.; COCKETT, M. I.; WILLIAMSON, R. A.; O'SHEA, M.; DOCHERTY, A. J. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. **Biochemistry**, v. 30, n. 33, p.8097-8102, 1991.

MURTHY, G. S.; SCHELLENBERG, C.; FRIESEN, H. G. Purification and characterization of bovine placental lactogen. **Endocrinology**, v. 111, p. 2117-2124, 1982.

PANARACE, M.; AGÜERO, J. I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L.; GUTIÉRREZ, J.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, J.; GARNIL, C.; FORTE-PONTES, J. E.; ERENO-JUNIO, J. C.; MOWER, S.; MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 142-51, 2007.

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**, v. 13, p. 351-359, 1996.

PATEL, O. V.; YAMADA, O.; KISAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; IZAIKE, Y.; SCHUL, L. A.; TAKEZAWA, T.; HASHIZUME, K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1114-1120, 2004.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 1; n. 29, p. e45, 2001.

PFARRER, C. D. Characterization of the bovine placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix. **Methods in Molecular Medicine**, v.121, p. 323-335, 2006.

PFARRER, C.; HIRSCH, P.; GUILLOMOT, M.; LEISER, R. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. **Placenta**, v. 24, p. 588-597, 2003.

PING, X.; WANG, Y. I.; PIAO, Y. S.; BAI, S. X.; XIAO, Z. J.; JIA, Y. I. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 240-246, 2001.

PRIOR, R. L.; LASTER, D. B. Development of the bovine fetus. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 1546, 1979.

RATTNER, J. B. Integrating chromosome structure with function. **Chromosoma**, v. 101, n. 5-6, p. 259-264, 1992.

- RAVELICH, S. R.; BREIER, B. H.; REDDY, S.; KEELAN, J. A.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1, 2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 430-438, 2004a.
- RAVELICH, S. R.; SHELLING, A. N.; RAMACHANDRAN, A.; REDDY, S.; KEELAN, J. A.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S.; BREIER, B. H. Altered placental lactogen and leptin expression in placentomes from bovine nuclear transfer pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1862-1869, 2004b.
- RAVELICH, S. R.; SHELLING, A. N.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S. F.; RAMACHANDRAN, A.; KEELAN, J. A. Expression of TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 and the receptors TGF- β RI and TGF- β RII in placentomes of artificially inseminated and nuclear transfer derived bovine pregnancies. **Placenta**, v. 27, p. 307-316, 2006.
- REDDY, K. V. R.; MANGALE, S. S. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. **Tissue and Cell**, v. 35, p. 260-273, 2003.
- REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-Placental vascular development and placental functions. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1839-1851, 1995.
- RIBEIRO, A. A. C. M.; LACERDA, P. M. O.; MELO, M. P.; BALIEIRO, J. C. C.; SOUZA, R. R. Placental microstructure and efficiency in cloned bovines: a design-based stereological approach. **Cell and Tissue Research**, v. 333, p. 105-114, 2008.
- ROBERTS, R. M.; CROSS, J. C.; FARIN, C. E.; HANSEN, T. R.; KLEMMANN, S. W.; IMAKAWA, K. Interferons at the placental interface. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 41, p. 63-74. 1990.
- RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspective in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-497, 1987.
- SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 145-160, 2000.
- SCHNIEKE A.E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K. H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 19, n. 278, p. 2130-2133, 1997.
- SCHULTZ, R. M.; SILBERMAN, S.; PERSKY, B.; BAJKOWSKI, A. S.; CARMICHAEL, D. F. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. **Cancer Research**, v. 48, P.5539-5545, 1988.

SCHUPPAN, D.; SOMASUNDARAM, R.; DIETERICH, W.; EHNIS, T.; BAUER, M. The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 733, p. 87–102, 1994.

SMALL, J. V.; ROTTNER, K.; KAVERINA, I. Functional design in the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 54-60, 1999.

SMITH, J. W.; CHERESH, D. A. Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 4, p. 2168-2172, 1990.

SMYTH, S. S.; PATTERSON, C. Tiny dancers: the integrin-growth factor nexus in angiogenic signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 1, p. 17-21, 2002.

SOMANATH, P. R.; CIOCEA, A.; BYZOVA, T. V. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 53-64, 2009.

SOUZA, P. C.; KATZ, S. G. Coexpression of cytokeratin and vimentin in mice trophoblastic giant cells. **Tissue and Cell**, v. 33, n.1, p. 40-45, 2001.

STARBORG, M.; GELL, K.; BRUNDELL, E.; HÖÖG, C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 143-53, 1996.

SUTHERLAND, A. E.; CALARCO, P. G.; DAMSKY, C. H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. **Development**, v.119, p. 1175-1186, 1993.

TAKAGI, M.; YAMAMOTO, D.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Quantitative Analysis of Messenger RNA Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), Tissue Inhibitor-2 of Matrix Metalloproteinases (TIMP-2), and Steroidogenic Enzymes in Bovine Placentomes During Gestation and Postpartum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 801-807, 2007.

TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, M.; HAMANO, S.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. In vitro attachment of bovine hatched blastocysts on fibronectin is mediated by integrin in a RGD dependent manner. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 47-57, 2005.

TANAKA, S.; ODA, M.; TOYOSHIMA, Y.; WAKAYAMA, T.; TANAKA, M.; YOSHIDA, N.; HATTORI, N.; OHGANE, J.; YANAGIMACHI, R.; SHIOTA, K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 6, p. 1813-1821, 2001.

