FELIPE CAMARGO BRAGA

Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados

São Paulo

2006

FELIPE CAMARGO BRAGA

Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados

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. Maria Angélica Miglino

Co-orientador:

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

São Paulo
2006

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.1813
FMVZ

Braga, Felipe Camargo
Apoptose em Placenta proveniente de Bovinos Clonados / Felipe Camargo
Braga. – São Paulo: F. C. Braga, 2006.
83 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Placenta. 2. Clonagem animal. 3. Apoptose. 4. BCL-2. 5. Bovinos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Felipe Camargo Braga

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 1023/2006, intitulado: "Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados", no qual foram utilizados 20 (vinte) amostras congeladas de placenta, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 01 de dezembro de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRAGA, Felipe Camargo

Título: Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados

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 aos meus pais,
Ricardo Silveira Braga e Sônia Maria Camargo Braga,
por todo investimento, formação e carinho.
Exemplos de caráter e sabedoria.
Somos todos a composição de nossos antepassados.

Ainda dedico às minhas irmãs,
Ana Maria, Mariana e Renata Camargo Braga
e minha bela namorada,
Thais Tessari Zampieri,
por todo carinho, amor, paciência e apoio,
ainda por sempre estar ao meu lado
incentivando e acreditando no meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

*À **Profa. Maria Angélica Miglino**, pela orientação desde a graduação e por acreditar e investir em meu crescimento profissional. Além de excelente cientista é excelente administradora, sempre preocupada em criar oportunidades aos seus alunos, como o EPG na Alemanha em 2003, sou eternamente grato.*

*Ao **Prof. Flávio Vieira Meirelles**, pela orientação desde a graduação, mais que um orientador, ele é um amigo, dando conselhos e responsável pela minha formação científica e espírito crítico. O prof. Flávio é excelente cientista e respeitado por todos.*

*À **CAPES e FAPESP**, por auxiliarem direta ou indiretamente para a realização desta Tese.*

*À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, me recebeu de braços abertos, onde criei uma nova família.*

*À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo**, onde desenvolvi todo meu projeto científico e sempre fui bem recebido.*

*Aos meus dois eternos amigos **Beatris Allécio** e **Kenji Teruya**, sempre prontos para ajudar em qualquer situação e interessados em meu trabalho.*

*Aos meus amigos de graduação **Ana Paula** (Nelore), **Flávio** (Pigarro), **Cláudio**, **André** (Simprão), **Patrícia** e ao quarteto fantástico **Fabiana**, **Jéssica** (Saxa), **Maria Augusta** e **Sabrina** (Pitomba). Outro agradecimento especial devo fazer a **Vanessa** (Fulana), **Patrícia** (Pisco) e **Caroline** (Febo) pelos 4 anos convivendo como irmãos.*

*À **Lilian Jesus de Oliveira** e **Janaina Munuera Monteiro**, sempre prontas para ajudar, também serão eternas amigas.*

*Aos amigos **Flavinha**, **Assis**, **Carlos Eduardo**, **Daniele**, **Tatiana**, **Adriana** e **Rafinha**, pelos anos de convivência.*

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, pela convivência, pelas horas dissecando peças no fundão, pelas discordâncias nas homogeneizações, a todos os momentos de convivência, com os quais aprendi tanto.

A todos os funcionários da graduação e pós-graduação da FMVZ – USP, que tanto me ajudaram.

*Aos **Prof. Pedro**, **Profa. Irvênia**, **Profa. Nancy**, **Prof. José Roberto**, **Prof Francisco**, **Prof. António** e **Profa Paula**, pelos ensinamentos e convivência.*

Ao **Maicon, Jaqueline e Cauê**, aos quais sempre recorremos nos momentos mais complicados.

A todo o pessoal do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, **Paula, Luis Gustavo, Edson, Silvia, Giovana, Marcos, Fernanda, Isabele, Lígia, Patrícia, Paulo, Pedro, Tiago, Fernando, Fabiana, Alexandre, Moyses, Kátia, Werusca e Sylvia**.

Ao casal **Paula e Luis Gustavo**, que sempre me ajudaram e socorreram nos momentos mais emergenciais.

As grandes amigas **Isabele, Lígia e Patrícia**, pela ajuda, pelos inúmeros momentos juntos, tardes de mussarela com salame, churrascos, pizzas e etc.

Aos amigos **Paulo, Pedro e Tiago**, pelos varios engradados de cerveja e transportes de estufas.

Aos amigos **Alexandre e Moyses**, posso dizer que são meus irmãos na pós-graduação.

À grande amiga **Fabiana Martini**, pronta a ajudar em todos os momentos, colega que se revelou muito especial.

À **Profa. Cláudia** e ao **Nilton**, sempre prontos a ajudar.

*À toda equipe do **VRA**, **VCM (Clínica de bovinos)** e **VPT**, envolvidos nos nascimentos dos clones em Tambaú.*

*Às amigas **Samira**, **Carla** e **Tania**, pelos agradáveis momentos.*

*Às bibliotecárias **Elza** e **Fátima**, que prontamente ajudaram nos momentos finais para conclusão desta Tese.*

Aos meus pais e irmãos sempre prontos a ajudarem, apoiarem, sempre torcendo e acreditando no meu trabalho e a toda minha família sempre curiosa com meus trabalhos.

*E a **Thais**, minha namorada, sempre pronta a ajudar, com coração enorme, uma menina ingênua que esconde uma mulher inteligente e sábia, uma menina jovem que esconde uma mulher madura, com sua sabedoria me ensinou a encarar as dificuldades de modo mais maduro.*

RESUMO

BRAGA, F. C. **Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados**. [Apoptosis in bovine cloned placenta]. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A produção comercial de bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática permitiu o desenvolvimento de novo modelo no estudo da placenta. A necessidade da cesariana para o nascimento do bezerro favorece a coleta das membranas fetais. Alterações como número total de placentônios, tamanho, formato, árvores vilosas, cordão umbilical, assim como alterações no recém nascido já foram mostradas anteriormente. Gestações produzidas por transferência de núcleo freqüentemente apresentam retenção de placenta. Durante a palpação retal após dois dias da cesariana notou-se placentônios sem diminuição no tamanho e sem alteração na consistência. A observação da ausência de regressão levaram à formulação da hipótese de placentônios provenientes de gestações produzidas por transferência de núcleo apresentam menor freqüência de apoptose quando comparados com placentônios provenientes de gestações produzidas por monta natural. Para testar essa hipótese 15 placentônios provenientes de clones e 3 placentônios provenientes de monta natural foram coletados e congelados em nitrogênio líquido. A extração de RNA foi realizada mediante protocolo Trizol (Invitrogen, Brasil) e a reação de transcriptase reversa feita com Kit Impron II (Promega, Brasil), usando 1µg de RNA

total. A quantificação relativa foi desenvolvida no “7500 Real Time PCR System” (Applied Biosystems, EUA), em reação de 25µL contendo 1X “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, EUA), 1µg de cDNA e 0,6µM de cada primer (BAX, BCL2, e GAPDH). Para a quantificação dos genes ITM2B e PI3K, também se utilizou o gene GAPDH como gene endógeno e reação contendo 1x “Taqman Universal Master Mix” (Applied Biosystems, EUA), 40ng de cDNA, 0,72µM de cada primers (ITM2B, PI3K e GAPDH) e 0,2µM de cada sonda. O programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) foi usado para o cálculo da eficiência individual de cada reação e para o cálculo estatístico usou-se o programa “REST2005” (PFAFFL et al., 2002). Os resultados mostraram que o gene BAX possui redução da expressão relativa no grupo transferência de núcleo ($P=0,04$), enquanto os genes BCL2, ITM2B e PI3K foram iguais entre grupo transferência de núcleo e monta natural. A relação BAX/BCL2 foi maior que 1 em 12 dos indivíduos analisados 12/15 (80%). Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparadas variáveis como sexo, sobrevivência e peso ao nascimento para todos os genes estudados. A redução da expressão do BAX no grupo transferência de núcleo sugere que a apoptose é menor neste grupo e a relação BAX/BCL2 indica que a redução na taxa de morte celular programada pode ser responsável pela redução na taxa de regressão dos placentônios.

Palavras-chave: Placenta. Clonagem animal. Apoptose. BCL-2. Bovinos.

ABSTRACT

BRAGA, F. C. **Apoptosis in bovine cloned placenta**. [Apoptose em placenta proveniente de bovinos clonados]. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciencias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The study of placenta from somatic cell nuclear transfer pregnancy originated a new model of study after the commercial production of bovine nuclear transfer clones, this technique requires caesarean section, that allows collection of fetal membranes. Alterations as differences in the placentomes total number, size, villous trees, umbilical cord and new born alterations were already described in NT placenta. These nuclear transfer gestations frequently have placental retention and during rectal palpation two days after caesarean section, we observed placentomes with normal characteristics as before section, suggesting an absence of receding. This information about the receding absence lead us to hypothesize that placentomes produced from nuclear transfer pregnancies show lower frequency of apoptosis thus produced from natural. For testing this hypothesis we collected 15 fragments of placentomes from nuclear transfer fetus and 3 of natural mating. The RNA extraction was performed with Trizol (Invitrogen, Brazil) protocol and the reverse transcriptase by Impon II (Promega, Brazil), using 1µg of total RNA. We performed the real time relative quantification technique in the “7500 SDS System” (Applied Biosystems, USA) to investigate the mRNA expression of BAX, BCL2 as apoptosis genes and GAPDH as endogenous gene, with concentrations of 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems,

USA), 1µg of cDNA and 0.6µM of each primer (BAX, BCL2, and GAPDH) in 25µL of total reaction. The ITM2b and PI3K as apoptosis genes and GAPDH as endogenous gene with concentrations of 1x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA), 40ng of cDNA, 0.72µM of primers (ITM2B, PI3K and GAPDH) and 0.2µM of each probe. The “LinRegPCR” software (RAMAKERS et al., 2003) was used for individual efficiency calculation and the “REST2005” (PFAFFL et al., 2002) software for statistical analysis, using the standard efficiency. The results show that BAX gene is down regulated in the nuclear transfer group ($P=0.04$), while the BCL2, ITM2B and PI3K are equal in nuclear transfer and natural mating groups. The relation BAX/BCL2 was greater than 1 in 12 nuclear transfer samples 12/15 (80%). No significant difference was found when evaluated variables such as survival, calf sex, birth weight for all studied genes. The lower expression of BAX gene in nuclear transfer groups suggests that apoptosis is lower in this group and the relation BAX/BCL2 is indicative that a lower rate of apoptosis may be responsible for the lower rate of placental recession.

Key words: Placenta. Nuclear Transfer. Apoptosis. BCL-2. Bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas.....61
- Figura 2 - Exemplo do “Software REST2005”, janela de “setup”, entrada de dados dos genes como nome, eficiência e CTs62
- Figura 3 - Exemplo do “Software REST2005”, janela de resultados62
- Figura 4 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de animais produzidos por monta natural (controle) em comparação com placentas de clones (BAX com $p=0,04$).....65
- Figura 5 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones que sobreviveram comparados com os que morreram66
- Figura 6 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com as fêmeas66
- Figura 7 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b, PI3K nas placentas dos clones com peso ao nascimento entre 35 e 42 kg comparados com clones com mais de 42 kg66
- Figura 8 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b, PI3K nas placentas dos clones com peso ao nascimento menor que 35 kg comparados com clones com peso entre 35 e 42 kg67

- Figura 9 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com as fêmeas que sobreviveram67
- Figura 10 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com clones fêmeas que não sobreviveram67
- Figura 11 - Fotomicrografia Imunohistoquímica FITC, 200x, em (A) placenta de animal proveniente de monta natural marcado para proteína BAX; (B) placenta de animal proveniente de monta natural marcado para proteína BCL-2; (C) placenta de clone marcado para proteína BAX; (D) placenta de clone marcado para proteína BCL-2; (E) controle negativo; (*) região materna; (VF) vilo fetal; (setas) células binucleadas69
- Figura 12 - Esquema das prováveis vias da ativação da apoptose na placenta durante o desenvolvimento e maturação na gestação de bovinos75
- Figura 13 - Organograma de eventos causa-efeito relacionando a reprogramação do genoma embrionário com as consequências na placentação e crescimento do feto devido as alterações nos níveis de apoptose na placenta. Os momentos em que o embrião, feto ou bezerro podem sofrer aborto ou morte estão indicados como balões de fundo vermelho com texto: Falha76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers e sondas utilizadas no experimento.....58

Tabela 2 - Taxas de estabelecimento de gestação (30d), mortalidade embrionária (30-60d), abortos (60d-nascimento), nascimentos, mortalidade pós-nascimentos e eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear para cada uma das linhas celulares utilizadas como fonte doadora de núcleo (*);ID = identificação; F = fêmea; M = macho; M.E. =mortalidade embrionária; nc/o = nascimento; morta/e = mortalidade (YAMAZAKI, 2006).....63

Tabela 3 - Dados dos clones bovinos nascidos vivos: identificação, sobrevivência neonatal, sexo e peso ao nascimento (kg) (YAMAZAKI, 2006).....64

