DANILA BARREIRO CAMPOS

Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina
e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas
células placentárias em cultura

São Paulo

2005

DANILA BARREIRO CAMPOS

Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta
bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona
pelas células placentárias em cultura

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

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1527
FMVZ

Campos, Danila Barreiro

Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura / Danila Barreiro Campos. – São Paulo : D. M. Campos, 2005.

193 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paulo de Carvalho Papa.

1. Fatores de crescimento. 2. Hormônios progesteracionais.
3. Imunohistoquímica. 4. Cultura de células. 5. Placenta.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura", protocolo nº 164/2002, utilizando 12 bovinos, sob a responsabilidade da Profª Drª Paula de Carvalho Papa está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Immunolocalization do VEGF, bFGF and their receptors in the bovine placenta and influence of these factors on the progesterone production by placental cells in culture" protocol number 164/2002, utilizing 12 bovines, under the responsibility of Profª Drª Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 06 de junho de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAMPOS, Danila Barreiro

Título: Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura

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: _____

AULA DE VÔO

*O conhecimento
caminha lento feito lagarta.
Primeiro não sabe que sabe
e voraz contenta-se com o cotidiano orvalho
deixado nas folhas vívidas das manhãs.*

*Depois pensa que sabe
e se fecha em si mesmo:
faz muralhas,
cava trincheiras,
ergue barricadas.
Defendendo o que pensa saber
levanta certezas na forma de muro
orgulhando-se de seu casulo.*

*Até que maduro
explode em vôos
rindo do tempo que imaginava saber
ou guardava preso que sabia.
Voa alta sua ousadia
reconhecendo o suor dos séculos
no orvalho de cada dia.*

*Mesmo o vôo mais belo
descobre um dia não ser eterno.
É tempo de acasalar:
voltar a terra com seus ovos
à espera de novas e prosaicas lagartas.*

*O conhecimento é assim:
ri de si mesmo
e de suas certezas.
É meta da forma,
metamorfose,
movimento,
fluir do tempo
que tanto cria como arrasa*

*a nos mostrar que para o vôo
é preciso tanto o casulo
como a asa.*

Mauro Iasi

Aos meus pais, **Rubem e Fátima**, por serem os melhores pais do mundo, por todo o carinho e pelo apoio incondicional em todas as etapas desta trajetória;

Aos meus queridos irmãos, **Alessandro e Denise**, por serem amigos sempre presentes;

Ao meu namorado, **Ricardo**, por tornar minha vida mais alegre e cheia de sonhos.

Amo vocês....Obrigada por tudo

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa**, pelo exemplo de força e determinação e, sobretudo, por ultrapassar os limites da universidade e se tornar uma grande amiga.

Palavras são pouco para agradecer!!!

Muito Obrigada

*“O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos,
não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.
Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber,
mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente”.*

Gibran Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Frederico Ozanam Carneiro e Silva**, pela amizade e incentivo, pelos constantes conselhos e por ter me guiado até aqui;

À **Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino**, coordenadora do curso de pós-graduação, pela oportunidade e confiança depositadas em mim;

Ao **Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato**, pelos constantes ensinamentos e por todo o tempo a mim dispensado;

Ao **Prof. Dr. José Buratini Jr.**, pelo auxílio com as dosagens de progesterona e principalmente por possibilitar minha ida ao Canadá e me orientar durante este período;

Aos professores **José Roberto Kfoury Jr., Franscisco Javier Hernandez-Blazquez, Maria Angélica Miglino, Ubiratan Fabres Machado e Ciro Moraes Barros**, por terem disponibilizado seus laboratórios durante a execução dos experimentos;

Aos professores **Eduardo Birguel Jr., José Antônio Visintin e Flávio Vieira Meirelles** pela realização das cesarianas e fornecimento do material de animais clonados;

À querida amiga, **Laura**, pela companhia, pelas conversas e pela ajuda em todas as etapas deste trabalho;

Ao meu namorado, **Ricardo**, pela amizade e carinho, pela companhia durante as imuno-histoquímicas noturnas e pela super ajuda com as fotos;

Aos amigos, **Flávia e Daniel**, pelos momentos agradáveis de convivência e pela ajuda com as análises estatísticas;

Às minhas amigas, **Danylla e Flávia**, que mesmo de longe sempre torceram por mim;

À pós-doutoranda **Tatiana**, pela ajuda durante o preparo das minhas aulas de qualificação e das imuno-histoquímicas;

Ao pós-graduando **Andrey Teixeira Borges**, pelo tempo disponibilizado e fundamental apoio durante as dosagens de progesterona;

A todos que auxiliam durante as coletas e processamento do material: **Carlos Eduardo (Cadu), Flávia (Flavinha), Fernando, Eduardo, Carolina, LÍlian, Janaína, Alex e Lisa Margareth;**

Ao **Frigorífico Mantiqueira**, pela colaboração na obtenção do material desta pesquisa;

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

Aos funcionários do Departamento, **Maicon, Jaqueline e Gracieva**, pela simpatia e auxílio durante todo esse período;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa;

A todos os colegas de pós-graduação com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

Muito Obrigado

RESUMO

CAMPOS, D. B. **Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura.** [Immunolocalization of VEGF, bFGF and their receptors in the bovine placenta and influence of these growth factors on progesterone production from placental cells in culture]. 2005. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O estabelecimento e perfeito funcionamento da placenta são fatores dependentes da intensa vascularização ocorrida no órgão. Os processos de vasculogênese e angiogênese placentária são modulados por diversos fatores, incluindo o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico). Apesar da importância do VEGF e bFGF durante a vascularização estar estabelecida, vários estudos indicam a participação desses fatores de crescimento como moduladores locais em outras funções fisiológicas, como por exemplo o controle da produção hormonal em tecidos esteroideogênicos. Animais clonados podem apresentar alterações na expressão de determinados genes durante seu desenvolvimento, o que pode alterar a função placentária. Os objetivos deste estudo são determinar a localização tecidual do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e avaliar a influência destes fatores de crescimento sobre a produção de progesterona placentária em bovinos não clonados e clonados. Placentomas de 90, 150 e 210 dias de gestação foram obtidos em abatedouro e placentônios de gestações aos 270 dias provenientes de bovinos clonados e não clonados foram coletados após cesarianas. As amostras foram fixadas em formol tamponado 4%, desidratadas e incluídas em parafina. Cortes foram submetidos a imuno-histoquímica para posterior localização das proteínas do VEGF, bFGF e seus receptores. Sob condições assépticas, as

células foram mecanicamente dispersas e cultivadas em placas de 96 cavidades. Os fatores foram adicionados em concentrações de 10 e 50 ng/ml de bFGF e VEGF, respectivamente. Amostras de meio de cultura e as células dos grupos controle, bFGF, VEGF e VEGF mais bFGF foram coletadas 24, 48 e 96 horas após a adição dos fatores. A progesterona foi dosada por radioimunoensaio e o conteúdo protéico pelo método de Lowry. Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System), as diferenças estatísticas encontradas foram comparadas pelo teste de variação múltipla de Duncan. O VEGF, bFGF e seus receptores foram localizados em células do epitélio e estroma maternos e fetais e células endoteliais vasculares em bovinos não clonados e clonados. As células placentárias apresentaram diferentes capacidades de síntese de progesterona ao longo da gestação. Aos 90 e 210 dias de gestação o VEGF estimulou a produção de progesterona, enquanto aos 270 dias de gestação o fator inibiu a produção deste hormônio. O bFGF estimulou a produção de progesterona pelas células placentárias aos 90 dias de gestação. A adição dos dois fatores de crescimento conjuntamente determinou um estímulo na produção de progesterona aos 210 dias de gestação. A produção de progesterona pelas células de bovinos clonados foi semelhante àquela observada em células de bovinos não clonados na mesma idade gestacional e os fatores de crescimento não influenciaram essa produção. Conclui-se que o VEGF e bFGF, atuando localmente no tecido placentário, funcionam como moduladores do processo de esteroidogênese, influenciando de maneira tempo-dependente a produção de progesterona deste órgão.

Palavras-chave: Fatores de crescimento. Hormônios progestacionais. Imuno-histoquímica. Cultura de células. Placenta.

ABSTRACT

CAMPOS, D. B. **Immunolocalization of VEGF, bFGF and their receptors in the bovine placenta and influence of these growth factors on progesterone production from placental cells in culture.** [Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura]. 2005. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Placental establishment and function are dependent on intense vascularization. Placental vasculogenesis and angiogenesis are modulated by several factors, including VEGF (vascular endothelial growth factor) and bFGF (basic fibroblast growth factor). Although the role of VEGF and bFGF during vascularization is already well established, some studies have indicated the participation of these growth factors as local modulators in other physiological functions, such as control of hormonal production in steroidogenic tissues. Cloned animals may exhibit alterations in gene expression during development modifying placental function. The aims of this study are to determine the tissue localization of VEGF, bFGF and their receptors in the bovine placenta and to evaluate the influence of bFGF and VEGF on placental progesterone production in non-cloned and cloned bovines. Placentomes from days 90, 150 and 210 of pregnancy were obtained at local slaughterhouse and placentomes from cloned and non-cloned gestations at 270 days were obtained after cesarean sections. Samples were fixed in 4% buffered formol solution, dehydrated and included in paraffin. Sections were submitted to immunohistochemistry for subsequent localization of VEGF, bFGF and their receptors proteins. Under aseptic conditions, cells were mechanically dispersed and then cultivated in a 96-well plate. Growth factors were added at concentrations of 10 and 50 ng/ml for bFGF and VEGF, respectively. Samples of

culture medium and cells from control, bFGF, VEGF and bFGF plus VEGF groups were collected 24, 48 and 96 hours after growth factor addition. Progesterone concentrations were assessed by radioimmunoassay and protein content was measured by Lowry's method. Data were analyzed by SAS (Statistical Analysis System) program, significant differences were compared by Duncan's range multiple test. VEGF, bFGF and their receptors were localized in maternal and fetal epithelial and stromal cells and vascular endothelial cells during pregnancy in non-cloned animals and in cloned bovine placenta at 270 days of pregnancy. Bovine placental cells were able to produce different amounts of progesterone during pregnancy. Growth factors were able to influence progesterone production in placental cells only after 24 hours in culture. At 90 and 210 days of pregnancy VEGF stimulated progesterone production, while at 270 days of pregnancy the growth factor inhibited production of this hormone. bFGF stimulated progesterone production in placental cells from 90 days of pregnancy. Both growth factors together determined an increase in progesterone production in placental cells from 210 days of pregnancy. Progesterone production in placental cells from cloned cattle is similar when compared with non-cloned placental cells at the same gestational age and growth factors did not influence progesterone production in these cells. VEGF and bFGF, acting locally in the placental tissue, are modulators of the steroidogenic process, influencing in a time-dependent manner the progesterone production in this organ.

Key Words: Growth Factors. Progestational hormones. Immunohistochemistry. Cell culture. Placenta.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Camadas teciduais da barreira materno-fetal da placenta sinepiteliocorial dos bovinos, identificando-se o processo de fusão das células binucleadas ao epitélio uterino (*). Vm. vaso materno; TCm. tecido conectivo materno; TCf. tecido conectivo fetal; Vf. vaso fetal. Adaptado de Leiser e Kaufmann (1994) 41
- Figura 2 - Arranjo das vias sanguíneas fetal (setas brancas) e materna (setas pretas) nos diferentes tipos de fluxos sanguíneos placentários. 1. concorrente; 2. multiviloso; 3. corrente cruzada; 4. contracorrente. Adaptado de Leiser e Kaufmann (1994) 42
- Figura 3 - Desenho esquemático dos epitélios trofoblástico (1) e uterino (2) em bovinos, demonstrando os estágios de desenvolvimento da célula binucleada e formação da célula trinucleada. a. célula trofoblástica mononucleada sem contato com o epitélio uterino; b. primeira mitose acitocinética; c. célula binucleada com dois núcleos diplóides; d. segunda mitose acitocinética; e. célula binucleada com dois núcleos tetraplóides; f. início da migração celular; g. fusão com a célula do epitélio uterino e formação da célula trinucleada; h. degeneração após exocitose; i. fagocitose pela célula do epitélio trofoblástico. Adaptado de Klisch et al. (1999) 45
- Figura 4 - Principais vias da esteroidogênese. 1. StAR (steroidogenic acute regulatory protein); 2. P450scc (enzima P450 side chain cleavage); 3. 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteróide desidrogenase); 4. P450c17 α (17 α -hidroxilase/17,20-liase; 5. 17 β -HSD (17 β -hidroxiesteróide desidrogenase); 6. AROM (aromatase). Adaptado de Herrmann, Scholmerich e Straub (1997) 48
- Figura 5 - Fotomicrografias da localização da proteína do VEGF na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal VG76e. A: Controle negativo. B e C: placenta de animais não clonados aos 90 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazada) do epitélio fetal e em células do epitélio materno (seta). Barra: 50 μ m 97
- Figura 6 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor VEGFR-1 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal C-17. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50 μ m 98

- Figura 7 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor VEGFR-2 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal C-20. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50µm 99
- Figura 8 - Fotomicrografias da localização da proteína do bFGF na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal bFM-2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação nuclear positiva para o fator de crescimento em células do estroma materno (seta vazia) e a reação citoplasmática positiva em células do epitélio materno (seta) e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50µm 101
- Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-1 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal 19B2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática e nuclear positiva para a proteína em células binucleadas do epitélio fetal (ponta de seta) e em células do epitélio materno (seta), a reação citoplasmática positiva em células mononucleadas do epitélio fetal (ponta de seta vazada) e a reação nuclear positiva em célula do estroma materno (seta vazada). Barra: 50µm 102
- Figura 10 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-2 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-FGFR-2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática e nuclear positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) do epitélio fetal. Barra: 50µm 103
- Figura 11 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-3 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-FGFR-3. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação nuclear positiva para a proteína em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal e a reação nuclear e citoplasmática positiva em células binucleadas do epitélio fetal (seta). Barra: 50µm 104

Figura 12 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle nas diferentes idades gestacionais após 24, 48 e 96 horas de cultura. Dados representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 10$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos em cultura na mesma idade gestacional. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as idades gestacionais no mesmo tempo em cultura. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)	109
Figura 13 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF aos 90 e 150 dias de gestação. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 9$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as horas de tratamento no mesmo grupo. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)	112
Figura 14 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF aos 210 e 270 dias de gestação. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 10$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as horas de tratamento no mesmo grupo. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)	113
Figura 15 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle aos 270 dias de gestação de animais clonados e não clonados. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos em animais clonados ($n = 12$) e não clonados ($n \geq 10$). Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)	114
Figura 16 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF, bFGF + VEGF aos 270 dias de gestação em animais clonados. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos (grupos controle e bFGF: $n \geq 11$; grupos VEGF e bFGF + VEGF: $n \geq 3$). Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Formulação da solução tampão fosfato. São Paulo, 2005	91
Tabela 2 -	Formulação da solução tampão fosfato livre de íons Ca^{++} e Mg^{++} . São Paulo, 2005	92
Tabela 3 -	Formulação da solução tampão fosfato com gelatina. São Paulo, 2005	93
Tabela 4 -	Formulação da solução tampão de homogeneização. São Paulo, 2005	93
Tabela 5 -	Porcentagem de viabilidade celular das células placentárias bovinas em diferentes idades gestacionais e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005.....	105
Tabela 6 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005.....	106
Tabela 7 -	Conteúdo proteico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005.....	107
Tabela 8 -	Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em diferentes idades gestacionais de animais não clonados. São Paulo, 2005	108
Tabela 9 -	Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais. São Paulo, 2005.....	110
Tabela 10 -	Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF ao 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	81
Quadro 2 -	Protocolo para dosagem de progesterona.....	86
Quadro 3 -	Protocolo para dosagem de proteína.....	88
Quadro 4 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	176
Quadro 5 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	177
Quadro 6 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	178
Quadro 7 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	179
Quadro 8 -	Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	180
Quadro 9 -	Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	181
Quadro 10 -	Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	182
Quadro 11 -	Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	183

Quadro 12 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	184
Quadro 13 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações os 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	185
Quadro 14 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em 3 diferentes experimentos aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	186
Quadro 15 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	187
Quadro 16 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	188
Quadro 17 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	189
Quadro 18 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas.....	190
Quadro 19 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados e não clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	191
Quadro 20 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 2 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas	192
Quadro 21 - Produção de progesterona total (ng/mg) por grupo experimental (Controle, bFGF, VEGF e bFGF + VEGF) em 3 diferentes experimentos de gestações aos 90, 150, 210 e 270 dias em animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados	193

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	proteína ativadora
APES	3-aminopropiltietroxi-silano
AROM	aromatase
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
bPAG	glicoproteínas associadas à gestação
CL	Corpo Lúteo
DHEA	17OH-pregnenolona dehidroepiandrosterona
D-MEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DNA	ácido desoxirribonucléico
EPM	erro padrão médio
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGFR	receptor para o fator de crescimento fibroblástico
Flt	Fms-like tyrosine kinase
FSH	hormônio folículo estimulante
GLM	general linear models
HSD	hidroxiesteróide desidrogenase
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IL	interleucina
KDR	kinase insert domain containing receptor
LH	hormônio luteinizante
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
P450c17 α	17 α hidroxilase/17,20-liase

P450scc	P450 side chain cleavage
PBS	solução tampão fosfato
PBS-G	solução tampão fosfato com gelatina
PGF2 α	prostaglandina 2 α
PGI ₂	prostaciclina
PIGF	fator de crescimento placentário
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SAS	statistical analysis system
SERBP	sterol regulatory element binding
SREs	sterol regulatory elements
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TGF	fator de crescimento tumoral
TNF	fator de necrose tumoral
TSH	hormônio tireóide estimulante
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR	receptor para o fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos específicos	31
3 REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1 Placenta	34
3.2 Placentação	35
3.2.1 Desenvolvimento das membranas fetais	35
3.2.2 Placentação nos bovinos	37
3.3 Classificação placentária	38
3.3.1 Quanto ao tipo e origem de membranas placentárias	38
3.3.2 Quanto à forma e ao modelo de interdigitação materno-fetal	38
3.3.3 Quanto às camadas teciduais da barreira materno-fetal	40
3.3.4 Quanto à inter-relação do fluxo sanguíneo materno-fetal	41
3.3.5 Outras classificações	43
3.4 Células trofoblásticas	43
3.4.1 Células trofoblásticas binucleadas	44
3.5 Esteroidogênese	47
3.5.1 Esteroidogênese na placenta	49
3.5.1.1 Síntese de progesterona	50
3.5.1.2 Síntese de estrógenos	52
3.6 Vasculogênese e angiogênese	54
3.6.1 Vasculogênese e angiogênese na placenta	55
3.7 Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	57
3.8 Receptores para VEGF	61
3.9 Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)	67
3.10 Receptores para bFGF	71
3.11 Fatores de crescimento e a esteroidogênese	73
3.12 Bovinos clonados	75
4 MATERIAL E MÉTODO	77
4.1 Preparo do material para imunohistoquímica	78
4.1.1 Imunohistoquímica para VEGF, bFGF e seus receptores	79

4.2 Preparo da cultura celular	81
4.2.1 Separação celular	82
4.2.2 Concentração e viabilidade celular	82
4.2.3 Cultivo celular	83
4.3 Adição do bFGF e VEGF	83
4.4 Coleta das amostras	84
4.5 Dosagem da Progesterona	85
4.5.1 Preparo da curva padrão, reagentes e controles	85
4.5.2 Radioimunoensaio	86
4.5.3 Análise dos ensaios	87
4.6 Dosagem da Proteína	87
4.6.1 Preparo da curva padrão	88
4.6.2 Ensaio	88
4.7 Análise estatística	89
4.8 Soluções e Reagentes	90
4.8.1 Solução citrato 10 mM	90
4.8.2 Solução tampão fosfato (PBS)	91
4.8.3 Solução tampão fosfato livre de íons Ca^{++} e Mg^{++}	91
4.8.4 Solução de Trypan Blue	92
4.8.5 Solução tampão fosfato com gelatina (PBS-G)	92
4.8.6 Solução tampão de homogeneização (TH)	93
4.8.7 Reativo para dosagem de proteína	93
5 RESULTADOS	95
5.1 Imunolocalização do VEGF e seus receptores	96
5.2 Imunolocalização do bFGF e seus receptores	100
5.3 Efeitos do VEGF e bFGF sobre a produção de progesterona pelas células placentárias bovinas em cultura	105
5.3.1 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas de animais não clonados nas diferentes idades gestacionais	108
5.3.2 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas tratadas com os fatores de crescimento nas diferentes idades gestacionais em animais não clonados	110

5.3.3 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas de animais clonados aos 270 dias de gestação	114
5.3.4 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas tratadas com os fatores de crescimento aos 270 dias de gestação em animais clonados	115
6 DISCUSSÃO	118
7 CONCLUSÕES	142
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICES	175

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão temporário, cuja função está relacionada à execução das trocas de substâncias entre mãe e feto (EVAIN-BRION; MALASSINE, 2003; MALASSINE; FRENDON; EVAIN-BRION, 2003) e à proteção do feto, semi-alógeno, contra o sistema imune materno (WOODING; FLINT, 1994) e contra a penetração de agentes infecciosos e tóxicos (SLOSS; DUFTY, 1980). A placenta funciona ainda como um órgão endócrino, produzindo hormônios que participam da manutenção da gestação e bem-estar fetal (MALASSINE; FRENDON; EVAIN-BRION, 2003).

O estabelecimento, crescimento e adequado funcionamento da placenta são fatores determinantes para o sucesso da gestação e dependem de intensa formação vascular ocorrida no endométrio e membranas fetais (REYNOLDS; REDMER, 1995). Durante a vascularização placentária dois processos de formação vascular podem ser distintos: a vasculogênese (desenvolvimento capilar a partir da diferenciação de células precursoras de origem mesenquimal) e a angiogênese (desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existent) (YLLERA; ALEXANDRE-PIRES; CIFUENTES, 2003), fenômenos modulados pelo balanço entre fatores estimuladores e inibidores (FOLKMAN; SHING, 1992; REYNOLDS; REDMER, 1995). Embora várias proteínas estejam envolvidas na modulação destes processos, os fatores de crescimento das famílias VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e FGF (fator de crescimento fibroblástico) e seus respectivos receptores são identificados como

os mais importantes mediadores da neovascularização placentária (REYNOLDS; REDMER, 2001).

Além da participação do VEGF e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) nos processos de neovascularização, estudos demonstraram a presença destes fatores e seus receptores em diversas células placentárias e não somente em células endoteliais, sugerindo a participação do VEGF e bFGF na modulação de outros eventos ocorridos na placenta durante a gestação (PFARRER et al., 2003; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). A importância destes fatores de crescimento como agentes moduladores autócrinos e parácrinos de funções teciduais no ovário também tem sido demonstrada por diversos pesquisadores (BERISHA; SINOWATZ; SCHMAS, 2004; GREENAWAY et al., 2004; OTANI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1997).

A atividade endócrina da placenta, incluindo a produção de estrógenos e progestágenos, obedece a uma fina regulação, ainda não totalmente esclarecida. Até o momento não existem estudos sobre a possível influência dos fatores de crescimento VEGF e bFGF na esteroidogênese placentária. Sabe-se, por exemplo, que estes fatores de crescimento são capazes de influenciar a secreção *in vitro* de hormônios esteróides em células luteínicas (GRASSELLI et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2001; LI; JOHNSON, 1993; VERNON; SPICER, 1994; YAMOTO; SHIKONE; NAKANO, 1993) e testiculares (FAUSER; BAIRD; HSUEH, 1988; MURONO; WASHBURN, 1990; RAESIDE et al., 1988; SORDOILLET et al., 1992). No entanto, não está esclarecido até o presente se esta influência se dá de maneira direta, ou seja, no mecanismo de síntese de esteróides ou se acontece

através da ativação de outros mecanismos celulares que estejam ligados indiretamente à esteroidogênese.

As potenciais aplicações da clonagem animal tem grande importância comercial e social (STICE et al., 1998; WALL; KERR; BONDIOLI, 1997). A clonagem surge como uma maneira mais eficiente e rápida para a produção, por exemplo, de fetos transgênicos utilizados em terapias celulares, animais adultos para a produção de proteínas, órgãos para xenotransplantes (STICE et al., 1998) e geração de produtos farmacêuticos para o tratamento humano (WALL; KERR; BONDIOLI, 1997).

Embora a clonagem seja empregada em diversas espécies animais, suas aplicações são restritas devido a limitações no potencial de desenvolvimento dos embriões resultantes (YOUNG; FAIRBURN, 2000). Até o momento, o processo de clonagem é considerado ineficiente e apresenta altas taxas de mortalidade durante a gestação e após o nascimento (HEYMAN et al., 2002; HILL et al., 1999, 2000). As perdas iniciais e tardias destes animais relacionam-se principalmente a alterações no processo de reprogramação nuclear (KONO, 1998; YOUNG; FAIRBURN, 2000), que determinam diferentes padrões de expressão de determinados genes (NIEMANN et al., 2002).

Com o conhecimento de possíveis fatores envolvidos na regulação da esteroidogênese placentária e caracterização mais específica dos mecanismos envolvidos nesta regulação, questões importantes referentes a perdas embrionárias, abortos e insuficiência placentária poderão ser melhor esclarecidas.

Adicionalmente, as recentes perspectivas positivas relacionadas ao uso terapêutico do VEGF e bFGF, seja através da terapia gênica ou da administração da proteína recombinante (MASAKI et al., 2002; STORKEBAUM et al., 2005; ZHENG et al., 2004), tornam justificáveis e de grande importância os estudos relacionados ao esclarecimento das funções biológicas relacionadas a estes fatores.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho hipotetizou que a localização de receptores para bFGF e VEGF em células placentárias bovinas relacionadas à esteroidogênese determina a influência destes fatores de crescimento sobre a produção de progesterona neste órgão.

2.1 Objetivos específicos

- determinar, por meio da técnica de imuno-histoquímica, a localização tecidual do VEGF e seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) e do bFGF e seus receptores (FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3) na placenta bovina de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação e aos 270 dias em animais clonados;
- determinar a produção de progesterona e o conteúdo protéico das células placentárias de bovinos não clonados em cultura durante as diferentes idades gestacionais;
- avaliar se os fatores de crescimento bFGF e VEGF influenciam a produção de progesterona destas células;

- determinar a produção de progesterona e conteúdo protéico de células placentárias aos 270 dias de gestação de animais clonados sob as mesmas condições de cultivo e comparar com a produção obtida na mesma idade gestacional em animais não clonados;
- avaliar se os fatores de crescimento bFGF e VEGF influenciam a produção de progesterona destas células e comparar com a produção obtida em células placentárias de animais não clonados na mesma idade gestacional.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura são abordados temas referentes à organogênese placentária e às características estruturais deste órgão nos bovinos, bem como aos aspectos relacionados a vasculogênese, angiogênese e esteroidogênese placentária. Em seguida, são apresentados dados relacionados aos fatores de crescimento VEGF e bFGF e seus receptores e a relação destes fatores com a esteroidogênese. Por último são relatadas as principais características relacionadas à placentação nos bovinos clonados.

3.1 Placenta

A placenta pode ser definida como a íntima aposição ou fusão das membranas fetais aos tecidos maternos com a finalidade de executar trocas fisiológicas (MOSSMAN, 1937). Através deste órgão é realizado o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos entre os sistemas materno e fetal (REYNOLDS; REDMER, 2001). Além disso, a placenta desempenha as funções endócrinas, produzindo hormônios protéicos e esteróides essenciais no processo de comunicação materno-fetal durante o período de gestação, bem como é capaz de proteger o feto, geralmente alogênico, contra o sistema imune materno

(MALASSINE; FREND; EVAIN-BRION, 2003; WOODING; FLINT, 1994) e contra a penetração de agentes infecciosos e tóxicos (SLOSS; DUFTY, 1980).

3.2 Placentação

A forma com que as membranas fetais se desenvolvem e se associam ao endométrio é definida como placentação (BJÖRKMAN, 1976). Durante este processo quatro estruturas membranosas fetais estão envolvidas: cório, âmnio, saco vitelino e alantóide (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.2.1 Desenvolvimento das membranas fetais

A fusão dos gametas feminino e masculino resulta na formação do zigoto (BJÖRKMAN, 1976), o qual após sucessivas divisões mitóticas (estágio de mórula), desenvolve uma cavidade central (blastocelo) atingindo o estágio de blastocisto (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000).