- TAVERNE, M. A. M.; BREUKELMAN, S. P.; PERÉNYL, Z.; DIELEMAN, S. J.; VOS, P. L. A. M.; JONKER, H. H.; RUIGH, L.; VAN-WAGTENDONK-DE-LEEuw, J. M.; BECKERS, J. F. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 42, p. 613-624, 2002.
- UEKITA, T.; YAMANOUCHI, K.; SATO, H.; TOJO, H.; SEIKI, M.; TACHI, C. Expression and localization of matrix metalloproteinases (MT1-MMP, MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) during synepitheliochorial placentation of goats (*Capra hircus*). **Placenta**, v. 25, n. 10, p. 810-819, 2004.
- VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, v. 305, p. 285-298, 2001.
- VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB Journal**, v. 5, n. 13, p.2814-2823, 1991.
- VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H. J.; SCHLINGEMANN, R. O.; BOEHMER, A. L.; VAN DRIEL, R.; BRAKENHOFF, G. J.; RAMAEKERS, F. C. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. **Journal of Cell Science**, v. 92, p. 123-130, 1989a.
- VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H. J.; VAN DRIEL, R.; BECK, J. L.; VAN DIERENDONCK, J. H.; BRAKENHOFF, G. J.; RAMAEKERS, F. C. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. **Journal of Cell Science**, v. 92, p. 531-40, 1989b.
- VOURI, K. Integrin signaling: Tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. **Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 191-1998.
- WALLACE, C. R. Concentration of bovine placental lactogen in dairy and beef cows across gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 67-70, 1993.
- WALTER, I.; BOOS, A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. **Placenta**, v. 22, n. 5, p. 473-83, 2001.
- WALTER, I.; SCHÖNKYPL, S. Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation. **Placenta**, v. 27, n. 2-3, p. 291-306, 2006.
- WARD, R. V.; HEMBRY, R. M.; REYNOLDS, J. J.; MURPHY, G. The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-

2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **Biochemistry Journal**, n. 278, p. 179-187, 1991.

WARREN, W. C.; LIANG, R.; KRIVI, G. G.; SIEGEL, N. R.; ANTHONY, R. V. Purification and structural characterization of ovine placental lactogen. **Journal of Endocrinology**, v. 126, n. 1, p.141-149, 1990.

WELLS, D.; MISICA, P.; TERVIT, H. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 996-1005, 1999.

WELSH, A.O.; ENDERS, A. C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. **American Journal of Anatomy**, v. 172, n. 1, p. 1-29, 1985.

WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Chorioallantoic placenta formation in the rat: I. Luminal epithelial cell death and extracellular matrix modifications in the mesometrial region of implantation chambers. **American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 4, p. 215-231, 1991.

WEWER, U. M.; DAMJANOV, A.; WEISS, J.; LIOTTA, L. A.; DAMJANOV, I. Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. **Differentiation**, v. 32, p. 49-58, 1986.

WILHELM, S. M.; COLLIER, I. E.; MARMER, B. L.; EISEN, A. Z.; GRANT, G. A.; GOLDBERG, G. I. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 29, p. 17213-17221, 1989.

WILLIAMS, W. F.; MARGOLIS, M. J.; MANSPEAKER, J. E.; DOUGLASS, L. W.; DAVIDSON, J. P. Peripartum change in the bovine placenta related to fetal membrane retention. **Theriogenology**, v. 28, p. 213-223, 1987.

WHITESIDE, E.J.; JACKSON, M. M.; HERINGTON, A. C.; EDWARDS, D. R.; HARVEY, M. B. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1331-1337, 2001.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. In: LAMMING, G. E. **Marshall's Physiology of Reproduction**, 4 ed, Chapman & Hall, Inglaterra, p. 235-460, 1994.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **Faseb Journal**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

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

WOODWARD, T. L.; MIENALTOWSKI, A. S.; MODI, R. R.; BENNETT, J. M.; HASLAM, S. Z. Fibronectin and the $\alpha 5 \beta 1$ integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland. **Endocrinology**, v. 142, p. 3214-3222, 2001.

YAMADA, T.; ISERMURA, M.; YAMAGUCHI, Y.; MUNAKATA, H.; HAYASHI, N.; KYOGOKU, M. Immunohistochemical localization of fibronectin in the human placentas at their different stages of maturation. **Histochemistry**, v. 86, p. 579-584, 1987.

YAMADA, O.; TODOROKI, J.; KIZAKI, K.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O. V.; SCHULER, L. A.; HASHIZUME, K. Expression of prolactin-related protein I at the fetomaternal interface during the implantation period in cows. **Reproduction**, v. 124, p. 427-437, 2002.

YANG, J. T.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. **Development**, v. 119, n. 4, p. 1093-1105, 1993.

YAO, N.; WAN, P. C.; HAO, Z. D.; GAO, F. F.; YANG, L.; CUI, M. S.; WU, Y.; LIU, J. H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S. M. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 132-139, 2009.

YOUNG, K. A.; TUMLINSON, B.; STOUFFER, R. L. ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. **Molecular and Human Reproduction**, v. 10, n. 8, p. 559-565, 2004.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155-163, 1998.

YU, C. C.; WOODS, A. L.; LEVISON, D. A. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. **Histochemistry Journal**, v. 24, n. 3, p. 121-31, 1992.

ZEILER, M. **In vitro expression von integrinen und extrazellulärer matrix in bovinen plazentazellen**. 2006. 139f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Justus-Liebig-Universität Gießen, Alemanha, 2006.

ZEILER, M.; LEISER, R.; JOHNSON, G. A.; TINNEBERG, H. R.; PFARRER, C. Development of an in vitro model for bovine placentation: a comparison of the in vivo and in vitro expression of integrins and components of extracellular matrix in bovine placental cells. **Cells Tissues Organs**, v. 186, p. 229-242, 2007.

ZHAO, R.; LIU, X. Q.; WU, X. P.; LIU, Y. F.; ZHANG, Z. Y.; YANG, G. Y.; GUO, S.; NIU, J.; WANG, J. Y.; XU, K. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances

gastric carcinoma invasiveness via integrin alpha(v)beta6. **Cancer Letters**, v. 4, p. no prelo, 2009.

ZHOU, Y.; DAMSKY, C. H.; CHIU, K.; ROBERTS, J. M.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 3, p. 950-960, 1993.