Tabela 4 - Dados dos neonatos bovinos do grupo controle concebidos por monta natural: identificação, sexo e peso ao nascimento (kg) (YAMAZAKI, 2006).....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNCS	Transferência de Núcleo de Célula Somática
PIV	Produção <i>In Vitro</i>
MN	Monta Natural
RT-PCR	PCR em Tempo Real
IUGR	Crescimento Retardado Intra-Uterino
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
bPSPB	Proteínas Específicas da Prenhes B
PÁGS	Glicoproteínas Associadas à Prenhes
PSP60	Proteína Sérica da Gestação
LOS	Síndrome do Bezerro Grande
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
DED	Domínios Efetores de Morte
DISC	Complexos Sinalizadores de Indução de Morte
EGF	Fator de Crescimento de Epitélio
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	FORMAÇÃO, CRESCIMENTO E MORTE DA PLACENTA BONIVA	24
2.2	PARÂMETROS ENDÓCRINOS NO PERÍODO FINAL DE GESTAÇÃO	30
2.3	ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS E FETAIS	32
2.4	APOPTOSE	38
3	HIPÓTESES	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES, TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO	48
5.1.1	<i>Maturação in vitro</i>	49
5.1.2	<i>Fibroblastos</i>	49
5.1.3	<i>Seleção do 1º Corpúsculo Polar e Enucleação de oócitos em metáfase II</i>	50
5.1.4	<i>Reconstrução, Ativação e Cultivo in vitro</i>	51
5.1.5	<i>Transferência dos embriões</i>	52
5.1.6	<i>Diagnóstico de gestação e monitoramento da sobrevivência embrionária</i>	52
5.2	COLETA DE PLACENTÔNIOS E EXTRAÇÃO DE MRNA E PROTEÍNA	53
5.3	ESTIMATIVA DA PRESENÇA DE MRNA	55
5.4	IMUNOGISTOQUÍMICA	58
5.5	ANALISE ESTATÍSTICA	60

6	RESULTADOS	63
7	DISCUSSÃO	70
8	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

As primeiras tentativas de clonagem de uma célula diferenciada foram utilizadas para testar a hipótese sobre a diferenciação celular e o gradual perda da sua informação hereditária. Mais recentemente, a clonagem animal tem outros objetivos como a multiplicação de animais de alto valor genético, preservar espécies em extinção e servir de modelo experimental para estudo da reprogramação nuclear.

A técnica de transferência de núcleo de célula somática (TNCS), assim como outras técnicas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, apresentam baixas taxas de blastocisto e gestação, além de uma alta taxa de morte peri natal. Estes fatores já foram relacionados com uma reprogramação parcial do genoma embrionário levando a alterações na formação das membranas fetais.

A placenta, órgão responsável pela comunicação da mãe com o feto, apresenta grandes alterações nas gestações de clones. A formação, crescimento, remodelação e maturação da placenta é regulada pela apoptose, sendo esta importante para formação correta das criptas maternas e homeostase funcional.

A apoptose ou morte programada é a autodestruição celular e que está relacionada com a homeostase e na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos. Na placenta, ela serve para modular o crescimento do tecido materno e fetal, além de promover a regressão das criptas maternas momentos antes do parto. A regressão das criptas possui o objetivo de facilitar a liberação dos envoltórios fetais.

Na placenta, os genes da família BCL-2 são os que apresentam maior relação e importância para estabelecimento da apoptose. A maior proporção da proteína do BAX

em relação ao BCL-2, os quais estão presentes na membrana das mitocôndrias na forma de heterodímeros, determina a ocorrência da apoptose. Por sua vez, os genes ITM2b e PI3K são outros genes envolvidos na regulação da via da apoptose.

A diminuição na frequência da apoptose nesses tecidos durante a gestação poderá resultar em placentônios ineficientes e com tamanho aumentado. No final da gestação resulta em alterações como ausência de parto espontâneo e retenção de placenta.

Essas alterações são freqüentemente observadas em gestações de animais clonados e o estudo destas alterações possibilitará melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos do diálogo materno fetal. Baseado nesses fatos formula-se a hipótese de que a frequência de apoptose é menor na placenta de animais produzidos por TNCS quando comparados com animais produzidos por monta natural (MN).

Os objetivos deste trabalho foram de estimar a expressão do mRNA mediante da técnica de quantificação relativa em reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K na placenta de animais produzidos por MN e TNCS e ainda demonstrar a presença da proteína dos genes BAX, BCL-2 e Caspase-3 em tecido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As primeiras tentativas de clonagem de uma célula diferenciada foram utilizadas para testar a hipótese da teoria sobre a diferenciação celular criada por August Weissman em 1883, na qual o zigoto a cada divisão celular perderia parte da sua informação hereditária, sendo esta célula filha incapaz de produzir um indivíduo completo novamente (CAMPBELL et al., 2005).

A metodologia para testar esta hipótese de Weissman baseia-se em transferir o núcleo da célula filha em uma célula de zigoto previamente enucleada, esta nova célula por sua vez, segundo a hipótese verdadeira, não deveria ser capaz de produzir um indivíduo completo, caso a hipótese fosse negada, a nova célula seria capaz de produzir um indivíduo completo e saudável (CAMPBELL et al., 2005).

A primeira tentativa de transferência de núcleo com êxito ocorreu em 1952, onde a técnica foi desenvolvida em células de blástula de rãs e foi produzida por Robert Briggs e Thomas King, os quais introduziram a técnica da microcirurgia. Mesmo com o êxito de Briggs e King, a hipótese de Weissman só foi realmente negada com o experimento de John Gurdon em 1962 que produziu clones de rãs a partir de células intestinais. A história da clonagem animal é antiga e polêmica, mas alcançou seu ápice em 1997, com o nascimento da ovelha “Dolly”, clone produzido de células provenientes da glândula mamária de uma ovelha adulta, sob responsabilidade de Ian Wilmut (CAMPBELL et al., 2005).

A utilização comercial da técnica de transferência de núcleo de células somáticas para imortalizar animais com alto valor genético tornou-se viável na

agropecuária brasileira, no entanto os resultados desta técnica para produção de clones são muito ineficientes (CAMPBELL et al., 2005; SOLTER 2000; THIBAUT et al., 2003; WESTHUSIN et al., 2001). Altas taxas de perdas durante a gestação e mesmo após o nascimento têm sido observadas em diversas espécies clonadas devido a anormalidades fetais e placentárias (CHAVATTE-PALMER et al., 2004; HEYMAN et al., 2002a; WELLS et al., 2004). Além destas anormalidades, quando o feto atinge o final da gestação, a receptora não apresenta os sinais do parto, como amojó e dilatação de cérvix mesmo quando o feto já está apresentando sinais de sofrimento fetal, fazendo-se então necessária a cirurgia cesariana (HILL et al., 1999; WELLS et al., 1999). Por outro lado, a necessidade da cesariana possibilitou coletar grande quantidade de material para estudo como membranas fetais, placenta, sangue, líquido amniótico, útero e o próprio feto ou bezerro em caso de óbito.

Hoje em dia, relaciona-se a principal causa das baixas taxas na produção de embriões e gestação, incluindo altas taxas de aborto, mortalidade peri-natal e anormalidades do feto e da placenta, a falhas no processo de reprogramação nuclear do embrião. Os genes “imprinted”, caracterizados por apresentarem um padrão de expressão gênico diferenciado de seus alelos parentais, devem também ser corretamente reprogramados, pois estes mesmos genes exercem função essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento do feto, bem como da placenta (REIK et al., 2003).

2.1 FORMAÇÃO, CRESCIMENTO E MORTE DA PLACENTA BONIVA

A placenta é o órgão responsável pelo diálogo materno-fetal, ou seja, pelas trocas de nutrientes, excreção e respiração do feto durante o período de gestação. Além disso, a placenta possui a função de um órgão endócrino sendo responsável pela síntese de hormônios como a progesterona, estradiol e lactogênio placentário.

A formação da placenta se dá pelo alongamento do trofotoderma que se expande pelo útero em ambos cornos uterinos, se diferenciando em córion e alantóide, onde o córion quando se sobrepõe às carúnculas, regiões especializadas do endotélio uterino, ocorre a diferenciação do córion em cotilédone, e a fusão da carúncula com o cotilédone formará os placentônios, unidade funcional da placenta. Segundo Constant et al. (2006) em gestações produzidas por monta natural são encontradas carúnculas sem formação de placentônio em ambos cornos gravídico e não gravídico, durante todas as fases de gestação.

O processo de invasão do trofoblasto, renovação do tecido, remodelação das células do epitélio materno, crescimento, maturação e liberação dos envoltórios fetais são eventos modulados através da apoptose, ou morte celular programada (BOOS et al., 2003; CONSTANT et al., 2006). Em humanos, a invasão do trofoblasto, a remodelação das ateríolas em espirais, a transformação do trofoblasto e sua renovação e o parto também são modulados pela apoptose (FALCO et al., 2001; STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

Na placenta humana, foi demonstrado nos sítios de invasão do trofoblasto que ocorre maior apoptose no epitélio materno sugerindo que este processo facilite a

invasão do trofoblasto e a remodelação dos vilos endometriais, esta evidência foi comprovada pela expressão de receptores Fas no epitélio materno e Fas-ligand no trofotoderma, sugerindo a ativação parácrina da apoptose das células trofoblásticas sobre as células do epitélio materno (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A massa da placenta bovina ao final da gestação pode atingir aproximadamente 5 Kg. A carúnculas crescem durante a gestação enquanto os cotilédones cessam seu crescimento e podem até regredir além do 7º mês de gestação. Isso é baseado no crescimento reduzido dos cotilédones. O crescimento do placentônio apresenta a seguinte relação materno:fetal durante a gestação: 1:1 durante 1º ao 3º mês, 1,5-1,6:1 durante o 4º ao 7º mês e 1,8:1 durante o 8º e 9º mês de gestação (BOOS et al., 2003). O crescimento da placenta apresenta comportamento sinusóide, apresentando crescimento significativo entre 70 a 190 dias de gestação (LAVEN; PETERS 2001).

Apoptose em células das criptas do epitélio materno e em menor proporção em epitélio do trofoblasto é detectada durante toda a gestação refletindo a renovação normal e a necessidade da apoptose para hemostasia da placenta. Próximo ao final da gestação, a maturação da placenta é iniciada. A maturação da placenta é caracterizada pelas alterações histológicas no epitélio das criptas maternas. A altura e número destas células diminuem, achatam e alargam estabelecendo maior contato com as células do epitélio do trofoblasto, ainda há o aumento da proporção de tecido conectivo materno (BOOS et al., 2003).

Em humanos, padrões crescentes de apoptose na placenta durante a gestação também foi observada e relacionada à constante renovação e remodelação tecidual como um processo natural (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). Diferentes receptores como Fas, Fas-L, TNF-R1, TNF- α , TRAIL-R1 e TRAIL são expressos em

padrões específicos e crescentes durante a gestação e podem contribuir para o aumento da apoptose no trofoblasto até o final da gestação.

A maturação da placenta pela regressão das células da cripta do epitélio materno resulta no afinamento e desnudamento das criptas e também diminuem a distância entre o sangue materno e fetal, mecanismo que a placenta encontra para atender à crescente demanda do feto nos últimos meses de gestação. Supõe-se que a maturação da placenta é responsável em parte pela liberação dos anexos fetais (BOOS et al., 2003).

Boos et al. (2003) utilizaram a técnica de imunohistoquímica com anticorpo monoclonal contra a proteína Ki-67, proteína responsável pela proliferação celular, e a técnica de “TUNEL”, que cora células com DNA fragmentado, para avaliar a frequência de apoptose. Relatam também em seus resultados que a proliferação celular decresce enquanto a apoptose aumenta durante a gestação, de modo inversamente proporcional. O tecido materno apresenta maior capacidade de crescimento quando comparado com o tecido fetal. Porém, o crescimento do tecido conjuntivo e vascular também contribui para o aumento da massa total da placenta, sendo que o aumento do tecido conjuntivo é dado pela produção de fibras e não pela divisão celular.

Boos et al. (2003) relatam ainda que a apoptose é um processo que leva de minutos a horas e uma vez terminado, o corpo apoptótico resultante é rapidamente fagocitado pelos macrófagos presentes nos placentônios. Straszewski-Chavez et al. (2005) relatam que em humanos o processo de apoptose também ocorre com a rápida fagocitose dos corpos apoptóticos, e que este é importante para a modulação da invasão do trofoblasto e modelação das artérias em espirais.

Em humanos os macrófagos encontram-se em toda área da placenta, enquanto em camundongos encontram-se especificamente na área de implantação. No final do primeiro trimestre, em humanos, os macrófagos encontram-se no estroma ao redor trofoblato extraviloso enquanto esse invade e transforma as artérias espiraladas. A função desses macrófagos é de auxiliar no remodelamento do estroma para melhor acomodar o crescimento do trofoblasto e evitar a liberação de fatores celulares, como hormônios e citocinas, que podem causar dano ao tecido e rejeição do feto (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A maturação placentária é um processo mediado pela apoptose das células das criptas do epitélio materno e o processo de apoptose ocorre durante toda a gestação. Ainda deve ser levado em consideração que o período que uma célula leva para passar por todas as fases da apoptose variam de minutos a horas (BOOS et al., 2003).