Inicialmente, o blastocisto é uma estrutura unilaminar caracterizada pela presença da massa celular interna, circundada por uma parede composta inteiramente por células ectodérmicas, denominada de trofoblasto (SLOSS; DUFTY, 1980). A massa celular interna e o trofoblasto constituem duas populações celulares especializadas que originam, respectivamente, o embrião e os componentes fetais da placenta (RAMSEY, 1982).

Em um estágio subsequente, a associação de uma camada endodérmica ao trofoblasto delimita o saco vitelino primário. Pouco depois, uma camada de mesoderma se desenvolve entre o endoderma e o trofoblasto, tornando o blastocisto uma estrutura trilaminar (RAMSEY, 1982). As células da camada mesodérmica proliferam (SLOSS; DUFTY, 1980) e, durante esse processo, surgem pequenas cavidades no interior desta camada, que ao se associarem originam o exoceloma (RAMSEY, 1982). Durante a formação do exoceloma, uma camada externa e avascular de mesoderma se associa ao trofoblasto dando origem ao cório (RAMSEY, 1982), que posteriormente se tornará vascularizado (LEISER; KAUFMANN, 1994). Além disso, uma camada vascular de mesoderma se associa ao endoderma, compondo a parede definitiva do saco vitelino (RAMSEY, 1982), estrutura anexa ao intestino médio embrionário (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide se desenvolve a partir do endoderma do intestino terminal embrionário, sendo circundado por mesênquima ricamente vascularizado. O âmnio é uma camada epitelial derivada do ectoderma embrionário, que como o cório, obtém suporte mesenquimal, porém permanece avascular (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.2.2 Placentação nos bovinos

O primeiro estágio do desenvolvimento placentário nos mamíferos é marcado pela formação de uma placenta coriônica (LEISER; KAUFMANN, 1994), inicialmente avascular, que apresenta funções somente quando as rotas de transporte são curtas (BJÖRKMAN, 1976). A nutrição do embrião nesta fase se dá somente de maneira histotrófica (RAMSEY, 1982). O aumento da demanda de substâncias necessárias ao desenvolvimento do embrião implica na necessidade de um eficiente sistema de transporte vascular (BJÖRKMAN, 1976), através do qual nutrientes hemotróficos possam atingir a circulação fetal (WOODING; FLINT, 1994). A conexão da membrana coriônica à circulação fetal é dada através da vascularização desta por capilares vitelinos e/ou alantoideanos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Nos bovinos, o período inicial de gestação é caracterizado pela presença de uma placenta vitelina funcional, no entanto, esta é rapidamente substituída pela formação da placenta corioalantoideana (BJÖRKMAN, 1976). Posteriormente, o saco vitelino sofre um processo de degeneração (BJÖRKMAN, 1976) e regressão (SLOSS; DUFTY, 1980), apresentando-se como um resquício no final da gestação (WOODING; FLINT, 1994).

3.3 Classificação placentária

Os tipos placentários podem ser classificados em níveis complementares que refletem diversas características placentárias, tais como, a origem e tipo das membranas, forma, interdigitação materno-fetal, camadas teciduais da barreira materno-fetal, inter-relação do fluxo sanguíneo materno-fetal, invasão trofoblástica e reação de decidualização celular, formação de sinciotrofoblasto e separação placentária ao nascimento (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.3.1 Quanto ao tipo e origem de membranas placentárias

A placenta definitiva dos bovinos é do tipo corioalantoideana, na qual a membrana coriônica é conectada à circulação fetal pelos vasos alantoideanos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.3.2 Quanto à forma e ao modelo de interdigitação materno-fetal

Nas placentas dos mamíferos o aumento da área de contato entre as superfícies materna e fetal ocorre pela formação de interdigitações entre ambos os tecidos (LEISER; KAUFMANN, 1994). Os locais e a forma com que estas

interdigitações ocorrem podem ser classificadas quanto a sua morfologia (macro e microscopicamente) (KAUFMANN; BURTON, 1994).

Na placenta cotiledonária dos bovinos (BJÖRKMAN, 1976; LEISER; KAUFMANN, 1994) estas áreas de interação materno-fetal se tornam mais intensas em pontos especializados, onde áreas não glandulares pré-formadas do endométrio (carúnculas) associam-se com a membrana corioalantoideana (cotilédone fetal) formando estruturas denominadas placentomas (KAUFMANN; BURTON, 1994; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). Laven e Peters (2001) descrevem que o perfeito desenvolvimento do placentoma é essencial para o crescimento e desenvolvimento fetal.

As áreas intercotiledonárias são relativamente menos vascularizadas e formadas pela associação microvilar do endométrio a uma membrana corioalantoideana lisa (BJÖRKMAN, 1976; KAUFMANN; BURTON, 1994; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). Nestas áreas podem ser encontradas aréolas, pequenas áreas onde o corioalantóide circunda glândulas uterinas (WOODING; FLINT, 1994) e a nutrição histotrófica pode ser observada, ou seja, as células trofoblásticas absorvem as secreções glandulares através da fagocitose ou pinocitose (RAMSEY, 1982). Tanto o corioalantóide cotiledonar como intercotiledonar tem função no suprimento hemotrófico das crescentes demandas metabólicas fetais (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000), no entanto, a área intercotiledonária representa menos de 2% da área total de trocas no final da gestação (WOODING; FLINT, 1994). Além disso, ambas as áreas têm papel

funcional essencial na síntese protéica, produção de hormônios e fatores de crescimento (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000).

O tipo de interdigitação materno-fetal determina o padrão geométrico em que os tecidos maternos e superfícies fetais estão espacialmente arranjados para formar a placenta (LEISER; KAUFMANN, 1994). Nos bovinos a placentação é do tipo vilosa, onde o componente fetal desenvolve projeções vilosas que se interdigitam com as criptas uterinas correspondentes (BJÖRKMAN, 1976).

3.3.3 Quanto às camadas teciduais da barreira materno-fetal

As placentas dos mamíferos podem ainda ser classificadas quanto ao tipo e número de camadas teciduais que separam as circulações materna e fetal. Nos bovinos a condição sinepiteliocorial é similar a epiteliocorial, na qual seis camadas (endotélio materno, tecido conectivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conectivo fetal, endotélio fetal) podem ser identificadas separando as circulações. Entretanto, algumas células trofoblásticas (células binucleadas) se fundem às células do epitélio uterino entrando em contato com o tecido conectivo materno (LEISER; KAUFMANN, 1994) (Figura 1).

Figura 1 - Camadas teciduais da barreira materno-fetal da placenta sinepiteliocorial dos bovinos, identificando-se o processo de fusão das células binucleadas ao epitélio uterino (*). Vm. vaso materno; TCm. tecido conectivo materno; TCf. tecido conectivo fetal; Vf. vaso fetal. Adaptado de Leiser e Kaufmann (1994)

3.3.4 Quanto à inter-relação do fluxo sanguíneo materno-fetal

Os vasos maternos na placenta se originam a partir da vasculatura uterina, enquanto a porção fetal recebe a irrigação sanguínea inteiramente através das artérias umbilicais (WOODING; FLINT, 1994). Durante a gestação dos bovinos, ocorrem a ramificação e organização progressiva das artérias carunculares e cotiledonares nos compartimentos materno e fetal, promovendo a configuração das criptas e vilos primários, secundários e terciários. A arquitetura vascular placentária mostra-se totalmente desenvolvida a partir do sexto mês de gestação (PFARRER et al., 2001). A drenagem da porção materna da placenta é realizada

por veias uterinas, enquanto a drenagem da porção fetal é realizada pelas veias umbilicais (WOODING; FLINT, 1994).

A direção do microfluxo sanguíneo materno-fetal pode influenciar de maneira importante as trocas de substâncias entre mãe e feto. Vários arranjos podem ser identificados, desde o tipo concorrente, no qual os fluxos sanguíneos materno e fetal fluem no mesmo sentido, até o mais eficiente sistema de contracorrente, no qual os fluxos se encontram em direções opostas. Os demais sistemas de fluxos, multiviloso e de corrente cruzada, ocupam posições intermediárias entre os fluxos concorrente e contracorrente em relação à eficiência de trocas materno-fetais (KAUFMANN; BURTON, 1994) (Figura 2). Nos bovinos, o microfluxo sanguíneo pode ser classificado como contracorrente no início da gestação, passando para o modelo de corrente cruzada quando as unidades placentárias terciárias se desenvolvem (PFARRER et al, 2001).

Figura 2 - Arranjo das vias sanguíneas fetal (setas brancas) e materna (setas pretas) nos diferentes tipos de fluxos sanguíneos placentários. 1. concorrente; 2. multiviloso; 3. corrente cruzada; 4. contracorrente. Adaptado de Leiser e Kaufmann (1994)

3.3.5 Outras classificações

Quanto à formação de sinciotrofoblasto, de acordo com Leiser e Kaufmann (1994) as células binucleadas podem ser consideradas como sinciotrofoblastos primitivos, havendo pouca invasão trofoblástica, sem reação de decidualização das células endometriais. Segundo os autores, no momento do parto ocorre a separação placentária na zona de contato materno-fetal, sendo que pouco tecido materno é liberado juntamente com a placenta fetal (placentação adecíduada).

3.4 Células trofoblásticas

O mesênquima vascular dos vilos fetais se encontra recoberto por uma simples camada de células trofoblásticas (BJÖRKMAN, 1976). De acordo Schlafer, Fisher e Davies (2000) podem ser identificados dois tipos de células trofoblásticas morfolologicamente distintos com subpopulações funcionalmente diferentes.

As células trofoblásticas mononucleadas compõem a maior parte do epitélio trofoblástico e entre estas podem ser identificadas duas populações com fenótipos fagocíticos; uma associada aos órgãos hematófagos e responsáveis pela fagocitose de eritrócitos maternos acumulados nas superfícies dos tecidos

endometrial e corioalantoideano e outra associada às aréolas presentes no corioalantóide intercotiledonário (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). As células binucleadas representam o segundo tipo celular presente na placenta bovina, sendo também possível a identificação de populações funcionalmente distintas (cotiledonárias e intercotiledonárias), que embora sejam ultraestruturalmente indistinguíveis, apresentam consideráveis diferenças quanto à expressão de glicoproteínas (WOODING et al., 1996).

3.4.1 Células trofoblásticas binucleadas

As células binucleadas fetais constituem de 15 a 20% do epitélio trofoblástico que recobre a superfície dos vilos da placenta bovina e estão diretamente envolvidas na modificação do epitélio uterino, que tem início no período de implantação e permanece até o final da gestação (WOODING, 1992).

As células binucleadas cotiledonárias e intercotiledonárias se originam a partir de células mononucleares do epitélio trofoblástico (WOODING, 1992; WOODING; MORGAN; ADAM, 1997; WOODING et al., 1996). Estas células não estão em contato com o epitélio uterino e sofrem duas mitoses acitocinéticas, originando uma célula binucleada com dois núcleos tetraplóides (KLISCH et al., 1999). Durante seu processo de maturação, a célula binucleada desenvolve um extenso retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, responsáveis pela produção de grande número de grânulos de secreção (WOODING, 1992).

Quando maduras, estas células migram para a junção microvilar trofoblástica e fundem-se à membrana de células uterinas formando células trinucleadas híbridas (KLISCH et al., 1999; WOODING, 1992; WOODING; MORGAN; ADAM, 1997). Estas células ultrapassam inteiramente a junção microvilar, que então é restabelecida (WOODING; MORGAN; ADAM, 1997). Após a exocitose dos grânulos das células fusionadas no tecido conectivo materno (KLISCH et al., 1999; WOODING; MORGAN; ADAM, 1997), estas sofrem um processo de degeneração e são fagocitadas por células do epitélio trofoblástico (KLISCH et al., 1999) (Figura 3).

Figura 3 - Desenho esquemático dos epitélios trofoblástico (1) e uterino (2) em bovinos, demonstrando os estágios de desenvolvimento da célula binucleada e formação da célula trinucleada. a. célula trofoblástica mononucleada sem contato com o epitélio uterino; b. primeira mitose acitocinética; c. célula binucleada com dois núcleos diplóides; d. segunda mitose acitocinética; e. célula binucleada com dois núcleos tetraplóides; f. início da migração celular; g. fusão com a célula do epitélio uterino e formação da célula trinucleada; h. degeneração após a exocitose; i. fagocitose pela célula do epitélio trofoblástico. Adaptado de Klisch et al. (1999)

Nos bovinos, as células binucleadas podem ser inicialmente identificadas entre os dias 16-17 e estão presentes até o final da gestação (WOODING; WATHES, 1980). O início do processo de implantação nestes animais pode ser definido pelo início da migração e fusão das células binucleadas às células epiteliais uterinas (WOODING; FLINT, 1994). Durante o período de implantação nos bovinos, a contínua migração das células binucleadas e consequente formação e fusão de células trinucleadas dá origem a placas sinciciais, que substituem completamente o epitélio uterino (WOODING; MORGAN; ADAM, 1997). Nesta espécie, as placas sinciciais são restritas e limitadas ao período de implantação, sendo completamente substituídas pela proliferação do epitélio uterino residual de 6 a 8 dias após o início da implantação (WOODING; FLINT, 1994; WOODING; MORGAN; ADAM, 1997).

Durante a gestação, o contínuo processo de migração e fusão das células binucleadas às uterinas origina somente células trinucleadas isoladas e transitórias, que se degeneram após a liberação de seus grânulos secretórios (WOODING, 1992; WOODING; FLINT, 1994). De acordo com Gross e Williams (1988b) um declínio do número de células binucleadas no período pré-parto pode ser importante para a completa separação placentária. Estudos demonstram que o número de células binucleadas reduz-se a 5% do total de células placentárias no momento do parto, permanecendo entre 20 a 25% em animais com retenção de placenta (GROSS; WILLIAMS, 1988a). Segundo Wooding (1992) esta diminuição do número de célula binucleadas ocorre de 1 a 2 dias antes do parto.

As células binucleadas estão envolvidas na síntese e liberação de hormônios esteróides, tais como a progesterona (GROSS; WILLIAMS, 1988b; REIMERS; ULLMANN; RANSEL, 1985; ULLMANN; REIMERS, 1989), estradiol-17 β e estrona (MATAMOROS et al., 1994), bem como de hormônios polipeptídicos, como o lactogênio placentário (DUELLO; BYATT; BREMEL, 1986; NAKANO et al., 2001, 2002; WOODING; BECKERS, 1987). Estudos demonstram ainda que estas células sintetizam prostanóides, incluindo a prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (REIMERS; ULLMANN; RANSEL, 1985) e proteínas não hormonais como as glicoproteínas bovinas associadas à gestação (bPAG) (GREEN et al., 2000; NAKANO et al., 2001; XIE et al., 1994; ZOLI et al., 1992).

3.5 Esteroidogênese

De acordo com Norman e Litwack (1997) o processo de biosíntese dos hormônios esteróides ocorre em diversos tecidos incluindo o córtex adrenal, ovários, testículos e a placenta. A produção dos hormônios esteróides tem início com o colesterol, envolvendo o transporte deste substrato do citoplasma para a membrana mitocondrial interna, o qual é regulado pela proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (HERRMANN; SCHOLMERICH; STRAUB, 2002). A conversão do colesterol em pregnenolona e então em progesterona é uma etapa comum nas diversas vias de formação dos hormônios esteróides. A partir de então podem ser identificadas duas vias pelas quais pode ser produzida a testosterona: as vias Δ^5 e Δ^4 . Na via Δ^5 a pregnenolona é

convertida em 17OH-pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediol, enquanto na via Δ^4 a pregnenolona é convertida em progesterona, 17OH-progesterona e androstenediona. Os esteróides intermediários na via Δ^5 podem ser convertidos para o esteróide correspondente na via Δ^4 por oxidação enzimática. A conversão da androstenediona e testosterona dá origem, respectivamente, a estrona e ao estradiol (NORMAN; LITWACK, 1997) (Figura 4).

Figura 4 - Principais vias da esteroidogênese. 1. StAR (steroidogenic acute regulatory protein); 2. P450scc (enzima P450 side chain cleavage); 3. 3β-HSD (3β-hidroxiesteróide desidrogenase); 4. P450c17α (17α-hidroxilase/17,20-liase; 5. 17β-HSD (17β-hidroxiesteróide desidrogenase); 6. AROM (aromatase). Adaptado de Herrmann, Scholmerich e Straub (1997)

3.5.1 Esteroidogênese na placenta

Na maioria dos mamíferos vivíparos, o estabelecimento e a manutenção da gestação envolvem a modulação por hormônios esteróides. Durante a gestação, o corpo lúteo e a placenta representam as duas maiores fontes de progesterona, que, em conjunto com os estrógenos e outros hormônios, atua na manutenção de um adequado balanço fisiológico do período gestacional e do parto (GEISERT; CONLEY, 1998). De acordo com Norman e Litwack (1997) a atividade esteroidogênica na placenta bovina envolve a síntese de progestágenos, andrógenos e estrógenos.

A esteroidogênese na placenta bovina difere daquela observada em outros tecidos por não ser modulada por nucleotídeos cíclicos como mensageiros intracelulares (SHEMESH et al., 1989; ULLMANN; REIMERS, 1989). Estudos demonstram que o Ca^{++} atua como mensageiro na sinalização do estímulo esteroidogênico (SHEMESH et al., 1989; ULLMANN; REIMERS, 1989), que é também modulado pela proteína quinase C (SHALEM et al., 1988; SHEMESH et al., 1989) e calmodulina (SHEMESH et al., 1988; ULLMANN; REIMERS, 1989). Além disso, de acordo com Reimers, Ullmann e Hansel (1985), a esteroidogênese na placenta bovina pode ser considerada um processo autônomo, não sendo influenciada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), hormônio tireóide estimulante (TSH) ou prolactina.

3.5.1.1 Síntese de progesterona

Durante o curso da evolução da placentação nos vivíparos, a placenta e o corpo lúteo adquiriram diferentes funções na síntese e manutenção da gestação (MEYER, 1994). Em várias espécies o corpo lúteo ovariano é a única fonte de progesterona durante a gestação, mas em outras, a função luteínica declina progressivamente e a placenta torna-se a fonte primária de progesterona (GEISERT; CONLEY, 1998).

Nos bovinos, durante os estágios iniciais da gestação somente o corpo lúteo sintetiza a progesterona. Este hormônio proporciona o estabelecimento de um ambiente uterino ideal para o desenvolvimento do embrião e adesão placentária, regulando a contratilidade miometrial, bem como a receptividade uterina ao conceito e secreção endometrial necessária para o seu desenvolvimento inicial (GEISERT; CONLEY, 1998). Nesta espécie, a síntese de progesterona placentária acontece a partir dos 50-60 dias de gestação (SHEMESH et al., 1992, 1994). Entre os dias 90 e 135 da gestação pode ser observado um aumento na síntese deste hormônio pela placenta (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992), período este seguido por uma fase de decréscimo nesta produção (140 aos 180 de gestação) (SHEMESH; HANSEL; STRAUSS III, 1984). No final da gestação a síntese de progesterona placentária volta a aumentar, suprimindo as necessidades de progesterona decorrentes do decréscimo da função luteínica observado a partir do meio da gestação (SHEMESH et al., 1984).

A síntese de progesterona na placenta bovina ocorre tanto nas células do epitélio trofoblástico, sendo as células binucleadas as principais envolvidas neste processo (REIMERS; ULLMANN; HANSEL, 1985; ULLMANN; REIMERS, 1989), como nas células placentárias maternas (GROSS; WILLIAMS, 1988b; SHEMESH et al., 1989). As principais alterações na capacidade de síntese de progesterona pela placenta bovina durante o período gestacional estão envolvidas com alterações na atividade ou expressão das enzimas relacionadas a biosíntese deste hormônio (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992).

A síntese de progesterona placentária contribui marginalmente com os níveis do plasma materno e sua capacidade de manter a gestação na ausência da progesterona luteínica é restrita ao período entre os dias 180 e 250 de gestação (SCHULER et al., 1999). Recentes estudos têm indicado que a progesterona placentária teria a função de desempenhar ações biológicas locais. A localização de receptores de progesterona em células do estroma e pericitos vasculares maternos sugere que estas células estejam sob controle da progesterona placentária e não luteínica, a qual atuaria como um fator parácrino envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e função placentária (HOFFMANN; SCHULER, 2002; SCHULER et al., 1999).

A produção de progesterona pelo epitélio trofoblástico é dependente da comunicação celular, uma vez que a enzima citocromo P450scc, necessária na via de conversão do colesterol em progesterona, esta presente apenas em células mononucleadas, indicando que as células binucleadas utilizariam a pregnenolona

produzida por essas células no processo de síntese da progesterona (SHEMESH et al., 1989).

3.5.1.2 Síntese de estrógenos

Durante a fase pré-adesão, onde o concepto sofre o alongamento no interior do corno uterino, o estrógeno apresenta capacidade luteolítica, sendo observada uma pequena atividade de aromatase e uma produção insignificante de estrógenos pelo concepto (GEISERT; CONLEY, 1998). Com o desenvolvimento do corioalantóide, é observado um aumento na produção de estrógenos placentários (GEISERT; CONLEY, 1998), que podem inicialmente ser identificados nos fluídos fetais aos 33 dias de gestação e começam a aumentar na circulação materna a partir dos 70 dias (ELEY; THATCHER; BAZER, 1979). Durante a gestação, as concentrações plasmáticas maternas de estrógenos placentários excedem as de origem ovariana e estes podem exercer suas atividades continuamente por vários meses. No entanto, nenhuma atividade biológica sistêmica destes hormônios placentários pode ser expressa na presença de altos níveis de progesterona, indicando que estes apresentem funções como reguladores autócrinos e parácrinos locais durante a gestação (HOFFMANN; SCHULER, 2002).

A produção de estrógenos pode ser observada nos tecidos placentários maternos e fetais, sendo que o epitélio trofoblástico se mostra mais ativo neste

processo de síntese (GROSS; WILLIAMS, 1988b). Tanto as células mononucleadas quanto as binucleadas sintetizam estradiol e estrona *in vitro* (MATAMOROS et al., 1994), porém o principal estrógeno secretado pela placenta ao longo da gestação, com exceção da fase pré-parto, é a estrona em sua forma sulfoconjugada (HOFFMANN; GOES DE PINHO; SCHULER, 1997; HOFFMANN; SCHULER, 2002). O sulfato de estrona não tem a habilidade de ativar receptores nucleares e sua hidrólise dá origem a forma ativa da molécula (estrona), cuja ação biológica é claramente inferior a do estradiol-17 β (HOFFMANN; GOES DE PINHO; SCHULER, 1997; HOFFMANN; SCHULER, 2002).

A placenta bovina contém todas as enzimas necessárias para a síntese de estrógenos, os quais são produzidos principalmente através da via Δ^5 . Como na síntese de progesterona, a produção de estrógenos envolve a comunicação entre as células mononucleadas e binucleadas, já que as últimas não expressam a enzima P450c17 α (GEISERT; CONLEY, 1998).

A síntese de estrógenos na placenta bovina ocorre em um nível relativamente constante e basal até o período pré-parto. Neste período há um colapso na síntese de progesterona placentária e um concomitante aumento de estrógenos livres, não devido à direta conversão da progesterona em estrógeno, mas resultado de um aumento no influxo de pregnenolona na via Δ^5 , mecanismo que envolve um aumento na atividade da enzima P450c17 α (HOFFMANN; SCHULER, 2002). O aumento dos estrógenos nesta fase da gestação está relacionado à preparação do trato genital feminino para o momento do parto,

incluindo a estimulação da atividade endometrial, maturação placentária e relaxamento do canal do parto (HOFFMANN; SCHULER, 2002).

Quanto às funções dos estrógenos placentários nas fases gestacionais precedentes ao parto, recentes estudos apontam a participação destes estrógenos modulando ações placentárias locais. Hoffmann et al. (2001) demonstraram a localização paralela das enzimas estrógeno-sulfatase e estrógeno-sulfotransferase no tecido placentário. Essas enzimas catalisam reações opostas, assim os estrógenos livres podem ser inativados pela atividade sulfotransferase, enquanto a hidrólise dos estrógenos sulfoconjugados pela atividade sulfatase origina estrógenos livres e biologicamente ativos (SCHULER et al., 2002). Desta forma, com estas enzimas catalisando a sulfoconjugação e a desulfatação, os estrógenos placentários poderiam exercer suas ações localmente durante a gestação (HOFFMANN et al., 2001). A posterior imunolocalização de receptores de estrógeno em células do estroma e pericitos capilares das carúnculas maternas, reforçam a idéia de que este esteróide atue como um fator parácrino envolvido na regulação do crescimento e diferenciação placentária (SCHULER et al., 2002).

3.6 Vasculogênese e angiogênese

O crescimento de vasos sanguíneos tem papel vital durante o desenvolvimento embrionário e também em diversos processos fisiológicos e

patológicos (GOLDENBERG, 1995). Durante o processo de formação vascular podem ser relacionadas a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é caracterizada pelo desenvolvimento capilar a partir da diferenciação de células precursoras de origem mesenquimal, sendo um processo envolvido na formação dos vasos ocorrida durante a embriogênese. A angiogênese consiste na formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e, além de ser indispensável durante desenvolvimento embrionário e fetal, está envolvida em diversos processos normais e patológicos durante a vida pós-natal (DÍAZ-FLORES; GUTIÉRREZ; VARELA, 1994).

3.6.1 Vasculogênese e angiogênese na placenta

O estabelecimento de circulações funcionais materna e fetal é um dos primeiros eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e placentário (REYNOLDS; REDMER, 2001). Durante o desenvolvimento vascular da placenta podem ser identificados os processos de vasculogênese e angiogênese. A rede capilar materna se origina a partir de vasos pré-existentes no endométrio (angiogênese), enquanto que no compartimento fetal os primeiros vasos extraembrionários são formados a partir de células precursoras sanguíneas (vasculogênese) situadas no mesoderma que compõe a parede do saco vitelino e alantóide, seguido pelo contínuo crescimento destes vasos sanguíneos (angiogênese) (YLLERA; ALEXANDRE-PIRES; CIFUENTES, 2003).

Segundo Charnock-Jones, Kaufmann e Mayhew (2004), na placenta humana, a vasculogênese é o processo de formação vascular predominante na unidade feto-placentária entre os dias 21 e 32 de gestação; a partir do 32º dia até o termo, a formação vascular nos vilos placentários fetais se dá principalmente pela angiogênese. Ao longo da gestação, o desenvolvimento da vasculatura placentária ocorre em resposta aos requerimentos necessários ao crescimento e desenvolvimento do conceito (REYNOLDS; REDMER, 2001; WOODING; FLINT, 1994), gerando um meio uterino otimizado para suprir suas necessidades metabólicas (REYNOLDS; REDMER, 2001).

O crescimento vascular que acompanha a placentação determina um aumento no fluxo sanguíneo placentário (REYNOLDS; REDMER, 2001), fator determinante para o desenvolvimento fetal normal (REYNOLDS; REDMER, 1995). Estudos demonstram que aumento da resistência vascular uterina ou um fluxo sanguíneo uterino diminuído podem ser usados como apontadores de gestações de risco e estão associados com o retardo no crescimento fetal (HARRINGTON et al., 1997; NORTH et al., 1994; TRUDINGER; GILES; COOK, 1985).

Desta forma, fatores que possam influenciar os processos de vasculogênese e angiogênese ocorridos nos tecidos maternos e fetais durante a placentação e o resultante aumento nos fluxos sanguíneos uterino e umbilical, têm grande impacto no crescimento e desenvolvimento fetal e também na sobrevivência neonatal (REYNOLDS; REDMER, 1995). Recentes observações levaram à identificação das famílias do VEGF, FGF e angiopoetinas como as

principais envolvidas na regulação da vascularização placentária (REYNOLDS; REDMER, 2001).

3.7 Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

O fator de crescimento VEGF-A (VEGF) foi inicialmente isolado e purificado a partir de meio de cultura de células foliculares da pituitária de bovinos (FERRARA; HENZEL, 1989), sendo o primeiro e melhor descrito membro da família dos VEGFs, que além desta, contém diversas proteínas, incluindo o VEGF-B (OLOFSSON et al., 1996; PAAVONEN et al., 1996), VEGF-C (JOUKOV et al., 1996; PAAVONEN et al., 1996), VEGF-D (ACHEN et al., 1998), VEGF-related protein (LEE et al., 1996), fator de crescimento placentário (PIGF) (PARK et al., 1994) e o homólogo viral VEGF-E (MEYER et al., 1999; OGAWA et al., 1998).