APÊNDICE A

Solução citrato 10mM

Para o preparo da solução citrato (Quadro 1) foram preparadas as soluções A e B. A solução citrato foi preparada adicionando-se 25 ml da solução B e 270 ml de água ultrapura e a solução B até que o pH 6,0 fosse atingido. Solução A: 2,1 g de ácido cítrico monohidratado (Merck, Alemanha) em 100 ml de água ultrapura. Solução B: 14,705 g de citrato de sódio dihidratado (Merck Alemanha) em 500 ml de água ultrapura.

Componentes	Quantidade
Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	2,1 g
Citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$)	14,705 g

Quadro 1 - Formulação da solução tampão citrato – Giessen - 2007

Solução tampão fosfato (PBS)

Os reagentes utilizados (Quadro 2) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2 (solução cinco vezes concentrada).

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	41,0 g
Fosfato de sódio dibásico dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	11,0 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	2,75 g

Quadro 2 - Formulação da solução tampão fosfato - São Paulo - 2009

Tampão de bloqueio

Os reagentes utilizados (Quadro 3) foram diluídos em 70 ml de água ultrapura. Esta solução foi preparada 2 horas antes de sua utilização.

Componentes	Quantidade
BSA (Soro albumina bovina)	1,0 g
Triton-X 100	21 µl

Quadro 3 - Formulação da solução tampão de bloqueio – Giessen - 2007

Tampão de lise Boehringer

Os reagentes utilizados (Quadro 4) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	Quantidade
Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ . ClH) pH 7,4	50 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	150 mM
Diclorotrifluoretano (NaF)	40 mM
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	5 mM
Ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA)	5 mM
Nomidet P40	1% (volume/volume)
Deoxicolato de sódio (DC)	0,1% (peso/volume)
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,1% (peso/volume)
Fluoreto de fenilmetalsulfonila (PMSF)	1 mM

Quadro 4 - Formulação da solução tampão de lise – Giessen - 2007

Tampão do gel de empacotamento

Os reagentes utilizados (Quadro 5) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	Quantidade
Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ · ClH) pH 6,8	500 mM
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,4% (peso/volume)

Quadro 5 - Formulação da solução tampão do gel de empacotamento – Giessen - 2007

Tampão do gel de separação

Os reagentes utilizados (Quadro 6) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	Quantidade
Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃) pH 8,8	1,5 M
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,4% (peso/volume)

Quadro 6 - Formulação da solução tampão do gel de separação - Giessen - 2007

Tampão Tris-Glicina (TG)

Os reagentes utilizados (Quadro 7) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e não ajustar o pH (solução dez vezes concentrada).

Componentes	Quantidade
Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$)	250 mM
Glicina ($C_2H_5NO_2$)	192 mM
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	10 ml

Quadro 7 - Formulação da solução tampão Tris-Glicina – Giessen - 2007

Tampão de eletroforese

Para o tampão de eletroforese foram misturados: 100 ml da solução dez vezes concentrada do tampão Tris-Glicina, 890 ml de água ultrapura e 10 ml de SDS.

Tampão de transferência com metanol

Foram misturados pouco antes do uso o tampão Tris-Glicina uma vez concentrado com 20% (volume/volume) de metanol e 0,037% de SDS, solução final de 1000 ml.

Solução Ponceau S

Os reagentes utilizados (Quadro 8) foram diluídos em 100 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	Quantidade
Ponceau S ($C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$)	2 g
Ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$)	30 g
Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado ($C_7H_6O_6S \cdot 2 H_2O$)	30 g

Quadro 8 - Formulação da solução Ponceau S – Giessen - 2007

Solução tampão Tris (TBS)

Os reagentes utilizados (Quadro 9) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,5 (solução dez vezes concentrada).

Componentes	Quantidade
Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$)	50 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	150 mM

Quadro 9 - Formulação da solução tampão tris – Giessen - 2007

Solução tampão Tris com Tween 20 (TBS-T)

Os reagentes utilizados (Quadro 10) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2 (solução cinco vezes concentrada).

Componentes	Quantidade
Tris-(hidroximetil)-aminometano - Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$)	50 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	150 mM
Polisorbato 20 (Tween 20)	0,05% (volume/volume)

Quadro 10 - Formulação da solução tampão tris com Tween 20 – Giessen – 2007

Gel de empacotamento

Os reagentes utilizados (Quadro 11) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	1 Gel	2 Géis	3 Géis	4 Géis
Água ultrapura	2,65 ml	5,35 ml	8,0 ml	10,7 ml
30% acril-bisacrilamida (ABA)	0,67 ml	1,34 ml	2,01 ml	2,68 ml
Tampão do gel de empacotamento	0,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	2,0 ml
Persulfato de amônio (APS)	0,04 ml	0,08 ml	0,12 ml	0,16 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamino (TEMED)	0,008 ml	0,016 ml	0,24 ml	0,032 ml
Bromophenol Blue (BFB)	0,05 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml

Quadro 11 - Formulação do gel de empacotamento – Giessen - 2007

Gel de separação 8%

Os reagentes utilizados (Quadro 12) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	1 Gel	2 Géis	3 Géis	4 Géis
Água ultrapura	3,45 ml	6,9 ml	10,55 ml	13,8 ml
30% acril-bisacrilamida (ABA)	1,95 ml	3,9 ml	5,55 ml	7,8 ml
Tampão do gel de separação	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	8,0 ml
Persulfato de amônio (APS)	0,075 ml	0,15 ml	0,025 ml	0,3 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamino (TEMED)	0,005 ml	0,010 ml	0,015ml	0,02ml

Quadro 12 - Formulação do gel de separação 8% - Giessen - 2007

Gel de separação 10%

Os reagentes utilizados (Quadro 13) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	1 Gel	2 Géis	3 Géis	4 Géis
Água ultrapura	3,0 ml	6,0 ml	9,0 ml	12,0 ml
30% acril-bisacrilamida (ABA)	2,5 ml	5,0 ml	7,5 ml	10,0 ml
Tampão do gel de separação	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	8,0 ml
Persulfato de amônio (APS)	0,075 ml	0,15 ml	0,225 ml	0,5 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamino (TEMED)	0,005 ml	0,01 ml	0,015 ml	0,02 ml

Quadro 13 - Formulação do gel de separação 10% - Giessen - 2007

Gel de separação 12%

Os reagentes utilizados (Quadro 14) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura e armazenados a 4°C.