O processo de maturação deverá levar mais tempo do que um efeito produzido pela indução do parto ou expulsão do feto, logo, em animais com indução do parto, não existe tempo suficiente para a alteração das secreções de esteróides pelo ovário e placenta e conseqüentemente sem aumentar suficientemente os níveis de apoptose no epitélio das criptas maternas, então a ausência da regressão dessas células leva à ocorrência da retenção das membranas fetais (BOOS et al., 2003).

Em humanos, tanto o excesso como a falta na quantidade de células apoptóticas na placenta também está relacionada com enfermidades como pré-eclâmpsia e crescimento intra-uterino retardado (IUGR) (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A ausência de maturação placentária é demonstrada pela ausência de células apoptóticas, manutenção do epitélio das criptas maternas e evidência de alta

proliferação celular através da marcação da proteína Ki-67, sendo significativamente relacionado com retenção das membranas fetais (BOOS et al., 2003).

Os corpos apoptóticos formados durante a gestação de bovinos são em grande parte fagocitados por macrófagos presentes no parênquima das carúnculas. Os macrófagos estão presentes no parênquima das carúnculas durante toda a gestação, sendo encontrados no septo principal e secundários. A partir do 6º ao 7º mês de gestação, o número de macrófagos aumenta até atingir a quantidade da hora do parto (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

A função destes macrófagos parece ser de digerir e modelar os componentes do estroma materno com objetivo de manter o tamanho e formato de cada carúncula. Esse processo ocorre durante toda a gestação e, finalmente, diminuindo a fixação do tecido fetal no materno ao final da gestação para liberação das membranas fetais após o parto. Mesmo após o parto, grande atividade fagocitária dos macrófagos é observada (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

Analisando todas informações, sugere-se que a transição entre o primeiro para o segundo trimestre de gestação é crucial para todas as espécies, devido às grandes mudanças nesse período. Em humanos, a formação das arteríolas espiraladas e a dissolução dos “plugs” luminiais de trofoblasto ocorre no final do 1º trimestre.

Os fatores de crescimento são proteínas com a propriedade de estimular a proliferação, maturação e diferenciação celular, através da ligação com receptores específicos nas membranas das células, por meio endócrino, parácrino ou autócrino.

O fator de crescimento similar com a insulina tipo 2 “Insulin-like Growth Factor 2” (Igf2) desempenha importante função na diferenciação celular, e desenvolvimento do

embrião (REIK; WALTER, 2001) no crescimento fetal (CHIARA et al., 1999; EFSTRATIADIS, 1998) e desenvolvimento da placenta (CONSTANCIA et al., 2002).

O efeito protetor dos fatores de crescimento como de outras moléculas já foi discutido por Raff (1992), onde ele levanta a teoria de que as células tendem a morrer e sua morte é evitada através do efeito parácrino de sinais produzidos por outras células, sendo um mecanismo dose dependente. Sendo assim, no nosso modelo da placenta, tanto as células maternas como as fetais, cresceriam de maneira dose dependente de fatores de crescimento necessários para mantê-las vivas. As células de maior proliferação, mas sem estímulo suficiente entrariam em apoptose. Esse mecanismo é um modo simples de controlar a proliferação celular, e promove a seleção natural (células com maior quantidade de receptores para os fatores de crescimento). Por outro lado, esta teoria da seleção natural explica a progressão de tumores encontrados em outros tecidos.

Dindot et al. (2004) demonstrou que o gene IGF-2 apresenta “genomic imprinting” paterno, em contraste ao achado em camundongo, onde o IGF-2 apresenta expressão bialélica.

O “genomic imprinting” é caracterizado por uma expressão gênica diferencial dos alelos parentais, determinadas por modificações epigenéticas nas bases nucleotídicas ou na cromatina sem que ocorram alterações na seqüência do DNA. O “genomic imprinting” introduz variáveis na genética clássica mendeliana uma vez que regiões de cromossomos homólogos não apresentam equivalência funcional. Embora tanto o alelo materno como paterno estejam presentes, um pode estar funcionalmente ativo enquanto que o outro silenciado ou inativo.

Os efeitos dos fatores de crescimento foram demonstrados por Sferruzi-Perri (2006), Onde o tratamento com IGF-2 aumentou o peso da placenta e dos fetos após 16,5 dias gestação, enquanto o “Knock-out” do IGF-2 causou a redução de 25% no peso da placenta e 40% no peso do feto aos 16,5 dias de gestação. O gene IGF-1, no entanto, não apresenta efeito na placenta, mas o tratamento aumenta o peso do feto e seu “Knock-out” reduz o peso do feto, sugerindo que o IGF-1 possui efeito na eficiência da placenta enquanto o IGF-2 apresenta efeito proliferativo e adaptativo.

2.2 PARÂMETROS ENDÓCRINOS NO PERÍODO FINAL DE GESTAÇÃO

O corpo lúteo, a placenta e as glândulas adrenais maternas são os órgãos com maior importância na produção de hormônios durante a gestação, sendo a progesterona um dos principais hormônios. A progesterona encontra-se alta durante toda a gestação e já foi observada diminuição de seus níveis momentos antes de abortos (KINDAHL et al., 2002).

O sulfato de estrona mantém-se em baixos níveis durante a gestação, apresentando aumento normal a partir do 100º dia de gestação. O aumento anormal foi observado em casos de luteólise. A partir do 210º dia de gestação, os níveis de sulfato de estrona estão diretamente relacionado com o peso do bezerro ao nascimento, ao peso dos cotilédones, com as membranas intercotiledonárias, ao peso total da placenta e à viabilidade do feto (KINDAHL et al., 2002). Os receptores para estrógeno estão

expressos no epitélio da cripta materna, mas não no epitélio coriônico fetal (BOOS et al., 2003).

Os níveis de sulfato de estrona também já foram relacionados com a eficiência do diálogo materno-fetal e à viabilidade da placenta. A produção insuficiente de sulfato de estrona é relacionada a distocias em gado de leite, retenção de membranas fetais, e envolvido com o processo de maturação da placenta (BOOS et al., 2003; KINDAHL et al., 2002; SHAH et al., 2006).

Ao término da gestação, a inversão nos níveis de progesterona e sulfato de estrona é essencial, para isso deve ocorrer a luteólise pré-parto, essa luteólise é mediada pelo aumento de prostaglandina (KINDAHL et al., 2002).

Shah et al. (2006) em seu trabalho sugere que o sulfato de estrona mantém-se baixo durante o período próximo ao parto. Com o aumento do cortisol no plasma induz a produção de citocromo P450_{c17} na placenta, possibilitando o aumento da síntese de sulfato de estradiol ao custo da síntese de progesterona.

Os níveis de cortisol aumentam momentos antes do parto e se mantêm mesmo após o parto. Sendo assim, é possível que o cortisol exerça pelo menos duas funções, deve exercer efeito de “feedback” negativo sobre a prostaglandina e participar do estresse influenciado pelo processo de parto (KINDAHL et al., 2002).

Proteínas secretadas pelas células binucleadas trofoblásticas como as proteínas específicas da prenhez B “pregnancy-specific protein B (bPSPB) e glicoproteínas associadas a prenhes “pregnancy associated glycoproteins” (PÁGS) apresentam níveis crescentes durante a gestação com elevado aumento a partir de 10 dias antes do parto. O níveis destas proteínas podem refletir o bem estar do feto

(KINDAHL et al., 2002), assim como a PSP60, conforme descrito posteriormente neste capítulo.

Shah et al. (2006) avaliou os níveis de sulfato de estrona e estradiol-17 β no plasma materno e sua relação com o momento do parto. Apesar de não haver diferença significativa nos dias precedentes ao parto, este mostraram aumento acentuado no dia anterior do parto, e demonstrando a importância do estrógeno na maturação placentária.

2.3 ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS E FETAIS

A clonagem animal tem grande número de registro de tentativas, com baixas taxas de desenvolvimento a blastocisto e gestação, e altas taxas de abortos e mortes peri-natais (CAMPBELL et al., 2005; HILL et al., 1999; HILL et al., 2000; KUIP et al., 1997; PACE et al., 2002; WELLS et al., 1999). As alterações nos envoltórios fetais como descolamento prematuro da placenta, molas, hidroâmnion, hidroalantóides, edema em placenta e cordão umbilical, placentônios aumentados e em menor número foram freqüentemente observados nas gestações de clones. Nos bezerros foram observados: imaturidade pulmonar, aspiração de mecônio, defeitos cardíacos congênitos, estreitamento da traquéia, aplasia de timo e síndrome do bezerro grande LOS (CONSTANT et al., 2006; FARIN et al., 2006; HEYMAN et al., 2002; HIENDLEDER et al., 2004; HILL et al., 1999; KUIP et al., 1997; PACE et al., 2002; SOUZA et al., 2001; YOUNG et al., 1998).

De todas as alterações descritas em gestações de clones, os mais citados são o peso aumentado da placenta e do bezerro ao nascimento. Diferentes trabalhos mostram que tanto o peso da placenta como do bezerro em gestações de clones são iguais ao de animais produzidos por MN e inseminação artificial até o terço final de gestação, quando ocorre o aumento no tecido placentário e peso do feto (CONSTANT et al., 2006; PACE et al., 2002).

Constant et al. (2006) não relaciona o aumento no peso da placenta dependente do peso aumentado do bezerro, para gestações de clones até 220 dias, e sim relaciona o aumento de peso do bezerro dependente ao aumento do peso da placenta, ou melhor, sugerindo que o aumento da placenta ocorre de modo compensatório e não apresenta origem no peso do feto, como no modelo descrito em ovelhas, após remoção cirúrgica de placentônios.

Farin et al. (2006) sugere que o peso aumentado do feto ao final da gestação se da pelo efeito compensatório da placenta que após o terceiro mês de gestação cresce mais que o normal na tentativa de compensar a ineficiência, dando condições para o feto crescer, e acarretando na síndrome do bezerro grande.

Os resultados de Constant et al. (2006) mostram que o número de placentônios antes de 220 dias de gestação é menor nos clones comparados com o grupo controle, mas a média do peso dos placentônios foi maior nos clones. O peso dos fetos não foi significativamente diferente entre os dois grupos e a relação “peso fetal”/”peso total da placenta” foi igual entre o controle e os animais clonados, sugerindo que o aumento da placenta até 220 dias de gestação ocorre devido ao efeito compensatório.

Entretanto, após 220 dias o número de placentônios foi igual entre o grupo controle e o clonado, mas a média de peso dos placentônios, o peso total da placenta,

o peso do feto foram maiores no grupo clonado comparado com o grupo controle e a relação “peso fetal”/“peso total da placenta” foi menor no grupo clonado, sugerindo que o aumento da placenta não ocorre devido somente ao efeito compensatório (CONSTANT et al., 2006).

Heyman et al. (2002) demonstraram que embriões produzidos por TNCS que apresentaram placentônios aumentados e altos níveis de proteína sérica da prenhez “pregnancy serum protein” (PSP60) até 50 dias de gestação estavam altamente relacionados com síndrome do bezerro grande “large offspring syndrome” (LOS) e hidroalantóide e abortaram em seguida. Estes autores ainda sugerem que os níveis séricos maternos de PSP60 podem ser um bom indicador de desenvolvimento anormal da placenta.

A PSP60 é uma proteína secretada pelas células binucleadas fetais e encontrada na circulação materna, sendo boa indicadora da função placentária. As gestações de animais produzidos por TNCS apresentam maior número de células binucleadas quando comparadas com gestações in vivo (HEYMAN et al., 2002). O aumento da PSP60 e a maior concentração de células binucleadas sugerem elevada atividade placentária (HEYMAN et al., 2002), o que pode ser indicativo do efeito compensatório na placenta de animais produzidos por TNCS, reforçando a hipótese do desenvolvimento anormal em relação ao efeito compensatório.

Outra característica das gestações de clones é o longo período de gestação e a ausência de sinalização do parto, inclusive a ausência do desenvolvimento da glândula mamária, ambas relacionadas com alterações de placenta. Estas observações são sugestivas de uma falha na comunicação materno-fetal (SOUSA et al., 2001; WELLS et al., 1999).

Um problema no eixo hipotalâmico pituitário adrenal, pode afetar a produção de cortisol fetal. Tal alteração não é deletéria para a viabilidade do feto, mas não induz a atividade das enzimas esteroidogênicas na placenta e, portanto retarda o aumento de estrógeno materno. Finalmente, como mencionando anteriormente, a elevação do estrógeno materno é o responsável pela cascata de eventos que levam ao parto (WELLS et al., 1999).

Loi et al. (2006) relacionam 8 das 12 mortes pós-natais de clones ovinos com alterações placentárias como extensiva degeneração placentária (5 dos 8 animais), acentuada redução na vascularização, particularmente no ápice do vilo e diferente dos animais normais. Células binucleadas e multinucleadas estavam ausentes no processo viloso dos placentônios provenientes dos animais clonados. Sousa (2001) e Loi et al. (2006) também relatam a relação de inadequada vascularização placentária com o crescimento retardado de clones.