O VEGF é um mitógeno específico para células endoteliais, estimulando a proliferação (DULL et al., 2001; LANG et al., 2001) e migração (BERNATCHEZ; SOKER; SIROIS, 1999) destas células, além de regular o desenvolvimento vascular sob condições normais (CAO et al., 2004; FRASER et al., 2000) e patológicas (DVORAK et al., 1991). O VEGF é estimulador específico da permeabilidade vascular, bem como da produção e migração das proteases produzidas pelas células endoteliais durante o processo de angiogênese

(REYNOLDS; REDMER, 2001). A proteína está ainda envolvida na modulação da linfogênese normal (CAO et al., 2004) e anormal (NAGY et al., 2002) dos tecidos.

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica (FERRARA, 1999), codificada por um único gene (HOUCK et al., 1991), cuja expressão pode ser regulada por alterações na tensão de oxigênio tecidual (CAO et al., 1996; GOLDBERG; SCHNEIDER, 1994; NOMURA et al., 1995) e inativação de fatores supressores tumorais (NEUFELD et al., 1999). Além disso, o estradiol (DABROSIN; MARGETTS; GAULDIE, 2003; ONOFRI et al., 2004), as gonadotrofinas coriônicas (BARBONI et al., 2000; GÓMEZ et al., 2003; WANG et al., 2002), citocinas e fatores de crescimento, tais como TNF- α (Fator de necrose tumoral α), TGF- α e β (fator de crescimento tumoral α e β), FGF-4, FGF-7, fator de crescimento epidermal, IL-1 α , 1 β e 6 (interleucinas 1 α , 1 β e 6) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) (ROBINSON; STRINGER, 2001) modulam a expressão do VEGF.

O gene do VEGF é constituído por 8 exons e várias formas do fator se originam deste gene por derivação alternativa (TISCHER et al., 1991). Até o momento foram identificadas seis diferentes isoformas do VEGF humano contendo 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos (ROBINSON; STRINGER, 2001). As isoformas diferem quanto ao ponto isoelétrico e habilidade de ligação com a heparina (HOUCK et al., 1991) e podem estar presentes em diferentes quantidades nos diversos tecidos (BACIC; EDWARDS; MERRILL, 1995), o que sugere papéis fisiológicos específicos para cada uma destas proteínas (HOUCK et al., 1991).

Enquanto o VEGF₁₂₁ é uma proteína ácida sem habilidade de ligação a heparina, sendo livremente difundível (PARK; KELLER; FERRARA, 1993), o VEGF₁₄₅ e VEGF₁₆₅ são proteínas básicas liberadas pelas células que se ligam com similar afinidade à heparina (POLTORAK et al., 1997); o VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ são proteínas altamente básicas que estão predominantemente associadas a proteoglicanas contendo heparina (PARK; KELLER; FERRARA, 1993) e que podem ser liberadas das superfícies celulares ou da matriz extracelular em formas solúveis e bioativas por proteases ativadas durante a remodelação tecidual (THOMAS, 1996). Quanto aos papéis fisiológicos, estudos demonstram que as proteínas VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ e VEGF₁₆₅ modulam a proliferação de células endoteliais e estão envolvidas na angiogênese, enquanto o VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ apresentam baixa atividade mitogênica. Todas as isoformas promovem a permeabilidade celular (HOUCK et al., 1991; POLTORAK et al., 1997).

De acordo com Yi et al. (1999), o VEGF tem importante papel na angiogênese e permeabilidade vascular no período de implantação embrionária. Durante a embriogênese, o VEGF atua como um mediador autócrino e parácrino, associado à angiogênese que ocorre durante os estágios embrionários iniciais e durante o desenvolvimento do cérebro, rim, músculo esquelético e diversos compartimentos mesodérmicos (AITKENHEAD et al., 1998).

No indivíduo adulto o VEGF pode ser detectado em vários órgãos, incluindo cérebro, rim, pulmão, baço, coração (BASIC; EDWARDS; MERRILL, 1995). Está ainda envolvido na resposta angiogênica da íris (TOLENTINO et al., 1996), da retina (YI et al., 1998), da córnea (CAO et al., 1996; CONNOLLY et al.,

1989; PHILLIPS et al., 1994) e dos ossos (CONNOLLY et al., 1989). A concentração anormal do fator contribui para várias condições patológicas, tais como retinopatias diabéticas, artrite reumatóide e o desenvolvimento de tumores sólidos (ROBINSON; STRINGER, 2001).

Estudos demonstram a relação espaço-temporal da expressão do VEGF e a proliferação de vasos sanguíneos que ocorrem durante o ciclo reprodutivo das fêmeas, indicando ser o VEGF um mediador do crescimento cíclico de vasos sanguíneos que ocorre no útero durante o ciclo estral (KARURI; KUMAR; MUKHOPADHYAY, 1998), da proliferação de capilares que acompanha o crescimento folicular (BERISHA et al., 2000a; OTANI et al., 1999) e da angiogênese e manutenção da função capilar no corpo lúteo (BERISHA et al., 2000b; OTANI et al., 1999).

Na placenta bovina aos 220 dias de gestação foram identificadas as proteínas contendo 120, 164 e 188 aminoácidos (correspondentes aos VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉ humanos). O VEGF₁₆₄ é a isoforma predominante no tecido placentário de origem fetal, enquanto no tecido materno é observada a predominância do VEGF₁₂₀. (MILES et al., 2004). Na placenta humana, o fator pode ser detectado em células trofoblásticas, do epitélio glandular da decídua materna e em macrófagos maternos e fetais (SHARKEY et al., 1993). Em ovinos, o VEGF é identificado em células citotrofoblásticas, epiteliais maternas e do músculo liso dos vasos maternos e fetais (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2000). Na espécie suína o fator pode ser localizado em células do músculo liso e endoteliais dos vasos maternos e fetais, células do músculo liso e do epitélio glandular

uterino e células trofoblásticas (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999). A localização da proteína no tecido placentário indica seu papel autócrino e parácrino na modulação da angiogênese coordenada e progressiva presente na placenta durante a gestação, na manutenção da integridade e do estado diferenciado dos vasos e na regulação da permeabilidade capilar (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2000; CHEUNG et al., 1995; SHARKEY et al., 1993; VONNAHME; WILSON; FORD, 2001; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001).

3.8 Receptores para VEGF

Três receptores para VEGF pertencentes à família de receptores tirosina quinase foram identificados e clonados: VEGFR-1/Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase 1) (DE VRIES et al., 1992), VEGFR-2/KDR (Kinase insert domain containing receptor) (TERMAN et al., 1992) e VEGFR-3/Flt-4 (Fms-like tyrosine kinase 4) (KAIPAINEN et al., 1995). Estes receptores são caracterizados pela presença de sete alças semelhantes à imunoglobulina em sua porção extracelular, uma região transmembrânica e um domínio tirosina quinase interrompido pela inserção da sequência quinase em sua porção intracelular (ROBINSON; STRIGER, 2001).

Os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são predominantemente expressos em células endoteliais (FERRARA, 1999) e de maneira semelhante ao observado em relação ao VEGF, alterações na tensão de oxigênio tecidual podem modular a

expressão de seus genes. Estudos demonstram que a expressão dos receptores é estimulada em condições de hipoxia *in vivo* (TUDER; FLOOK; VOELKEL, 1995), enquanto estudos *in vitro* demonstram que devido a uma regulação transcricional distinta, somente a expressão do VEGFR-1 é estimulada em condições de hipoxia (GERBER et al., 1997). A expressão do VEGFR-2 é regulada por diversos fatores: é estimulada pelo VEGF (SHEN et al., 1998) e bFGF (PEPPER; MANDRIOTA, 1998) e inibida pelo TNF- α e TGF- β (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

O receptor VEGFR-1 pode ser ativado pelo VEGF₁₆₅ (POLTORAK et al., 1997) e VEGF₁₈₉ (PLOUET et al., 1997). O VEGFR-2 é ativado pelas isoformas contendo 121, 145 e 165 aminoácidos (POLTORAK et al., 1997) e pelo VEGF₁₈₉ após sua maturação pela uroquinase (PLOUET et al., 1997). Além disso, os receptores podem ser ativados por outros membros da família VEGF, sendo o VEGFR-1 ativado pelo VEGF-B (OLOFSSON et al., 1998) e PIGF (KARKKAINEN; PETROVA, 2000) e o VEGFR-2 pelo VEGF-C (JOUKOV et al., 1996), VEGF-D (ACHEN et al., 1998) e pelo homólogo viral VEGF-E (MEYER et al., 1999; OGAWA et al., 1998).

A ligação do VEGF a seu receptor promove sua dimerização, podendo ser induzida a formação de homodímeros ou heterodímeros (VEGFR-1/VEGFR-2) (KENDALL; WANG; THOMAS, 1996; NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005), seguida pela ativação de sua atividade tirosina quinase (GERWINS; SKÖLDENBERG; CLAEISSON-WELSH, 2000). O sinal de tradução associado à ativação dos receptores não está totalmente elucidado e envolve a participação de outras proteínas como a neurofilina 1, que atua como co-receptor para o

VEGF₁₆₅ aumentando sua ligação ao VEGFR-2 e proteoglicanas contendo sulfato de heparina, que interagem com ambos os receptores (ROBINSON; STRINGER, 2001). Além disso, diferentes propriedades relacionadas ao sinal de tradução dos receptores homodímeros e heterodímeros fazem com que a eficiência deste sinal e a atividade biológica resultante sejam variáveis de acordo com o dímero formado (HUANG et al., 2001).

Após a ativação dos receptores, diversas são as vias e substratos que podem ser fosforilados. Estudos demonstram que nas várias ações mediadas pelo VEGF, proteínas da família Src podem ser ativadas (HE et al., 1999; WALTENBERGER et al., 1994), além da fosfolipase C γ 1 (GILLE et al., 2001; HE et al., 1999; HUANG et al., 2001; XIA et al., 1996), óxido nítrico sintetase e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (HE et al., 1999), proteína quinase C (XIA et al., 1996) e fosfatidilinositol 3'-quinase (GERBER et al., 1998; GILLE et al., 2001; HUANG et al., 2001).

A maior parte das respostas das células endoteliais ao VEGF, incluindo mitogênese, migração (BERNATCHEZ; SOKER; SIROIS, 1999; GILLE et al., 2001; WALTENBERGER et al., 1994), alterações na forma, reorganização do citoesqueleto (WALTENBERGER et al., 1994) e indução da permeabilidade vascular (GILLE et al., 2001; GÓMEZ et al., 2002) são mediadas pela ativação do VEGFR-2.

Ainda existem consideráveis controvérsias quanto às ações desempenhadas pelo VEGFR-1. Segundo Shibuya (2001) a ativação de um dos

produtos do gene VEGFR-1 também pode induzir sinais que controlam a proliferação celular e permeabilidade vascular, no entanto, devido à baixa atividade tirosina quinase deste receptor, estes sinais são cerca de um décimo do sinal observado após a ativação do VEGFR-2. A ativação de um segundo produto do gene, a forma solúvel do receptor, desencadeia uma potente atividade negativa relacionada aos fenômenos de crescimento das células endoteliais e permeabilidade vascular induzidos pelo VEGF. Assim o gene VEGFR-1 exercendo duas atividades biológicas opostas na angiogênese e pode ser fundamental para uma fina regulação da formação e manutenção dos vasos sanguíneos.

As propriedades do sinal de tradução do VEGFR-1 são afetadas pela dimerização com o VEGFR-2. A transfosforilação com o receptor 2 parece fazer com que aumente a eficiência da atividade quinase do receptor 1 (HUANG et al., 2001). Recentes estudos demonstram que a ativação de receptores heterodímeros determina ações biológicas específicas não determinadas pela ativação de receptores homodímeros, como por exemplo, a síntese de PGI_2 pelas células endoteliais (NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005).

Além das ações predominantes em células endoteliais, a localização dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 em outros tipos celulares sugere que estes possam desempenhar outras funções nestas células. Estudos indicam a participação do VEGFR-1 mediando a migração de monócitos (BARLEON et al., 1996), a maturação de precursores megacariocíticos (CASELLA et al., 2003) e a proliferação de células mesangiais renais (TAKAHASHI et al., 1995). Além disso,

a localização do VEGFR-1 em células do endométrio, glândulas endometriais e estroma uterino de roedores, indica que este possa modular a decidualização do endométrio no período de implantação embrionária (YI et al., 1999). De acordo com Otani et al. (1999) o VEGFR-1 é localizado nas células da granulosa e teca durante o crescimento folicular e nas células luteínicas durante o ciclo estral e início da gestação, indicando que este receptor e o VEGF possam modular o processo de ovulação e a função luteínica. O VEGFR-2 tem sido apontado como atuante na proteção de células da granulosa contra a apoptose e consequente atresia folicular (GREENAWAY et al., 2004), além de atuar na manutenção e sobrevivência de células tronco hematopoiéticas (KATOH et al., 1995) e na neurogênese mediada por células progenitoras neurais da retina (YANG; CEPKO, 1996).

Na placenta, a localização dos receptores 1 e 2 tem sido observada em diversos tipos celulares, indicando que, além das propriedades angiogênicas, o VEGF apresenta funções adicionais, podendo atuar de maneira parácrina e autócrina em eventos ocorridos durante o estabelecimento e desenvolvimento placentário (CHEUNG, 1997; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). Na placenta humana e de primatas a expressão do VEGFR-2 é restrita às células endoteliais, enquanto o VEGFR-1 foi detectado em células do sinciotrofoblasto (HELSKE et al., 2001; WULFF et al., 2002). Na placenta de ovinos, o VEGFR-2 foi localizado na vasculatura fetal e materna e no epitélio materno, não sendo detectada a expressão do VEGFR-1 (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2001). Na placenta dos suínos e do visão, ambos os receptores são detectados nas células endoteliais maternas e fetais e também nas células

trofoblásticas (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001).

O terceiro receptor para VEGF (VEGFR-3), cujos ligantes específicos são VEGF-C (JOUKOV et al., 1996), VEGF-D (ACHEN et al., 1998) e VEGF-protein related (LEE et al., 1996), é principalmente expresso nos vasos linfáticos, tendo importante função na gênese e manutenção destes vasos (KAIPAINEN et al., 1995). Além disso, o receptor é essencial para o desenvolvimento cardiovascular embrionário (DUMONT et al., 1998). Sua localização em diversos tecidos onde ocorre o processo de angiogênese, sugere também o papel do receptor na modulação das respostas angiogênicas no indivíduo adulto (WITMER et al., 2001).

Na placenta humana o VEGFR-3 é expresso no endotélio de vasos sanguíneos, em células da decídua materna e do sinciotrofoblasto (DUNK; AHMED, 2001; HELSKE et al., 2001), bem como em células do microvilos que envolve o trofoblasto (HELSKE et al., 2001). De acordo com Dunk e Ahmed (2001) a diminuição da expressão do VEGFR-3 pode contribuir para o desenvolvimento anormal dos vilos placentários.

3.9 Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)

A família dos FGFs é composta por 24 polipeptídios estruturalmente identificados (FISCHER; DRAPER; NEUMANN, 2003). Inicialmente purificado a partir de extratos da pituitária de bovinos (GOSPODAROWICZ, 1975), o bFGF (FGF-2) tem a propriedade de ligar-se à heparina e ao sulfato de heparina (NUGENT; IOZZO, 2000) e modula importantes ações no desenvolvimento e funções de diversos órgãos e sistemas, bem como a patogênese de doenças tumorais e vasculares (BIKFALVI et al., 1997a).

O bFGF tem propriedades mitogênicas em diversos tipos celulares, incluindo condrócitos (ARGENTIN; CICCHETTI, 2000; FUJIMOTO et al., 1999), células da granulosa e teca em aves (ROBERTS; ELLIS, 1999), células progenitoras de megacariócitos (KASHIWAKURA; TAKAHASHI, 2003), células endoteliais vasculares (IRUELA-ARISPE; RODRIGUEZ-MANZANEQUE; ABU-JAWDEH, 1999; LANG et al., 2001; ROGELJ et al., 1989) e células do músculo liso vascular (DAVIS et al., 1997). O fator é um importante modulador da diferenciação (FUJIMOTO et al., 1999; ROGELJ et al., 1989) e migração (BIKFALVI et al., 1995) celular, além de ser um potente indutor da angiogênese sob condições normais *in vitro* e *in vivo* (INGBER; FOLKMAN, 1989; LAZAROUS et al., 1995) e patológicas (HORI et al., 1991; YOSHIJI et al., 2002).

O fator de crescimento está ainda associado a eventos durante a morfogênese, participando no desenvolvimento e maturação dos metanéfrons

(CANCILLA; FORD-PERRISS; BERTRAM, 1999; DONO; ZELLER, 1994), mesonéfrons (DONO; ZELLER, 1994) e do sistema nervoso central (GIORDANO et al., 1992). Estudos demonstram que animais $bFGF^{-/-}$ apresentam desenvolvimento anormal dos neurônios do córtex cerebral, hipocampo e medula espinal (DONO et al., 1998) e também dos circuitos neuronais envolvidos na regulação central da pressão sanguínea (DONO et al., 2002).

A proteína bFGF apresenta-se naturalmente em 5 isoformas originadas por traduções alternativas de seu RNAm. A tradução de um códon AUG origina a isoforma de menor peso molecular (18-kDa), enquanto as traduções de quatro códons CUG originam as formas de alto peso molecular (22, 22,5, 24 e 34 kDa) (ARNAUD et al., 1999; OKADA-BAN; THIERY; JOUANNEAU, 2000). As traduções alternativas regulam a localização celular das diferentes isoformas e podem modular suas funções (BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991).

A isoforma de 18-kDa está localizada no citoplasma (BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991; DAVIS et al., 1997; RENKO et al., 1990; YU et al., 1993), sendo secretada pelas células provavelmente através de um mecanismo ativo de exocitose independente do mecanismo de secreção via retículo endoplasmático e complexo de Golgi (FLORKIEWICZ et al., 1995; MIGNATTI; MORIMOTO; RIFKIN, 1992). O bFGF liberado pela célula associa-se a proteoglicanas contendo sulfato de heparina (HSPG) presentes nas superfícies celulares e matriz extracelular (AVIEZER et al., 1994) e a liberação do complexo fator de crescimento/sulfato de heparina através de processos proteolíticos é um mecanismo fisiológico que disponibiliza moléculas biologicamente ativas (IOZZO, 1998), protegidas da

degradação por proteinases extracelulares (SAKSELA et al., 1988). Esta isoforma do bFGF exerce ações celulares parácrinas e autócrinas (ARESE et al., 1999; BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997).

As isoformas de alto peso molecular apresentam localização nuclear (BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991; DAVIS et al., 1997; RENKO et al., 1990; YU et al., 1993) e permanecem associadas às células, sendo responsáveis por efeitos intrácrinos independentes da ativação dos receptores (ARESE et al., 1999; BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997).

A expressão do gene do bFGF é modulada por diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo as IL-1 α e 1 β (GAY; WINKLES, 1991), TGF β (PERTOVAARA; SAKSELA; ALITALO, 1993) e interferon α (DINNEY et al., 1998). Estudos demonstram ainda que a tradução das isoformas de alto peso molecular é ativada pela IL-1 β , TNF, fator de crescimento epidermal (KAMIGUCHI et al., 1996) e também em células submetidas ao estresse oxidativo e choque térmico (VAGNER et al., 1996).

Estudos relacionados ao sistema reprodutor feminino indicam que o bFGF é um fator importante na regulação de diversas funções ovarianas. De acordo com Nilsson, Parrott e Skinner (2001), o fator tem participação no desenvolvimento folicular primordial e início da foliculogênese. Adicionalmente, o fator tem importante atividade angiogênica durante o processo de foliculogênese, suportando o crescimento do folículo dominante (BERISHA; SINOWATZ;

SCHAMS, 2004) e também durante o desenvolvimento do corpo lúteo (GABLER et al., 2004).

Estudos demonstram a participação do bFGF durante a organogênese placentária. Segundo Srivastava et al. (1998) a proteína é altamente expressa na decídua mesometrial de ratos, local onde ocorre intensa angiogênese, proliferação e invasão das células trofoblásticas. Na placenta humana, o bFGF é expresso em zonas delimitadas especificamente envolvidas nos processos de diferenciação tempo-dependentes (MÜHLHAUSER et al., 1996), detectado em múltiplos compartimentos vilosos e tipos celulares, incluindo células do sinciotrofoblasto e citotrofoblasto, células estromais, células de Hofbauer (macrófagos), células do músculo liso vascular e células mononucleares maternas (BURLEIGH et al., 2004; MÜHLHAUSER et al., 1996).

Na placenta bovina, durante o período de 80 dias de gestação até o pré-parto, o RNAm do bFGF é principalmente detectado nas células trofoblásticas binucleadas e menos expresso nas células trofoblásticas mononucleadas, epiteliais carunculares e endoteliais fetais e uterinas (PFARRER et al., 2003). De acordo com os autores, quando se inicia o decréscimo da concentração de progesterona plasmática no período pré-parto, a expressão do bFGF na placenta bovina se altera, sendo detectado predominantemente em células do estroma materno e epitélio caruncular e somente em poucas células binucleadas e do endotélio fetal.

3.10 Receptores para bFGF

A família de receptores dos FGFs inclui cinco genes identificados e numerosas isoformas originadas por derivação alternativa, que mediam diferentes respostas celulares (SLEEMAN et al., 2001; STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 2000). Foram identificados e clonados os receptores: FGFR-1 (DIONNE et al., 1990; LEE et al., 1989), FGFR-2 (DIONNE et al., 1990), FGFR-3 (KEEGAN et al., 1991), FGFR-4 (PARTANEN et al., 1991) e FGFR-5 (SLEEMAN et al., 2001).

Os receptores são proteínas compostas por uma porção extracelular, a qual contém dois ou três domínios semelhantes à imunoglobulina, uma região transmembrânica e uma porção citoplasmática contendo um domínio tirosina quinase com uma típica inserção de quinase (DIONNE et al., 1990; LEE et al., 1989; STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 2000). Os receptores podem apresentar diferentes isoformas (ORNITZ et al., 1996). Os receptores 1-3 apresentam isoformas que diferem quanto à composição da porção extracelular: estas podem apresentar três versões do terceiro domínio originados por derivação alternativa do exon III (IIIa, IIIb e IIIc) (BIKFALVI et al., 1997a). O FGFR-4 não sofre derivação alternativa no exon III (ORNITZ et al., 1996) e estudos indicam que o FGFR-5 apresenta duas isoformas (SLEEMAN et al., 2001).

A especificidade de ligação dos diferentes receptores para FGF é determinada pela derivação alternativa do terceiro domínio semelhante a

imunoglobulina. A inclusão ou exclusão de exons alternativos no terceiro domínio afeta drasticamente a especificidade dos receptores (BIKFALVI et al., 1997b). O bFGF pode ligar-se aos receptores 1-5, no entanto, o fator ativa preferencialmente as isoformas contendo o domínio IIIc (COLEMAN, 2003). O FGFR-4 é desprovido do exon IIIb, embora o bFGF também se ligue preferencialmente a este receptor (BIKFALVI et al., 1997b).

A ativação dos receptores é dependente da formação de um complexo ternário entre estes, o bFGF e proteoglicanas contendo sulfato de heparina (KAN et al., 1993), as quais atuam como receptores de baixa afinidade (IOZZO, 1998; YAYON et al., 1991). A ligação do fator a seu receptor promove sua dimerização, ativação da atividade tirosina quinase e autofosforilação, seguidas do aumento do pH e Ca^{++} no interior das células e fosforilação de diversas proteínas, tais como a fosfolipase C γ 1, quinase Raf-1, quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e ERK2), quinase S6 ribossomal (RSK) (FANTL; JOHNSON; WILLIAMS, 1993) e MAPK (ZHENG et al., 1999).

Semelhantemente ao bFGF, seus receptores são identificados em diversos tipos celulares, incluindo células vasculares endoteliais (BASTAKI et al., 1997; KANDA et al., 1996; PETERS et al., 1992; ZHENG et al., 1999), células do metanefron em desenvolvimento (CANCILLA; FORD-PERRISS; BERTRAM, 1999), células renais (NEUFELD; GOSPODAROWICZ, 1985), células da granulosa (BERISHA; SINOWATZ; SCHAMS, 2004; SHIKONE; YAMOTO; NAKANO, 1992) e da teca interna (BERISHA; SINOWATZ; SCHAMS, 2004),

células do músculo esquelético (OLWIN; HAUSCHKA, 1988), células tronco embrionárias e células tumorais (MUMMERY et al., 1993).

Na placenta humana o FGFR-1 pode ser localizado em células endoteliais vasculares, do estroma e do sinciotrofoblasto (ARANY; HILL, 1998). De acordo com Pfarrer et al. (2003) o RNAm dos receptores FGFR-1 e FGFR-2 é expresso na placenta bovina desde os 80 dias de gestação até pré-parto em células trofoblásticas binucleadas e mononucleadas, células do epitélio caruncular e células endoteliais fetais e maternas.

3.11 Fatores de crescimento e a esteroidogênese

Estudos *in vitro* demonstram que os fatores de crescimento VEGF e bFGF apresentam efeito modulatório sobre a esteroidogênese em células de várias espécies animais. De acordo com Grasselli et al. (2002) o VEGF e bFGF têm influência na produção de estradiol-17 β e progesterona em células da granulosa de suínos; segundo Kobayashi et al. (2001) os fatores aumentam a produção de progesterona na fase inicial do corpo lúteo em bovinos.

A infusão de bFGF *in vitro*, através do sistema de microdiálise, apresenta um efeito dose dependente agudo e a longo prazo na secreção de progesterona pelo corpo lúteo bovino. Esse efeito estimulatório é observado em todas as fases luteínicas, no entanto, apresenta-se mais acentuado nos estágios inicial (dias 5-7)

e médio (8-12), tanto durante a infusão do peptídeo, como posteriormente a ela (LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996; MIYAMOTO et al., 1992). O bFGF modula também a esteroidogênese induzida pelo hormônio folículo estimulante, inibindo a produção de estradiol-17 β e de progesterona em células da granulosa de bovinos (VERNON; SPICER, 1994) e ratos (YAMOTO et al., 1993), bem como a produção de androstenediona em células da granulosa de galinhas (LI; JOHNSON, 1993).

O bFGF atua como um importante fator controlando a esteroidogênese testicular *in vitro*. O fator inibe a produção de testosterona pelas células de Leydig imaturas e neonatais de ratos (FAUSER; BAIRD; HSUEH, 1988; MURONO; WASHBURN, 1990). De acordo com Raeside et al. (1988) e Sordoillet et al. (1992) o bFGF estimula a produção de estrógenos e testosterona, respectivamente, pelas células de Leydig imaturas de suínos.

Até o presente momento não existem relatos sobre a possível influência destes fatores sobre a produção esteroidogênica da placenta, além disso, embora os estudos demonstrem o efeito dos fatores na esteroidogênese do ovário e corpo lúteo, não elucidam completamente se este é mediado por ações diretas sobre as enzimas esteroidogênicas, por mecanismos que estejam ligados indiretamente a esteroidogênese ou por ambos. Segundo Li e Johnson (1993) o efeito inibitório do bFGF sobre a produção de androstenediona em células da granulosa de galinhas é mediado pela inibição da expressão da enzima citocromo P45017 α . Em contrapartida, de acordo com Kobayashi et al. (2001), o aumento da produção de progesterona observado após a adição do VEGF e bFGF na fase inicial do corpo

lúteo de bovinos, possivelmente seja mediado pelo estímulo destes fatores na secreção luteínica de angiotensina II e $\text{PGF2}\alpha$ (prostaglandina $\text{F2}\alpha$), que modulariam os mecanismos de síntese de progesterona nesta fase.

3.12 Bovinos clonados

O processo de clonagem, embora aplicado em diversas espécies animais, tem suas aplicações restritas por limitações no potencial de desenvolvimento dos embriões resultantes (YOUNG; FAIRBURN, 2000). Até o momento, o processo de clonagem é considerado ineficiente, apresentando altas taxas de mortalidade durante a gestação e após o nascimento (HEYMAN et al., 2002; HILL et al., 1999, 2000).

As altas taxas de mortalidade fetal e pós-natal dos bovinos clonados estão principalmente associadas a diversas anormalidades cardiopulmonares ocorridas durante o desenvolvimento fetal, também relacionadas a alterações placentárias (HILL et al., 1999, 2000). As anormalidades placentárias ocorrem com altas incidências tanto no início como no final da gestação e incluem alterações morfológicas do epitélio trofoblástico (HILL et al., 2000), deficiências no estabelecimento da vascularização placentária (HILL et al., 2000), diminuição no número de cotilédones (ALLEN et al., 2003; HILL et al., 2000), aumento do tamanho dos placentomas (ALLEN et al., 2003; HEYMAN et al., 2002), edema

placentário (HILL et al., 1999) e desenvolvimento de hidroalantóide (ALLEN et al., 2003; HEYMAN et al., 2002, HILL et al., 1999).