Componentes	1 Gel	2 Géis	3 Géis	4 Géis
Água ultrapura	2,4 ml	4,8 ml	7,2 ml	9,6 ml
30% acril-bisacrilamida (ABA)	3,1 ml	6,2 ml	9,3 ml	12,4 ml
Tampão do gel de separação	2,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	8,0 ml
Persulfato de amônio (APS)	0,075 ml	0,15 ml	0,23 ml	0,3 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamino (TEMED)	0,005 ml	0,01 ml	0,015 ml	0,02 ml

Quadro 14 - Formulação do gel de separação 12% - Giessen - 2007

Tabela 7 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pela lamina

animais	média	desvio padrão
15-06	32,60	11,08
22-06	46,80	3,96
34-06	44,60	5,68
40-06	35,80	3,27
46-06	43,40	9,45
59-06	51,83	8,75
26-07	38,40	6,99
28-07	50,20	8,44
3.3	16,60	2,61
3.4	42,90	8,74
3.5	32,20	6,07
3.6	36,80	8,26
Indep	26,54	6,87
2.1	24,00	6,78
42	13,13	2,49

Tabela 8 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pelo TIMP-2

animais	média	desvio padrão
15-06	31,80	3,56
22-06	36,20	4,09
34-06	38,00	8,28
40-06	38,20	2,39
46-06	32,40	5,22
59-06	42,20	5,22
13-07	30,40	5,03
26-07	36,60	2,51
28-07	25,20	3,70
3.3	53,40	3,21
3.4	39,20	5,89
3.5	42,60	7,89
3.6	31,60	5,18
Indep	32,20	9,78
2.1	42,40	5,94
42	29,20	4,27

Tabela 9 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pelo Ki-67

animais	média	desvio padrão
90d	231,20	39,09
90d	212,80	26,87
90d	223,40	14,64
90d	203,20	17,96
90d	240,00	27,25
90d	203,40	24,87
270d	63,20	22,42
270d	58,80	8,04
Indep	39,60	10,81
3.4	110,80	11,41
3.5	57,80	5,67
3.6	40,80	13,31

Tabela 10 - Média por animal da contagem de TGCs coradas pelo Lactogênio placentário

animais	média	desvio padrão
15-06	16,00	4,18
22-06	31,60	1,30
34-06	31,60	6,27
40-06	17,80	1,79
46-06	25,00	6,32
59-06	22,60	2,07
13-07	18,80	2,17
26-07	23,00	4,42
28-07	23,40	5,81
30-07	25,40	5,03
70-07	21,60	2,19
235-05	25,40	4,83
20-07	21,20	1,79
Indep	16,00	1,73
2.1	13,20	3,42
42	9,00	1,58

Tabela 11 - Densitometria óptica da integrina $\beta 1$

$\beta 1$	D.O. bandas
90d	265772278
90d	184960169
90d	389564526
270d	362825502
270d	271731429
270d	313564151
270d	431198980
3.3	323351770
3.4	483403504
42	501908477
5.8	555508312

Tabela 12 - Densitometria óptica da integrina αV

AV	D.O. bandas
90d	90851603
90d	66405871
90d	124598399
270d	164031640
270d	152929018
270d	166697361
270d	154435472
3.3	155130314
3.4	100711164
42	106895552
5.8	100723711

Tabela 13 - Densitometria óptica da integrina $\beta 3$

$\beta 3$	D.O. bandas
90d	23659027
90d	12720884
90d	13663756
270d	25591730
270d	26898863
270d	24741422
270d	23688806
3.3	31173330
3.4	22296052
42	29712109
5.8	25419690

Tabela 14 - Densitometria óptica da laminina

Laminina	D.O. banda 1	D.O. banda 2	D.O. banda 3
90d	358043516	46876064	49198942
90d	538154433	45480897	52844841
90d	429768181	51531655	46284684
270d	470290121	45991261	55639985
270d	285813583	49933857	65347881
270d	256399489	48126676	56621892
270d	146406573	44437093	69718431
3.3	93753613	42719813	32920996
3.4	130621986	49998254	44780671
42	177939072	45159253	36300259
5.8	452162398	47047707	53793054

Tabela 15 - Densitometria óptica da β -actina

β -actina	D.O. bandas
90d	65518833
90d	65410624
90d	33821584
270d	79974955
270d	64737431
270d	79507667
270d	52485499
3.3	59697525
3.4	52412421
42	66258637
5.8	60863454

Tabela 16 - Densitometria óptica da vimentina

Vimentina	D.O. bandas
90d	100226596
90d	23983855
90d	22116733
270d	108176718
270d	84329151
270d	64342424
270d	41884514
3.3	94564214
3.4	38017876
42	68945610
5.8	15643673

Tabela 17 - Densitometria óptica do TIMP-2

TIMP-2	D.O. bandas
90d	136227217
90d	151287858
90d	143425476
270d	132525083
270d	121474054
270d	131918157
270d	142249705
3.3	76655973
3.4	35272444
42	9574586
5.8	7110931