As gestações com estresse oxidativo na placenta levam à glicólise anaeróbica e à produção de lactato (LOI et al., 2006; SOUSA et al., 2001). A elevação do lactato no plasma fetal atrai osmoticamente mais água da circulação materna para a fetal ocasionando hidroânio. O estresse oxidativo também mostrou importância na restrição do crescimento fetal, e já foi relacionado com o desenvolvimento anômalo do pulmão em ovelhas e humanos (SOUSA et al., 2001).

De modo semelhante, Hill et al. (1999) relacionaram a morte de 2 bezerros e 2 fetos apresentando problemas cardiopulmonares com edema de placenta, onde a necrópsia revelou elevada pressão do sistema venoso, provavelmente desenvolvida no útero. Well et al. (1999) relacionaram o hidroalantóide como consequência do reduzido número de placentônios, levando à disfunção placentária e ocorrendo em conjunto com

edema das membranas fetais, aumento dos vasos do cordão umbilical e placentônios aumentados.

Na maior parte dos trabalhos, além das alterações placentárias e fetais, a cirurgia cesariana é necessária, e a retenção das membranas fetais ocorre em todas gestações provenientes de animais produzidos por TNCS (HILL et al., 1999; WELLS et al., 1999).

A retenção das membranas fetais é um grande problema na ginecologia bovina, causando problemas reprodutivos e aumentando o custo de produção. A morfologia dos placentônios provenientes de retenção de membranas fetais pode estar associada à maturação insuficiente, ou seja, redução insuficiente no número de células do epitélio das criptas maternas durante o período do pré-parto (BOOS et al., 2003).

Como citado anteriormente, gestações contendo enfermidades apresentam disfunção na frequência de apoptose nas células da placenta. Em humanos, a expressão da proteína BCL-2 apresentou-se menor e até ausente em gestações que apresentaram pré-eclâmpsia e IUGR, sugerindo maior chance de ocorrer apoptose nessas gestações. Outra evidência é o aumento na expressão do p53, uma proteína supressora de crescimento que ativa genes pró-apoptóticos como BAX, nas placentas de IUGR (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). O aumento na frequência da apoptose no sinciotrofoblasto e citotrofoblasto em gestações apresentando enfermidades também é relatado por Liu et al. (2003).

Straszewski-Chavez et al. (2005) relata que o aumento da frequência de apoptose nas placentas apresentando pré-eclâmpsia e IUGR podem ter origem no estresse oxidativo o qual é causado pela hipóxia. A apoptose também foi evidenciada

em cultura de células de citotrofoblasto humano de primeiro trimestre que foram submetidas o estresse oxidativo em cultura (HU et al., 2006).

Liu et al. (2003), utilizaram a técnica de TUNEL para avaliar apoptose em placenta de coelhas tratadas ou não com IFN- γ , e anticorpos monoclonais contra BAX, BCL-2 e caspase-3 para imunohistoquímica e “western blotting”. Esses autores demonstraram que a apoptose ocorre na gestação controle, como citado em humano, e resulta em afinamento do trofoblasto que é importante para da difusão passiva, sendo uma resposta adaptativa positiva.

Os resultados de Liu et al. (2003) são semelhantes ao de Falco et al. (2001) onde a expressão de BCL-2 encontra-se baixa durante toda a gestação e a expressão de BAX encontra-se mais alta, e ambas aumentam durante o decorrer da gestação. A expressão das duas proteínas BAX e BCL-2 individualmente não apresentaram diferença entre o grupo tratado e controle, mas a relação BAX:BCL-2 apresentou diferença, sugerindo que a relação entre as duas proteínas é importante para a determinação da apoptose. (LIU et al., 2003).

Liu et al. (2003) relataram ainda que a caspase-3 localizou-se no sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto mostrando aumento da sua marcação ao decorrer da gestação e está mais expresso no grupo tratado com IFN- γ do que no controle.

Assim como a disfunção na frequência de apoptose pode gerar distocias, aborto e retenção de placenta, a diminuição ou ausência da atividade digestiva dos macrófagos presentes no estroma materno pode estar relacionada com a ausência de regressão das estruturas da carúncula que se mantêm intactas impedindo o descolamento do cotilédone (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

Miyoshi e Sawamukai (2004) também observaram menor atividade dos macrófagos em placentas provenientes de gestações em que ocorreram retenção das membranas fetais, sugerindo ser mais uma causa da retenção do que consequência, uma vez que isto foi observado antes do parto (MIYOSHI et al., 2002).

Na diabetes em humanos, a hiperglicemia estimula a expressão de p53 enquanto inibe a expressão de transportadores de glicose, ativando a via mitocondrial da apoptose. Ainda, o estresse oxidativo causado pela privação de glucose ativa a expressão de BAX e a subsequente ativação da caspase e progresso da apoptose, na placenta de pacientes diabéticas (SGARBOSA et al., 2006).

2.4 APOPTOSE

Apoptose ou morte celular programada é o processo ativo pelo qual células desnecessárias ou disfuncionais são eliminadas com o objetivo de manter a função normal do tecido. Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser induzida por duas vias: intrínseca, pela via da mitocôndria, ou extrínseca, pela via de receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) ou por resposta a um estímulo externo como uma citocina. Os principais executores da apoptose são as caspases, proteases que induzem poros na membrana celular das mitocôndrias, e liberação do citocromo-c, um fator indutor de apoptose (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

Diferentes proteínas agem regulando a ativação ou inibição da apoptose como as moléculas da família BCL-2, sendo que as três estudadas neste trabalho a BAX,

ITM2B e BCL-2, as proteínas BAX e BCL-2 possuem a propriedade de formar poros na membrana celular da mitocôndria. Os poros, pH dependentes, produzidos pelo BAX e BCL-2 apresentam características distintas, onde o BAX, proteína proapoptótica, permite a passagem passiva de íons, pequenas moléculas e do citocromo-c, enquanto o BCL-2 não permite a passagem passiva (ANTONSSON et al., 1997; FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

As proteínas de BAX e BCL-2 encontram-se na mesma orientação na membrana da mitocôndria, mas elas podem dimerizar mesmo em orientações opostas. O homodimerização do BAX parece ser favorecido em relação a heterodimerização com BCL-2 (OLTVAI et al., 1993).

A super expressão de BAX em células IL-3 dependentes não alterou a viabilidade e ciclo celular, sugerindo que a super expressão de BAX não é o suficiente para induzir a célula a apoptose, mas sim acelera o processo de morte naqueles tecidos que já estão destinados à apoptose (OLTVAI et al., 1993).

O mecanismo de regulação do metabolismo celular por dímeros de proteínas semelhantes como o BAX-BCL2, já foi observado em outras famílias de genes como na família Myc, onde a proporção dos homodímeros e heterodímeros das proteínas desta família vão regular a transcrição final do complexo Myc-Max (OLTVAI et al., 1993).

O excesso de proteína BAX formará complexos com BCL-2 inibindo sua função protetora, enquanto a formação de homodímeros de BAX forma poros suficientes na membrana da mitocôndria para que ocorra a liberação do citocromo-c e fatores indutores de apoptose para o citosol (LIU et al., 2003).

A ativação extrínseca da apoptose ocorre pela ativação de receptores de TNF que apresentam uma região C-terminal conhecida como domínio da morte. A interação

entre molécula e seu receptor da morte ligado à membrana resulta na ativação dos trímeros de receptores pré-associados à morte. Para transferir os sinais apoptóticos, os receptores de morte TNF possuem domínios intracelulares, os quais mediam ligações proteína-proteína com outros domínios da morte de proteínas adaptadoras contendo domínios de morte Fas-associados e TNF-R-associados. Após a ligação do FADD a cauda citoplasmática desses receptores de morte, diretamente pelo TNF-R1 ou indiretamente pelo TNF-R-associado ao receptor de morte, outras proteínas celulares são recrutadas incluindo a pró-caspase-8 e a pró-caspase-10 através de domínios efetores de morte (DED) para formar os complexos sinalizadores de indução de morte (DISC). Este é o ponto onde as vias convergem. Uma vez que o DISC é convocado, “iniciadores” da caspase-8 e caspase-10 podem se tornar ativados, mas o mecanismo não é completamente conhecido. As caspase-8 e caspase-10, uma vez ativadas, afetam a cascata da apoptose iniciados pelos receptores de morte TNF e por ativar efetores das caspase-3, caspase-6 e caspase-7, eventualmente terminam na morte da célula (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A ativação da via intrínseca, diferente da via extrínseca, é iniciada pela ou diretamente na mitocôndria. Em resposta ao estresse celular como dano no DNA ou privação de fatores de crescimento, a via mitocondrial pode ser ativada pela p53, uma proteína supressora de tumoração que ativa membros pró-apoptóticos da família BCL-2. Ambas as vias não são necessariamente independentes, uma vez que o p53 pode regular a expressão de certos receptores de morte e a via mitocondrial pode agir como amplificador da ativação de algumas vias ativadas pelos receptores de morte, sugerindo que a intercomunicação entre as duas vias pode ocorrer (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A ativação de membros pro-apoptóticos da família BCL-2 como o BAX e o BAK aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e levam à liberação de citocromo-c e outros fatores pró-apoptóticos. Como resultado, o citocromo-c se liga a proteína adaptadora ao fator de ativação de protease apoptótica, junto com ATP e dATP, e em seguida recrutam e ativam a caspase-9, formando uma macromolécula chamada “apoptosomo”. Análogo ao DISC na via extrínseca, o apoptosomo serve como complexo ativador para caspase-9 na via intrínseca. Após o recrutamento, a caspase-9 dimeriza com o apoptosomo, de modo similar ao DISC com as caspases-8 e 10, e a caspase-9 ativada irá ativar os efetores da caspase-3, caspase-6 e caspase-7, este é o ponto onde as via intrínseca e extrínseca convergem (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A caspase-3, caspase-6 e caspase-7 ativadas clivarão uma variedade de proteínas vitais, incluindo enzimas reparadoras do DNA e proteínas do citoesqueleto, o que pode explicar as características das células apoptóticas como condensação nuclear, bolhas na membrana e retração celular. Há a liberação da deoxyribonuclease caspase ativada que corta o DNA inespecificamente em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases e terminando o ciclo da apoptose (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

Raff (1992) descreve a teoria da regulação do crescimento celular com suicídio como padrão, onde todas as células de um tecido tendem naturalmente a ativar a cascata da apoptose, assim as células com maior número de receptores para os fatores de crescimento para aquele tecido específico e na presença desses fatores de crescimento iriam sobreviver. Este tipo de regulação do crescimento celular serve como um fator de seleção natural daquelas células específicas daquele tecido e ainda mais,

um selecionador das células mais adaptadas às doses de fatores de crescimento presentes neste tecido específico. Por outro lado, este tipo de regulação possibilita a formação de células tumorais, uma vez que existindo falha na cascata da apoptose de uma célula específica e não natural de um tecido específico, esta célula não seria selecionada e cresceria livremente.

Sabe-se hoje em dia que a maior proporção de Th2 em relação a Th1 é essencial para que ocorra gestação. A apoptose pode ser regulada por citocinas como as Th1 e Th2, onde as citocinas Th1, pró-inflamatórias como as TNF- α e IFN- γ , podem induzir a apoptose por estimular a expressão de XAF1 ou Fas em células do citotrofoblasto, por ativar a caspase-3. Em contraste, tratamento com IL-10, uma citocina Th2 anti-inflamatória, pode inibir o efeito pró-apoptótico da TNF- α e IFN- γ , por aumentar a expressão de FLIP nas células do trofoblasto (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

Outros fatores de crescimento, como EGF, mostraram-se capazes de bloquear os estímulos da apoptose incluindo do TNF- α e IFN- γ . Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual isso acontece, mas sabe-se que no tratamento com EGF, o TNF- α e IFN- γ não alteram a expressão de BCL-2 nas células do trofoblasto. O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e IGF-I mostraram-se capazes de proteger o trofoblasto do efeito do TNF- α e IFN- γ (STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

A BCL-2, outra proteína da família BCL-2, contém um domínio BH3 dos membros da família BCL-2, que dá a propriedade desta proteína se associar à membrana da mitocôndria e induzir a perda do potencial de membrana possibilitando a liberação do citocromo-c e conseqüentemente resultando na apoptose. Sua atividade

está relacionada à ativação das caspase-9 e caspase-3 (FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

Não foi observada a translocação do p53 para a mitocôndria em células que expressaram a proteína ITM2B, confirmando que a ITM2B ativa a via da apoptose por mecanismo p53-independente, sugerindo que a ITM2B é um regulador da apoptose p53-independente (FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

Em ratos, observou-se o aumento da atividade da caspase-9 enquanto houve diminuição da expressão da proteína BCL-2 e manutenção dos níveis da proteína BAX, sugerindo que há aumento da ativação na via mitocondrial da apoptose e que esta se relaciona com a regressão da decídua durante o período de gestação (CORREIA-DA-SILVA et al., 2005).