Estudos indicam que as principais anormalidades que provocam perdas iniciais e tardias dos animais clonados estariam principalmente relacionadas a alterações no processo de reprogramação nuclear (KONO, 1998; YOUNG; FAIRBURN, 2000) e alterações nos padrões de expressão de determinados genes, os quais podem não ser expressos ou ter sua expressão aumentada ou diminuída significativamente (NIEMANN et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Placentomas de 90, 150 e 210 dias de gestação foram obtidos em abatedouro localizado no município de São José dos Campos, São Paulo. Placentomas de 270 dias de gestação provenientes de animais clonados e não clonados foram coletados após cesarianas realizadas nos Departamentos de Reprodução Animal e Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A determinação das idades gestacionais referentes aos placentomas obtidos em abatedouro foi realizada pela tomada da medida cefalococcígea do feto (*“Crown Rump”*), de acordo com Sloss e Dufty (1980).

4.1 Preparo do material para imuno-histoquímica

Fragmentos de tecido placentário foram fixados em formol¹ tamponado a 4% durante 24 horas e então submetidos ao processo de inclusão utilizando-se procedimento convencional. Resumidamente: os tecidos foram desidratados em uma série de etanol¹ com concentrações crescentes (70%, 90% e absolutos I, II e III; 1 hora cada), clareados em xilol¹ (I, II e III; 1 hora cada) e embebidos em

¹ Labsynt Produtos para Laboratórios Ltda., BRA

parafina pura² (I, II e de inclusão; 1 hora cada).

Cortes de 0,5µm foram obtidos em micrótomo³ e preparados em lâminas previamente tratadas em solução de 5% de 3-aminopropiltietoxi-silano (APES)⁴ em acetona⁵ (1 minuto), dois banhos em acetona (20 segundos) e 2 banhos rápidos em água destilada.

4.1.1 Imuno-histoquímica para VEGF, bFGF e seus receptores

Os cortes teciduais foram desparafinizados em xilol⁴ (2 vezes por 15 minutos), rehidratados em uma série de etanol⁴ com concentrações decrescentes (absolutos I e II, 96% e 70%; 5 minutos cada) e lavadas em água destilada (1 vez por 15 minutos). Para melhor exposição dos antígenos, as lâminas referentes às reações para imunolocalização do VEGF foram imersas em solução tampão Tris-HCl⁵ 1,0 M, pH 10 e as demais imersas em solução citrato 10 mM, pH 6,0 (item 4.8.1) por 5 minutos em temperatura ambiente, com posterior tratamento em microondas (3 vezes por 5 minutos, potência máxima). Todas as lavagens seguintes foram realizadas em solução tampão fosfato (PBS) (3 vezes por 5 minutos) (item 4.8.2). A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de 2% de peróxido de hidrogênio⁴ em PBS para o VEGF e seus

² Histosec®, Merck, GER

³ Leica RM 2065®, Leica Instruments GmbH, GER

⁴ Labsynt Produtos para Laboratórios Ltda., BRA

⁵ Sigma Chemical Co., U.S.A.

receptores (20 minutos, temperatura ambiente) e em metanol para o bFGF e seus receptores (20 minutos, -20 °C), e, a seguir, as lâminas foram lavadas em PBS. Para reduzir as ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos em solução de soro eqüino⁶ em PBS (1:10). As secções teciduais foram incubadas por 20 horas a 4 °C com os anticorpos primários para o VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 e FGFR-1 e 2 horas em temperatura ambiente para o bFGF, FGFR-2 e FGFR-3 (Quadro 1), lavadas em PBS, incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário⁶ (BA-1400, anti-coelho e camundongo, IgG, produzido em cavalo) na diluição de 1:200 e lavadas novamente em PBS. Em seguida, foram incubadas por 45 minutos com o complexo de peroxidase-estreptavidina-biotina⁷ para amplificação do sinal de reação e lavadas em PBS. A reação de imunohistoquímica específica foi revelada utilizando-se NovaRed⁸ por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Harris⁹ por 8 segundos, lavadas em água corrente por 20 minutos e então montadas utilizando-se glicerina¹⁰. Como controle positivo para todos os anticorpos utilizou-se corpo lúteo bubalino, para o qual os testes imunohistoquímicos já haviam sido descritos (Prado, 2004; Moura, 2003). Em cada lâmina testada, um dos cortes foi eleito para controle negativo e sobre ele pipetou-se PBS ao invés do anticorpo primário.

⁶ Vector Laboratories Inc., U.S.A

⁷ Vectastain® Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc., U.S.A.

⁸ Vector® NovaRED™, Vector Laboratories Inc., U.S.A.

⁹ Cral Artigos para Laboratório, BRA

¹⁰ Labsynt Produtos para Laboratórios Ltda., BRA

Anticorpo	Clone, Isotipo	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor (n° de catálogo)
VEGF (anti-humano)	VG76e, IgG monoclonal	camundongo	1:100	Abcam (ab119)
VEGFR-1 (anti-humano)	C-17, IgG policlonal	coelho	1:100	Santa Cruz (sc-316)
VEGFR-2 (anti-camundongo)	C-20, IgG policlonal	coelho	1:400	Santa Cruz (sc-315)
bFGF (anti-humano)	bFM-2, IgG _{1k} monoclonal	camundongo	1:100	Upstate (05-118)
bFGFR-1 (anti-humano)	19B2, IgG ₁ monoclonal	camundongo	1:100	Upstate (05-149)
bFGFR-2 (anti-humano)	policlonal	coelho	1:200	Sigma (F 0300)
bFGFR-3 (anti-humano)	policlonal	coelho	1:400	Sigma (F 0425)

Quadro 1 - Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica

4.2 Preparo da cultura celular

Os placentomas foram lavados em solução isotônica estéril de cloreto de sódio¹¹ 0,9% e transportados ao laboratório, a 4°C, em solução tampão fosfato livre de íons Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, contendo solução de antibiótico e antifúngico (item 4.8.3).

Os placentomas foram trabalhados em condições assépticas sob o fluxo laminar. Durante os procedimentos utilizou-se o Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)¹², pH 7,2, autoclavado por 15 minutos a 121°C, suplementado com 5%

¹¹ Áster Produtos Médicos Ltda., BRA

¹² Sigma Chemical Co., U.S.A.

de soro fetal bovino¹³ inativado a 56°C por 30 minutos, 2% de L-Glutamina¹⁴ 3%, 5% de HEPES¹⁴ 280mM, 0,5% de bicarbonato de sódio 7,5% (NaHCO₃)¹³ e solução de antibiótico e antifúngico¹⁴ (100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina e 250 µg de anfotericina B). As soluções de L-Glutamina, HEPES e NaHCO₃ foram previamente filtradas em película de 0,20 µm de diâmetro.

4.2.1 Separação celular

As células placentárias totais (maternas e fetais) foram isoladas para o cultivo. Os placentomas foram cortados em fragmentos de 0,5 cm² e as células foram mecanicamente separadas pela passagem através de uma rede de 150 mesh¹³. As células foram lavadas em meio de cultivo por 3 ciclos seqüenciais de centrifugação (450 x g por 5 minutos a 4°C)¹⁵ e ressuspensão.

4.2.2 Concentração e viabilidade celular

A concentração e viabilidade celular foram determinadas através do método de exclusão pelo Trypan Blue. Após adição e homogeneização da suspensão celular em solução de Trypan Blue (1:1) (item 4.8.4), uma alíquota de

¹³ Merck, GER

¹⁴ Sigma Chemical Co., U.S.A.

¹⁵ Rotina 46 R®, Hettich Zentrifugen, GER

15 μ l foi colocada em hematocítômetro e observada ao microscópio óptico (aumento de 400X).

4.2.3 Cultivo celular

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades¹⁶ em incubadora umidificada, com uma atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37,5°C. Foi utilizada uma concentração de 5×10^6 células viáveis em 300 μ l de meio de cultivo em cada cavidade.

4.3 Adição do bFGF e VEGF

Depois de estabelecida, e decorridas 24 horas do início da cultura celular, as células não viáveis e não aderidas foram retiradas através de duas lavagens com meio de cultivo. A seguir foram estabelecidos 4 grupos experimentais:

- Grupo Controle: recebeu somente meio de cultura;
- Grupo bFGF: recebeu a adição de 10 η g/ml de bFGF (18kDa) recombinante humano¹⁷;

¹⁶ Costar®, Corning, U.S.A.

¹⁷ Chemicon International, CA

- Grupo VEGF: recebeu a adição de 50 ng/ml de VEGF₁₆₅ recombinante humano¹⁸;
- Grupo bFGF + VEGF: recebeu a adição de 10 ng/ml de bFGF e 50 ng/ml de VEGF.

4.4 Coleta das amostras

Os tratamentos permaneceram por 24, 48 e 96 horas nos experimentos com células provenientes de placentoma de animais não clonados e em um experimento com placentoma de animais clonados. Em dois experimentos com células de animais clonados, amostras dos grupos controle e bFGF foram coletadas após 24, 48 e 96 horas e amostras dos grupos VEGF e bFGF + VEGF após 24 e 48 horas de cultivo.

As amostras de meio de cultivo foram coletadas e armazenadas a -20°C para posterior dosagem de progesterona. As células contidas em cada cavidade foram coletadas após adição 100 µl de tripsina¹⁹ 1% seguida de incubação por 10 minutos a 37,5°C. A atividade da tripsina foi inativada pela adição de 100 µl de meio de cultivo e o completo destacamento celular foi realizado mecanicamente por sucessivas pipetagens. As amostras foram coletadas, peletizadas por

¹⁸ Chemicon International, CA

¹⁹ Gibco, U.K.

centrifugação (1700 x *g* por 15 minutos a 4°C)²⁰ e armazenadas a -40°C para posterior dosagem do conteúdo protéico das mesmas.

4.5 Dosagem de Progesterona

A determinação da concentração de progesterona no meio de cultivo foi realizada através de uma técnica de radioimunoensaio padronizada no laboratório do Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, São Paulo.

4.5.1 Preparo da curva padrão, reagentes e controles

A curva padrão com concentrações crescentes de progesterona²¹ (3,9062; 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 pg/100 µl) em tampão fosfato com gelatina (PBS-G) (item 4.7.3), foi elaborada a partir de uma solução de progesterona em etanol²².

Os reagentes utilizados no radioimunoensaio foram obtidos a partir de um Kit comercial para dosagem de progesterona²³. A progesterona radioativa [I-125]

²⁰ Rotina 46 R®, Hettich Zentrifugen, GER

²¹ Sigma Chemical Co., U.S.A.

²² Labsynt Produtos para Laboratórios Ltda

²³ DSL-3400®, Diagnostic Systems Laboratories, U.S.A.

foi diluída a 70% em PBS-G e o 1º anticorpo contra a progesterona (extraído de coelho) e o líquido de precipitação (extraído de cabra) foram diluídos a 60% em PBS-G.

Para controle dos ensaios foram utilizadas amostras de fluídos foliculares diluídas 1:10 em PBS-G com concentrações baixa, média e alta de progesterona previamente estabelecidas.

4.5.2 Radioimunoensaio

As dosagens foram realizadas conforme a seqüência descrita no quadro 2.

Tubos	PBS-G	Padrões	Amostras	P ₄ [I-125]	1º anticorpo
Total (T)				500 µl	
Ligações não específicas	200 µl			500 µl	
Referência (BO)	100 µl			500 µl	100 µl
Curva	75 µl	25 µl		500 µl	100 µl
Experimental			100 µl	500 µl	100 µl
Controle	75 µl		25 µl	500 µl	100 µl

Quadro 2 - Protocolo para dosagem de progesterona

Após homogeneização e incubação por 70 minutos a 37°C, 1 ml do líquido de precipitação foi adicionado em todos os tubos (com exceção dos tubos T). Decorridos 10 minutos de incubação em temperatura ambiente (25 °C), os tubos

foram centrifugados (exceto os tubos T) ($1600 \times g$ por 20 minutos a 4°C)²⁴ e foi realizada decantação do sobrenadante.

As amostras foram submetidas à leitura em um contador de radiação gama²⁵. Os cálculos dos resultados foram feitos através do programa Riasmart deste contador.

4.5.3 Análise dos ensaios

Nos 12 radioimunoensaios realizados a concentração média de progesterona detectável a 80% do B0 foi de $414,06 \pm 49,03$ pg/100 μl , a porcentagem média de ligações inespecíficas foi de $0,99 \pm 0,52\%$ e os coeficientes de variação intraensaio e interensaio foram de 9,21% e 3,32%, respectivamente.

4.6 Dosagem da Proteína

A determinação da concentração de proteína nas amostras celulares foi realizada através do método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951).

²⁴ Rotina 46 R®, Hettich Zentrifugen, GER

²⁵ Cobra-II Auto-Gamma®, Packard, U.K.

4.6.1 Preparo da curva padrão

A curva padrão com concentrações decrescentes de proteína (1,0; 0,75; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml) em tampão de homogeneização (item 4.7.4) foi preparada a partir de uma solução de albumina sérica bovina²⁶.

4.6.2 Ensaio

Os *pellets* celulares foram ressuspensos em 300 µl de tampão de homogeneização e levados ao sonicador²⁷ (12 segundos, pulsos: 4 on 2 off, amplitude 25%).

As dosagens de proteína foram realizadas de acordo com a seqüência descrita no quadro 3.

Tubos	Tampão de homogeneização	Padrões	Amostras	Reativo (item 4.7.5)
Branco	100 µl			1 ml
Curva		100 µl		1 ml
Experimental	50 µl		50 µl	1 ml

Quadro 3 - Protocolo para dosagem de proteína

²⁶ Sigma Chemical Co., U.S.A.

²⁷ Vibra Cell®, Sonics & Materials, U.S.A.

Após homogeneização e incubação por 10 minutos a 37°C, foi acrescentado 75 µl de reativo de fenol Folin de Ciocalteu²⁸ em todos os tubos, os quais foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a 37°C.

A amostras foram levadas ao espectrofotômetro²⁹ e a leitura de absorbância foi realizada em filtro com comprimento de onda de 670 nm.

4.7 Análise estatística

Os dados apresentados nos resultados representam a média $\pm$ erro padrão médio (EPM) de 3 diferentes experimentos com células de bovinos não clonados (9 - 12 replicatas/tratamento) e 3 diferentes experimentos com células de bovinos clonados (11 - 12 replicatas/tratamento nos grupos controle e bFGF e 3 - 9 replicatas/tratamento nos grupos VEGF e bFGF + VEGF). A produção de progesterona pelas células placentárias do grupo controle nas diferentes idades gestacionais e tempos de cultura, bem como os efeitos do tratamento e tempo sobre a concentração deste hormônio no meio de cultura das células controle e tratadas com os fatores de crescimento foram analisados utilizando-se o GLM (General Linear Models) do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) e, quando diferenças estatísticas foram encontradas, as médias dos quadrados mínimos foram comparadas pelo teste de variação múltipla de Duncan

²⁸ Merck, Germany

²⁹ SB-190®, CELM-Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, BRA

e consideradas significativas quando $p < 0,05$. A variável dependente estudada foi a progesterona e o modelo estatístico empregado foi: tratamento, duração do tratamento, experimento individual e tratamento* duração do tratamento.

4.8 Soluções e Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram adquiridos na Merck (Germany), com exceção dos identificados em notas de rodapé.

4.8.1 Solução citrato 10mM

A solução citrato foi preparada adicionando-se 18 ml da solução A e 82 ml da solução B em 1000 ml de água ultrapura, pH 6,0.

- Solução A: 21,01 g de ácido cítrico monohidratado³⁰ ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 1000 ml de água ultrapura.

- Solução B: 29,41 g de citrato de sódio dihidratado³⁰ ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) em 1000 ml de água ultrapura.

³⁰ Ecibra Reagentes Analíticos

4.8.2 Solução tampão fosfato (PBS)

Os reagentes (Tabela 1) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2. Solução cinco vezes concentrada.

Tabela 1 - Formulação da solução tampão fosfato. São Paulo, 2005

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	41,0 g
Fosfato de sódio dibásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11,0 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	2,75 g

4.8.3 Solução tampão fosfato livre de íons Ca^{++} e Mg^{++}

Os reagentes (Tabela 2) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121° C. Em seguida foi adicionada solução contendo antibiótico e antifúngico³¹ (100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina e 250 µg de anfotericina B).

³¹ Sigma Chemical Co., U.S.A.

Tabela 2 - Formulação da solução tampão fosfato livre de íons Ca^{++} e Mg^{++} . São Paulo, 2005

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	8,0 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	1,15 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,2 g

4.8.4 Solução de Trypan Blue

A solução uso de Trypan Blue foi preparada no momento do uso adicionando-se 200 μl de Trypan Blue³² 0,2% e 50 μl de cloreto de sódio (NaCl) 4,25%.

4.8.5 Solução tampão fosfato com gelatina (PBS-G)

Os reagentes (Tabela 3) foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,5. Em seguida, adicionou-se 1,0 g de gelatina³² e a solução foi homogeneizada sob agitação a 37°C.

³² Sigma Chemical Co., U.S.A.

Tabela 3 - Formulação da solução tampão fosfato com gelatina. São Paulo, 2005

Componentes	Quantidade
Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4)	2,3 g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	4,76 g
Azida de sódio (NaN_3)	0,10 g
Cloreto de sódio (NaCl)	8,41 g

4.8.6 Solução tampão de homogeneização

Os reagentes (Tabela 4) foram diluídos em 500 ml de água ultrapura, pH 7,4.

Tabela 4 - Formulação da solução tampão de homogeneização. São Paulo, 2005

Componentes	Quantidade
TRIS-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)	0,6057 g
EDTA Sódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)	0,1861 g
Sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	42,79 g

4.8.7 Reativo para dosagem de proteína

A solução do reativo para a dosagem de proteína foi preparada adicionando-se 49 ml da solução A e 1 ml da solução B, no momento do uso.

-Solução A: 10 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,1 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 2g de hidróxido de sódio (NaOH) em 500 ml de água ultrapura. A solução foi usada 24 horas após o preparo, tempo este necessário para a decantação do tartarato de sódio e potássio.

-Solução B: 5 g sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em 1000 ml de água ultrapura.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Inicialmente são demonstrados os resultados relativos a imunolocalização do VEGF e bFGF e seus receptores na placenta de animais não clonados e clonados e, em seguida, os resultados referentes ao tratamento das células placentárias destes animais com os fatores de crescimento.

5.1 Imunolocalização do VEGF e seus receptores

A proteína do VEGF, identificada na placenta bovina em todas as idades gestacionais investigadas (90, 150, 210 e 270 dias em bovinos não clonados e 270 dias em bovinos clonados), foi localizada no citoplasma das células do epitélio e estroma maternos e em células do epitélio fetal (Figura 5).

O VEGFR-1 foi localizado no citoplasma de células do **epitélio** e estroma maternos, células do **epitélio** e estroma fetais e células endoteliais aos 90, 150 e 210 dias de gestação. Aos 270 dias de gestação as células do estroma fetal apresentaram reação negativa para a proteína em animais não clonados e clonados (Figura 6). A reação citoplasmática positiva para a proteína do VEGFR-2 foi observada em células do **epitélio** e estroma maternos, células do **epitélio** e estroma fetais e células endoteliais em todas as idades gestacionais investigadas em animais não clonados e clonados (Figura 7).

Figura 5 - Fotomicrografias da localização da proteína do VEGF na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal VG76e. A: Controle negativo. B e C: placenta de animais não clonados aos 90 e 270 dias de gestação, respectivamente. D: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazada) do epitélio fetal e em células do epitélio materno (seta). Barra: 50µm

Figura 6 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor VEGFR-1 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal C-17. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50µm

Figura 7 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor VEGFR-2 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal C-20. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50µm

5.2 Imunolocalização do bFGF e seus receptores

A proteína do bFGF foi localizada no citoplasma de células do epitélio e estroma maternos, células do epitélio e estroma fetais e células endoteliais vasculares na placenta bovina em todas as idades gestacionais estudadas e aos 270 dias em animais clonados. Nas células dos estromas materno e fetal e nas células endoteliais, além da reação citoplasmática, foi observada a reação nuclear positiva para o fator de crescimento (Figura 8).

O receptor FGFR-1 foi localizado no citoplasma e núcleo de células do **epitélio** e estroma maternos, células do **epitélio** e estroma fetais e células endoteliais aos 90, 150 e 210 dias de gestação. Em animais não clonados e clonados aos 270 dias de gestação as células do estroma fetal apresentaram reação negativa ao receptor (Figura 9). A reação positiva para o receptor FGFR-2 pôde ser observada no citoplasma e núcleo de células do **epitélio** e estroma maternos, células do **epitélio** e estroma fetais e células endoteliais na placenta bovina em todas as idades gestacionais estudadas e em animais clonados (Figura 10). A proteína do FGFR-3 também foi encontrada nestas células durante a gestação e em animais clonados, no entanto, esta proteína apresentou localização predominantemente nuclear em todas as células. A localização citoplasmática do receptor também foi observada (Figura 11).

Figura 8 - Fotomicrografias da localização da proteína do bFGF na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal bFM-2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação nuclear positiva para o fator de crescimento em células do estroma materno (seta vazia) e a reação citoplasmática positiva em células do epitélio materno (seta) e em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal. Barra: 50µm

Figura 9 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-1 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal 19B2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática e nuclear positiva para a proteína em células binucleadas do epitélio fetal (ponta de seta) e em células do epitélio materno (seta), a reação citoplasmática positiva em células mononucleadas do epitélio fetal (ponta de seta vazada) e a reação nuclear positiva em célula do estroma materno (seta vazada). Barra: 50µm

Figura 10 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-2 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-FGFR-2. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação citoplasmática e nuclear positiva para a proteína em células do epitélio (seta) e estroma (seta vazia) maternos e em células binucleadas (ponta de seta) do epitélio fetal. Barra: 50µm

Figura 11 - Fotomicrografias da localização da proteína do receptor FGFR-3 na placenta de bovinos. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-FGFR-3. A: Controle negativo. B, C, D e E: placenta de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação, respectivamente. F: placenta de animal clonado aos 270 dias de gestação. Observar a reação nuclear positiva para a proteína em células em células binucleadas (ponta de seta) e mononucleadas (ponta de seta vazia) do epitélio fetal e a reação nuclear e citoplasmática positiva em células binucleadas do epitélio fetal (seta). Barra: 50µm

5.3. Efeitos do VEGF e bFGF sobre a produção de progesterona pelas células placentárias bovinas em cultura

Para a realização dos cultivos celulares, após a chegada do material ao laboratório, foi determinada a porcentagem de viabilidade celular. A tabela 5 demonstra a porcentagem de viabilidade das células placentárias bovinas de acordo com a idade gestacional em animais não clonados e aos 270 dias em animais clonados.

Tabela 5 - Porcentagem de viabilidade celular das células placentárias bovinas em diferentes idades gestacionais e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005

Idade gestacional (dias)	Experimentos	Viabilidade celular (%)
90 dias	1	30
	2	22
	3	35
150 dias	1	33
	2	50
	3	25
210 dias	1	36
	2	40
	3	52
270 dias	1	34
	2	43
	3	51
270 dias (animais clonados)	1	40
	2	30
	3	45

Após a realização dos cultivos celulares foram determinadas as concentrações de progesterona no meio de cultivo (ng/ml) (Tabela 6 – Apêndices 1-5), bem como o conteúdo protéico (mg/ml) das células placentárias (Tabela 7 – Apêndices 6-10). As concentrações apresentadas de progesterona no meio de cultivo foram calculadas em relação à concentração de proteína e são expressas em ng de progesterona por mg de proteína.

Tabela 6 - Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005

Idade Gestacional (dias)	Grupo experimental	Tempo de tratamento (horas)		
		24	48	96
90	controle	0,164 ± 0,01	0,248 ± 0,05	0,271 ± 0,02
	bFGF	0,226 ± 0,01	0,197 ± 0,01	0,233 ± 0,01
	VEGF	0,221 ± 0,02	0,192 ± 0,01	0,196 ± 0,02
	bFGF + VEGF	0,259 ± 0,03	0,242 ± 0,02	0,186 ± 0,01
150	controle	0,145 ± 0,01	0,162 ± 0,01	0,220 ± 0,01
	bFGF	0,191 ± 0,03	0,169 ± 0,01	0,214 ± 0,01
	VEGF	0,212 ± 0,07	0,207 ± 0,03	0,203 ± 0,01
	bFGF + VEGF	0,103 ± 0,01	0,166 ± 0,01	0,145 ± 0,01
210	controle	0,127 ± 0,01	0,419 ± 0,03	0,335 ± 0,06
	bFGF	0,293 ± 0,03	0,209 ± 0,02	0,280 ± 0,03
	VEGF	0,373 ± 0,07	0,311 ± 0,02	0,279 ± 0,04
	bFGF + VEGF	0,458 ± 0,07	0,276 ± 0,04	0,235 ± 0,04
270	controle	0,259 ± 0,01	0,229 ± 0,01	0,276 ± 0,01
	bFGF	0,232 ± 0,01	0,232 ± 0,01	0,231 ± 0,01
	VEGF	0,223 ± 0,01	0,299 ± 0,05	0,245 ± 0,01
	bFGF + VEGF	0,291 ± 0,01	0,279 ± 0,02	0,240 ± 0,01
270 (animais clonados)	controle	0,252 ± 0,02	0,252 ± 0,02	0,242 ± 0,03
	bFGF	0,233 ± 0,02	0,246 ± 0,02	0,223 ± 0,02
	VEGF	0,231 ± 0,03	0,274 ± 0,02	0,301 ± 0,02
	bFGF + VEGF	0,257 ± 0,03	0,260 ± 0,04	0,336 ± 0,01

Valores representam média ± EPM de três diferentes experimentos em animais não clonados (n ≥ 9) e clonados (grupos controle e bFGF: n = 12; grupos VEGF e bFGF + VEGF: n ≥ 3).

Tabela 7 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005

Idade Gestacional (dias)	Grupo experimental	Tempo de tratamento (horas)		
		24	48	96
90	controle	0,262 ± 0,01	0,317 ± 0,03	0,225 ± 0,02
	bFGF	0,214 ± 0,01	0,348 ± 0,03	0,220 ± 0,02
	VEGF	0,188 ± 0,01	0,347 ± 0,05	0,236 ± 0,01
	bFGF + VEGF	0,229 ± 0,02	0,320 ± 0,02	0,200 ± 0,02
150	controle	0,318 ± 0,02	0,345 ± 0,03	0,370 ± 0,02
	bFGF	0,347 ± 0,02	0,427 ± 0,02	0,371 ± 0,02
	VEGF	0,366 ± 0,03	0,408 ± 0,04	0,395 ± 0,02
	bFGF + VEGF	0,395 ± 0,03	0,448 ± 0,03	0,432 ± 0,03
210	controle	0,333 ± 0,04	0,378 ± 0,03	0,471 ± 0,03
	bFGF	0,343 ± 0,02	0,444 ± 0,02	0,446 ± 0,01
	VEGF	0,340 ± 0,03	0,451 ± 0,02	0,396 ± 0,02
	bFGF + VEGF	0,320 ± 0,02	0,453 ± 0,01	0,464 ± 0,02
270	controle	0,156 ± 0,01	0,148 ± 0,01	0,177 ± 0,02
	bFGF	0,165 ± 0,01	0,179 ± 0,02	0,174 ± 0,01
	VEGF	0,177 ± 0,02	0,152 ± 0,01	0,161 ± 0,01
	bFGF + VEGF	0,158 ± 0,01	0,176 ± 0,01	0,168 ± 0,01
270 (animais clonados)	controle	0,180 ± 0,02	0,209 ± 0,02	0,159 ± 0,02
	bFGF	0,175 ± 0,01	0,204 ± 0,02	0,196 ± 0,02
	VEGF	0,176 ± 0,01	0,176 ± 0,02	0,153 ± 0,01
	bFGF + VEGF	0,178 ± 0,04	0,171 ± 0,03	0,184 ± 0,01

Valores representam média ± EPM de três diferentes experimentos em animais não clonados ($n \geq 10$) e animais clonados (grupos controle e bFGF: $n \geq 11$; grupos VEGF e bFGF + VEGF: $n \geq 3$).

5.3.1 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas de animais não clonados em diferentes idades gestacionais

A tabela 8 (Apêndice 11) indica as concentrações de progesterona ($\eta\text{g}/\text{mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias do grupo controle nas diferentes idades gestacionais após 24, 48 e 96 horas de cultivo.