Tabela 18 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\alpha 6$

	GAPDH			$\alpha 6$											
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	$\alpha 6$	GAPDH	ratio	log	log + 1
270 d	17,15	17,18	17,16	26,27	26,28	26,28	9,46375	9,11000	-7,70125	-16,81125	1,75456	3,47642	0,50470	-0,29696	0,70304
270 d	17,18	17,3	17,24	26,37	26,10	26,24	9,46375	8,99500	-7,77625	-16,77125	1,75222	3,51886	0,49795	-0,30281	0,69719
270 d	18,34	18,53	18,43	28,16	28,47	28,32	9,46375	9,88000	-8,97125	-18,85125	1,87844	4,26942	0,43998	-0,35657	0,64343
270 d	19,34	19,31	19,32	29,22	29,17	29,20	9,46375	9,87000	-9,86125	-19,73125	1,93455	4,93066	0,39235	-0,40633	0,59367
3,3	19,99	20,02	20,00	31,70	32,09	31,90	9,46375	11,89000	-10,54125	-22,43125	2,11736	5,50409	0,38469	-0,41489	0,58511
3,4	18,17	18,30	18,23	27,07	27,11	27,09	9,46375	8,85500	-8,77125	-17,62625	1,80304	4,13348	0,43620	-0,36031	0,63969
3,5	19,10	19,02	19,06	32,42	32,19	32,31	9,46375	13,24500	-9,59625	-22,84125	2,14659	4,72373	0,45443	-0,34254	0,65746
3,6	19,95	19,96	19,95	00,00	00,00	00,00	9,46375	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Penta	17,04	17,00	17,02	26,56	26,62	26,59	9,46375	9,57000	-7,55625	-17,12625	1,77314	3,39581	0,52216	-0,28220	0,71780
Bela	17,09	17,16	17,12	28,34	28,84	28,59	9,46375	11,46500	-7,66125	-19,12625	1,89580	3,45399	0,54887	-0,26053	0,73947
Indep	17,68	17,50	17,59	27,64	27,79	27,72	9,46375	10,12500	-8,12625	-18,25125	1,84113	3,72387	0,49441	-0,30591	0,69409
Morta	16,58	16,69	16,63	24,90	25,05	24,98	9,46375	8,34000	-7,17125	-15,51125	1,67992	3,19074	0,52650	-0,27860	0,72140

Tabela 19 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 1$

	GAPDH			$\beta 1$											
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	$\beta 1$	GAPDH	ratio	log	
270 d	17,15	17,18	17,17	23,49	23,71	23,60	6,3188	6,43500	-10,84625	-17,28125	152,03653	5,78251	26,29248	1,41983	
270 d	17,18	17,30	17,24	22,56	22,54	22,55	6,3188	5,31000	-10,92125	-16,23125	112,04021	5,85311	19,14201	1,28199	
270 d	18,34	18,53	18,44	24,80	24,64	24,72	6,3188	6,28500	-12,11625	-18,40125	210,55244	7,10156	29,64877	1,47201	
270 d	19,34	19,31	19,33	26,60	26,54	26,57	6,3188	7,24500	-13,00625	-20,25125	360,53143	8,20143	43,95956	1,64305	
3,3	19,99	20,02	20,01	30,84	30,79	30,82	6,3188	10,81000	-13,68625	-24,49625	1238,57151	9,15525	135,28537	2,13125	
3,4	18,17	18,30	18,24	24,63	24,60	24,62	6,3188	6,38000	-11,91625	-18,29625	204,22216	6,87544	29,70314	1,47280	
3,5	19,10	19,02	19,06	26,39	26,20	26,30	6,3188	7,23500	-12,74125	-19,97625	332,82915	7,85723	42,35961	1,62695	
3,6	19,95	19,96	19,96	29,46	29,69	29,58	6,3188	9,62000	-13,63625	-23,25625	863,68911	9,08149	95,10437	1,97820	
Penta	17,04	17,00	17,02	23,46	23,49	23,48	6,3188	6,45500	-10,70125	-17,15625	146,61059	5,64843	25,95598	1,41424	
Bela	17,09	17,16	17,13	26,05	25,99	26,02	6,3188	8,89500	-10,80625	-19,70125	307,25544	5,74521	53,48029	1,72819	
Indep	17,68	17,50	17,59	27,16	27,06	27,11	6,3188	9,52000	-11,27125	-20,79125	421,81699	6,19411	68,09964	1,83314	
Morta	16,58	16,69	16,64	24,06	24,07	24,07	6,3188	7,43000	-10,31625	-17,74625	174,04411	5,30733	32,79318	1,51578	

Tabela 20 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina αV

	GAPDH			αV										
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	αV	GAPDH	ratio	log
270d	20,94	20,49	20,72	28,45	28,47	28,46	8,18375	7,74500	-12,53125	-20,27625	8,91793	7,59475	1,17422	0,06975
270d	21,25	21,05	21,15	30,32	30,35	30,34	8,18375	9,18500	-12,96625	-22,15125	10,91786	8,14853	1,33986	0,12706
270d	21,39	21,35	21,37	29,00	28,88	28,94	8,18375	7,57000	-13,18625	-20,75625	9,39204	8,44379	1,11230	0,04622
270d	23,21	23,09	23,15	31,59	31,18	31,39	8,18375	8,23500	-14,96625	-23,20125	12,22776	11,26186	1,08577	0,03574
3.3	22,79	22,50	22,65	31,22	30,82	31,02	8,18375	8,37500	-14,46125	-22,83625	11,75549	10,37829	1,13270	0,05411
3.4	20,69	20,76	20,73	28,28	28,25	28,27	8,18375	7,54000	-12,54125	-20,08125	8,73223	7,60705	1,14791	0,05991
3.5	21,80	21,27	21,54	29,77	30,03	29,90	8,18375	8,36500	-13,35125	-21,71625	10,41720	8,67224	1,20121	0,07962
3.6	23,01	22,55	22,78	32,20	32,29	32,25	8,18375	9,46500	-14,59625	-24,06125	13,41688	10,60747	1,26485	0,10204
Penta	18,42	18,45	18,44	27,17	27,05	27,11	8,18375	8,67500	-10,25125	-18,92625	7,70895	5,25180	1,46787	0,16669
Bela	19,68	19,67	19,68	28,26	28,25	28,26	8,18375	8,58000	-11,49125	-20,07125	8,72281	6,41856	1,35900	0,13322
Indep	21,93	21,43	21,68	30,82	30,39	30,61	8,18375	8,92500	-13,49625	-22,42125	11,24065	8,87810	1,26611	0,10247
Morta	19,86	19,49	19,68	28,00	27,95	27,98	8,18375	8,30000	-11,49125	-19,79125	8,46319	6,41856	1,31855	0,12010