Yuan et al. (2006) estudou o efeito de inibidores dos genes iNOS e Cox-2 na frequência da apoptose em células do trofoblasto a termo de humano, e sugeriu que as espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico aumentam a expressão dos genes iNOS e Cox-2 que por sua vez estimulam a produção das proteínas BAX e BAK no citosol, e são transportadas para a membrana mitocondrial induzindo apoptose. A regulação dos genes iNOS e Cox-2 são estimulados por citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que estimulam seus receptores. Yuan et al. (2006) sugerem que o estresse oxidativo aumenta a frequência da apoptose no trofoblasto sendo um dos mecanismos de ruptura e liberação das membranas fetais no final da gestação

A apoptose já foi estudada especificamente nas células binucleadas trofoblásticas, sendo descrita uma isoforma da proteína BCL-2 chamada de BCL-2A1. Sua expressão, específica da célula binucleada, aumenta até o meio da gestação apresentando diminuição na sua expressão até o final. Este padrão de expressão

também é observado no lactogênio placentário, também produzido pelas células binucleadas durante a gestação. A diminuição do número de células binucleadas mortas reduz ao decorrer gestação e esse resultado concorda com o observado pelo BCL-2Ai. BAX também é expresso pelas células binucleadas com pico no meio da gestação e a relação BAX/BCL-2A1 deve estar diretamente relacionado ao controle populacional dessas células (USHIZAWA et al., 2006).

Em camundongos, foi demonstrado a ocorrência de apoptose no epitélio uterino com a presença de receptores para TNF- α , TNF-R1, e caspase-3 ativa, enquanto no tecido decidual também houve ocorrência de apoptose com a expressão de genes como o BAX e BCL-2, mas sem a presença dos receptores para TNF- α e TNF-R1, sugerindo que a placenta pode induzir apoptose por uma via independente dos receptores de morte, sendo possível ocorrer a apoptose pelas duas vias (JOSWIG et al., 2003).

Em sua tese, Benetone (2005) demonstrou a proliferação e apoptose em placenta de bufalinos, através de imunohistoquímica contra caspase-3 ativada, marcador de morte celular M30, antígeno nuclear para proliferação celular (PCNA) e pela técnica de TUNEL. Este autor, relata menor frequência de marcação para caspase-3 ativa no tecido mesenquimal fetal quando comparado com o estroma materno. Ainda, relata maior marcação para apoptose nas placentas provenientes de 9 a 10 meses de gestação comparados com placentas provenientes de 2 a 5 meses de gestação.

Benetone (2005) através da marcação de PCNA nas placentas provenientes de diferentes meses de gestação relata redução da marcação no decorrer da gestação. E relaciona a redução da proliferação com o aumento da frequência da apoptose com a maturação da placenta e conseqüentemente a liberação dos anexos fetais após o parto.

HIPÓTESES

Mesmo em clones bovinos produzidos a termo com sucesso, ocorrem modificações na transcrição placentária dos genes relacionados à apoptose BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K;

alterações placentárias na expressão dos genes apoptóticos BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K estão relacionadas à mortalidade neonatal;

o sexo do clone influencia o padrão de expressão dos genes apoptóticos BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K na placenta;

animais clonados classificados em diferentes faixas de peso apresentam modificação placentária do padrão de expressão dos genes apoptóticos BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K;

existe diferença na expressão da proteína dos genes apoptóticos BAX e BCL-2 na placenta dos animais clonados.

3 OBJETIVOS

Avaliar a expressão gênica dos genes relacionados a apoptose em placenta de animais produzidos por TNCS e comparar com a expressão gênica de placentas de animais produzidos por MN.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar a frequência dos transcritos dos genes relacionados a apoptose BAX e ITM2B (genes pro-apoptóticos), e BCL-2 e PI3K (genes anti-apoptóticos) em placentônios de animais produzidos por TNCS e animais controle (monta natural), que se desenvolveram a termo.

Verificar a existência de relação entre os genes BAX e BCL-2 na placenta de animais produzidos por TNCS e comprar com a placenta de animais produzidos por MN.

Avaliar a existência de relação entre modificações dos padrões de expressão dos genes relacionados a apoptose BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K em placentônios de TNCS bovinos e a mortalidade neonatal.

Verificar se a diferença de sexo entre os clones pode influenciar a frequência dos transcritos dos genes relacionados a apoptose BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K nas placentas destes animais.

Estudar se clones classificados em diferentes faixas de peso ao nascimento podem apresentar modificação da expressão dos genes relacionados a apoptose BAX, BCL-2, ITM2B e PI3K em suas respectivas placentas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento localizado no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga.

A coleta dos placentônios foi realizada na fazenda Santa Carolina localizada na cidade Tambaú interior de São Paulo e no departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica do campus de Pirassununga.

4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES, TRANSFERÊNCIA DE NÚCLEO

Abaixo segue a descrição dos materiais e métodos para a produção do embriões pela técnica de transferência de núcleo.

4.1.1 Maturação *in vitro*

Os oócitos foram coletados mediante a aspiração de ovários, de vacas zebus ou azebuadas, oriundos de abatedouros localizados em Piracicaba – S.P., distante 110Km do laboratório e Sertãozinho – S.P., distante 150Km do laboratório.

Após a aspiração dos ovários, somente os oócitos cuja camada de células do *cumulus oophorus* estivesse compacta e cujo citoplasma estivesse límpido e de aspecto homogêneo (finas granulações) foram utilizados nos experimentos. Os oócitos selecionados foram maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/ml), gentamicina (50µg/ml) e 0,5 µg de FSH/ml, 50µg de LH/ml e 1µg de estradiol/ml em microgotas de 100µl, cobertas com óleo mineral em incubadora a 38,5°C e 5% CO₂ em ar com máxima umidade, durante 22-24 horas.

4.1.2 Fibroblastos

Para obtenção de fibroblastos, foi realizada biópsia auricular seguindo o protocolo fornecido por HEYMAN em 2000 por comunicação pessoal. A amostra foi lavada 3 vezes em PBS e manipulada, sob estereomicroscópio e fluxo laminar, para remoção da cartilagem e dos pêlos. Após este procedimento, a biópsia foi cortada em pequenos fragmentos de 2 a 3mm, sendo cada fragmento colocado sob pressão no fundo de uma placa de Petri (35mm) e coberto com 2ml do meio de cultura (DMEM +

10% de SFB + piruvato + gentamicina). As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e alta umidade por 4 dias, tomando-se o cuidado para não movimentá-las durante este período. No quarto dia de cultivo foi adicionado 1ml do meio de cultura fresco em cada placa. As placas permaneceram em cultura até atingirem o estado próximo da confluência (8 a 15 dias), quando as células foram então repicadas e/ou congeladas.

4.1.3 Seleção do 1º Corpúsculo Polar e Enucleação de oócitos em metáfase II

Após 18h do início da maturação, os oócitos foram retirados das gotas de maturação e então as células do *cumulus oophorus* foram removidas mediante sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase (0,1%) diluída em PBS. Em seguida os oócitos foram selecionados sob lupa estereomicroscópica em meio TCM199 com sais de Earle, glutamina, NaHCO₃ e tampão HEPES, suplementado com 10% de SFB, piruvato (22µg/ml), gentamicina (50µg/ml), quanto a presença do 1º corpúsculo polar (1ºCP). Somente os oócitos que apresentaram a extrusão do 1ºCP e o citoplasma homogêneo foram utilizados. Após a seleção, os oócitos foram mantidos em grupos de quarenta em microgotas de meio CR2 suplementado com albumina sérica bovina (0,5µg/mL) e gentamicina (50µg/mL) até o momento da micromanipulação.

Com o auxílio de micropipetas montadas em um micromanipulador, as 21h do início da maturação *in vitro* os oócitos foram enucleados mediante a aspiração do 1ºCP junto com cerca de 20% do citoplasma adjacente. Em seguida, um fibroblasto foi

aspirado para o interior da micropipeta de injeção e inserido no espaço perivitelíneo do oócito. O procedimento foi realizado em todos os oócitos.

4.1.4 Reconstrução, Ativação e Cultivo *in vitro*

Para reconstrução embrionária, os oócitos com a célula somática foram previamente equilibrados durante 3 minutos em solução de Manitol (0,3M). Em seguida foram transferidos para a câmara de fusão com Manitol, posicionados entre dois eletrodos paralelos de platina (200 μ m de espaço) e submetidos a uma descarga elétrica de 1V de corrente contínua durante 5s seguida de duas descargas elétricas de 1,75KV/cm por 45 μ s para promover a fusão das membranas do oócito e da célula somática.

Os oócitos foram então incubados novamente em meio CR2 e avaliados quanto a fusão uma hora depois. Os oócitos fundidos foram mantidos em meio CR2 e as 26h após o início da maturação foram ativados pela exposição por 5 minutos a Ionomicina (5 μ M), seguida da incubação por 3h em 2mM de 6-dimetilaminopiridina (6-DMAP) diluída em meio CR2. Após a ativação os embriões foram cultivados *in vitro* por 7 dias em meio CR2 suplementado com albumina sérica bovina (0,5 μ g/mL) e gentamicina (50 μ g/mL) sob atmosfera com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂.

4.1.5 Transferência dos embriões

De acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS), os embriões grau I foram transferidos em fêmeas nulíparas sincronizadas previamente.

Para proporcionar uma divisão eqüitativa entre os grupos, as receptoras foram divididas em função do escore de condição corporal, classificadas de 1 a 9 segundo (RICHARDS et al., 1986) e em função da atividade ovariana, como fêmeas ciclando, com ovários com comprimento acima de 30mm, macios com presença de CL ou útero com turgidez acentuada.

4.1.6 Diagnóstico de gestação e monitoramento da sobrevivência embrionária

Após 28 dias da realização da transferência dos embriões para as receptoras foi realizado o diagnóstico de gestação mediante do exame ultra-sonográfico transretal com utilização do aparelho ALOKA SSD 500 e um transdutor linear (7 MHz) para verificação da presença do conceito e batimento cardíaco.

Aos 45 e 60 dias de gestação foi realizado novamente o exame ultra-sonografico para avaliação das perdas embrionárias ocorridas entre os períodos, monitoramento do batimento cardíaco, comprimento Crown-Rump e comprimento da vesícula amniótica.

4.2 COLETA DE PLACENTÔNIOS E EXTRAÇÃO DE MRNA E PROTEÍNA

Placentônios foram coletados no momento da cirurgia cesariana a termo no caso de animais produzidos por MN ou TNCS. Os placentônios foram recortados, sobre placa de Petri apoiada em gelo, em fragmentos de aproximadamente 1cm³, contendo tecido materno e fetal, e em seguida colocados em criotubos e submersos em nitrogênio líquido, para evitar a ação de RNAses, uma vez que estas possuem atividade acima de 14°C. Foram anotados o peso, características da placenta como presença de edema, hemorragia e presença de mecônio no líquido amniótico. Uma vez no laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Para extração de mRNA e proteína foi utilizado o protocolo do “Trizol[®] Reagent” (Invitrogen Brasil, Cat. No. 15596-026). Cada amostra foi retirada do freezer -80°C somente no momento da extração sendo sempre mantida em gelo. Para a homogeneização das amostras, almofariz, pistilo e espátula foram lavados duas vezes com peróxido de hidrogênio a 5% intercalando com duas lavagens de água bidestilada ultrapura. Então, todo o material foi colocado em estufa de secagem. Após a secagem do material, este foi previamente resfriado com nitrogênio líquido e procedeu-se à homogeneização.

A amostra foi retirada do criotubo e picada em pequenos pedaços com auxílio de lâmina de bisturi, sem que este descongelasse. Em seguida, a amostra sempre foi mantida resfriada e imersa em nitrogênio líquido e a homogeneização feita com movimentos circulatorios do pistilo.

Quantidades de amostras homogeneizadas que variaram de 70 a 137mg foram pesadas em tubos de 1,7 μ L previamente contendo 1mL de “Trizol” e pesados. Quando foi feita a extração de mais de uma amostra ao mesmo tempo, neste momento a amostra imersa no “Trizol” e agitada em vortex, permaneceu em gelo até a conclusão da homogeneização das demais amostras. O “Trizol” é um reagente comercial a base de fenol com a propriedade de lisar as células, estabilizar e proteger o RNA de enzimas presentes na própria célula.

Segundo o manual do fabricante é muito importante manter as proporções dos demais reagentes com o volume de “Trizol” usado para solubilizar a amostra homogeneizada.

Uma vez que todas as amostras homogeneizadas em solução com “Trizol”, estas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, e foram acrescentados 200 μ L de clorofórmio seguido por agitação em vortex por 15 segundos, seguindo de incubação a temperatura ambiente por 3 minutos.

Então as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 8°C, em centrífuga refrigerada e previamente resfriada. Nesta fase, intitulada fase de separação, os tubos apresentaram três fases, a superior incolor contendo o RNA total, uma intermediária de cor branca contendo os “debris” celulares, e uma inferior rósea contendo fenol. A parte superior foi cuidadosamente transportada, total de 400 μ L, para um tubo novo de 1,7 μ L estéril e foi acrescentado 500 μ L de álcool isopropílico. Esta fase é intitulada fase de precipitação. Os tubos foram centrifugados à 12000 g por 10 minutos a 8 °C e nesta fase já é possível ver o pellet de RNA total. O sobrenatante foi desprezado, e foi acrescentado 1 mL de álcool etílico a 75% e foi passado no vortex, e foi centrifugada a 7500 g por 5 min a 8°C, esta fase é intitulada fase de lavagem.