Tabela 8 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g}/\text{mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em diferentes idades gestacionais de animais não clonados. São Paulo, 2005

Idade Gestacional (dias)	Tempo de tratamento (horas)		
	24	48	96
90	$0,686 \pm 0,07^{a,1}$	$0,698 \pm 0,06^{a,1}$	$1,240 \pm 0,19^{b,1,2}$
150	$0,551 \pm 0,06^1$	$0,557 \pm 0,05^1$	$0,698 \pm 0,05^2$
210	$0,388 \pm 0,04^{a,1}$	$1,144 \pm 0,08^{b,1}$	$0,660 \pm 0,11^{a,2}$
270	$1,776 \pm 0,17^2$	$1,868 \pm 0,36^2$	$1,630 \pm 0,26^1$

Valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 10$). Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos em cultura na mesma idade gestacional. Números diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as idades gestacionais no mesmo tempo em cultura. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Aos 90 dias de gestação a produção de progesterona pelas células placentárias do grupo controle após 96 horas de cultivo foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a observada após 24 e 48 horas de cultivo. Uma concentração significativamente maior de progesterona ($p < 0,05$) também foi observada no meio de cultivo de células do grupo controle provenientes de gestações de 210 dias após 48 horas de cultura. Quando comparadas às produções do hormônio nas diferentes idades gestacionais no mesmo tempo de cultivo, notou-se que as células placentárias de 270 dias de gestação produziram

quantidades significativamente superiores de progesterona ($p < 0,05$) em relação às células de 90, 150 e 210 dias de gestação após 24 e 48 horas e em relação às células de 150 e 210 dias de gestação após 96 horas (Figura 12).

Figura 12 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle nas diferentes idades gestacionais após 24, 48 e 96 horas de cultura. Dados representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 10$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos em cultura na mesma idade gestacional. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as idades gestacionais no mesmo tempo em cultura. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

5.3.2 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas tratadas com os fatores de crescimento nas diferentes idades gestacionais em animais não clonados

A tabela 9 (Apêndices 12-15) indica as concentrações de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura das células placentárias controle e tratadas com os fatores de crescimento bFGF e VEGF nas diferentes idades gestacionais.

Tabela 9 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em diferentes idades gestacionais. São Paulo, 2005

Idade Gestacional (dias)	Grupo experimental	Tempo de tratamento (horas)		
		24	48	96
90	controle	$0,686 \pm 0,07^{a,1}$	$0,698 \pm 0,06^1$	$1,240 \pm 0,19^2$
	bFGF	$1,139 \pm 0,13^{b,1}$	$0,583 \pm 0,10^2$	$1,014 \pm 0,09^1$
	VEGF	$1,320 \pm 0,21^{b,1}$	$0,601 \pm 0,07^2$	$0,842 \pm 0,14^2$
	bFGF + VEGF	$1,021 \pm 0,13^{a,1}$	$0,659 \pm 0,04^2$	$0,828 \pm 0,09^{1,2}$
150	controle	$0,551 \pm 0,06^{a,b}$	$0,557 \pm 0,05$	$0,698 \pm 0,05^{a,b}$
	bFGF	$0,824 \pm 0,16^b$	$0,504 \pm 0,02$	$0,709 \pm 0,07^a$
	VEGF	$0,765 \pm 0,22^{a,b}$	$0,713 \pm 0,01$	$0,640 \pm 0,07^{a,b}$
	bFGF + VEGF	$0,338 \pm 0,01^{b,1}$	$0,489 \pm 0,05^2$	$0,519 \pm 0,02^{b,2}$
210	controle	$0,388 \pm 0,04^{a,1}$	$1,144 \pm 0,08^{a,2}$	$0,660 \pm 0,11^1$
	bFGF	$0,946 \pm 0,13^{a,b,1}$	$0,482 \pm 0,05^{b,2}$	$0,598 \pm 0,07^{1,2}$
	VEGF	$1,118 \pm 0,32^b$	$0,686 \pm 0,07^b$	$0,683 \pm 0,10$
	bFGF + VEGF	$1,365 \pm 0,15^{b,1}$	$0,577 \pm 0,06^{b,2}$	$0,410 \pm 0,08^2$
270	controle	$1,776 \pm 0,17^{a,b}$	$1,868 \pm 0,36$	$1,630 \pm 0,26$
	bFGF	$1,394 \pm 0,14^{b,c}$	$1,804 \pm 0,28$	$1,583 \pm 0,21$
	VEGF	$1,320 \pm 0,08^{c,1}$	$2,493 \pm 0,16^2$	$1,812 \pm 0,26^{1,2}$
	bFGF + VEGF	$1,849 \pm 0,13^a$	$1,905 \pm 0,13$	$1,771 \pm 0,21$

Valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 9$). Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. Números diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as horas de tratamento no mesmo grupo. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Os efeitos dos fatores de crescimento VEGF e bFGF na produção de progesterona pelas células placentárias bovinas foram observados somente após 24 horas de tratamento. O VEGF estimulou significativamente ($p < 0,05$) a produção de progesterona pelas células placentárias aos 90 e 210 dias de gestação (Figuras 13 e 14). A adição do bFGF ao meio de cultivo estimulou a produção do hormônio ($p < 0,05$) aos 90 dias de gestação (Figura 13). Em células de 270 dias de gestação foi observada uma produção de progesterona significativamente inferior ($p < 0,05$) no grupo tratado com o VEGF (Figura 14). A adição dos fatores de crescimento conjuntamente no meio de cultivo determinou um estímulo ($p < 0,05$) na produção de progesterona em células placentárias bovinas de 210 dias de gestação (Figura 14).

Figura 13 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF aos 90 e 150 dias de gestação. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 9$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as horas de tratamento no mesmo grupo. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

Figura 14 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF aos 210 e 270 dias de gestação. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos ($n \geq 10$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. Número de asteriscos diferente corresponde a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as horas de tratamento no mesmo grupo. Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

5.3.3 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas de animais clonados aos 270 dias de gestação

Os resultados demonstram que as células placentárias do grupo controle aos 270 dias de gestação de animais clonados produziram quantidades de progesterona semelhantes às células de animais não clonados na mesma idade gestacional após 24, 48 e 96 horas de cultivo ($1,502 \pm 0,16$ ng/mg de proteína versus $1,776 \pm 0,17$ ng/mg de proteína; $1,376 \pm 0,18$ ng/mg de proteína versus $1,868 \pm 0,36$ ng/mg de proteína e $1,713 \pm 0,26$ ng/mg de proteína versus $1,630 \pm 0,26$ ng/mg de proteína, respectivamente) (Figura 15 - Apêndice 16).

Figura 15 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle aos 270 dias de gestação de animais clonados e não clonados. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos em animais clonados ($n = 12$) e não clonados ($n \geq 10$). Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

5.3.4 Produção de progesterona pelas células placentárias bovinas tratadas com os fatores de crescimento aos 270 dias de gestação em animais clonados

As concentrações de progesterona no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com os fatores de crescimento provenientes de gestações de 270 dias de animais clonados estão indicados na tabela 10 (Anexo 17).

Tabela 10 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/mg}$ de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF ao 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2005

Grupo experimental	Tempo de tratamento (horas)		
	24	48	96
Controle	$1,152 \pm 0,16$	$1,376 \pm 0,18$	$1,713 \pm 0,26$
bFGF	$1,418 \pm 0,14$	$1,400 \pm 0,17$	$1,346 \pm 0,23$
VEGF	$1,327 \pm 0,15$	$1,616 \pm 0,14$	$1,988 \pm 0,10$
bFGF + VEGF	$1,592 \pm 0,24$	$1,646 \pm 0,21$	$1,992 \pm 0,05$

Valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos (grupos controle e bFGF: $n \geq 11$; grupos VEGF e bFGF + VEGF: $n \geq 3$). Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

O tratamento das células placentárias de bovinos clonados com os fatores de crescimento VEGF e bFGF não influenciou significativamente ($p > 0,05$) a produção de progesterona por estas células (Figura 16).

Figura 16 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF, bFGF + VEGF aos 270 dias de gestação em animais clonados. Os valores representam média $\pm$ EPM de três diferentes experimentos (grupos controle e bFGF: $n \geq 11$; grupos VEGF e bFGF + VEGF: $n \geq 3$). Valores sem identificação não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSAO

Os fatores de crescimento VEGF e bFGF são identificados como os principais moduladores da neovascularização placentária (REYNOLDS; REDMER, 2001). As ações destes fatores de crescimento no sistema vascular são mediadas pela ativação de receptores específicos localizados nas células endoteliais placentárias (REYNOLDS; REDMER, 2001). Este trabalho demonstrou que ambos os fatores de crescimento e seus receptores são expressos na placenta bovina aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação em animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. Além disso, demonstrou-se uma nova ação extravascular do VEGF e bFGF na placenta bovina, ou seja, o envolvimento destes fatores na modulação do processo de produção de progesterona pelas células placentárias em cultura.

A presença do VEGF e seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células placentárias tem sido descrita em diversas espécies (humanos: HELSKE et al., 2001; SHARKEY et al., 1993; WULFF et al., 2002; ovinos: BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2000; suínos WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; visão: WINTHER; DANTZER, 2001). Nos bovinos, a presença deste fator foi descrita em células do epitélio e estroma maternos e em células do epitélio fetal e seus receptores foram localizados em células do epitélio e estroma maternos e fetais e em células endoteliais.

Em acordo com os relatos presentes na literatura (BURLEIGH et al., 2004; MÜHLHAUSER et al., 1996; SRIVASTAVA et al., 1998; WEI et al., 2004) a proteína bFGF foi localizada também nas células placentárias bovinas. Pfarrer et al. (2003) descreveram a presença do RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) do fator nas células placentárias maternas e fetais e em células endoteliais. No presente trabalho a proteína bFGF foi localizada nestas células e ainda nas células do estroma fetal e materno em todas as idades gestacionais investigadas nos animais não clonados e clonados. Observou-se que o fator apresenta-se distribuído pelo citoplasma destas células e ainda tem localização nuclear nas células do estroma materno e fetal e nas células endoteliais.

Além do bFGF, foi identificada na placenta bovina de animais não clonados e clonados a expressão das proteínas dos receptores FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3. O FGFR-1 também foi identificado em células endoteliais, do estroma e do sinciotrofoblasto da placenta humana (ARANY; HILL, 1998) e de acordo com Pfarrer et al. (2003) os receptores FGFR-1 e FGFR-2 são expressos na placenta bovina desde os 80 dias de gestação até o pré-parto em células trofoblásticas binucleadas e mononucleadas, células do epitélio caruncular e células endoteliais. Neste trabalho, estes receptores foram localizados no citoplasma e núcleo das células do epitélio (caruncular) e estroma maternos, células do epitélio (trofoblásticas) e estroma fetais e células endoteliais; a localização do receptor FGFR-3 apresentou-se predominantemente nuclear.

A localização nuclear do bFGF e seus receptores tem sido descrita por diversos autores (GONZALEZ et al., 1995; HSIA; RICHARDSON; NUGENT, 2003;

JOHNSTON et al., 1995; MYERS et al., 2003; SHENG; LEWIS; CHIRICO, 2004; SINOWATZ et al., 2000; STACHOWIAK ET AL., 1997; ZAMMIT et al., 2001). De acordo com Joy et al. (1997) e Stachowiak et al. (1997) a localização nuclear do bFGF e do receptor FGFR-1, respectivamente, estaria envolvida com a proliferação celular, uma vez que astrócitos em divisão possuem predominantemente o bFGF nuclear e astrócitos nos quais o processo de divisão está inibido possuem o fator somente no citoplasma. A presença citoplasmática do bFGF e seus receptores em células do epitélio materno e fetal na placenta bovina sugere que este fator seja, neste caso, responsável por modular também outra (s) função (ões) que não a proliferação celular.

De acordo com Winther, Ahmed, Dantzer (1999) e Winther, Dantzer (2001) a distribuição espaço-temporal do VEGF e seus receptores na placenta sustenta a idéia de que os fatores de crescimento desempenham diferentes funções celulares durante a gestação. Neste trabalho observou-se que os receptores VEGFR-1 e bFGFR-1 não estão presentes em células dos estromas materno e fetal aos 270 dias de gestação em animais não clonados e clonados. Estes dados sugerem que também na placenta bovina o VEGF e bFGF podem estar modulando diferentes funções de acordo com o período gestacional ou ainda que a função desempenhada por estes fatores nas células dos estromas materno e fetal não seja mais requerida na fase que precede parto e, então, estes receptores não são fisiologicamente expressos neste período na placenta. Além disso, possíveis diferenças nos níveis de expressão destes fatores também poderiam influenciar a função destes na placenta. Os resultados indicam que, aparentemente, a expressão do VEGF, bFGF e seus receptores é variável entre

os diferentes tipos celulares da placenta durante a gestação e que especialmente essa expressão difere dentre animais clonados e não clonados de mesma idade gestacional. No entanto, estudos mais específicos relacionados à quantificação destas proteínas devem ser realizados para que os resultados possam ser conclusivos.

Os dados relativos a imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na células da placenta bovina sugerem que os fatores atuam de maneira autócrina e parácrina na modulação de suas funções biológicas neste órgão através da ativação de seus receptores de superfície celular. Adicionalmente, a localização nuclear do bFGF e seus receptores sugere que o fator possa também participar da sinalização de vias intrácrinas nestas células. A localização dos receptores para VEGF e bFGF em vários tipos celulares da placenta e não somente em células endoteliais foi descrita na literatura (PFARRER et al., 2003; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). De fato, a modulação dos processos de apoptose e esteroidogênese por estes fatores tem sido descrita no tecido ovariano (GRASSELLI et al., 2002; GREENAWAY et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2001; LI; JOHNSON, 1993; LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996; MIYAMOTO et al., 1992; VERNON; SPICER, 1994; YAMOTO et al., 1993). Sendo assim, em uma segunda etapa foram preparadas culturas de células placentárias com o objetivo de verificar se o VEGF e o bFGF atuam como moduladores da produção de progesterona neste órgão.

No presente estudo foram preparadas culturas de células placentárias totais, ou seja, incluindo todos os tipos celulares presentes nos compartimentos

materno e fetal da placenta. Desta forma puderam ser mantidas as relações intercelulares, uma vez que muitas das funções placentárias, tais como a produção de estrógenos e progesterona, são dependentes da comunicação celular. Para a produção de progesterona, por exemplo, as células binucleadas utilizam a pregnenolona produzida pelas células mononucleadas, uma vez que a enzima citocromo P450_{scc}, necessária na via de conversão do colesterol em pregnenolona, esta presente apenas nestas células (SHEMESH et al., 1989).

Durante o preparo dos cultivos celulares foram observadas diferentes porcentagens de viabilidade celular. Essas diferenças podem ser devidas ao tempo decorrido entre a coleta do material e o início do cultivo celular ou estar relacionadas a outros fatores, tais como características individuais do tecido placentário utilizado. Os experimentos foram conduzidos sob as mesmas condições de cultivo e o mesmo número de células viáveis foi adicionado em cada cavidade, no entanto, diferenças relacionadas ao número de células viáveis durante o período experimental, fossem devidas a características inerentes às células utilizadas ou mesmo à influência dos fatores de crescimento sobre a proliferação destas células, poderiam proporcionar resultados sub ou superestimados da produção de progesterona por estas células. Para corrigir essas possíveis diferenças, todos os dados relativos às concentrações de progesterona no meio de cultivo foram expressos em relação ao conteúdo protéico presente em cada cavidade experimental.

Os resultados demonstraram que as células placentárias bovinas em cultura foram capazes de produzir progesterona em todas as idades gestacionais

estudadas (Figura 5). Aos 90 dias de gestação notou-se uma produção significativamente maior de progesterona após 96 horas de experimento, sugerindo haver um efeito cumulativo do hormônio no meio de cultura ao longo do tempo. Uma maior produção de progesterona também foi observada após 48 horas de cultivo em células de 210 dias de gestação, esta provavelmente relacionada a uma maior atividade destas células após um período de adaptação ao ambiente e condições de cultura.

Nos bovinos o papel essencial do corpo lúteo durante a primeira metade da gestação é descrito por diversos autores. A retirada da fonte ovariana de progesterona durante esse período é seguida pelo aborto, entretanto, a ovariectomia ou administração de drogas luteolíticas entre os dias 180 e 250 de gestação não induzem o aborto (DAY, 1977; ESTERGREEN et al., 1967; JOHNSON et al., 1981). Estes dados sugerem que a progesterona requerida após a metade da gestação tenha origem placentária. De fato, após os 200 dias de gestação, ocorre uma crescente diminuição da atividade secretória do corpo lúteo (CL). Esta redução da produção de progesterona no CL ocorre em consequência de um declínio no número de células luteínicas viáveis, bem como de uma redução da atividade secretória e da responsividade aos agentes tróficos (SHEMESH, 1990). A identificação da produção de progesterona pela placenta durante todo o período gestacional associada à localização dos receptores de progesterona em células do estroma e pericitos vasculares maternos (HOFFMANN; SCHULER, 2002; SCHULER et al., 1999), embasam a idéia de que, além da manutenção da gestação, a progesterona placentária teria a função de desempenhar ações biológicas locais, atuando como um fator parácrino

envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e função placentária. Funções adicionais da progesterona placentária têm sido identificadas em outras espécies, como por exemplo, a proteção da placenta contra o sistema imunológico materno na ovelha e em humanos (HANSEN; LIU, 1996; PICCINNI et al., 1995) ou a manutenção da integridade histológica da porção materna da placenta em ratos (OGLE; MILLS; COSTOFF, 1990), eventos provavelmente regulados localmente.

Neste trabalho observou-se que as células placentárias possuem diferentes capacidades de síntese de progesterona dependendo da idade gestacional. Embora não diferente estatisticamente, notou-se que as células aos 150 dias de gestação sintetizaram menores quantidades de progesterona quando comparadas às outras idades gestacionais. Já as células placentárias aos 270 dias de gestação produziram quantidades significativamente maiores de progesterona em relação às células de 90, 150 e 210 dias de gestação. Os dados deste trabalho concordam com as observações relacionadas ao padrão de síntese de progesterona observada na placenta dos bovinos. Nestes animais, a síntese de progesterona placentária pode ser identificada a partir dos 50-60 dias de gestação, ou seja, durante o primeiro terço da gestação (SHEMESH et al., 1992 e 1994). Entre os 90 e 135 dias de gestação pode ser observado um aumento crescente na síntese deste hormônio (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992), o qual é seguido por um decréscimo nesta produção, observado entre os dias 140 e 182 de gestação. A produção de progesterona placentária eleva-se novamente no final da gestação (SHEMESH; HANSEL; STRAUSS III, 1984).

A síntese de hormônios esteróides placentários ocorre tanto nas células de origem fetal como nas de origem materna. Estudos demonstram que estas células têm diferentes habilidades relacionadas à produção destes hormônios e que este padrão de síntese de progesterona observado na placenta bovina esta relacionado a alterações na capacidade de síntese das células placentárias de origem materna e na expressão das enzimas esteroidogênicas nestas células. A expressão do RNAm e a proteína da enzima P450scc nos cotilédones fetais é constante durante toda a gestação (CONLEY et al., 1992), ou seja, estas células podem produzir o hormônio desde os períodos iniciais até o final da gestação (SHEMESH et al., 1989). Em contrapartida, as células de origem materna produzem baixas ou indetectáveis concentrações de progesterona até os 80 dias de gestação e então um crescente aumento da produção do hormônio pode ser notado entre os 90 e 135 dias de gestação. Este aumento na produção de progesterona não é devido a alterações na expressão das enzimas esteroidogênicas nestas células, mas devido a um aumento na atividade das enzimas P450scc e 3 β -HSD (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992). O período entre os dias 140 e 182 de gestação é marcado por um decréscimo na produção de progesterona pelas células placentárias maternas, este relacionado com o decréscimo na expressão da enzima P450scc observado nesta fase (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992). No final do período gestacional as células placentárias maternas recuperam a capacidade de síntese de progesterona (SHEMESH; HANSEL; STRAUSS III, 1984).

Estudos demonstram que a capacidade de esteroidogênese das células placentárias maternas tem relação com a atividade adrenal fetal. Segundo Conley

et al. (1992) a ativação da adrenal do feto determina alterações na expressão das enzimas esteroidogênicas na placenta. Esta ativação ocorre no primeiro trimestre da gestação e é marcada pelos aumentos na expressão de enzimas esteroidogênicas na adrenal e da concentração de glicocorticóides sistêmicos fetais. Este período de ativação é seguido por um período de quiescência da adrenal e a reativação da sua função e conseqüente aumento dos níveis de glicocorticóides na circulação fetal ocorre novamente após os 240 dias de gestação (LUND et al., 1988). A ativação inicial da função adrenal precede o aumento placentário da P45017 α , enzima relacionada à síntese de precursores andrógenos para a produção de estrógenos. Na fase de quiescência da adrenal fetal esta enzima tem sua expressão diminuída na placenta, sugerindo que a sua expressão possa ser regulada pela exposição da placenta aos glicocorticóides fetais (CONLEY et al., 1992). Não existem dados sobre a relação entre a exposição aos glicocorticóides fetais e a expressão das enzimas relacionadas à produção de progesterona na placenta, no entanto, a diminuição da expressão da enzima P450scc observada nas células placentárias maternas entre os dias 140 e 182 de gestação pode estar relacionada também à menor exposição aos glicocorticóides fetais durante a fase de quiescência da adrenal fetal. Após este período, os níveis de progesterona sintetizados pela placenta voltam a aumentar, como observado também neste trabalho aos 210 dias de gestação, período em que a adrenal fetal ainda encontra-se em fase de quiescência. Os dados sugerem a presença de outro mecanismo regulando a expressão ou atividade das enzimas relacionadas à produção de progesterona nesta fase e que, provavelmente, o mecanismo associado à exposição aos glicocorticóides fetais determina a síntese dos elevados níveis do hormônio observados aos 270 dias de gestação. A maior

capacidade de síntese de progesterona pela placenta parece ser particularmente importante na manutenção da gestação a partir dos 200 dias já que é observada uma crescente diminuição da atividade do corpo lúteo neste período. Conley et al. (1995), descrevendo o padrão de expressão das enzimas esteroidogênicas durante o desenvolvimento folicular e do corpo lúteo em bovinos, relatam que a ovulação está associada a uma marcante diminuição da expressão da enzima $P450c17\alpha$ (até níveis indetectáveis) e um aumento da expressão da enzima 3β -HSD no parênquima do corpo lúteo em organização. No corpo lúteo em desenvolvimento há um aumento da proporção de células que expressam a enzima 3β -HSD e a fase de regressão do corpo lúteo é caracterizada por declínio no número de células parenquimais que expressam esta enzima. Segundo os autores estas alterações nos níveis de expressão destas enzimas influenciam o padrão de secreção hormonal do corpo lúteo na espécie bovina. Após os 200 dias de gestação, um dos motivos relacionados à redução da produção de progesterona observada no corpo lúteo gestacional é a redução da atividade secretória das células luteínicas. Com base nos dados acima descritos, pode-se sugerir que esta diminuição na expressão da enzima 3β -HSD também possa ocorrer no corpo lúteo durante o terço final de gestação e determine a diminuição da secreção de progesterona pelo órgão observada neste período.

Os principais efeitos dos fatores de crescimento na produção de progesterona pelas células placentárias foram observados somente após 24 horas de cultivo. Tanto efeitos agudos como efeitos em longo prazo destes fatores de crescimento são descritos na literatura (MIYAMOTO et al., 1992; NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005). Neste trabalho não foi observada influência do VEGF e

bFGF sobre a produção de progesterona pelas células placentárias após 48 e 96 horas de cultivo. Diversos podem ser os motivos pelos quais estes efeitos não foram notados: as células placentárias bovinas podem responder somente de forma aguda a estes fatores de crescimento; o VEGF e bFGF podem ser degradados ou tornarem-se inativos depois de determinado tempo em cultura; o estímulo inicial na produção de progesterona pelos fatores de crescimento pode ter ocasionado o esgotamento das reservas de colesterol, substrato necessário durante o processo de esteroidogênese. Com base nos estudos relacionados ao tratamento de culturas celulares com estes fatores (Grasselli et al., 2002), podem-se excluir as possibilidades de que 1) as células respondam somente de maneira aguda ao tratamento com VEGF e bFGF e 2) que estes possam ser degradados ou inativados neste sistema de cultivo. A explicação mais plausível seria o esgotamento das reservas do substrato requerido para a esteroidogênese após o estímulo inicial pelos fatores de crescimento. Esta hipótese foi testada somando-se a produção total de progesterona por grupo experimental (controle, bFGF, VEGF e bFGF + VEGF) ao longo das 96 horas de cultivo. Este procedimento foi repetido para todas as idades gestacionais estudadas (90, 150, 210 e 270 dias). Observou-se que a produção total de cada grupo foi semelhante (apêndice 18) apesar dos efeitos agudos resultantes de alguns tratamentos. A adição de precursores esteroidogênicos, neste caso o colesterol ou a pregnenolona, ao meio de cultivo permitiria avaliações relacionadas aos efeitos em longo prazo dos fatores de crescimento após 48 e 96 horas de cultura.

O colesterol utilizado pela placenta durante o processo de esteroidogênese é adquirido a partir da circulação materna, portanto, na situação *in vitro*, as fontes

de colesterol seriam somente as próprias reservas celulares e o colesterol proveniente do soro fetal bovino presente no meio de cultivo, já que neste sistema de cultivo não foram utilizados precursores da esteroidogênese, tais como colesterol ou pregnenolona. Observou-se que as células aos 270 dias de gestação produziram maiores concentrações de progesterona quando comparadas às células nas outras idades gestacionais. Estes dados sugerem que estas células possam ter maiores reservas intracelulares de colesterol, já que nesta fase gestacional seria realmente necessária uma maior produção placentária de progesterona no intuito de suprir a hipofunção ovariana normalmente observada neste período (SHEMESH, 1990).

Este estudo demonstrou que os fatores de crescimento VEGF e bFGF participam da modulação da produção de progesterona pelas células placentárias bovinas, produção esta dependente da fase gestacional. O VEGF, aos 90 e 210 dias de gestação, e o bFGF, aos 90 dias de gestação, estimularam significativamente ($p < 0,05$) a produção do hormônio após 24 horas de cultivo. Em células placentárias de 150 dias de gestação, embora também tenha sido observada uma maior produção de progesterona após a adição do VEGF, esta não diferiu da produção observada no grupo controle ($p > 0,05$), sendo o mesmo observado em relação ao tratamento com o bFGF em células de 150 e 210 dias de gestação. Em contrapartida, aos 270 dias de gestação, ambos os fatores influenciaram de maneira negativa a produção de progesterona pelas células placentárias, sendo observada uma produção de progesterona significativamente inferior ($p < 0,05$) no grupo tratado com o VEGF e uma produção inferior, porém

não diferente estatisticamente em relação à observada no grupo controle ($p > 0,05$), após o tratamento com o bFGF.

Os resultados apresentados neste trabalho concordam com observações prévias sobre a ação temporal do VEGF e bFGF na modulação da produção de progesterona. Em um estudo *in vitro* com células da granulosa de suínos, Grasselli et al. (2002) demonstraram que a resposta observada após o tratamento com os fatores de crescimento foi dependente da fase do desenvolvimento folicular. O tratamento com o bFGF determinou um aumento na produção de progesterona pelas células da granulosa provenientes de folículos médios (3-5 mm), não influenciando a produção do hormônio em células de folículos pequenos (< 3 mm) e grandes (> 5 mm). Já em relação ao VEGF, os autores verificaram um efeito modulatório na produção de progesterona apenas em células provenientes de folículos pequenos, onde a adição do fator determinou uma diminuição nos níveis de progesterona no meio de cultivo. De acordo com Grasselli et al. (2002), após 48 horas de cultivo, a produção basal de progesterona e estradiol pelas células da granulosa foi, respectivamente: 0,70 e 0,38 em células de folículos pequenos; 2,04 e 6,70 em células de folículos médios e 75 e 20 em células de folículos grandes. Estudos demonstram que o estrógeno modula a expressão do VEGF e bFGF (NAKAGAWA; FUJIMOTO; TAMAYA, 2004; SEO et al., 2004). O estímulo da produção de progesterona em folículos médios pelo bFGF e em folículos pequenos pelo VEGF sugere que as ações destes fatores em folículos seja influenciada pela concentração de estradiol. A ação do VEGF se deu quando os níveis de estradiol eram baixos (inferiores aos níveis de progesterona); em contrapartida, o efeito estimulatório do bFGF foi observado quando os níveis de

estradiol eram médios (superiores aos níveis de progesterona). Em folículos grandes, onde a concentração de estradiol era elevada, porém inferior aos níveis de progesterona não foi observado os efeitos dos fatores de crescimento.