Tabela 21 - Expressão relativa do RNAm da subunidade de integrina $\beta 3$

	GAPDH			$\beta 3$										
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	$\beta 3$	GAPDH	ratio	log
270d	20,94	20,49	20,72	33,63	33,88	33,76	12,24375	13,04000	-8,47125	-21,51125	135,80866	3,93764	34,48986	1,53769
270d	21,25	21,05	21,15	32,58	32,11	32,35	12,24375	11,19500	-8,90625	-20,10125	98,42836	4,22475	23,29801	1,36732
270d	21,99	22,30	22,15	34,69	34,68	34,69	12,24375	12,54000	-9,90125	-22,44125	167,93481	4,96267	33,83959	1,52943
270d	23,21	23,09	23,15	35,40	35,30	35,35	12,24375	12,20000	-10,90625	-23,10625	195,46913	5,83892	33,47694	1,52475
3.3	22,79	22,50	22,65	35,34	34,82	35,08	12,24375	12,43500	-10,40125	-22,83625	183,78353	5,38082	34,15531	1,53346
3.4	20,69	20,76	20,73	28,85	28,67	28,76	12,24375	8,03500	-8,48125	-16,51625	43,41632	3,94402	11,00815	1,04171
3.5	21,80	21,27	21,54	31,98	31,53	31,76	12,24375	10,22000	-9,29125	-19,51125	86,02395	4,49628	19,13223	1,28177
3.6	23,01	22,55	22,78	35,57	34,89	35,23	12,24375	12,45000	-10,53625	-22,98625	190,18650	5,49964	34,58164	1,53885
Penta	18,42	18,45	18,44	31,94	32,30	32,12	12,24375	13,68500	-6,19125	-19,87625	93,49978	2,72289	34,33838	1,53578
Bela	19,68	19,67	19,68	35,40	34,59	35,00	12,24375	15,32000	-7,43125	-22,75125	180,25133	3,32782	54,16497	1,73372
Indep	21,93	21,43	21,68	36,47	36,22	36,35	12,24375	14,66500	-9,43625	-24,10125	245,32197	4,60301	53,29596	1,72669
Morta	19,86	19,49	19,68	32,49	32,63	32,56	12,24375	12,88500	-7,43125	-20,31625	103,38044	3,32782	31,06550	1,49228

Tabela 22 - Expressão relativa do RNAm do colágeno tipo IV

	GAPDH			Colágeno IV			calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	Colágeno IV	GAPDH	ratio	log
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct								
270 d	17,15	17,18	17,17	31,19	31,22	31,21	12,8225	14,04000	-4,34250	-18,38250	280,27542	2,01896	138,82171	2,14246
270 d	17,18	17,30	17,24	28,74	28,95	28,85	12,8225	11,60500	-4,41750	-16,02250	135,94298	2,04361	66,52107	1,82296
270 d	18,34	18,53	18,44	31,05	30,74	30,90	12,8225	12,46000	-5,61250	-18,07250	254,86446	2,47950	102,78850	2,01194
270 d	19,34	19,31	19,33	32,29	32,73	32,51	12,8225	13,18500	-6,50250	-19,68750	418,16009	2,86352	146,02984	2,16444
3,3	19,99	20,02	20,01	33,46	36,02	34,74	12,8225	14,73500	-7,18250	-21,91750	828,44110	3,19655	259,16728	2,41358
3,4	18,17	18,30	18,24	29,79	30,04	29,92	12,8225	11,68000	-5,41250	-17,09250	188,72293	2,40055	78,61638	1,89551
3,5	19,10	19,02	19,06	32,88	33,19	33,04	12,8225	13,97500	-6,23750	-20,21250	491,18495	2,74335	179,04592	2,25296
3,6	19,95	19,96	19,96	35,68	36,19	35,94	12,8225	15,98000	-7,13250	-23,11250	1195,01394	3,17080	376,88147	2,57620
Penta	17,04	17,00	17,02	28,05	28,01	28,03	12,8225	11,01000	-4,19750	-15,20750	105,88672	1,97215	53,69111	1,72990
Bela	17,09	17,16	17,13	31,22	31,49	31,36	12,8225	14,23000	-4,30250	-18,53250	293,46556	2,00594	146,29859	2,16524
Indep	17,68	17,50	17,59	32,26	31,93	32,10	12,8225	14,50500	-4,76750	-19,27250	368,20217	2,16267	170,25344	2,23110
Morta	16,58	16,69	16,64	28,44	28,69	28,57	12,8225	11,93000	-3,81250	-15,74250	124,76003	1,85305	67,32688	1,82819

Tabela 23 - Expressão relativa do RNAm da fibronectina

	GAPDH			Fibronectina											
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	Fibronec	GAPDH	ratio	log	log + 1
270 d	17,15	17,18	17,165	27,71	28,00	27,855	10,6063	10,69000	-6,55875	-17,24875	0,88526	2,88970	0,30635	-0,51378	0,48622
270 d	17,18	17,3	17,24	25,94	26,26	26,10	10,6063	8,86000	-6,63375	-15,49375	0,89630	2,92498	0,30643	-0,51367	0,48633
270 d	18,34	18,53	18,435	30,36	30,51	30,44	10,6063	12,00000	-7,82875	-19,82875	0,86926	3,54887	0,24494	-0,61094	0,38906
270 d	19,34	19,31	19,325	30,02	30,38	30,20	10,6063	10,87500	-8,71875	-19,59375	0,87071	4,09852	0,21244	-0,67275	0,32725
3,3	19,99	20,02	20,005	30,83	31,15	30,99	10,6063	10,98500	-9,39875	-20,38375	0,86586	4,57517	0,18925	-0,72296	0,27704
3,4	18,17	18,3	18,235	29,04	28,59	28,82	10,6063	10,58000	-7,62875	-18,20875	0,87927	3,43588	0,25591	-0,59191	0,40809
3,5	19,1	19,02	19,06	28,95	28,74	28,85	10,6063	9,78500	-8,45375	-18,23875	0,87908	3,92651	0,22388	-0,64998	0,35002
3,6	19,95	19,96	19,955	31,24	31,40	31,32	10,6063	11,36500	-9,34875	-20,71375	0,86384	4,53831	0,19034	-0,72046	0,27954
Penta	17,04	17	17,02	26,37	26,48	26,43	10,6063	9,40500	-6,41375	-15,81875	0,89425	2,82270	0,31680	-0,49921	0,50079
Bela	17,09	17,16	17,125	28,65	29,06	28,86	10,6063	11,73000	-6,51875	-18,24875	0,87902	2,87106	0,30617	-0,51404	0,48596
Indep	17,68	17,5	17,59	32,45	32,92	32,69	10,6063	15,09500	-6,98375	-22,07875	0,85555	3,09540	0,27640	-0,55847	0,44153
Morta	16,58	16,69	16,635	26,41	26,14	26,28	10,6063	9,64000	-6,02875	-15,66875	0,89519	2,65224	0,33752	-0,47170	0,52830