O sobrenatante foi desprezado e o tubo foi seco a temperatura ambiente, e foram acrescentados 100 µL de água DEPC, e o pellet foi solubilizado com auxílio da pipeta. O tubo foi incubado em banho seco à 57 °C por 10 minutos e armazenado em freezer -80 °C.

4.3 ESTIMATIVA DA PRESENÇA DE MRNA

Para o estudo do mRNA, primeiramente, foi feita a síntese do cDNA utilizando o kit “ImProm-II™ Reverse Trascriptase” (Cat. No. A3802) fornecido pela Promega Brasil, e foi seguido o protocolo fornecido pelo fabricante, a quantidade de RNA total utilizado foi de 1µg por reação, e a quantificação do RNA total foi feito pelo aparelho “BioPhotometer” (Cat. No. 6131 000.012) fornecido pela Eppendorf, com diluição de 1/99.

A expressão do mRNA foi estimado mediante PCR semi-quantitativo em tempo real, utilizando o aparelho “7500 Real-Time PCR System” (Cat. No. 4351105) fornecido pela Applied Biosystems. A técnica de PCR em tempo real é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em cada ciclo, para tal foi utilizado a técnica de coloração “SYBR Green” para os genes BAX e BCL2 (Tabela 1). A técnica de coloração pelo “SYBR Green” segue o princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e emite sinal de fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita.

Para montagem da reação, foi obedecida uma sequência na montagem das placas a fim de manter a uniformidade máxima dos reagentes presentes em cada tubo. Como foram dois genes estudados (BAX e BCL-2) e um gene endógeno (GAPDH) foi estabelecido que haveria uma amostra por linha e um gene a cada duas colunas respeitando a duplicata.

O mix total foi misturado por linha, iniciando pelo volume de água ultrapura (51µL), seguindo do "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Cat. No. 4367659) (75µL) e a amostra referentes à seis tubos (6µL), após homogeneização o equivalente à duas reações menos o volume dos primers (44µL) foi transferido aos tubos da coluna 3 e 5. Então foi acrescentado o volume de primers equivalente para duas reações (3µL do primer senso e 3µL do primer anti-senso) a esses tubos das colunas 1, 3 e 5. Após nova homogeneização o equivalente a uma reação (25µL) foi transferido ao tubo do lado equivalente. Para cada pipetagem a ponteira foi descartada a fim de evitar variações devido à tensão superficial.

O "Power SYBR Green PCR Master Mix" possui duas características, ele possui uma enzima que degrada uracila (AmpErase® UNG) e sua enzima requer a técnica de "Hot Start". O programa utilizado inicia com 5 minutos a 52°C para ativação da "AmpErase® UNG" e segue para 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase. Então, fez-se 45 ciclos de três passos, primeiro passo: 95°C por 30 segundos, segundo passo 60°C por 30 segundos e terceiro passo 72°C por 1 minuto, seguindo para a curva de dissociação.

A técnica de coloração "TaqMan® MGB™ Probes" (Cat. No. 4316034) fornecido pela Applied Biosystems foi utilizado para os genes ITM2-B e PI3K (Tabela 1). Onde também segue o princípio do FRET, mas o fluoróforo encontra-se não em solução como

no "SYBR Green" mas nas extremidades de uma sonda desenhada entre os primers no qual após a síntese da fita de interesse, os fluoróforos são cortados da sonda e uma vez livres em solução emitem fluorescência.

O mix total foi misturado por linha, iniciando pelo volume de água ultrapura (20,5µL), seguindo do "TaqMAN Universal PCR Master Mix" (Cat. No. 4304437) (75µL) e a amostra referentes à seis tubos (6µL), após homogeneização o equivalente à duas reações menos o volume dos primers (47,5µL) foi transferido aos tubos da coluna 3 e 5. Então foi acrescentado o volume de primers equivalente para duas reações (2,5µL de assay que contém o par de primers e a sonda) a esses tubos das colunas 1, 3 e 5. Após nova homogeneização o equivalente a uma reação (25µL) foi transferido ao tubo do lado equivalente. Para cada pipetagem a ponteira foi descartada a fim de evitar variações devido à tensão superficial.

O "TaqMAN Universal PCR Master Mix" também possui as características do "Power SYBR Green PCR Master Mix". O programa utilizado inicia com 5 minutos a 52°C para ativação da "AmpErase® UNG" e segue para 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase. Então, fez-se 45 ciclos de dois passos, primeiro passo: 95°C por 30 segundos, segundo passo 60°C por 30 segundos.

Tabela 1 - Sequência dos primers e sondas utilizadas no experimento.

Primers e Sondas	
GAPDH	F: 5'--3' GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: 5'--3' CCCTCCACGATGCCAAAGT
BAX	F: 5'--3' GACGGGTCCGGGGAGCAAC R: 5'--3' ATGGTGAGCGAGGCGGTGAG
BCL-2	F: 5'--3' TTCGCCGAGATGTCCAGTCAGC R: 5'--3' TTGACGCTCTCCACACACATGACC
GAPDH	F: 5'--3' AAGGCCATCACCATCTTCCA R: 5'--3' CCACTACATACTCAGCACCAGCAT S: 5'--3' VIC-AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG-TAMRA
ITM2b	F: 5'--3' GTCCCAGAGTTTGCAGATAGTGA R: 5'--3' GGAATCACATAGCACTTATCCAGGTT S: 5'--3'
PI3K	F: 5'--3' CCCAAGAATGCACAAAGACAAGA R: 5'--3' GCCGAATAGCTAGATAAGCCTTGTA S: 5'--3' FAM-CTGAAACCTCTCAAATTC-NFQ

4.4 IMUNOGISTOQUÍMICA

Os placentônios foram coletados durante a cirurgia cesariana e foram recortados em fragmentos de aproximadamente meio centímetro cúbico evitando-se de desconectar o tecido materno do fetal. Os fragmentos foram imersos em formol 10% tamponado em PBS por 24 horas e então deixados não mais que uma semana na solução de PBS. Após as 24 horas no PBS, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool etílico 70% por uma hora, álcool etílico 95% por uma hora, álcool etílico puro de análise por uma hora, álcool etílico puro de análise por uma hora, xilol I por uma hora, xilol II por uma hora, parafina I por uma hora e parafina II por uma hora.

Os fragmentos foram então emblocados em parafina e mantidos em freezer - 20°C até o momento da preparação dos cortes no micrótomo. As lâminas contendo os cortes foram colocadas em suporte permanecendo na vertical e levadas a estufa a 56°C para secagem e desparafinização dos cortes.

Para confecção da solução de PBS utilizou-se 8g de cloreto de sódio, 0,2g de cloreto de potássio, 2,68g de fosfato de sódio dibásico hidratado, 0,24 de fosfato de potássio monobásico anidro, o pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico e o volume foi completado para 1L.

Três banhos de xilol puro de análise e novo por 20 minutos em estufa a 56°C, para a desparafinização dos cortes. Um banho de álcool puro de análise por cinco minutos a temperatura ambiente, seguida e um banho de álcool 95% por cinco minutos a temperatura ambiente e um banho de álcool 70% por cinco minutos a temperatura ambiente. Então foram feitos três banhos de PBS adicionado de TWEEN20 a 0,05% por cinco minutos a temperatura ambiente para reidratação dos cortes, e um banho de PBS mais TWEEN20 a 0,05% adicionado de leite desnatado a 5% para bloqueio de anticorpos inespecífico, seguido de mais três banhos de PBS adicionado de TWEEN20 a 0,05% por cinco minutos a temperatura ambiente.

Então as lâminas foram colocadas em câmara úmida e foram adicionados os anticorpos primários sobre os cortes na proporção 1:100 diluídos em PBS. A câmara úmida protegida da luz foi mantida em refrigerador por 24 horas.

Um banhos de PBS adicionado de TWEEN20 por cinco minutos a temperatura ambiente, e foi adicionado o anticorpo secundário na proporção 1:200 em câmara úmida protegida da luz e mantida em refrigerador por 40 minutos e 3 banhos de PBS adicionado de TWEEN20 0,05% por 5 minutos a temperatura ambiente. Para a

visualização das células foi feita a coloração de iodeto de propídeo, para isso foram feitos três banhos de iodeto de propídeo a 0,01mg/mL por 20 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Então as lâminas foram montadas para visualização em microscópio de fluorescência Zeiss.

Os anticorpos monoclonais BAX (B-9): sc-7480 e BCL-2 (C-2) sc-7382 produzidos em camundongo, marcados com FITC, concentração 200 µg IgG_{2b} em 1 mL de PBS contendo 0,1% BSA (Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo secundário monoclonal contra camundongo de número de catálogo F 4018, marcado com FITC na concentração 0,01 M em solução PBS (Sigma).

Segundo o manual do fabricante dos anticorpos monoclonais as proteínas BAX e BCL-2 foram encontradas na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e membrana nuclear.

4.5 ANALISE ESTATÍSTICA

Para análise da quantificação dos resultados do PCR em tempo real, foi utilizado o software “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003) (Figura 1) e para análise da eficiência a curva de amplificação individual de cada tubo. Onde no mínimo 4 pontos de cada curva na fase exponencial foi analisado e delimitou-se um limite mínimo e máximo e a média desses valores delimitou o Threshold para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo.

Depois de determinado o “threshold” os dados são novamente analisados e exportados para uma planilha de dados, onde esses dados (CT) de cada indivíduo foram organizados com dados de peso ao nascer, sexo, sobrevivência e tempo de gestação. Os Cts foram então exportados para o programa “REST2005” (PFAFFL et al., 2002) (Figuras 2 e 3) que por sua vez analisa dois grupos de dados com correção pela eficiência individual para cada gene.

Figura 2 - Exemplo de análise da curva de eficiência para cada poço individual através do software “LinRegPCR”, onde as linhas azuis do gráfico superior indicam intervalo analisado da curva de amplificação em sua fase exponencial, e o gráfico inferior mostra as eficiências calculadas

Values for GAPDH:

Reaction Efficiency: 0.882

☒ Reference

☐ Use Calculated Reaction Efficiency

Calculated Reaction Efficiency: N/A

Sample CP	Control CP	Std. CP	Std. Concentration
21,565	20,374		
19,171	19,251		
19,284	21,262		
19,054	20,455		
19,437	17,452		
19,163	20,53		
18,498	18,645		
18,159	18,267		
20,446			
18,578			

Figura 2 - Exemplo do “Software REST2005”, janela de “setup”, entrada de dados dos genes como nome, eficiência e CTs

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	50000
Normalisation Factor	1.07

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
GAPDH	REF	0.882	1.000	0.431 - 2.249	0.165 - 4.655	1.000
BAX	TRG	0.9	0.321	0.076 - 1.229	0.036 - 2.292	0.039 DOWN
BCL-2	TRG	0.834	0.816	0.365 - 1.687	0.187 - 3.370	0.536

Interpretation

GAPDH sample group is not different to control group. P(H1)=1.000

BAX is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0.321 (S.E. range is 0.076 - 1.229). BAX sample group is different to control group. P(H1)=0.039

BCL-2 sample group is not different to control group. P(H1)=0.536

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
GAPDH	REF	0.882	1.069	0.461 - 2.403	0.177 - 4.975	0.859
BAX	TRG	0.9	0.343	0.081 - 1.314	0.038 - 2.450	0.051
BCL-2	TRG	0.834	0.872	0.391 - 1.802	0.200 - 3.602	0.671

Figura 3 - Exemplo do “Software REST2005”, janela de resultados

5 RESULTADOS

As taxas de nascimentos de bezerros produzidos por TNCS, eficiência da técnica e de mortalidade pós-nascimento, obtidas das cinco linhas celulares empregadas como fonte doadora de núcleo, assim como os dados dos clones (identificação, origem da linha celular, sexo, peso ao nascimento e sobrevivência neonatal), estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Com base nas diferenças de peso ao nascimento, bem como das variações encontradas nos resultados de sobrevivência neonatal e de acordo com o sexo (eficiência da técnica foi 123% superior na clonagem de machos do que em clones fêmeas). Além da análise individual de cada clone, bem como de todo grupo clonado em comparação ao grupo controle concebido por monta natural (Tabela 4), avaliou-se também a influência do sexo (macho ou fêmea), da sobrevivência neonatal (morto ou vivo) e do peso ao nascimento (maior ou menor que 40kg).