Observou-se que o VEGF apresenta-se normalmente expresso na placenta bovina ao longo da gestação. As ações biológicas deste fator são dependentes da ativação dos receptores tirosina quinase VEGFR-1 e VEGFR-2 (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). A ativação do receptor VEGFR-1 provavelmente está relacionada à manutenção e fina regulação da formação dos vasos sanguíneos (SHIBUYA, 2001), sendo a maior parte das ações biológicas induzidas pelo VEGF no tecido endotelial mediadas pela ativação do VEGFR-2 (MEYER; RAHIMI, 2003). Adicionalmente, estudos demonstram a formação espontânea de receptores heterodímeros VEGFR-1/R-2 (AUTIERO et al., 2003). A ativação destes receptores determina ações biológicas específicas não observadas durante a fosforilação de receptores homodímeros, incluindo a síntese de PGI_2 pelas células endoteliais vasculares (NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005). Como observado neste trabalho, ambos os receptores são expressos nas células placentárias bovinas, no entanto estudos mais detalhados relacionados à atividade dos receptores, seja pelo uso de análogos do VEGF, inibidores seletivos de seus receptores (NEAGOE; LEMIEUX; SIROIS, 2005) ou pelo silenciamento gênico destes (RNA interference) (ZHOU et al., 2004), são necessários para elucidar se os efeitos observados sobre a produção de progesterona pelas células placentárias bovinas foram devidos à ativação dos receptores VEGFR-1 ou VEGFR-2, ou ainda se estes se deram via fosforilação do receptor heterodímero VEGFR-1/R-2.

De forma semelhante ao VEGF, o bFGF exerce suas funções através da fosforilação de receptores tirosina quinase (FGFR-1 a 5) (SLEEMAN et al., 2001). Neste trabalho, foram estudados e identificados na placenta bovina os receptores 1, 2 e 3. Estes receptores apresentam diferentes isoformas originadas a partir da derivação alternativa do exon III (IIIa, IIIb e IIIc) (BIKFALVI et al., 1997a). Os anticorpos utilizados nesta investigação podem identificar todas as isoformas destes receptores, no entanto, é sabido que o bFGF ativa preferencialmente as isoformas contendo o domínio IIIc destes receptores (COLEMAN, 2003). Estudos específicos relacionados à atividade dos receptores são necessários para identificar precisamente qual o receptor está envolvido na modulação da produção de progesterona observada após o tratamento com o fator de crescimento. Além disso, futuros estudos relacionados à identificação e localização tecidual dos receptores FGFR-4 e 5 são necessários uma vez que o bFGF é um dos principais ligantes de ambos os receptores (BIKFALVI et al., 1997b; SLEEMAN et al., 2001).

A influência do VEGF e bFGF na modulação da esteroidogênese é descrita por diversos autores (FAUSER; BAIRD; HSUEH, 1988; GRASSELLI et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2001; LIEBERMANN; SCHAMS; MIYAMOTO, 1996; MIYAMOTO et al., 1992; MURONO; WASHBURN, 1990; RAESIDE et al., 1988; SORDOILLET et al., 1992). No entanto, estes não elucidam completamente quais os mecanismos envolvidos nesta regulação. Segundo Li e Johnson (1993) o efeito inibitório do bFGF sobre a produção de androstenediona em células da granulosa de galinhas é mediado diretamente pela inibição da expressão da enzima citocromo P45017 α . Em contrapartida, de acordo com Kobayashi et al. (2001),

que estudaram os efeitos do VEGF e bFGF em cultura de células luteínicas, o aumento da produção de progesterona observado após a adição do VEGF e bFGF na fase inicial do corpo lúteo de bovinos, seria mediado indiretamente pelo estímulo destes fatores na secreção luteínica de angiotensina II e $\text{PGF2}\alpha$, que modulariam os mecanismos de síntese de progesterona nesta fase. Vários são os mecanismos que podem estar envolvidos na modulação do processo de esteroidogênese pelo VEGF e bFGF nas células placentárias bovinas. Os fatores de crescimento podem atuar diretamente sobre a expressão ou atividade das enzimas esteroidogênicas, mediar a ativação de mecanismos que estejam ligados a esteroidogênese ou ambos os mecanismos podem estar envolvidos.

O controle da expressão das enzimas esteroidogênicas pelo VEGF e bFGF pode ocorrer em diversos níveis. A expressão de um gene pode ser controlada em várias etapas incluindo eventos transcricionais e pós-transcricionais, tais como estabilidade do RNAm, tradução, estabilidade da proteína e sua modificação (DAY; TUIE, 1998). De acordo com Chuzel et al. (1996) o bFGF modula a taxa de transcrição da enzima $\text{P450c17}\alpha$, diminuindo sua expressão e conseqüentemente a produção de testosterona pelas células testiculares suínas. Em ratos, o bFGF diminui a atividade da enzima $\text{P450c17}\alpha$ (FAUSER; BAIRD; HSUEH, 1988; MURONO; WASHBURN, 1990), no entanto, os autores não determinam se o fator é responsável pela modulação de eventos transcricionais ou pós-transcricionais.

Recentemente tem sido dispensada especial atenção ao estudo dos fatores epigenéticos envolvidos na regulação da expressão gênica. De fato, a regulação

da expressão de um gene ou supressão de sua transcrição pode ser influenciada pela estrutura de sua cromatina. Dentre as modificações epigenéticas envolvidas na regulação da transcrição estão as modificações pós-traducionais ocorridas nas histonas presentes na cromatina (MARKS et al., 2004). Estas modificações, as quais incluem processos de acetilação e fosforilação, determinam alterações na estrutura da cromatina e representam mecanismos chave na regulação da transcrição gênica (KHAN; KRISHNAMURTHY, 2005; PETERSON; LANIEL, 2004). Diversas famílias de enzimas estão envolvidas nos processos de acetilação (histona acetiltransferases e deacetilases) e fosforilação (histona quinases), atuando primariamente na organização da interação entre o DNA (ácido desoxirribonucléico) e as histonas e participando como moléculas facilitadoras ou repressoras da transcrição (PETERSON; LANIEL, 2004; SPOTSWOOD; TURNER, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que as atividades acetiltransferase e deacetilase podem ser intrínsecas a certos fatores da transcrição e a proteínas (DAVIE; SPENCER, 1999).

Estudos demonstram que o bFGF, através da ativação do fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), atua inibindo a acetilação de histonas no processo de indução do mesoderma ocorrido durante a embriogênese (XU et al., 2000). Segundo os autores essa inibição pode ser mediada por alterações na atividade das enzimas acetiltransferases ou deacetilases, ou por uma possível atividade intrínseca deacetilase do AP-1 ou de outros fatores de transcrição ou proteínas ativados por este fator. Sun et al. (2001) demonstraram que o fator aumenta a compactação da cromatina, podendo contribuir para a regulação da expressão gênica. O VEGF também induz a acetilação de histonas através da

ativação de fatores de transcrição em células endoteliais humanas (JOSHI et al., 2005). Os dados acima demonstram que VEGF e bFGF são fatores que podem participar da regulação de fatores epigenéticos, sugerindo a possibilidade de ser este um dos mecanismos envolvidos na modulação da produção de progesterona pelas células placentárias. Regulando processos como a acetilação ou fosforilação das histonas, o VEGF e bFGF podem estimular ou inibir a expressão das enzimas esteroidogênicas, determinando um aumento ou diminuição, respectivamente, da produção de progesterona.

O VEGF e bFGF podem ainda modular indiretamente a produção de progesterona pelas células placentárias através da regulação de outros mecanismos envolvidos no processo de esteroidogênese. Recentemente foi demonstrado que o VEGF promove a ativação das SREBPs 1 e 2 (sterol regulatory element binding proteins) em células endoteliais (ZHOU et al., 2004). A capacidade do fator em ativar estas proteínas, além de importante para a regulação do processo de angiogênese (ZHOU et al., 2004), sugere que este possa ser um dos mecanismos envolvidos na regulação da produção de progesterona placentária observada neste estudo. As SREBPs são importantes fatores de transcrição envolvidos na regulação da homeostase lipídica celular (HORTON, 2002). Uma vez ativadas estas proteínas promovem a transcrição de genes envolvidos na síntese de colesterol e ácidos graxos, através da ligação em SREs (sterol regulatory elements) ou uma sequência conhecida como E-box (CANNTG), presente na região promotora destes genes (SHIMANO, 2001).

Entre os genes ativados pelas SREBPs encontra-se o gene da proteína StAR (CHRISTENSON et al., 1998; RUIZ-CORTÈS et al., 2003; SHEA-EATON et al., 2001). Esta proteína regula uma importante etapa da esteroidogênese, controlando o transporte intracelular de colesterol do citoplasma celular para a membrana mitocondrial interna, na qual a primeira etapa da biosíntese hormonal ocorre, ou seja, onde a enzima P450_{scc} metaboliza o colesterol em pregnenolona (STRAUSS III et al., 2003). O papel essencial da StAR na produção de esteróides é revelado pelo severo comprometimento da esteroidogênese após a inativação de seu gene em camundongos (CARON et al., 1997) ou na hiperplasia lipóide adrenal congênita, doença humana de ocorrência natural onde são observadas mutações gênicas dessa proteína (LIN et al., 1995; MILLER, 1997). Adicionalmente, estudos sugerem que a StAR tem papel central na secreção luteínica de progesterona, uma vez que estudos *in vivo* (JUENGEL et al., 1995) e *in vitro* (MAMLUK; GREBER; MEIDAN, 1999) tem demonstrado a associação positiva entre a expressão da proteína StAR em células luteínicas e a produção do hormônio por estas células. Desta forma, através da ativação das SREBPs, o VEGF e também o bFGF podem indiretamente regular da expressão da StAR e modular a produção da progesterona nas células placentárias bovinas.

A adição conjunta do VEGF e bFGF ao meio de cultura também determinou respostas variadas de acordo com a idade gestacional. Aos 90 dias de gestação, observou-se que a produção de progesterona pelas células tratadas com os dois fatores, embora não diferente estatisticamente, foi maior em relação ao grupo controle. Quando comparados os grupos tratados com os fatores isoladamente e o grupo tratado com ambos os fatores, notou-se que VEGF e

bFGF em conjunto determinaram uma menor produção de progesterona ($p < 0,05$). Aos 150 dias de gestação, após o tratamento com os dois fatores de crescimento, foi notada produção de progesterona inferior às observadas nos grupos controle ($p < 0,05$) e tratados com o bFGF ($p < 0,05$) e VEGF ($p > 0,05$). Uma resposta estimulatória ($p < 0,05$) na produção do hormônio foi observada após 24 horas de tratamento com o VEGF e bFGF nas células placentárias bovinas de 210 dias de gestação e, embora esta produção também tenha sido superior àquela observada nos grupos tratados com os fatores isoladamente, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Aos 270 dias de gestação o tratamento com ambos os fatores não influenciou a produção de progesterona pelas células placentárias, não sendo, portanto, observado o efeito inibitório identificado após o tratamento com os fatores isoladamente. Os dados acima demonstram que a presença dos fatores de crescimento no meio de cultivo determina diferentes respostas em relação aos grupos tratados com os fatores isoladamente e ainda de acordo com a idade gestacional estudada. Estes dados tornam-se importantes uma vez que *in vivo* ambos estão expressos na placenta durante todo o período gestacional e provavelmente atuam conjuntamente na modulação do processo de produção de progesterona deste órgão.

Aos 210 dias de gestação é sugerido um efeito aditivo na produção de progesterona após 24 horas de tratamento com o VEGF e bFGF conjuntamente. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a interação dos fatores VEGF e bFGF durante o processo de angiogênese, resultando em uma amplificação da resposta quando comparada à resposta obtida com os fatores isoladamente. De acordo com Castellon et al. (2002) um efeito aditivo na formação capilar foi notado

quando o VEGF e o bFGF foram adicionados conjuntamente à cultura primária de células endoteliais da retina de bovinos ou no meio de cultivo de células endoteliais da veia umbilical de humanos (CHEN et al., 2001). Além disso, o efeito sinérgico do VEGF e bFGF no processo de angiogênese tem sido descrito por diversos autores (ASAHARA et al., 1995; GOTO et al., 1993; PEPPER et al., 1992; PEPPER et al., 1998; SUN et al., 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que a adição combinada do VEGF e bFGF em células endoteliais resulta em uma maior e mais rápida formação capilar em relação à observada quando os fatores são adicionados isoladamente (GOTO et al., 1993; PEPPER et al., 1992; PEPPER et al., 1998; SUN et al., 2004). Este sinergismo foi confirmado também *in vivo*, quando a administração do VEGF e bFGF em modelos animais de isquemia do membro superior determinou um maior e mais rápido aumento da circulação colateral, resultando em uma melhora hemodinâmica superior quando comparada à determinada pela administração isolada dos fatores (ASAHARA et al., 1995). Embora aparentemente divergentes, os dados acima demonstram a existência da interação entre os fatores VEGF e bFGF, importante durante os processos de angiogênese normal e patológica, bem como em outras funções desempenhadas pelos mesmos, incluindo-se a produção de progesterona.

A maneira pela qual os fatores de crescimento atuam de maneira aditiva ou sinérgica não está totalmente elucidada e os mecanismos envolvidos podem ser complexos. Recentemente tem sido observado que a presença de certos fatores de crescimento são requisitos necessários para a correta sinalização e completa atividade de outros. Estudos demonstram que a neutralização do bFGF através de anticorpos inibe a angiogênese induzida pelo VEGF, sugerindo que a

angiogênese induzida por este fator é dependente do bFGF endógeno (MANDRIOTA; PEPPER, 1997). Da mesma forma, o VEGF endógeno parece ser importante para a angiogênese estimulada pelo bFGF, uma vez que a inibição do VEGFR-2 inibe não só a angiogênese induzida pelo VEGF como também inibe de maneira similar a induzida pelo bFGF (TILLE et al., 2001).

Adicionalmente, como VEGF e bFGF podem regular a fisiologia celular por diversas vias de sinalização, existe a possibilidade de que moléculas sinalizadoras sejam unicamente reguladas em resposta à combinação dos fatores, e assim, com a convergência das vias, a ação biológica resultante indicaria um efeito somatório de diferente magnitude. Embora estudos indiquem que a transfosforilação do VEGFR-2 pelo bFGF não ocorra durante o processo de angiogênese (TILLE et al., 2001), existe a possibilidade de que a ocorrência da fosforilação cruzada dos receptores destes fatores seja um dos mecanismos envolvidos na amplificação da resposta induzida após o tratamento com os dois fatores de crescimento. Vários fatores de crescimento podem estimular a expressão de outros fatores ou de seus receptores, atuando de maneira sinérgica ou aditiva na resposta final. De fato, estudos demonstraram que o bFGF estimula não só a expressão do VEGF, o aumento de sua proteína (HATA; ROOK; AIELLO, 1999; SEGHEZZI et al., 1998) e sua liberação (TOKUDA et al., 2000 e 2003; YASUDA et al., 2005), como também induz a expressão do RNAm e da proteína do VEGFR-2, o que pode explicar aumentos na resposta observada quando os dois fatores são adicionados conjuntamente (CHEN et al., 2001; HATA; ROOK; AIELLO, 1999; PEPPER et al., 1998). Diante disto, futuras investigações são necessárias com o intuito de revelar os mecanismos de

sinalização das ações aditivas destes fatores de crescimento no processo de esteroidogênese das células placentárias.

Neste trabalho observou-se que a produção de progesterona pelas células placentárias bovinas de animais clonados não foi inferior àquela observada na mesma idade gestacional em animais não clonados. Embora o padrão de resposta ao tratamento com o VEGF e bFGF tenha sido semelhante em relação aos animais não clonados, não se identificou diferenças significativas na produção de progesterona pelas células placentárias de animais clonados. Embora as três gestações de animais clonados estudados tenham chegado a termo, estas diferenças em relação à capacidade de resposta ao tratamento com os fatores de crescimento quando comparadas às células de animais não clonados podem ser resultantes de diferenças na ativação e expressão gênica nestas placentas. Estudos demonstram que as principais alterações observadas durante a gestação dos animais clonados estariam principalmente relacionadas a alterações no processo de reprogramação nuclear (KONO, 1998; YOUNG; FAIRBURN, 2000), ocorrendo alterações nos padrões de expressão de determinados genes, os quais podem não ser expressos ou ter sua expressão aumentada ou diminuída significativamente (NIEMANN et al., 2002). De fato, neste trabalho foram observadas diferenças em relação à expressão dos VEGF, bFGF e seus receptores quando comparados os animais clonados e não clonados, podendo estas estarem relacionadas as diferentes respostas obtidas durante as culturas celulares.

A localização celular citoplasmática das proteínas VEGF, bFGF e seus receptores nos diferentes tipos celulares da placenta sugere a participação destes fatores como moduladores autócrinos e parácrinos em diferentes eventos celulares ocorridos durante a gestação e a localização nuclear do bFGF e seus receptores indica que o fator ativa mecanismos celulares intrácrinos. Este trabalho demonstrou que o VEGF e bFGF participam da modulação do processo de síntese de progesterona na placenta, no entanto, estes podem estar envolvidos na modulação de outros eventos ocorridos neste órgão, relacionados ou não à esteroidogênese, e futuros estudos fazem-se necessários para determinar todas as funções biológicas destes fatores na placenta bovina.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O VEGF e seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) e o bFGF e seus receptores (FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3) localizam-se em células do epitélio e estroma maternos, células do epitélio e estroma fetais e células endoteliais na placenta bovina nas diferentes idades gestacionais estudadas (90, 150, 210 e 270 dias) e que as células dos animais clonados apresentaram variações quantitativas em relação à expressão das proteínas estudadas;
- O sistema de cultivo celular utilizado foi parcialmente eficiente, já que não permitiu a avaliação dos efeitos dos fatores de crescimento após 48 e 96 horas de cultivo;
- O VEGF e bFGF modulam a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura, sendo a natureza do efeito (inibitório ou estimulatório) dependente da fase gestacional estudada;
- As células placentárias de bovinos clonados aos 270 dias de gestação apresentam semelhantes capacidades de produção de progesterona em relação às células de animais não clonados na mesma idade gestacional e não sofrem influência dos fatores de crescimento VEGF e bFGF, sugerindo diferenças na ativação e expressão gênica nestas placentas;

- A hipótese de que o VEGF e bFGF atuam localmente na placenta e modulam não somente os processos de vasculogênese e angiogênese deste órgão, mas também outros eventos celulares como a produção de progesterona foi comprovada, o que confere a estes fatores a papel de importantes reguladores do desenvolvimento e função placentária.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHEN, M. G.; JELTSCH, M.; KUKK, E.; MAKINEN, T.; VITALI, A.; WILKS, A. F.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 2, p. 548-553, 1998.

AITKENHEAD, M.; CHRIST, B.; EICHMANN, A.; FEUCHT, M.; WILSON, D. J.; WILTING, J. Paracrine and autocrine regulation of vascular endothelial growth factor during tissue differentiation in the quail. **Developmental Dynamics**, New York, v. 212, n. 1, p. 1-13, 1998.

ALLEN, W. R.; CARTER, A. M.; CHAVATTE-PALMER, P.; DANTZER, V.; ENDERS, A. C.; FREYER, C.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Comparative placentation-a workshop report. **Placenta** London, v. 24, p. S100-S103, 2003. Supplement A.

ARANY, E.; HILL, D. J. Fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 mRNA expression and peptide localization in placenta from normal and diabetic pregnancies. **Placenta**, London, v. 19, n. 2-3, p. 133-142, 1998.

ARESE, M.; CHEN, Y.; FLORKIEWICZ, R. Z.; GUALANDRIS, A.; SHEN, B.; RIFKIN, D. B. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 10, n. 5, p. 1429-1444, 1999.

ARGENTIN, G.; CICHETTI, R. In vitro proliferation of achondroplastic and normal mouse chondrocytes, before and after basic fibroblast growth factor stimulation. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 397-405, 2000.

ARNAUD, E.; TOURIOL, C.; BOUTONNET, C.; GENSAC, M.; VAGNER, S.; PRATS, H.; PRATS, A. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 1, p. 505-514, 1999.

ASAHARA, T.; BAUTERS, C.; ZHENG, L. P.; TAKESHITA, S.; BUNTING, S.; FERRARA, N.; SYMES, J. F.; ISNER, J. M. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. **Circulation**, New York, v. 92, n. 9, p. II365-II371, 1995. Supplement.

AUTIERO, M.; WALTENBERGER, J.; COMMUNI, D.; KRANZ, A.; MOONS, L.; LAMBRECHTS, D.; KROLL, J.; PLAISANCE, S.; DE MOL, M.; BONO, F.; KLICHE, S.; FELLBRICH, G.; BALLMER-HOFER, K.; MAGLIONE, D.; MAYR-

BEYRLER, U.; DEWERCHIN, M.; DOMBROWSKI, S.; STANIMIROVIC, D.; VAN HUMMELEN, P.; DEHIO, C.; HICKLIN, D. J.; PERSICO, G.; HERBERT, J. M.; COMMUNI, D.; SHIBUYA, M.; COLLEN, D.; CONWAY, E. M.; CARMELIET, P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 7, p. 936-943, 2003.

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

BACIC, M.; EDWARDS, N. A.; MERRILL, M. J. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. **Growth Factors**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 11-15, 1995.

BALLARD, P. L. Glucocorticoids and differentiation. **Monographs on Endocrinology**, Berlin, v. 12, p. 493-515, 1979.

BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MATTIOLI, M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 3, p. 858-864, 2000.

BARLEON, B.; SOZZANI, S.; ZHOU, D.; WEICH, H. A.; MANTOVANI, A.; MARME, D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. **Blood**, New York, v. 87, n. 8, p. 3336-3343, 1996.

BASTAKI, M.; NELLI, E. E.; DELL'ERA, P.; RUSNATI, M.; MOLINARI-TOSATTI, M. P.; PAROLINI, S.; AUERBACH, R.; RUCO, L. P.; POSSATI, L.; PRESTA, M. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 17, n. 3, p. 454-464, 1997.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, London, v. 167, n. 3, p. 371-382, 2000a.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 4, p. 1106-1114, 2000b.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine

ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 67, n. 2, p. 162-171, 2004.

BERNATCHEZ, P. N.; SOKER, S.; SIROIS, M. G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 43, p. 31047-31054, 1999.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; QUARTO, N.; MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 129, n. 1, p. 233-243, 1995.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 26-45, 1997a.

BIKFALVI, A.; SAVONA, C.; PEROLLET, C.; JAVERZAT, S. New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. **Angiogenesis**, Netherlands, v. 1, n. 2, p. 155-173, 1997b.

BJÖRKMAN, N. Placentation. In: ULLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1976. p. 351-369.

BOGIC, L. V.; BRACE, R. A.; CHEUNG, C. Y. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. **Placenta**, London, v. 21, n. 2-3, p. 203-209, 2000.

BOGIC, L. V.; BRACE, R. A.; CHEUNG, C. Y. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. **Placenta**, London, v. 22, n. 4, p. 265-275, 2001.

BUGLER, B.; AMALRIC, F.; PRATS, H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, n. 1, p. 573-577, 1991.

BURLEIGH, D. W.; STEWART, K.; GRINDLE, K. M.; KAY, H. H.; GOLOS, T. G. Influence of maternal diabetes on placental fibroblast growth factor-2 expression, proliferation, and apoptosis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, Washington, v. 11, n. 1, p. 36-41, 2004.

CANCILLA, B.; FORD-PERRISS, M. D.; BERTRAM, J. F. Expression and localization of fibroblast growth factors and fibroblast growth factor receptors in the developing rat kidney. **Kidney International**, New York, v. 56, n. 6, p. 2025-2039, 1999.

CAO, R.; ERIKSSON, A.; KUBO, H.; ALITALO, K.; CAO, Y.; THYBERG, J. Comparative evaluation of FGF-2, VEGF-A, and VEGF-C induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. **Circulation Research**, New York, v. 94, n. 5, p. 664-670, 2004.

CAO, Y.; LINDEN, P.; SHIMA, D.; BROWNE, F.; FOLKMAN, J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 98, n. 11, p. 2507-2511, 1996.

CARON, K. M.; SOO, S. C.; WETSEL, W. C.; STOCCO, D. M.; CLARK, B. J.; PARKER, K. L. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 21, p. 11540-11545, 1997.

CASELLA, I.; FECCIA, T.; CHELUCCI, C.; SAMOGGIA, P.; CASTELLI, G.; GUERRIERO, R.; PAROLINI, I.; PETRUCCI, E.; PELOSI, E.; MORSILLI, O.; GABBIANELLI, M.; TESTA, U.; PESCHLE, C. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. **Blood**, New York, v. 101, n. 4, p. 1316-1323, 2003.

CASTELLON, R.; HAMDY, H. K.; SACERIO, I.; AOKI, A. M.; KENNEY, M. C.; LJUBIMOV, A. V. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. **Experimental Eye Research**, London, v. 74, n. 4, p. 523-535, 2002.

CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, 103-113, 2004.

CHEN, J. H.; WANG, X. C.; KAN, M.; SATO, J. D. Effect of FGF-1 and FGF-2 on VEGF binding to human umbilical vein endothelial cells. **Cell Biology International**, London, v. 25, n. 3, p. 257-260, 2001.

CHEUNG, C. Y. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 4, n. 4, p. 169-177, 1997.

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

CHRISTENSON, L. K.; MCALLISTER, J. M.; MARTIN, K. O.; JAVITT, N. B.; OSBORNE, T. F.; STRAUSS III, J. F. Oxysterol regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Structural specificity and transcriptional and posttranscriptional actions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 46, p. 30729-30735, 1998.

CHUZEL, F.; CLARK, A. M.; AVALLET, O.; SAEZ, J. M. Transcriptional regulation of the lutropin/human chorionadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 239, p. 8-16, 1996.

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

CONLEY, A. J.; HEAD, J. R.; STIRLING, D. T.; MASON, J. I. Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. **Endocrinology**, Springfield, v. 130, n. 5, p. 2641-2650, 1992.

CONLEY, A. J.; KAMINSKI, M. A.; DUBOWSKY, S. A.; JABLONKA-SHARIFF, A.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. **Biology of Reproduction**, Champaign v. 52, n. 5, p. 1081-1094, 1995.

CONNOLLY, D. T.; HEUVELMAN, D. M.; NELSON, R.; OLANDER, J. V.; EPPLEY, B. L.; DELFINO, J. J.; SIEGEL, N. R.; LEIMGRUBER, R. M.; FEDER, J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 84, n. 5, p. 1470-1478, 1989.

DABROSIN, C.; MARGETTS, P. J.; GAULDIE, J. Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 107, n. 4, p. 535-540, 2003.

DAVIE, J. R.; SPENCER, V. A. Control of histone modifications. **Journal of Cellular Biochemistry**, London, v. 32-33, p. 141-148, 1999. Supplement.

DAVIS, M. G.; ZHOU, M.; ALI, S.; COFFIN, J. D.; DOETSCHMAN, T.; DORN II, G. W. Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 29, n. 4, p. 1061-1072, 1997.

DAY, A. M. Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston North, v. 25, n. 6, p. 139-144, 1977.

DAY, D. A.; TUIE, M. F. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. **Journal of Endocrinology**, London, v. 157, n. 3, p. 361-371, 1998.

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

DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; VARELA, H. Angiogenesis: an update. **Histology and Histopathology: cellular and molecular biology**, Murcia, v. 9, n. 4, p. 807-943, 1994.

DINNEY, C. P.; BIELENBERG, D. R.; PERROTTE, P.; REICH, R.; EVE, B. Y.; BUCANA, C. D.; FIDLER I, J. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. **Cancer Research**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 808-814, 1998.

DIONNE, C. A.; CRUMLEY, G.; BELLOT, F.; KAPLOW, J. M.; SEARFOSS, G.; RUTA, M.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; SCHLESSINGER, J. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acid and basic fibroblastic growth factors. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 2685-2692, 1990.

DONO, R.; FAULHABER, J.; GALLI, A.; ZUNIGA, A.; VOLK, T.; TEXIDO, G.; ZELLER, R.; EHMKE, H. FGF2 signaling is required for the development of neuronal circuits regulating blood pressure. **Circulation Research**, New York, v. 90, n. 1, p. E5-E10, 2002.