Tabela 24 - Expressão relativa do RNAm da laminina

	GAPDH		Laminina												
	Ct	Ct	M Ct	Ct	Ct	M Ct	calibrador	DCt	DCPref	DCPtarget	Laminina	GAPDH	ratio	log	log + 1
270 d	17,15	17,18	17,17	35,21	35,42	35,32	17,12875	18,15000	-0,03625	-18,18625	0,89333	1,00588	0,88810	-0,05154	0,94846
270 d	17,18	17,30	17,24	35,14	35,12	35,13	17,12875	17,89000	-0,11125	-18,00125	0,89435	1,01816	0,87840	-0,05631	0,94369
270 d	18,34	18,53	18,44	35,12	35,21	35,17	17,12875	16,73000	-1,30625	-18,03625	0,89416	1,23533	0,72382	-0,14037	0,85963
270 d	19,34	19,31	19,33	35,02	35,12	35,07	17,12875	15,74500	-2,19625	-17,94125	0,89468	1,42666	0,62712	-0,20265	0,79735
3,3	19,99	20,02	20,01	36,06	35,95	36,01	17,12875	16,00000	-2,87625	-18,87625	0,88951	1,59258	0,55853	-0,25295	0,74705
3,4	18,17	18,30	18,24	37,30	37,04	37,17	17,12875	18,93500	-1,10625	-20,04125	0,88311	1,19600	0,73838	-0,13172	0,86828
3,5	19,10	19,02	19,06	36,37	36,87	36,62	17,12875	17,56000	-1,93125	-19,49125	0,88612	1,36678	0,64833	-0,18821	0,81179
3,6	19,95	19,96	19,96	0,00	0,00	0,00	17,12875	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Penta	17,04	17,00	17,02	37,30	37,38	37,34	17,12875	20,32000	0,10875	-20,21125	0,88218	0,98256	0,89783	-0,04680	0,95320
Bela	17,09	17,16	17,13	0,00	0,00	0,00	17,12875	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Indep	17,68	17,50	17,59	35,39	35,57	35,48	17,12875	17,89000	-0,46125	-18,35125	0,89241	1,07748	0,82824	-0,08184	0,91816
Morta	16,58	16,69	16,64	32,19	32,40	32,30	17,12875	15,66000	0,49375	-15,16625	0,91022	0,92322	0,98591	-0,00616	0,99384

Tabela 25 - Resultados dos testes estatísticos para as subunidades de integrina

Integrina $\alpha 6$ - RNAm	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
270 x clones	0,440	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,0001	Sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,0001	Sig	nao parametrico
270d x clones M	0,104	Sig	nao parametrico
270d x clones F	0,005	Sig	nao parametrico
Integrina $\beta 1$ - densitometria optica	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,2860	n sig	parametrico
270 x clones	0,1020	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,0360	Sig	parametrico
clones M x clones F	0,0304	Sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,0120	Sig	paramétrico
270d x clones M	0,3560	n sig	parametrico
270d x clones F	0,0080	Sig	parametrico
Integrina $\beta 1$ - RNAm	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
270 x clones	0,0300	Sig	parametrico
clones M x clones F	0,1560	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0260	Sig	nao parametrico
270d x clones M	0,0136	Sig	nao parametrico
270d x clones F	0,0540	n sig	parametrico
Integrina αV - densitometria optica	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,0130	Sig	parametrico
270 x clones	0,1124	n sig	nao parametrico
90d x 270d x clones	0,0050	Sig	parametrico
clones M x clones F	1,0000	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,1160	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,3123	n sig	nao parametrico
270d x clones F	0,0304	Sig	nao parametrico
Integrina αV - RNAm	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
270 x clones	0,1090	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,0001	Sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0001	Sig	parametrico
270d x clones M	0,7870	Sig	parametrico
270d x clones F	0,0030	n sig	parametrico
Integrina $\beta 3$ - densitometria optica	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,0450	Sig	parametrico
270 x clones	0,4350	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,0080	Sig	parametrico
clones M x clones F	0,7850	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,6270	n sig	paramétrico
270d x clones M	0,6100	n sig	parametrico
270d x clones F	0,1740	n sig	parametrico
Integrina $\beta 3$ - RNAm	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
270 x clones	0,5635	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,0406	Sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,0800	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,7132	n sig	nao parametrico
270d x clones F	0,1036	n sig	nao parametrico

Tabela 26 - Resultados dos testes estatísticos para as proteínas da ECM e citoesqueleto