Tabela 2 - Taxas de estabelecimento de gestação (30d), mortalidade embrionária (30-60d), abortos (60d-nascimento), nascimentos, mortalidade pós-nascimentos e eficiência da técnica de clonagem por transferência nuclear para cada uma das linhas celulares utilizadas como fonte doadora de núcleo (*);ID = identificação; F = fêmea; M = macho; M.E. =mortalidade embrionária; nc/o = nascimento; morta/e = mortalidade (YAMAZAKI, 2006)

<i>ID do animal</i>	<i>gestação 30d</i>	<i>M.E. 30-60d</i>	<i>abortos 60d-nc/o</i>	<i>nasci-mentos</i>	<i>morta/e pós-nc/o</i>	<i>Eficiência clonagem</i>
Linha 2 F	33,3%	71,4%	75,0%	02,4%	00,0%	2,4%
Linha 3 M	21,9%	00,0%	14,3%	18,8%	50,0%	9,4%
Linha 4 M	38,2%	61,5%	60,0%	05,9%	00,0%	5,9%
Linha 5 F	26,4%	21,4%	45,5%	11,3%	66,7%	3,8%
Linha 6 F	18,0%	11,1%	62,5%	06,0%	33,3%	4,0%
Linha 7 F	18,0%	16,0%	25,0%	33,0%	33,3%	6,0%
Média	26,0%	30,2%	47,1%	11,1%	33,3%	5,3%
Linhas F	23,9%	30,0%	52,0%	10,4%	37,5%	4,1%
Linhas M	30,1%	30,8%	37,2%	12,4%	25,0%	7,7%

Tabela 3 - Dados dos clones bovinos nascidos vivos: identificação, sobrevivência neonatal, sexo e peso ao nascimento (kg) (YAMAZAKI, 2006)

<i>Linha celular</i>	<i>Identificação do clone</i>	<i>sobrevivência neonatal</i>	<i>sexo</i>	<i>peso ao nascimento (kg)</i>
Linha celular 2	2.1	Vivo	Fêmea	42,0
Linha celular 3	3.1	Morto	Macho	51,0
Linha celular 3	3.3	Vivo	Macho	37,0
Linha celular 3	3.4	Morto	Macho	14,0
Linha celular 3	3.5	Morto	Macho	56,0
Linha celular 3	3.6	Vivo	Macho	37,0
Linha celular 4	4.1	Vivo	Macho	57,0
Linha celular 6	6.1	Morto	Fêmea	62,0
Linha celular 6	6.3	Morto	Fêmea	29,2
Linha celular 6	6.4	Morto	Fêmea	51,0
Linha celular 6	6.5	Vivo	Fêmea	43,0
Linha celular 6	6.6	Vivo	Fêmea	48,5
Linha celular 7	7.1	Vivo	Fêmea	39,0
Linha celular 7	7.3	Vivo	Fêmea	50,0

Tabela 4 - Dados dos neonatos bovinos do grupo controle concebidos por monta natural: identificação, sexo e peso ao nascimento (kg) (YAMAZAKI, 2006)

<i>Identificação do clone</i>	<i>Sexo</i>	<i>peso ao nascimento (kg)</i>
N2	Macho	40,0
N3	Fêmea	36,0
N4	Fêmea	35,2

Os resultados da expressão relativa dos genes relacionados a apoptose em placentas provenientes de gestações produzidas por TNCS quando comparada com placentas provenientes de gestações produzidas por MN, mostraram diferença para o gene BAX ($p=0,04$), no entanto, não houve diferença para os genes BCL-2, ITM2B e PI3K ($p=0,528$; $p=0,994$; $p=0,923$; Figura 4). As placentas provenientes de gestações produzidas por SCNT apresentaram redução expressão do mRNA para a proteína Bax com fator de 0,679 quando comparado com as placentas provenientes de gestações produzidas por MN.

Figura 4 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de animais produzidos por monta natural (controle) em comparação com placentas de clones (BAX com $p=0,04$)

Quando analisamos a expressão do mRNA para genes ligados a apoptose comparando as variáveis como sobrevivência, sexo, e peso ao nascimento não houve diferença (com $p=0,472$) para o gene BAX, ($p=0,485$) para o gene BCL-2, ($p=0,720$) para o gene ITM2B e ($p=0,791$) para o gene PI3K. Quando comparados os clones vivos com os clones mortos, ($p=0,334$) para o gene BAX, ($p=0,847$) para o gene BCL-2, ($p=0,882$) para o gene ITM2B e ($p=0,909$) para o gene PI3K quando comparados os clones machos com os clones fêmeas, ($p=0,670$) para o gene BAX, ($p=0,516$) para o gene BCL-2, ($p=0,953$) para o gene ITM2B e ($p=0,997$) para o gene PI3K quando comparados os clones com peso ao nascimento entre 35 e 42 quilos e menor que 35 e maior que 42 (Figuras 5 a 8).

Não foi observada diferença quando comparada a expressão dos genes apoptóticos entre os animais que sobreviveram do sexo masculino com os animais que sobreviveram do sexo feminino (com $p=0,890$) para o gene BAX, ($p=0,807$) para o gene BCL-2, ($p=0,871$) para o gene ITM2B e ($p=0,896$) para o gene PI3K quando comparados os clones (Figura 9). O mesmo se observou para a expressão em animais mortos do sexo masculino comparados com animais mortos do sexo feminino, $p=0,576$

para o gene BAX, $p=0,703$ para o gene BCL-2, $p=0,921$ para o gene ITM2B e $p=0,952$ para o gene PI3K quando comparados os clones (Figura 10).

Figura 5 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones que sobreviveram comparados com os que morreram

Figura 6 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com as fêmeas

Figura 7 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b, PI3K nas placentas dos clones com peso ao nascimento entre 35 e 42 kg comparados com clones com mais de 42 kg

Figura 8 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b, PI3K nas placentas dos clones com peso ao nascimento menor que 35 kg comparados com clones com peso entre 35 e 42 kg

Figura 9 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com as fêmeas que sobreviveram

Figura 10 - Expressão relativa dos genes BAX, BCL-2, ITM2b e PI3K nas placentas de clones machos comparados com clones fêmeas que não sobreviveram

A fluorescência dos anticorpos monoclonais contra as proteínas dos genes BAX e BCL-2 foi observado em todo tecido materno com maior intensidade no estroma materno e com maior intensidade quando comparado com o tecido fetal, em todos indivíduos. A marcação ocorreu no citoplasma e membrana nuclear como previsto pelo fabricante (Figura 11).

Nas lâminas de animais produzidos por monta natural para o anticorpo contra a proteína BAX evidenciou-se células binucleadas com maior fluorescência quando comparadas com as demais células do trofoblasto, além de apresentaram polaridade com maior intensidade na região da célula binucleada com maior volume de citoplasma (Figura 11A).

Nas lâminas de placenta provenientes de animais clonados marcados com anticorpo contra a proteína BAX evidenciou-se menor fluorescência do tecido materno e fetal comparados com a lâmina de placentas provenientes de animais produzidos por monta natural. As células binucleadas estavam menos fluorescentes, mas notou-se que aquelas localizadas adjacentes ao epitélio materno apresentaram maior intensidade de fluorescência similar ao epitélio materno (Figura 11C).

Nas lâminas de placentas provenientes de animais produzidos por monta natural e transferência de núcleo de célula somática marcados com anticorpo contra a proteína BCL-2 evidenciou-se menor intensidade de fluorescência em ambos tecidos materno e fetal comprado com as lâminas hibridizadas com BAX, mas com maior intensidade no tecido materno. As células binucleadas apresentaram maior intensidade de fluorescência comparadas com as demais células do tecido fetal, mas com algumas células binucleadas apresentando padrões uniformes, diferentes das células binucleadas

de placentas de animais produzidos por monta natural e hibridizadas com anticorpo para proteína BAX (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografia Imunohistoquímica FITC, 200x, em (A) placenta de animal proveniente de monta natural marcado para proteína BAX; (B) placenta de animal proveniente de monta natural marcado para proteína BCL-2; (C) placenta de clone marcado para proteína BAX; (D) placenta de clone marcado para proteína BCL-2; (E) controle negativo; (*) região materna; (VF) vilo fetal; (setas) células binucleadas

6 DISCUSSÃO

Os genes da família BCL-2 são os principais reguladores da apoptose na placenta, entre eles o BAX pro-apoptótico e BCL-2 anti-apoptótico (ANTONSSON et al., 1997; FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

Na análise da expressão relativa destes genes nas placentas obtidas no momento da cesariana de animais clonados comparada com as placentas de animais produzidos por monta natural mostrou diferença do gene BAX de expressão com fator de 0,679 ($p=0,04$) menor nos animais clonados comparados com os produzidos por MN, enquanto não houve diferença significativa da expressão para o gene BCL-2.

Tendo em vista que a proporção BAX/BCL-2 é responsável pela ativação da via da apoptose, os resultados da expressão de BAX menor nos animais clonados e a expressão de BCL-2 igual para ambos os grupos nos sugere que a frequência de apoptose deve ser menor nos animais clonados comparados com os animais produzidos por MN.

A frequência do mRNA deve estar diretamente ligada proporcionalmente à expressão da proteína, uma vez que a célula deve gastar mais energia para regular a expressão de um gene na transcrição do RNA mensageiro do que na tradução do RNA mensageiro em proteína. De modo a confirmar os resultados e identificar as células onde o gene é expresso, fez-se a imunohistoquímica e avaliou-se de modo qualitativo.

Na observação qualitativa da imunohistoquímica se evidencia maior fluorescência para anticorpos contra a proteína BAX nas lâminas de placenta provenientes de NM comparadas com lâminas de placenta provenientes clones,

enquanto não existiu diferença semelhante para os anticorpos contra a proteína BCL-2. Esses resultados concordam com os resultados obtidos para para os mesmo genes na quantificação relativa dos transcritos.

A menor frequência de apoptose nas placentas provenientes de animais produzidos por TNCS conseqüentemente produzirá menor quantidade de corpos apoptóticos exigindo menor atividade fagocitária de macrófagos, este resultado é reforçado pela descrição de Boos et al. (2003) e Miyoshi e Sawamukai (2004) onde foi evidenciado menor frequência de apoptose e atividade fagocitária na placenta de gestações que apresentaram retenção de placenta e ausência de maturação placentária, sendo assim, mais um fator indicativo de que a maturação é ineficiente na placenta de animais provenientes de TNCS.

A hibridização dos anticorpos contra as proteínas BAX e BCL-2 foi evidenciada através da fluorescência e com maior intensidade no tecido materno do que no fetal, concordando com os resultados de Boos et al. (2003) onde o tecido materno apresentou maior frequência de apoptose do que o fetal.

As células do estroma materno apresentaram grande fluorescência para o anticorpo do gene BAX nas lâminas de placenta dos animais produzidos por MN do que nos produzidos por TNCS, sugerindo maior apoptose nesse tecido e nos animais produzidos por MN, como descrito por Constant et al. (2006) onde se evidenciou maior frequência de apoptose nesse tecido com afinamento do epitélio materno, sendo esta uma característica da maturação placentária e preparação para liberação do tecido fetal.

A maior marcação na imunohistoquímica para a proteína do gene BAX no tecido materno sugerindo que a apoptose ocorre em maior frequências nesse tecido

nas placentas a termo, concordam com os resultados de Benetone (2005) e Miyoshi e Sawamukai (2004) onde se evidenciou maior marcação para caspase-3 ativa no tecido materno em placentas neste mesmo período. Neste trabalho, a imunohistoquímica para proteína caspase-3 ativada esta em andamento, sendo de grande importância para conclusão final do trabalho.

Nossos resultados confirmam a hipótese de que na placenta de animais produzidos por TNCS a frequência dos transcritos para os genes pró-apoptóticos estão diminuídos em relação aos de animais produzidos por NM, com expressão do gene BAX pró-apoptótico apresentando fator de 0,679 ($p=0,04$) menor nos animais produzidos por TNCS em relação aos animais produzidos por NM.

Estes resultados sugerem que há menor frequência de apoptose na placenta dos animais clonados contribuindo para a ausência de maturação da placenta, conforme o que foi observado na placenta de animais produzidos por NM e apresentaram alterações placentárias com ausência da maturação e retenção de placenta.

Os genes ITM2B e PI3K, que agem regulando a atividade das proteínas BAX e BCL-2, não apresentaram diferença na expressão de seus transcritos quando as placentas de animais produzidos por NM foram comparados com as placentas de clones. Baseado neste resultado, concluiu-se que os genes ITM2B e PI3K não influenciam a frequência da apoptose no período de maturação da placenta em bovinos.

Os resultados de Smith et al. (2002) e Miller et al. (2005) onde fatores de crescimento como EGF, IGF-1, IGF-2 e bFGF, PDGF-AA promovem o crescimento de

células trofoblásticas prevenindo a apoptose, reforçam a teoria de Raff (1992) sobre a regulação do crescimento celular com suicídio como padrão.

Para a fisiologia anormal da placenta a expressão de fatores de crescimento como devem estar alterados e conseqüentemente ocorrerá alteração na freqüência na proliferação e apoptose nesse tecido ocasionando as alterações placentárias e fetais.

Se a concentração de fatores de crescimento sérico nos animais produzidos por transferência de núcleo de célula somática é maior que nos animais produzidos por NM no momento da cesariana, ainda existirá maior estímulo à proliferação celular e menor freqüência de apoptose, conseqüentemente, não ocorrerá à maturação da placenta e a receptora não sinalizará o parto e após a cirurgia cesariana não ocorrerá à liberação dos envoltórios fetais.