DONO, R.; TEXIDO, G.; DUSSEL, R.; EHMKE, H.; ZELLER, R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 17, n. 15, p. 4213-4225, 1998.

DONO, R.; ZELLER, R. Cell-type-specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. **Developmental Biology**, New York, v. 163, n. 2, p. 316-330, 1994.

DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R. D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, Springfield, v. 119, n. 3, p. 1351-1355, 1986.

DULL, R. O.; YUAN, J.; CHANG, Y. S.; TARBELL, J.; JAIN, R. K.; MUNN, L. L. Kinetics of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor synergy in endothelial hydraulic conductivity and proliferation. **Microvascular Research**, New York, v. 61, n. 2, p. 203-210, 2001.

DUMONT, D. J.; JUSSILA, L.; TAIPALE, J.; LYMBOUSSAKI, A.; MUSTONEN, T.; PAJUSOLA, K.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. **Science**, Washington, v. 282, n. 5390, p. 946-949, 1998.

DUNK, C.; AHMED, A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. **Histology and Histopathology: cellular and molecular biology**, Murcia, v. 16, n. 2, p. 359-375, 2001.

DVORAK, H. F.; SIOUSSAT, T. M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; NAGY, J. A.; SOTREL, A.; MANSEAU, E. J.; VAN DE WATER, L.; SENGHER, D. R. Distribution

of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 174, n. 5, p. 1275-1278, 1991.

ELEY, R. M.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W. Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 181-190, 1979.

ESTERGREEN, V. L.; FROST, O. L.; GOMES, W. R.; ERB, R. E.; BULLARD, J. F. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 50, n. 8, p. 1293-1295, 1967.

EVAIN-BRION, D.; MALASSINE, A. Human placenta as an endocrine organ. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 13, p. S34-S37, 2003. Supplement A.

FANTL, W. J.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Signalling by receptor tyrosine kinases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 62, p. 453-481, 1993.

FAUSER, B. C.; BAIRD, A.; HSUEH, A. J. Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated androgen production by cultured rat testicular cells. **Endocrinology**, Springfield, v. 123, n. 6, p. 2935-2941, 1988.

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

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 161, n. 2, p. 851-858, 1989.

FISCHER, S.; DRAPER, B. W.; NEUMANN C. J. The zebrafish FGF24 mutant identifies an additional level of FGF signaling involved in vertebrate forelimb initiation. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 15, p. 3515-3524, 2003.

FLORKIEWICZ, R. Z.; MAJACK, R. A.; BUECHLER, R. D.; FLORKIEWICZ, E. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 162, n. 3, p. 388-399, 1995.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FRASER, H. M.; DICKSON, S. E.; LUNN, S. F.; WULFF, C.; MORRIS, K. D.; CARROLL, V. A.; BICKNELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, Springfield, v. 141, n. 3, p. 995-1000, 2000.

FUJIMOTO, E.; OCHI, M.; KATO, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SUMEN, Y.; IKUTA, Y. Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, Berlin, v. 119, n. 3-4, p. 139-145, 1999.

GABLER, C.; PLATH-GABLER, A.; KILLIAN, G. J.; BERISHA, B.; SCHAMS D. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 5, p. 321-327, 2004.

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

GEISERT, R. D.; CONLEY, A. J. Secretion and metabolism of steroids in subprimate mammals during pregnancy. In: BAZER, F. W. **The Endocrinology of Pregnancy**. Totowa: Humana Press, 1998. p. 291-318.

GERBER, H.; McMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B. A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 46, p. 30336-30343, 1998.

GERBER, H. P.; CONDORELLI, F.; PARK, J.; FERRARA, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 38, p. 23659-23667, 1997.

GERWINS, P.; SKÖLDENBERG, E.; CLAEISSON-WELSH, L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2000.

GILLE, H.; KOWALSKI, J.; LI, B.; LeCOUTER, J.; MOFFAT, B.; ZIONCHECK, T. F.; PELLETIER, N.; FERRARA, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 5, p. 3222-3230, 2001.

GIORDANO, S.; SHERMAN, L.; LYMAN, W.; MORRISON, R. Multiple molecular weight forms of basic fibroblast growth factor are developmentally regulated in the central nervous system. **Developmental Biology**, New York, v. 152, n. 2, p. 293-303, 1992.

GOLDBERG, M. A.; SCHNEIDER, T. J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and

erythropoietin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 6, p. 4355-4359, 1994.

GOLDENBERG, N. A. Elucidating angiogenesis: the role of basement membrane proteolysis and endothelial cell motility and proliferation. **McGill Journal of Medicine**, Montreal, v. 1, p. 127-137, 1995.

GÓMEZ, R.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 2164-2171, 2003.

GÓMEZ, R.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. **Endocrinology**, Springfield, v. 143, n. 11, p. 4339-4348, 2002.

GONZALEZ, A. M.; BERRY, M.; MAHER, P. A.; LOGAN, A.; BAIRD, A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. **Brain Research**, London, v. 701, n. 1-2, p. 201-226, 1995.

GOSPODAROWICZ, D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 7, p. 2515-2520, 1975.

GOTO, F.; GOTO, K.; WEINDEL, K.; FOLKMAN, J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. **Laboratory Investigation**, New York, v. 69, n. 5, p. 508-517, 1993.

GRASSELLI, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, n. 6, p. 362-368, 2002.

GREEN, J. A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J.; ROBERTS, M. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 6, p. 1624-1631, 2000.

GREENAWAY, J.; CONNOR, K.; PEDERSEN, H. G.; COOMBER, B. L.; LAMARRE, J.; PETRIK, J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. **Endocrinology**, Springfield, v. 145, n. 6, p. 2896-2905, 2004.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 38, n. 5, p. 1027-1034, 1988a.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 83, n. 2, p. 565-573, 1988b.

HANSEN, P. J.; LIU, W. J. Immunological aspects of pregnancy: concepts and speculations using the sheep as a model. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, p. 483-493, 1996.

HARRINGTON, K.; CARPENTER, R. G.; GOLDFRAD, C.; CAMPBELL, S. Transvaginal ultrasound of the uteroplacental circulation in the early prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 674-681, 1997.

HATA, Y.; ROOK, S. L.; AIELLO, L. P. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **Diabetes**, New York, v. 48, n. 5, p. 1145-1155, 1999.

HE, H.; VENEMA, V. J.; GU, X.; VENEMA, R. C.; MARRERO, M. B.; CALDWELL, R. B. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/KDR activation of c-Src. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 35, p. 25130-25135, 1999.

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

HERRMANN, M.; SCHOLMERICH, J.; STRAUB, R. H. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 966, p. 166-186, 2002.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 1, p. 6-13, 2002.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 6, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 8, p. 1451-1465, 1999.

HOFFMANN, B.; FALTER, K.; VIELEMEIER, A.; FAILING, K.; SCHULER, G. Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and sulfatase from midgestation to parturition. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, Leipzig, v. 109, n. 5, p. 294-301, 2001.

HOFFMANN, B.; GOES DE PINHO, T.; SCHULER, G. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, Leipzig, v. 105, n. 5, p. 296-303, 1997.

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

HORI, A.; SASADA, R.; MATSUTANI, E.; NAITO, K.; SAKURA, Y.; FUJITA, T.; KOZAI, Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. **Cancer Research**, Chicago, v. 51, n. 22, p. 6180-6184, 1991.

HORTON, J. D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 30, p. 1091-1095, 2002. pt. 6.

HOUCK, K. A.; FERRARA, N.; WINER, J.; CACHIANES, G.; LI, B.; LEUNG, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 5, n. 12, p. 1806-1814, 1991.

HSIA, E.; RICHARDSON, T. P.; NUGENT, M. A. Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**, London, v. 88, n. 6, p. 1214-1225, 2003.

HUANG, K.; ANDERSSON, C.; ROOMANS, G. M.; ITO, N.; CLAEISSON-WELSH, L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 33, n. 4, p. 315-324, 2001.

INGBER, D. E.; FOLKMAN, J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 109, n. 1, p. 317-330, 1989.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 609-652, 1998.

IRUELA-ARISPE, M. L.; RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; ABU-JAWDEH, G. Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. **Microcirculation**, v. 6, n. 2, p. 127-140, 1999.

IZHAR, M.; PASMANIK, M.; SHEMESH, M. Bovine placental progesterone synthesis: comparison of first and second trimesters of gestation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 846-852, 1992.

JOHNSON, W. H.; MANNS, J. G.; ADAMS, W. M.; MAPLETOFT, R. J. Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. **Canadian Veterinary Journal**, Ontario, v. 22, n. 9, p. 288-290, 1981.

JOHNSTON, C. L.; COX, H. C.; GOMM, J. J.; COOMBES, R. C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. A splice variant of FGFR-3 localizes to the nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 51, p. 30643-30650, 1995.

JOSHI, B.; ORDONEZ-ERCAN, D.; DASGUPTA, P.; CHELLAPPAN, S. Induction of human metallothionein 1G promoter by VEGF and heavy metals: differential involvement of E2F and metal transcription factors. **Oncogene**, Basinstoke, v. 24, n. 13, p. 2204-2217, 2005.

JOUKOV, V.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; CHILOV, D.; LAHTINEN, I.; KUKK, E.; SAKSELA, O.; KALKKINEN, N.; ALITALO, K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 290-298, 1996.

JOY, A.; MOFFETT, J.; NEARY, K.; MORDECHAI, E.; STACHOWIAK, E. K.; COONS, S.; RANKIN-SHAPIRO, J.; FLORKIEWICZ, R. Z.; STACHOWIAK, M. K. Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. **Oncogene**, Basinstoke, v. 14, n. 2, p. 171-183, 1997.

JUENGEL, J. L.; MEBERG, B. M.; TURZILLO, A. M.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology**, Springfield, v. 136, n. 12, p. 5423-5429, 1995.

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

KAN, M.; WANG, F.; XU, J.; CRABB, J. W.; HOU, J.; McKEEHAN, W. L. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. **Science**, Washington, v. 259, n. 5103, p. 1918-1921, 1993.

KANDA, S.; LANDGREN, E.; LJUNGSTROM, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. **Cell Growth and Differentiation**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 383-395, 1996.

KAMIGUCHI, H.; YOSHIDA, K.; WAKAMOTO, H.; INABA, M.; SASAKI, H.; OTANI, M.; TOYA, S. Cytokine-induced selective increase of high-molecular-weight bFGF isoforms and their subcellular kinetics in cultured rat hippocampal astrocytes. **Neurochemical Research**, New York, v. 21, n. 6, p. 701-706, 1996.

KARKKAINEN, M. J.; PETROVA, T. V. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Oncogene**, Basinstoke, v. 19, n. 49, p. 5598-5605, 2000.

KARURI, A. R.; KUMAR, A. M.; MUKHOPADHYAY, D. Differential expression and selective localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. **Journal of Endocrinology**, London, v. 159, n. 3, p. 489-499, 1998.

KASHIWAKURA, I.; TAKAHASHI, T. A. Basic fibroblast growth factor-stimulated *ex vivo* expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. **British Journal Haematology**, Oxford, v. 122, n. 3, p. 479-488, 2003.

KATOH, O.; TAUCHI, H.; KAWAISHI, K.; KIMURA, A.; SATOW, Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. **Cancer Research**, Chicago, v. 55, n. 23, p. 5687-5692, 1995.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 441-484.

KEEGAN, K.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T.; HAYMAN, M. J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1095-1099, 1991.

KENDALL, R. L.; WANG, G.; THOMAS, K. A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, p. 226, n. 2, p. 324-328, 1996.

KHAN, A. U.; KRISHNAMURTHY, S. Histone modifications as key regulators of transcription. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 10, p. 866-872, 2005.

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

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 α . **Journal of Endocrinology**, London, v. 170, n. 2, p. 369-380, 2001.

KONO, T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v. 10, n. 7-8, p. 593-598, 1998.

LANG, I.; HOFFMANN, C.; OLIP, H.; PABST, M. A.; HAHN, T.; DOHR, G.; DESOYE, G. Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 143-155, 2001.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 36, n. 6, p. 289-296, 2001.

LAZAROUS, D. F.; SCHEINOWITZ, M.; SHOU, M.; HODGE, E.; RAJANAYAGAM, S.; HUNSBERGER, S.; ROBISON JR., W. G.; STIBER, J. A.; CORREA, R.; EPSTEIN, S. E.; UNGER, E. F. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. **Circulation**, Dallas, v. 91, n. 1, p. 145-153, 1995.

LEE, J.; GRAY, A.; YUAN, J.; LUOH, S.; AVRAHAM, H.; WOOD, W. I. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1988-1992, 1996.

LEE, P. L.; JOHNSON, D. E.; COUSENS, L. S.; FRIED, V. A.; WILLIAMS, L. T. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. **Science**, Washington, v. 245, n. 4913, p. 57-60, 1989.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LI, Z.; JOHNSON, A. L. Expression and regulation of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in

hen granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 49, n. 6, p. 1293-1302, 1993.

LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v. 8, n. 6, p. 1003-1011, 1996.

LIN, D.; SUGAWARA, T.; STRAUSS III, J. F.; CLARK, B. J.; STOCCO, D. M.; SAENGER, P.; ROGOL, A.; MILLER, W. L. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, Washington, v. 267, n. 5205, p. 1828-1831, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUND, J.; FAUCHER, D. J.; FORD, S. P.; PORTER, J. C.; WATERMAN, M. R.; MASON, J. I. Developmental expression of bovine adrenocortical steroid hydroxylases. Regulation of P-450(17 alpha) expression leads to episodic fetal cortisol production. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 31, p. 16195-16201, 1988.

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

MAMLUK, R.; GREBER, Y.; MEIDAN, R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, n. 3, p. 628-634, 1999.

MANDRIOTA, S. J.; PEPPER, M. S. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. **Journal of Cell Science**, London, v. 110, p. 2293-2302, 1997. pt 18.

MARKS, P. A.; RICHON, V. M.; MILLER, T.; KELLY, W. K. Histone deacetylase inhibitors. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 91, p. 137-168, 2004.

MASAKI, I.; YONEMITSU, Y.; YAMASHITA, A.; SATA, S.; TANII, M.; KOMORI, K.; NAKAGAWA, K.; HOU, X.; NAGAI, Y.; HASEGAWA, M.; SUGIMACHI, K.; SUEISHI, K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. **Circulation Research**, New York, v. 90, n. 9, p. 966-973, 2002.

MASON, J. I.; FRANCE, J. T.; MAGNESS, R. R.; MURRY, B. A.; ROSENFELD, C. R. Ovine placental steroid 17-hydroxylase/C-17,20-lyase, aromatase and

sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition. **Journal of Endocrinology**, London, v. 122, n. 1, p. 351-359, 1989.

MATAMOROS, R. A.; CAAMANO, L.; LAMB, S. V.; REIMERS, T. J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, n. 3, p. 486-492, 1994.

MEYER, H. H. Luteal versus placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 190-192, 1994.

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

MEYER, R. D.; RAHIMI, N. Comparative structure-function analysis of VEGFR-1 and VEGFR-2: What have we learned from chimeric systems? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 995, p. 200-207, 2003.

MIGNATTI, P.; MORIMOTO, T.; RIFKIN, D. B. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 151, n. 1, p. 81-93, 1992.

MILES, J. R.; FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, P. W. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 6, p. 1919-1926, 2004.

MILLER, W. L. Congenital lipoid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 19, n. 3, p. 227-240, 1997.

MIYAMOTO, A.; OKUDA, K.; SCHWEIGERT, F. J.; SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, London, v. 135, n. 1, p. 103-114, 1992.

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

MOURA, C. E. B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos**. 2003. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MÜHLHAUSER, J.; MARZIONI, D.; MORRONI, M.; VUCKOVIC, M.; CRESCIMANNO, C.; CASTELLUCCI, M. Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycan in the growth zones of the human placenta. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 285, n. 1, p. 101-107, 1996.

MUMMERY, C. L.; VAN ROOYEN, M.; BRACKE, M.; VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ, J.; VAN ZOELLEN, E. J.; ALITALO, K. Fibroblast growth factor-mediated growth regulation and receptor expression in embryonal carcinoma and embryonic stem cells and human germ cell tumours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 191, n. 1, p. 188-195, 1993.

MURONO, E. P.; WASHBURN, A. L. Basic fibroblast growth factor inhibits delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in cultured immature Leydig cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 168, n. 1, p. 248-253, 1990.

MYERS, J. M.; MARTINS, G. G.; OSTROWSKI, J.; STACHOWIAK, M. K. Nuclear trafficking of FGFR1: a role for the transmembrane domain. **Journal of Cellular Biochemistry**, London, v. 88, n. 6, p. 1273-1291, 2003.

NAGY, J. A.; VASILE, E.; FENG, D.; SUNDBERG, C.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. J.; LAWITTS, J. A.; BENJAMIN, L.; TAN, X.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 196, n. 11, p. 1497-1506, 2002.

NAKAGAWA Y, FUJIMOTO J, TAMAYA T. Placental growth by the estrogen-dependent angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor, throughout gestation. **Gynecological Endocrinology**, Carnforth, v. 19, n. 5, p. 259-266, 2004.

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

NAKANO, H.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 303, n. 2, p. 263-270, 2001.

NEAGOE, P. E.; LEMIEUX, C.; SIROIS, M. G. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 11, p. 9904-9912, 2005.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, n. 1, p. 9-22, 1999.

NEUFELD, G.; GOSPODAROWICZ, D. The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 25, p. 13860-13868, 1985.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, W. A.; KUES, W. A.; CARNWATH, J. W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning and Stem Cells**, New York, v. 4, n. 1, p. 29-38, 2002.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 123-130, 2001.

NOMURA, M.; YAMAGISHI, S.; HARADA, S.; HAYASHI, Y.; YAMASHIMA, T.; YAMASHITA, J.; YAMAMOTO, H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 47, p. 28316-28324, 1995.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Steroid hormones: chemistry, biosynthesis, and metabolism. In: _____. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 49-86.

NORTH, R. A.; FERRIER, C.; LONG, D.; TOWNEND, K.; KINCAID-SMITH, P. Uterine artery doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 83, n. 3, p. 378-386, 1994.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, New York, v. 32, n. 2, p. 115-120, 2000.

OGAWA, S.; OKU, A.; SAWANO, A.; YAMAGUCHI, S.; YAZAKI, Y.; SHIBUYA, M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 47, p. 31273-31282, 1998.

OGLE, T. F.; MILLS, T. M.; COSTOFF, A. Progesterone maintenance of the placental progesterone receptor and placental growth in ovariectomized rats. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 43, n. 2, p. 276-284, 1990.

OKADA-BAN, M.; THIERY, J. P.; JOUANNEAU, J. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, New York, v. 32, n. 3, p. 263-267, 2000.

OLOFSSON, B.; KORPELAINEN, E.; PEPPER, M. S.; MANDRIOTA, S. J.; AASE, K.; KUMAR, V.; GUNJI, Y.; JELTSCH, M. M.; SHIBUYA, M.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 95, n. 20, p. 11709-11714, 1998.

OLOFSSON, B.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; VON EULER, G.; JOUKOV, V.; SAKSELA, O.; ORPANA, A.; PETTERSSON, R. F.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 93, n. 6, p. 2576-2581, 1996.

OLWIN, B. B.; HAUSCHKA, S. D. Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 107, n. 2, p. 761-769, 1988.

ONOFRI, C.; CARBIA, A. N.; SCHAAF, L.; FEIRER, M.; LOHRER, P.; STUMMER, W.; BERNER, S.; CHERVIN, A.; GOLDBERG, V.; STALLA, G. K.; RENNER, U.; ARZT, E. Estradiol stimulates vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in human lactotroph and lactosomatotroph pituitary adenomas. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, Leipzig, v. 112, n. 1, p. 18-23, 2004.

OTANI, N.; MINAMI, S.; YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; OTANI, H.; NISHIYAMA, R.; OTANI, T.; NAKANO, R. The vascular endothelial growth factor/*fms*-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Lawrence, v. 84, n. 10, p. 3845-3851, 1999.

PAAVONEN, K.; HORELLI-KUITUNEN, N.; CHILOV, D.; KUKK, E.; PENNANEN, S.; KALLIONIEMI, O.; PAJUSOLA, K.; OLOFSSON, B.; ERIKSSON, U.; JOUKOV, V.; PALOTIE, A.; ALITALO, K. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34. **Circulation**, Dallas, v. 93, n. 6, p. 1079-1082, 1996.

PARK, J. E.; CHEN, H. H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, 1994.

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

PARTANEN, J.; MAKELA, T. P.; EEROLA, E.; KORHONEN, J.; HIRVONEN, H.; CLAESSESSON-WELSH, L.; ALITALO, K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 1347-1354, 1991.

PEPPER, M. S.; FERRARA, N.; ORCI, L.; MONTESANO, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 189, n. 2, p. 824-831, 1992.

PEPPER, M. S.; MANDRIOTA, S. J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 241, n. 2, p. 414-425, 1998.

PEPPER, M. S.; MANDRIOTA, S. J.; JELTSCH, M.; KUMAR, V.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 177, n. 3, p. 439-452, 1998.

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

PETERS, K. G.; WERNER, S.; CHEN, G.; WILLIAMS, L. T. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. **Development**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 233-243, 1992.

PETERSON, C. L.; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Current Biology**, London, v. 14, n. 14, p. R546-R551, 2004.

PFARRER, C.; BERISHA, B.; SCHULER, G.; SCHAMS, D.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Expression and localization of mRNA for fibroblast growth factor (FGF) family members and FGF-receptor (FGFR) mRNAs in bovine placentomes from early gestation until term. **Placenta**, London, v. 24, n. 8-9, p. A.29, 2003.

PFARRER, C.; EBERT, B.; MIGLINO, M. A.; KLISCH, K.; LEISER, R. The three-dimensional feto-maternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. **Journal of Anatomy**, London, v. 198, n. 5, p. 591-602, 2001.

PHILLIPS, G. D.; STONE, A. M.; JONES, B. D.; SCHULTZ, J. C.; WHITEHEAD, R. A.; KNIGHTON, D. R. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. **In Vivo**, v. 8, n. 6, p. 961-965, 1994.

PICCINNI, M. P.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cells clones. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 155, n. 1, p. 128-133, 1995.

PLOUET, J.; MORO, F.; BERTAGNOLLI, S.; COLDEBOEUF, N.; MAZARGUIL, H.; CLAMENS, S.; BAYARD, F. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 20, p. 13390-13396, 1997.

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

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

RAESIDE, J. I.; BERTHELON, M. C.; SANCHEZ, P.; SAEZ, J. M. Stimulation of aromatase activity in immature porcine Leydig cells by fibroblast growth factor (FGF). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 151, n. 1, p. 163-169, 1988.

RAMSEY, E. M. **The placenta: human and animal**. New York: Praeger Publishers, 1982. 187 p.

REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 33, n. 5, p. 1227-1236, 1985.

RENKO, M.; QUARTO, N.; MORIMOTO, T.; RIFKIN, D. B. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 144, n. 1, p. 108-114, 1990.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 4, p. 1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, n. 6, p. 1839-1851, 1995.

ROBERTS, R. D.; ELLIS, R. C. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 6, p. 1387-1392, 1999.

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

ROGELJ, S.; KLAGSBRUN, M.; ATZMON, R.; KUOKAWA, M.; HAIMOVITZ, A.; FUKS, Z.; VLODAVSKY, I. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix

component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 109, n. 2, p. 823-831, 1989.

RUIZ-CORTES, Z. T.; MARTEL-KENNES, Y.; GEVRY, N. Y.; DOWNEY, B. R.; PALIN, M. F.; MURPHY, B. D. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 789-796, 2003.

SAKSELA, O.; MOSCATELLI, D.; SOMMER, A.; RIFKIN, D. B. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 107, n. 2, p. 743-751, 1988.

SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 145-160, 2000.

SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; PFARRER, C.; LEISER, R.; HOFFMANN, B. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 3, p. 797-801, 1999.

SCHULER, G.; WIRTH, C.; TEICHMANN, U.; FAILING, K.; LEISER, R.; THOLE, H.; HOFFMANN, B. Occurrence of estrogen α in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 4, p. 976-982, 2002.

SEGHEZZI, G.; PATEL, S.; REN, C. J.; GUALANDRIS, A.; PINTUCCI, G.; ROBBINS, E. S.; SHAPIRO, R. L.; GALLOWAY, A. C.; RIFKIN, D. B.; MIGNATTI, P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 141, n. 7, p. 1659-1673, 1998.

SEO, K. H.; LEE, H. S.; JUNG, B.; KO, H. M.; CHOI, J. H.; PARK, S. J.; CHOI, I. H.; LEE, H. K.; IM, S. Y. Estrogen enhances angiogenesis through a pathway involving platelet-activating factor-mediated nuclear factor-kappaB activation. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6482-6488, 2004.

SHALEM, Z.; IZHAR, M.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; HANSEL, W.; STRAUSS III, J. F. Control of bovine placental progestin synthesis: calcium dependent steroidogenesis is modulated at site of the cholesterol side chain cleavage enzyme. **The Journal of Steroid Biochemistry**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 835-838, 1988.

SHARKEY, A. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BOOCOOCK, C. A.; BROWN, K. D.; SMITH, S. K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 99, n. 2, p. 609-615, 1993.

SHEA-EATON, W. K.; TRINIDAD, M. J.; LOPEZ, D.; NACKLEY, A.; MCLEAN, M. P. Sterol regulatory element binding protein-1a regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. **Endocrinology**, Springfield, v. 142, n. 4, p. 1525-1533, 2001.

SHEMESH, M. Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, v. 2, n. 2, p. 129-135, 1990.

SHEMESH, M.; HANSEL, W.; STRAUSS III, J. F. Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 20, p. 6403-6407, 1984.

SHEMESH, M.; HANSEL, W.; STRAUSS III, J. F.; SHORE, L. S. Regulation of side-chain cleavage enzyme and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase by Ca^{2+} second messenger and protein kinase C systems in the placenta of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, p. 163-172, 1989. Supplement 37.

SHEMESH, M.; HAREL-MARKOWITZ, E.; GUREVICH, M.; SHORE, L. S. Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, n. 1, p. 146-151, 1994.

SHEMESH, M.; IZHAR, M.; PASMNIK, M.; SHORE, L. S. Regulation of steroidogenesis in the bovine placenta. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, Lucknow, v. 43, n. 4, p. 153-163, 1992. Supplement 1.

SHEMESH, M.; STRAUSS III, J. F.; HANSEL, W.; SHORE, L. S.; IZHAR, M. Control of bovine placental progesterone synthesis: roles of cholesterol availability and calcium-activated systems. **Journal of Steroid Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 1, p. 21-25, 1988.

SHEN, B.; LEE, D. Y.; GERBER, H.; KEYT, B. A.; FERRARA, N.; ZIONCHECK, T. F. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 45, p. 29979-29985, 1998.

SHENG, Z.; LEWIS, J. A.; CHIRICO, W. J. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 38, p. 40153-40160, 2004.

SHIBUYA, M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 33, n. 4, p. 409-420, 2001.

SHIKONE, T.; YAMOTO, M.; NAKANO, R. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. **Endocrinology**, Springfield, v. 131, n. 13, p. 1063-1068, 1992.

SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Progress in Lipid Reserach**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 439-452, 2001

SINOWATZ, F.; SCHAMS, D.; EINSPANIER, R.; ARNOLD, G.; PFEFFER, M.; TEMMIM-BAKER, L.; AMSELGRUBER, W.; PLENDL, J. Cellular localization of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in benign prostatic hyperplasia. **Histology and Histopathology: cellular and molecular biology**, Murcia, v. 15, n. 2, p. 475-481, 2000.

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

SLOSS, V.; DUFTY, J. H. Pregnancy and gestation. In: _____. **Handbook of Bovine Obstetrics**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980. p. 30-68.

SORDOILLET, C.; SAVONA, C.; CHAUVIN, M. A.; DE PERETTI, E.; FEIGE, J. J.; MORERA, A. M.; BENAHMED, M. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. **Molecular Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 89, n. 1-2, p. 163-171, 1992.

SPOTSWOOD, H. T.; TURNER, B. M. An increasingly complex code. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 110, n. 5, p. 577-582, 2002.

SRIVASTAVA, R. K.; GU, Y.; AYLOO, S.; ZILBERSTEIN, M.; GIBORI, G. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 21, n. 3, p. 355-362, 1998.

STACHOWIAK, E. K.; MAHER, P. A.; TUCHOLSKI, J.; MORDECHAI, E.; JOY, A.; MOFFETT, J.; COONS, S.; STACHOWIAK, M. K. Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. **Oncogene**, Basinstoke, v. 14, n. 18, p. 2201-2211, 1997.