<u>β-actina - densitometria optica</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
90d x 270d	0,2110	n sig	parametrico
270 x clones	0,2620	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,2800	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,0350	Sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,1300	n sig	paramétrico
270d x clones M	0,1540	n sig	parametrico
270d x clones F	0,4680	n sig	parametrico
<u>Colágeno tipo IV - RNAm</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
270 x clones	0,4060	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,0340	Sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0300	Sig	parametrico
270d x clones M	0,0440	Sig	parametrico
270d x clones F	0,7132	n sig	nao parametrico
<u>Fibronectina - RNAm</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
270 x clones	0,7630	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,0001	Sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0020	Sig	nao parametrico
270d x clones M	0,0406	Sig	nao parametrico
270d x clones F	0,1036	n sig	nao parametrico
<u>Laminina - imuno - contagem de células</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
90d x 270d	0,5990	n sig	parametrico
270 x clones	0,0050	Sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,0020	Sig	paramétrico
clones M x clones F	0,0150	Sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0001	Sig	parametrico
270d x clones M	0,0080	Sig	parametrico
270d x clones F	0,0001	Sig	parametrico
<u>Laminina - densitometria optica (banda 1)</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
90d x 270d	0,1180	n sig	parametrico
270 x clones	0,5030	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,0870	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,0304	Sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,0250	Sig	nao paramétrico
270d x clones M	0,0800	n sig	parametrico
270d x clones F	0,8170	n sig	parametrico
<u>Laminina - densitometria optica (banda 2)</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
90d x 270d	0,6540	n sig	parametrico
270 x clones	0,6670	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,6670	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,9140	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,8740	n sig	paramétrico
270d x clones M	0,7680	n sig	parametrico
270d x clones F	0,4840	n sig	parametrico
<u>Laminina - densitometria optica (banda 3)</u>	<u>Valor do p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Tipo de teste</u>
90d x 270d	0,0430	Sig	parametrico
270 x clones	0,0190	Sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,0080	Sig	parametrico
clones M x clones F	0,3560	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,0080	Sig	paramétrico
270d x clones M	0,0050	Sig	parametrico
270d x clones F	0,0400	Sig	parametrico

Tabela 27 - Resultados dos testes estatísticos para a laminina e vimentina

Laminina - densitometria optica (bandas 1, 2 e 3)	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,7508	n sig	nao parametrico
270 x clones	0,1749	n sig	nao parametrico
90d x 270d x clones	0,3200	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,2602	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,1650	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,0885	n sig	nao parametrico
270d x clones F	0,3123	n sig	nao parametrico
Laminina - densitometria optica (bandas 1 e 2)	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,5635	n sig	nao parametrico
270 x clones	0,6365	n sig	nao parametrico
90d x 270d x clones	0,6330	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,4309	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,6130	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,4309	n sig	nao parametrico
270d x clones F	0,8748	n sig	nao parametrico
Laminina - densitometria optica (bandas 1 e 3)	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,7929	n sig	nao parametrico
270 x clones	0,2271	n sig	nao parametrico
90d x 270d x clones	0,4160	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,2271	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,1790	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,1036	n sig	nao parametrico
270d x clones F	0,4309	n sig	nao parametrico
Laminina - densitometria optica (bandas 2 e 3)	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,2701	n sig	nao parametrico
270 x clones	0,2271	n sig	nao parametrico
90d x 270d x clones	0,0640	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,2271	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,1790	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,0120	Sig	parametrico
270d x clones F	0,0470	Sig	parametrico
Laminina - RNAm	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
270 x clones	0,908	n sig	nao parametrico
clones M x clones F	0,001	n sig	nao parametrico
270d x clones M x clones F	0,0001	n sig	nao parametrico
270d x clones M	0,037	Sig	nao parametrico
270d x clones F	0,035	n sig	nao parametrico
Vimentina - densitometria optica	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0,3120	n sig	parametrico
270 x clones	0,4030	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0,5340	n sig	parametrico
clones M x clones F	0,3340	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0,3440	n sig	parametrico
270d x clones M	0,7140	n sig	parametrico
270d x clones F	0,1820	n sig	parametrico

Tabela 28 - Resultados dos testes estatísticos do TIMP-2, ki-67 e Lactogênio placentário

TIMP-2 - imuno - contagem de células	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.0250	Sig	parametrico
270 x clones	0.0580	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0.0590	n sig	parametrico
clones M x clones F	0.1599	n sig	nao
270d x clones M x clones F	0.0060	Sig	paramétrico
270d x clones M	0.0040	Sig	parametrico
270d x clones F	0.1900	n sig	parametrico
TIMP-2 - densitometria optica	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.0780	n sig	parametrico
270 x clones	0.0090	Sig	parametrico
90d x 270d x clones	0.0100	Sig	nao
clones M x clones F	0.0304	Sig	nao
270d x clones M x clones F	0.0070	Sig	nao
270d x clones M	0.0090	Sig	parametrico
270d x clones F	0.0304	Sig	parametrico
TIMP-2 expressão relativa do RNAm:	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.0260	Sig	parametrico
270 x clones	0.5610	n sig	parametrico
90d x 270d x clones	0.0850	n sig	parametrico
clones M x clones F	0.0122	Sig	nao
270d x clones M x clones F	0.0080	Sig	paramétrico
270d x clones M	0.0090	Sig	parametrico
270d x clones F	0.2760	n sig	parametrico
Ki-67 - imuno - contagem de células	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.0051	Sig	nao
270 x clones	0.3785	n sig	nao
90d x 270d x clones	0.0030	Sig	nao
clones M x clones F	0.0051	Sig	nao
270d x clones M x clones F	0.0030	Sig	nao
270d x clones M	0.3785	n sig	nao
270d x clones F	0.0051	Sig	nao
PL - imuno - contagem de células	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.6470	n sig	parametrico
270 x clones	0.0298	Sig	parametrico
90d x 270d x clones	0.0390	Sig	nao
clones M x clones F	0.0022	Sig	nao
270d x clones M x clones F	0.0001	Sig	nao
270d x clones M	0.0350	Sig	parametrico
270d x clones F	0.0022	Sig	nao
PL - expressão relativa do RNAm:	Valor do p	Resultado	Tipo de teste
90d x 270d	0.3230	n sig	parametrico
270 x clones	0.0760	Tend	parametrico
90d x 270d x clones	0.1510	n sig	nao
clones M x clones F	0.1370	n sig	parametrico
270d x clones M x clones F	0.0160	Sig	paramétrico
270d x clones M	0.0020	Sig	parametrico
270d x clones F	0.6761	n sig	nao