Essas informações concordam com os resultados de Yamazaki (2006), onde em sua tese, ele demonstrou que os mRNA para os genes H19 e IGF-2 apresentaram menor expressão nas placentas dos animais clonados, mas sem diferença para o gene IGF-2r (sendo estes animais os mesmo utilizados nesta tese). Esse padrão pode ter ocorrido devido a uma resposta de “Feedback” negativo em relação aos altos níveis de IGF-2 produzido pelo feto. O aumento da produção do IGF-2 pelo feto pode ser em resposta à placenta ineficiente, como demonstrado por Heyman et al. (2002) através da análise de PSP60 pelas células binucleadas.

Através dos estudos deste projeto foi elaborado um esquema com as prováveis vias de ativação da apoptose mostrado abaixo na figura 12. Segundo STRASZEWSKI-CHAVEZ (2005) os receptores Fas foram detectados no trofoblasto. Uma vez estimulados, estes receptores ativam uma série de caspases que por fim ativam a caspase-3 levando a célula à apoptose. Ainda este autor relata que a ausência ou

redução nos níveis dos fatores de crescimento causam redução da atividade da proteína PI3K que evita a desfosforilação da proteína Bad. A proteína Bad desfosforilada compete com a proteína BCL-2, esta competição possibilita a homodimerização das proteínas Bax liberando o citocromo-c para o citosol que ativará a caspase-3. Os fatores de crescimento também agem inibindo o efeito apoptótico de citocinas, e logicamente sua redução possibilitará a ativação da cascata das caspases através dos receptores de morte.

Yuan et al. (2006) relata que o estresse oxidativo no tecido placentário estimula a expressão do gene iNOS que por sua vez estimula a expressão dos genes Bax e Bak. Os genes Bax e Bak possibilitam o transporte passivo do citocromo-c da mitocôndria para o citosol, uma vez no citosol o citocromo-c ativará a caspase-3 finalizando a via da apoptose.

Hormônios como o sulfato de estrona já foi relacionado com o crescimento da placenta e do feto, e também com o peso da placenta e do feto ao nascimento. Sua ação também foi relacionada com a eficiência placentária e foi sugerida sua relação com a maturação da placenta horas antes do parto (BOOS et al., 2003; KINDAHL et al., 2002; SHAH et al., 2006). Alguns hormônios como o próprio sulfato de estrona podem estar relacionados com a regulação da expressão nuclear de genes da família BCL-2, podendo apresentar atividade ou controle direto na ativação das vias de apoptose (Figura 12).

Figura 12 - Esquema das prováveis vias da ativação da apoptose na placenta durante o desenvolvimento e maturação na gestação de bovinos

Ainda o estudo deste projeto possibilitou a elaboração de um organograma com as prováveis consequências da reprogramação nuclear incompleta que o embrião sofre no processo de ativação genômica, e as alterações produzidas na placenta e seus efeitos no bezerro (Figura 13). O objetivo deste organograma é de formular hipóteses para explicar a grande variação no peso ao nascimento dos bezerros clonados.

Aqui a reprogramação dos genes será a responsável pelas alterações placentárias e consequentemente no clone durante todo o desenvolvimento. No primeiro caso a reprogramação pode ocorrer de modo suficiente para garantir uma placentação adequada para a sobrevivência fetal apresentando baixas taxas de aborto, nesse caso o bezerro pode nascer sem grandes alterações, mas mesmo neste caso, a placenta

pode apresentar insuficiência e sua compensação na tentativa de suprir o feto pode levar a LOS.

No segundo caso a reprogramação pode ocorrer de modo inadequado, mas garantindo a sobrevivência do embrião e a formação da placenta. Neste caso, a placenta pode apresentar poucas alterações e baixa eficiência. Caso ocorra a compensação da ineficiência, ocorrerá LOS. Mas por outro lado, se a placenta não for capaz de compensar a sua ineficiência e ainda sim for compatível com a sobrevivência do bezerro, este apresentará crescimento menor que o normal.

Figura 13 - Organograma de eventos causa-efeito relacionando a reprogramação do genoma embrionário com as consequências na placentação e crescimento do feto devido as alterações nos níveis de apoptose na placenta. Os momentos em que o embrião, feto ou bezerro podem sofrer aborto ou morte estão indicados como balões de fundo vermelho com texto: Falha

7 CONCLUSÃO

Negando a hipótese nula, existe diferença na expressão do gene BAX com redução na expressão das placentas produzidas por TNCS quando comparado com o grupo controle MN, pelo menos no mRNA como demonstrado pela técnica de PCR em tempo real.

Confirmando a hipótese nula, não existe diferença na expressão dos genes BCL-2, ITM2B e PI3K entre as placentas produzidas por TNCS e o grupo controle MN.

Confirmando a hipótese nula, os efeitos e as interações dos efeitos como mortalidade perinatal, sexo do clone e peso ao nascimento não apresentam diferenças na expressão dos genes estudados nas placentas produzidas por TNCS e o grupo controle MN.

A imunohistoquímica confirmou a presença das proteínas BAX e BCL-2 nas placentas de todos animais, apresentando maior intensidade na placenta de animais de animais produzidos por TNCS para a proteína BAX.

A imunohistoquímica apresentou maior intensidade de marcação no tecido materno comparado com o trofoblasto fetal para as proteínas BAX e BCL-2.

Apesar de ainda não provada a hipótese da alteração na frequência da apoptose na placenta entre os grupos estudados, após a imunohistoquímica e ou “westernblotting” para proteína caspase-3 teremos resultados para testar a hipótese.

REFERÊNCIAS

- ANTONSSON, B.; CONTI, F.; CIAVATTA, A.; MONTESSUIT, S.; LEWIS, S.; MARTINOU, I.; BERNASCONI, L.; BERNARD, A.; MERMOD, J. J.; MAZZEI, G.; MAUNDRELL, K.; GAMBALE, F.; SADOUL, R.; MARTINOU, J. C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science**, v. 277, p. 370-372, 1997.
- BAKER, J.; LIU, J-P.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell**, v. 75, p. 73-82, 1993.
- BENETONE, M. Z. **Apoptose e proliferação na placenta de búfalas**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BOOS, A.; JANSSEN, V.; MULLING, 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.
- CAMPBELL, K.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.; LEE, J. H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 256-268, 2005.
- CHAVATTE-PALMER, P.; REMY, D.; CORDONNIER, N. Health status of cloned cattle at different ages. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 94-100, 2004.
- CHIARA, T.M.; EFSTRATIADIS, A.; ROBERTSON, E.J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting, **Nature**, v. 345, p. 78-80, 1990.
- CONSTANCIA, M.; HEMBERGER, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; STEWART, F.; KELSEY, G.; FOWDEN, A.; SIBLEY, C. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945-948, 2002.
- CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-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.

CORREIA-DA-SILVA, G.; BELL, S. C.; PRINGLE, J. H.; TEIXEIRA, N. A. Patterns of expression of Bax, Bcl-2 and Bcl-x(L) in the implantation site in rat during pregnancy. **Placenta**, v. 26, p. 796-806, 2005.

DINDOT, S. V.; KENT, K. C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N.; WOMACK, J.; PIEDRAHITA, J. A. Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, v. 15, p. 966-974, 2004.

EFSTRATIADIS, A. Genetics of mouse growth. **International Journal of Development Biology**, v. 42, p. 955-976, 1998.

FALCO, M.; DE LUCA, L.; ACANFORA, F.; CAVALLOTTI, I.; COTTONE, G.; LAFORGIA, V.; DE LUCA, B.; BALDI, A.; DE LUCA, A. Alteration of the Bcl-2:Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. **The Histochemical Journal**, v. 33, p. 421-425, 2001.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.

FLEISCHER, A; REBOLLO, A. Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. **FEBS Letters**, v. 557, p. 283-287, 2004.

GOODALL, J. J.; SCHMUTZ, S. M. Linkage mapping of IGF2 on cattle chromosome 29. **Animal Genetics**, v. 34, p. 313, 2003.

HAMMER, C. J.; TYLER, H. D.; LOSKUTOFF, N. M.; ARMSTRONG, D. L.; FUNK, D. J.; LINDSEY, B. R.; SIMMONS, L. G. Compromised development of calves (*Bos gaurus*) derived from in vitro-generated embryos and transferred interspecifically into domestic cattle (*Bos taurus*). **Theriogenology**, v. 55, p. 1447-1455, 2001.

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

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

HU, R.; ZHOU, S.; LI, X. Altered Bcl-2 and Bax expression is associated with cultured first trimester human cytotrophoblasts apoptosis induced by hypoxia. **Life Science**, v. 79, p. 351-355, 2006.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J. C. Apoptosis and its role in the trophoblast. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 195, p. 29-39, 2006.

JOSWIG, A.; GABRIEL, H. D.; KIBSCHULL, M.; WINTERHAGER, E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 26, p. 1-44, 2003.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; KONIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. **Domestic animal Endocrinology**, v. 23, p. 321-328, 2002.

KRUIP, TH. A. M.; DEN DAAS, J. H. G. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 289-296, 2001.

LIU, Z.; SUN, Q. H.; YANG, Y.; LIU, J. M.; PENG, J. P. Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. **Cytokine**, v. 24, p. 201-209, 2003.

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FLUKA, J.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; DELLA SALDA, L.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, v. 65, p. 1110-1121, 2005.

LOPEZ, M. L.; DIKKES, P.; ZURAKOWSKI, D.; VILLA-KOMARKOFF, L. Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. **Endocrinology**, v. 137, p. 2100-2108, 1996.

MATTHEWS, J. C.; BEVERIDGE, M. J.; DIALYNAS, E.; BARTKE, A.; KILBERG, M. S.; KAUFMAN, P. Placental anionic and cationic amino acid transporter expression in growth hormone overexpressing and null IGF-II or null IGF-I receptor mice. **Placenta**, v. 20, p. 639-650, 1999.

MILLER, A. G.; APLIN, J. D.; WESTWOOD, M. Adenovirally mediated expression of insulin-like growth factors enhances the function of first trimester placental fibroblasts. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 379-385, 2005.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 53-56, 2002.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 125-128, 2004.

MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. **BioEssays**, v. 25, p. 577-588, 2003.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, p. 609-619, 1993.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M. FORSBERG, E. J.; GARBER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPAMG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, P. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 334-339, 2002.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. e36, 2002.

RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v. 356, p. 397-400, 1992.

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

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, p. 21-32, 2001.

SFERRUZZI-PERRI, A. N.; OWENS, J. A.; PRINGLE, K. G.; ROBINSON, J. S.; ROBERTS, C. T. Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. **Endocrinology**, v. 147, p. 3344-3355, 2006.

SGARBOSA, F.; BARBISAN, L. F.; BRASIL, M. A.; COSTA, E.; CALDERON, I. M.; GONÇALVES, C. R.; BEVILACQUA, E.; RUDGE, M. V. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 73, p. 143-149, 2006.

SHAH, K. D.; NAKAO, T.; KUBOTA, H. Plasma estrone sulphate (E(1)S) and estradiol-17beta (E(2)beta) profiles during pregnancy and their relationship with the relaxation of sacrospinal ligament, and prediction of calving time in Holstein-Friesian cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 38-53, 2006.

SIBLEY, C. P.; COAN, P. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; DEAN, W.; HUGHES, J.; SMITH, P.; REIK, W.; BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L.; CONSTANCIA, M. Placental-specific Igf-2 regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, p. 8204-8208, 2004.

SMITH, S.; FRANCIS, R.; GUILBERT, L.; BAKER, P. N. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. **Placenta**, v. 23, p. 322-330, 2002.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. **Nature Reviews. Genetics**, v. 1, p. 199-207, 2000.

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

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMAS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 877-897, 2005.

THIBAULT C. Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 43, p. 303-324, 2003.

USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; KANEYAMA, K.; HOSOE, M.; HASHIZUME, K.. Cloning of the bovine antiapoptotic regulator, BCL2-related protein A1, and its expression in trophoblastic binucleate cells of bovine placenta. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 344-351, 2006.

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

WELLS, D. N.; FORSYTH, J. T.; MCMILLAN, V.; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 101-110, 2004.

WESTHUSIN, M. E.; COLLAS, P.; MAREK, D.; SULLIVAN, E.; STEPP, P.; PRYOR, J.; BARNES, F. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by *in vitro* fertilization and nuclear transplantation. **Theriogenology**, v. 46, p. 243-252, 1996.

YAMAZAKI, W. **Estudo do “Genomic Imprinting” na placenta de clones bovinos**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

YUAN, B.; OHYAMA, K.; BESSHO, T.; TOYODA, H. Contribution of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 to apoptosis induction in smooth chorion trophoblast cells of human fetal membrane tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 822-827, 2006.

YUI, J.; GARCIA-LLORET, M.; BROWN, A. J.; BERDAN, R. C.; MORRISH, D. W.; WEGMANN, T. G.; GUILBERT, L. J. Functional, long-term cultures of human term trophoblasts purified by column-elimination of CD9 expressing cells. **Placenta**, v. 15, p. 231-246, 1994.