STAUBER, D. J.; DIGABRIELE, A. D.; HENDRICKSON, W. A. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 1, p. 49-54, 2000.

STICE, S. L.; ROBL, J. M.; PONCE DE LEON, F. A.; JERRY, H.; GOLUEKE, P. G.; CIBELLI, J. B.; KANE, J. J. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, n. 1, p. 129-138, 1998.

STORKEBAUM, E.; LAMBRECHTS, D.; DEWERCHIN, M.; MORENO-MURCIANO, M. P.; APPELMANS, S.; OH, H.; VAN DAMME, P.; RUTTEN, B.; MAN, W. Y.; DE MOL, M.; WYNS, S.; MANKA, D.; VERMEULEN, K.; VAN DEN BOSCH, L.; MERTENS, N.; SCHMITZ, C.; ROBBERECHT, W.; CONWAY, E. M.;

COLLEN, D.; MOONS, L.; CARMELIET, P. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. **Nature Neuroscience**, New York, v. 8, n. 1, p. 85-92, 2005.

STRAUSS III, J. F.; KISHIDA, T.; CHRISTENSON, L. K.; FUJIMOTO, T.; HIROI, H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. **Molecular Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 202, n. 1-2, p. 59-65, 2003.

SUN, G.; DOBLE, B. W.; SUN, J. M.; FANDRICH, R. R.; FLORKIEWICZ, R.; KIRSHENBAUM, L.; DAVIE, J. R.; CATTINI, P. A.; KARDAMI, E. CUG-initiated FGF-2 induces chromatin compaction in cultured cardiac myocytes and in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 186, n. 3, p. 457-467, 2001.

TAKAHASHI, T.; SHIRASAWA, T.; MIYAKE, K.; YAHAGI, Y.; MARUYAMA, N.; KASAHARA, N.; KAWAMURA, T.; MATSUMURA, O.; MITARÁI, T.; SAKAI, O. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 209, n. 1, p. 218-226, 1995.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

THOMAS, K. A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 2, p. 603-606, 1996.

TILLE, J. C.; WOOD, J.; MANDRIOTA, S. J.; SCHNELL, C.; FERRARI, S.; MESTAN, J.; ZHU, Z.; WITTE, L.; PEPPER, M. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 299, n. 3, p. 1073-1085, 2001.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T.; SILVA, M.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J. C.; ABRAHAM, J. A. The human gene for vascular endothelial growth factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 18, p. 11947-11954, 1991.

TOKUDA, H.; HIRADE, K.; WANG, X.; OISO, Y.; KOZAWA, O. Involvement of SAPK/JNK in basic fibroblast growth factor-induced vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. **Journal of Endocrinology**, London, v. 177, n. 1, p. 101-107, 2003.

TOKUDA, H.; KOZAWA, O.; UEMATSU, T. Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated

protein kinase. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 15, n. 12, p. 2371-2379, 2000.

TOLENTINO, M. J.; MILLER, J. W.; GRAGOUDAS, E. S.; CHATZISTEFANOU, K.; FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a non-human primate. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 114, n. 8, p. 964-970, 1996.

TRUDINGER, B. J.; GILES, W. B.; COOK, C. M. Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 39-45, 1985.

TUDER, R. M.; FLOOK, B. E.; VOELKEL, N. F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 95, n. 4, p. 1798-1807, 1995.

ULLMANN, M. B.; REIMERS, T. J. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 37, p. 173-179, 1989. Supplement 37.

VAGNER, S.; TOURIOL, C.; GALY, B.; AUDIGIER, S.; GENSAC, M.; AMALRIC, F.; BAYARD, F.; PRATS, H.; PRATS, A. Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 135, n. 5, p. 1391-1402, 1996.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, n. 10, p. 2696-2702, 1994.

VONNAHME, K. A.; WILSON, M. E.; FORD, S. P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 6, p. 1821-1825, 2001.

XIA, P.; AIELLO, L. P.; ISHII, H.; JIANG, Z. Y.; PARK, D. J.; ROBINSON, G. S.; TAKAGI, H.; NEWSOME, W. P.; JIROUSEK, M. R.; KING, G. L. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 98, n. 9, p. 2018-2026, 1996.

XIE, S.; LOW, B. G.; NAGEL, R. J.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoblast. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, n. 6, p. 1145-1153, 1994.

XU, R. H.; PENG, Y.; FAN, J.; YAN, D.; YAMAGOE, S.; PRINCLER, G.; SREDNI, D.; OZATO, K.; KUNG, H. F. Histone acetylation is a checkpoint in FGF-stimulated

mesoderm induction. **Developmental Dynamics**, New York, v. 218, n. 4, p. 628-635, 2000.

YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; NANBU, K.; KOMATSU, T.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; MORI, T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. **Gynecological Endocrinology**, Carnforth, v. 11, n. 4, p. 223-230, 1997.

YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Opposite effects of basic fibroblast growth factor on gonadotropin-stimulated steroidogenesis in rat granulosa cells. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 40, n. 6, p. 691-697, 1993.

YANG, X.; CEPKO, C. L. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 16, n. 19, p. 6089-6099, 1996.

YASUDA, E.; TOKUDA, H.; ISHISAKI, A.; HIRADE, K.; KANNO, Y.; HANAI, Y.; NAKAMURA, N.; NODA, T.; KATAGIRI, Y.; KOZAWA, O. PPAR-gamma ligands up-regulate basic fibroblast growth factor-induced VEGF release through amplifying SAPK/JNK activation in osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 328, n. 1, p. 137-143, 2005.

YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J. D.; LEDER, P.; ORNITZ, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**, Cambridge, v. 64, n. 4, p. 841-848, 1991.

YI, X. J.; JIANG, H. Y.; LEE, K. K. H.; O, W. S.; TANG, P. L.; CHOW, P. H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 296, n. 2, p. 339-349, 1999.

YI, X.; MAI, L. C.; UYAMA, M.; YEW, D. T. W. Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. **Experimental Brain Research**, New York, v. 118, n. 2, p. 155-160, 1998.

YLLERA, M. M.; ALEXANDRE-PIRES, G. M.; CIFUENTES, J. M. Placenta: regularization of neovascularization. Microvascularization pattern of the rabbit term placenta. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 60, n. 1, p. 38-45, 2003.

YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; YOSHII, J.; IKENAKA, Y.; NOGUCHI, R.; HICKLIN, D. J.; HUBER, J.; NAKATANI, T.; TSUJINOUE, H.; YANASE, K.; IMAZU, H.; FUKUI, H. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, Orlando, v. 35, n. 4, p. 834-842, 2002.

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, n. 2, p. 627-648, 2000.

YU, Z.; BIRO, S.; FU, Y.; SANCHEZ, J.; SMALE, G.; SASSE, J.; FERRANS, V. J.; CASSCELLS, W. Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells: immunohistochemical and biochemical studies. **Experimental Cell Research**, New York, v. 204, n. 2, p. 247-259, 1993.

WALL, R. J.; KERR, D. E.; BONDIOLI, K. R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 9, p. 2213-2224, 1997.

WALTENBERGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L.; SIEGBAHN, A.; SHIBUYA, M.; HELDIN, C. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 43, p. 26988-26995, 1994.

WANG, T.; HORNG, S.; CHANG, C.; WU, H.; TSAI, Y.; WANG, H.; SOONG, Y. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Lawrence, v. 87, n. 7, p. 3300-3308, 2002.

WEI, P.; YU, F. Q.; CHEN, X. L.; TAO, S. X.; HAN, C. S.; LIU, Y. X. VEGF, bFGF and their receptors at the fetal-maternal interface of the rhesus monkey. **Placenta**, London, v. 25, n. 2-3, p. 184-196, 2004.

WINTHER, H.; AHMED, A.; DANTZER, V. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. **Placenta**, London, v. 20, n. 1, p. 35-43, 1999.

WINTHER, H.; DANTZER, V. Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors Flt-1 and KDR in the mink placenta. **Placenta**, London, v. 22, n. 5, p. 457-465, 2001.

WITMER, A. N.; BLIJSWIJK, B. C.; DAI, J.; HOFMAN, P.; PARTANEN, T. A.; VRENSSEN, G. F. J. M.; SCHLINGEMANN, R. O. VEGFR-3 in adult angiogenesis. **Journal of Pathology**, Sussex, v. 195, n. 4, p. 490-497, 2001.

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

WOODING, F. B.; BECKERS, J. F. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 247, n. 3, p. 667-673, 1987.

WOODING, F. B.; MORGAN, G.; MONAGHAN, S.; HAMON, M.; HEAP, R. B. Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. **Placenta**, London, v. 17, n. 1, p. 75-86, 1996.

WOODING, F. B.; WATHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 59, n. 2, p. 425-430, 1980.

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

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; ADAM, C. L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 38, n. 1-2, p. 3888-3899, 1997.

WULFF, C.; WILSON, H.; DICKSON, S. E.; WIEGAND, S. J.; FRASER, H. M. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 802-812, 2002.

ZAMMIT, C.; BARNARD, R.; GOMM, J.; COOPE, R.; SHOUSHA, S.; COOMBES, C.; JOHNSTON, C. Altered intracellular localization of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer. **The Journal of Pathology**, Amsterdam, v. 194, n. 1, p. 27-34, 2001.

ZHENG, C.; NENNESMO, I.; FADEEL, B.; HENTER, J. I. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. **Annals of Neurology**, Boston, v. 56, n. 4, p. 564-567, 2004.

ZHENG, J.; BIRD, I. M.; MELSAETHER, A. N.; MAGNESS, R. R. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells. **Endocrinology**, Springfield, v. 140, n. 3, p. 13399-13407, 1999.

ZHOU, R. H.; YAO, M.; LEE, T. S.; ZHU, Y.; MARTINS-GREEN, M.; SHYY, J. Y. Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis. **Circulation Research**, New York, v. 95, n. 5, p. 471-478, 2004.

ZOLI, A. P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J.; REZNIK, M.; BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 46, n. 4, p. 623-629, 1992.

APÊNDICES

Apêndice 1

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,196	0,190	0,240	0,140	0,085	0,168	0,180	0,125	0,109	0,349	0,088	0,112
	2	0,149	0,115	0,124	0,104	0,092	0,115	0,145	0,105	0,082	0,140	0,099	0,086
	3	0,095	-	0,129	0,105	0,138	0,098	0,255	0,079	0,092	0,158	0,078	0,102
	4	0,099	0,092	0,140	0,128	0,198	0,133	0,115	0,134	0,376	0,131	-	-
2	1	0,215	0,231	0,530	0,341	0,482	0,574	0,270	0,334	0,356	0,536	0,653	0,471
	2	0,156	0,328	0,702	0,357	0,438	0,543	0,317	0,295	0,366	0,252	0,465	0,384
	3	0,191	0,897	0,678	0,370	0,451	0,595	0,366	0,408	0,356	0,511	0,301	0,348
	4	0,228	0,451	0,377	-	-	-	0,178	0,336	0,237	0,486	0,521	-
3	1	0,165	0,041	0,059	0,232	0,053	0,093	0,135	0,138	0,096	-	0,141	0,085
	2	0,111	0,124	0,101	0,156	0,069	0,065	0,233	0,146	0,125	0,142	0,152	0,040
	3	0,187	0,152	0,070	0,255	0,113	0,083	0,195	0,139	0,068	0,084	0,101	-
	4	0,172	0,109	0,106	0,298	0,052	0,097	0,268	0,067	0,083	0,058	0,066	0,050
Média		0,164	0,248	0,271	0,226	0,197	0,233	0,221	0,192	0,196	0,259	0,242	0,186
Erro padrão		0,01	0,05	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01

Quadro 4 - Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 2

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,067	0,163	0,165	0,103	0,152	0,194	0,100	0,134	0,337	0,069	0,133	0,098
	2	0,112	0,180	0,221	0,121	0,149	0,152	0,111	0,157	0,146	0,096	0,120	0,096
	3	0,156	0,101	0,153	0,134	0,175	0,173	0,103	0,131	0,231	0,069	0,114	0,076
	4	0,296	0,158	0,245	0,447	0,217	0,212	1,019	0,142	0,121	0,097	-	-
2	1	0,178	0,243	0,320	0,101	0,200	0,337	0,260	0,157	0,323	0,120	0,224	0,196
	2	0,153	0,261	0,278	0,155	0,217	0,334	0,154	0,546	0,286	0,127	0,226	0,311
	3	0,183	0,224	0,263	0,184	0,268	0,295	0,163	0,111	0,241	0,165	0,292	0,269
	4	0,123	0,180	0,327	0,353	0,269	0,256	0,206	0,191	0,275	0,142	0,292	0,263
3	1	0,124	0,140	0,185	0,165	-	0,199	0,146	0,181	0,093	0,067	0,117	0,077
	2	0,102	0,121	0,159	0,153	0,055	0,187	0,136	-	0,139	0,100	0,079	0,070
	3	0,129	0,088	0,126	0,134	0,068	0,122	0,054	0,263	0,149	0,104	0,107	0,065
	4	0,114	0,089	0,200	0,239	0,092	0,110	0,096	0,266	0,099	0,083	0,121	0,075
Média		0,145	0,162	0,220	0,191	0,169	0,214	0,212	0,207	0,203	0,103	0,166	0,145
Erro padrão		0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,07	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01

Quadro 5 - Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 3

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,159	0,839	0,717	0,523	0,188	0,460	1,157	0,505	0,298	0,539	0,436	0,633
	2	0,362	0,752	0,187	0,506	0,380	0,392	0,325	0,851	0,641	0,640	0,401	0,246
	3	0,193	1,122	0,865	0,592	0,469	0,490	0,438	0,572	0,796	1,285	0,417	0,314
	4	0,199	0,927	1,008	0,983	0,465	0,826	0,545	0,678	0,381	0,784	-	-
2	1	0,055	0,230	0,223	0,180	0,198	0,306	0,531	0,215	0,181	0,410	0,398	0,260
	2	0,066	0,171	0,144	0,178	0,176	0,201	0,484	0,186	0,157	0,138	0,146	0,147
	3	0,130	0,218	0,304	0,134	0,142	0,185	0,327	0,271	0,224	0,311	0,188	0,380
	4	0,117	0,411	0,201	0,202	0,222	0,252	0,145	0,177	0,152	0,346	0,555	-
3	1	0,062	0,066	0,149	0,066	0,078	0,077	0,056	0,084	0,086	0,056	0,079	0,042
	2	0,049	0,101	0,062	0,049	0,067	0,050	0,045	0,078	0,051	-	0,098	-
	3	0,057	0,070	0,099	0,050	0,076	0,050	-	0,049	-	-	0,046	0,041
	4	0,075	0,116	0,061	0,052	0,049	0,074	0,047	0,068	0,105	0,069	-	0,057
Média		0,127	0,419	0,335	0,293	0,209	0,280	0,373	0,311	0,279	0,458	0,276	0,235
Erro padrão		0,01	0,03	0,06	0,03	0,02	0,03	0,07	0,02	0,04	0,07	0,04	0,04

Quadro 6 - Concentração de progesterona ($\eta\text{g/ml}$) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 4

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,056	0,075	0,137	0,098	0,143	0,118	0,116	0,043	0,092	0,049	0,091	0,095
	2	0,112	0,138	0,123	0,060	0,097	0,048	0,104	0,044	0,065	0,153	0,069	0,124
	3	0,175	0,268	0,122	0,077	0,103	0,122	0,095	0,123	0,160	0,237	0,089	0,114
	4	0,148	0,091	0,048	0,121	0,102	0,126	0,076	0,076	0,108	0,163	0,188	0,161
2	1	0,478	0,251	0,279	0,263	0,352	0,395	0,334	0,375	0,373	0,406	0,386	0,314
	2	0,292	0,252	0,465	0,313	0,190	0,223	0,237	0,346	0,269	0,349	0,634	0,253
	3	0,295	0,265	0,443	0,336	0,242	0,313	0,268	0,490	0,366	0,387	0,283	0,272
	4	0,322	0,232	0,531	0,247	0,404	0,257	0,333	0,348	0,326	0,358	0,382	0,306
3	1	0,352	0,302	0,303	0,391	0,303	0,321	0,242	0,269	0,222	0,324	0,319	0,303
	2	0,319	0,283	0,306	0,238	0,299	0,268	0,267	0,874	0,302	0,380	0,353	0,314
	3	0,300	0,333	0,290	0,319	0,260	0,296	0,306	0,269	0,366	0,353	0,293	0,260
	4	0,255	0,256	0,265	0,324	0,286	0,282	0,301	0,332	0,294	0,331	0,265	0,360
Média		0,259	0,229	0,276	0,232	0,232	0,231	0,223	0,299	0,245	0,291	0,279	0,240
Erro padrão		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,02	0,01

Quadro 7 - Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 5

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,201	0,186	0,208	0,167	0,197	0,216	0,165	0,235	-	0,186	0,161	-
	2	0,196	0,218	0,341	0,149	0,158	0,187	0,213	0,209	-	0,142	0,168	-
	3	0,196	0,283	0,181	0,159	0,177	0,171	-	-	-	-	-	-
	4	0,196	0,217	0,222	0,171	0,212	0,210	-	-	-	-	-	-
2	1	0,227	0,246	0,156	0,181	0,306	0,163	0,151	0,224	-	0,122	0,117	-
	2	0,399	0,290	0,126	0,148	0,273	0,148	0,175	0,246	-	0,290	0,234	-
	3	0,145	0,170	0,402	0,164	0,138	0,133	-	-	-	-	-	-
	4	0,143	0,099	0,104	0,369	0,286	0,122	-	-	-	-	-	-
3	1	0,326	0,330	0,352	0,305	0,318	0,344	0,351	0,343	0,321	0,345	0,409	0,367
	2	0,341	0,351	0,338	0,339	0,317	0,362	0,283	0,314	0,321	0,326	0,360	0,383
	3	0,334	0,328	0,229	0,320	0,285	0,331	0,291	0,296	0,261	0,326	0,286	0,351
	4	0,318	0,305	0,245	0,323	0,285	0,284	0,221	0,323	-	0,321	0,348	0,363
Média		0,252	0,252	0,242	0,233	0,246	0,223	0,231	0,274	0,301	0,257	0,260	0,366
Erro padrão		0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,01

Quadro 8 - Concentração de progesterona (ng/ml) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 6

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,329	0,344	0,196	0,200	0,228	0,349	0,304	0,181	0,301	0,198	0,248	0,221
	2	0,283	0,344	0,332	0,220	0,325	0,132	0,176	0,267	0,205	0,252	0,196	0,142
	3	0,247	0,237	0,264	0,213	0,327	0,228	0,121	0,260	0,186	0,220	0,228	0,303
	4	0,261	0,295	0,398	0,187	0,337	0,221	0,191	0,258	0,221	0,181	0,354	0,193
2	1	0,143	0,315	0,317	0,367	0,453	0,354	0,192	0,371	0,210	0,383	0,601	0,352
	2	0,211	0,287	0,358	0,140	0,664	0,211	0,101	0,840	0,385	0,217	0,511	0,323
	3	0,213	0,633	0,176	0,189	0,227	0,233	0,251	0,824	0,428	0,232	0,365	0,168
	4	0,244	0,338	0,249	0,229	0,520	0,194	0,240	0,256	0,341	0,352	0,426	0,217
3	1	0,205	0,065	0,066	0,244	0,200	0,157	0,154	0,318	0,128	0,081	0,244	0,131
	2	0,381	0,269	0,097	0,106	0,287	0,198	0,221	0,211	0,101	0,239	0,243	0,121
	3	0,267	0,335	0,134	0,223	0,320	0,238	0,118	0,264	0,189	0,184	0,218	0,107
	4	0,363	0,344	0,107	0,251	0,290	0,128	0,192	0,111	0,133	0,208	0,200	0,116
Média		0,262	0,317	0,225	0,214	0,348	0,220	0,188	0,347	0,236	0,229	0,320	0,200
Erro padrão		0,01	0,03	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	0,05	0,01	0,02	0,02	0,02

Quadro 9 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 7

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	-	0,300	0,605	0,630	0,735	0,672	0,798	0,693	0,674	0,764	0,605	0,989
	2	0,490	0,460	0,712	0,508	0,940	0,557	0,624	0,748	0,607	0,842	0,798	0,869
	3	0,551	0,557	0,445	0,674	0,746	0,515	0,570	0,773	0,655	0,523	0,838	0,796
	4	0,553	0,639	0,512	0,772	0,867	0,579	0,383	0,458	0,653	0,525	0,662	0,574
2	1	0,337	0,259	0,241	0,189	0,217	0,232	0,202	0,237	0,329	0,252	0,426	0,207
	2	0,317	0,335	0,350	0,272	0,265	0,317	0,296	0,506	0,280	0,265	0,283	0,296
	3	0,165	0,176	0,274	0,282	0,350	0,184	0,138	0,285	0,145	0,241	0,337	0,283
	4	0,189	0,317	0,270	0,160	0,274	0,348	0,140	0,142	0,339	0,250	0,310	0,217
3	1	0,152	0,348	0,257	0,207	0,183	0,270	0,188	0,217	0,322	0,193	0,386	0,195
	2	0,215	0,411	0,240	0,252	0,202	0,227	0,380	-	0,273	0,335	0,252	0,250
	3	0,328	0,182	0,311	0,089	0,155	0,275	0,326	0,158	0,202	0,319	0,139	0,282
	4	0,205	0,152	0,225	0,130	0,188	0,273	0,351	0,270	0,260	0,227	0,340	0,220
Média		0,318	0,345	0,370	0,347	0,427	0,371	0,366	0,408	0,395	0,395	0,448	0,432
Erro padrão		0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03

Quadro 10 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 8

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,443	0,428	0,796	0,315	0,381	0,518	0,255	0,646	0,419	0,327	0,473	0,527
	2	0,404	0,249	0,416	0,221	0,291	0,467	0,397	0,477	0,451	0,258	0,422	0,458
	3	0,378	0,391	0,707	0,376	0,493	0,446	0,304	0,376	0,427	0,425	0,400	0,691
	4	0,256	0,393	0,516	0,292	0,510	0,460	0,534	0,521	0,396	0,292	0,463	0,473
2	1	0,210	0,491	0,575	0,560	0,639	0,644	0,543	0,611	0,610	0,352	0,666	0,677
	2	0,235	0,309	0,631	0,556	0,556	0,551	0,447	0,622	0,660	0,433	0,784	0,567
	3	0,649	0,608	0,497	0,430	0,644	0,611	0,353	0,709	0,391	0,458	0,613	0,541
	4	0,231	0,746	0,549	0,541	0,653	0,588	0,159	0,697	0,499	0,303	0,666	0,653
3	1	0,231	0,218	0,170	0,246	0,337	0,235	0,207	0,271	0,350	0,206	0,299	0,306
	2	0,392	0,241	0,304	0,120	0,311	0,354	0,300	0,138	0,136	0,283	0,209	0,196
	3	0,261	0,267	0,350	0,191	0,261	0,230	0,298	0,145	0,212	0,209	0,232	0,258
	4	0,304	0,191	0,138	0,269	0,248	0,246	0,287	0,198	0,202	0,294	0,204	0,218
Média		0,333	0,378	0,471	0,343	0,444	0,446	0,340	0,451	0,396	0,320	0,453	0,464
Erro padrão		0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02

Quadro 11 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 9

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,100	0,197	0,197	0,137	0,067	0,075	0,140	0,158	-	0,151	0,213	0,269
	2	0,158	0,139	0,254	0,111	0,172	0,168	0,115	0,142	0,072	0,132	0,193	0,102
	3	0,183	0,063	0,120	0,080	0,221	-	0,079	0,177	0,146	0,141	0,208	0,154
	4	0,118	0,163	0,190	0,155	0,272	0,187	0,304	0,212	0,183	0,131	0,286	0,147
2	1	0,117	0,074	-	0,229	0,103	0,106	0,158	0,075	0,132	0,160	0,139	0,132
	2	0,133	0,133	0,114	0,152	-	0,154	0,123	0,079	0,112	0,136	0,228	0,135
	3	0,120	0,192	0,226	0,118	-	0,108	0,157	0,090	0,075	0,157	0,069	0,069
	4	0,117	0,120	-	0,172	0,071	0,129	0,228	0,063	0,198	0,154	0,112	0,070
3	1	0,163	0,112	0,215	0,214	0,274	0,281	0,167	0,176	0,221	0,195	0,208	0,221
	2	0,176	0,188	0,114	0,228	0,209	0,206	0,219	0,277	0,197	0,139	0,212	0,272
	3	0,297	0,137	0,113	0,209	0,245	0,217	0,219	0,159	0,227	0,183	0,113	0,228
	4	0,188	0,255	0,231	0,177	0,160	0,278	0,217	0,214	0,205	0,213	0,125	0,222
Média		0,156	0,148	0,177	0,165	0,179	0,174	0,177	0,152	0,161	0,158	0,176	0,168
Erro padrão		0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Quadro 12 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 10

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,228	0,287	0,113	0,140	0,288	0,369	0,164	0,248	-	0,133	0,103	-
	2	0,331	0,311	0,113	0,100	0,164	0,169	0,193	0,128	-	0,109	0,119	-
	3	0,163	0,285	0,285	0,227	0,231	0,170	-	-	-	-	-	-
	4	0,188	0,304	0,239	0,100	0,342	0,161	-	-	-	-	-	-
2	1	0,140	0,114	0,159	0,196	0,166	0,298	0,193	0,149	-	0,104	0,121	-
	2	0,185	0,145	0,145	-	0,135	0,161	0,153	0,127	-	0,088	0,120	-
	3	0,154	0,084	0,232	0,191	0,069	0,177	-	-	-	-	-	-
	4	0,073	0,188	0,131	0,232	0,145	0,279	-	-	-	-	-	-
3	1	0,172	0,221	0,135	0,155	0,184	0,148	0,163	0,169	0,148	0,195	0,147	0,176
	2	0,152	0,179	0,100	0,228	0,234	0,158	0,188	0,202	0,179	0,165	0,202	0,160
	3	0,191	0,185	0,128	0,155	0,345	0,155	0,171	0,231	0,130	0,422	0,156	0,149
	4	0,185	0,200	0,123	0,201	0,141	0,105	0,179	0,158	-	0,117	0,397	0,196
Média		0,180	0,209	0,159	0,175	0,204	0,196	0,176	0,176	0,153	0,178	0,171	0,184
Erro padrão		0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,03	0,01

Quadro 13 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações os 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 11

Experimentos	Repetições	Fase Gestacional											
		90			150			210			270		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,596	0,554	1,225	-	0,544	0,273	0,359	1,961	0,901	0,561	0,379	0,693
	2	0,526	0,333	0,373	0,228	0,390	0,310	0,895	3,021	0,449	0,707	0,990	0,486
	3	0,385	-	0,488	0,284	0,181	0,343	0,510	2,869	1,223	0,954	4,253	1,016
	4	0,380	0,310	0,351	0,535	0,248	0,478	0,779	2,360	1,954	1,257	0,557	0,254
2	1	1,507	0,734	1,672	0,527	0,938	1,329	0,263	0,468	0,388	4,086	3,389	-
	2	0,738	1,141	1,962	0,483	0,779	0,794	0,283	0,554	0,228	2,195	1,893	4,081
	3	0,898	1,417	3,851	1,110	1,271	0,958	0,201	0,359	0,611	2,457	1,382	1,962
	4	0,936	1,334	1,513	0,652	0,567	1,210	0,505	0,550	0,366	2,755	1,937	-
3	1	0,803	0,627	0,888	0,817	0,403	0,721	0,270	0,303	0,879	2,161	2,701	1,407
	2	0,290	0,459	1,043	0,477	0,294	0,665	0,125	0,420	0,203	1,810	1,508	2,680
	3	0,701	0,454	0,520	0,393	0,486	0,404	0,220	0,263	0,282	1,010	2,428	2,568
	4	0,475	0,316	0,993	0,557	0,586	0,890	0,248	0,605	0,443	1,358	1,002	1,148
Média		0,686	0,698	1,240	0,551	0,557	0,698	0,388	1,144	0,660	1,776	1,868	1,630
Erro padrão		0,07	0,06	0,19	0,06	0,05	0,05	0,04	0,08	0,11	0,17	0,36	0,26

Quadro 14 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em 3 diferentes experimentos aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 12

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,596	0,554	1,225	0,702	0,373	0,481	0,592	0,691	0,361	1,762	0,357	0,506
	2	0,526	0,333	0,373	0,471	0,283	0,872	0,823	0,391	0,401	0,557	0,506	0,604
	3	0,385	-	0,488	0,492	0,423	0,432	2,109	0,305	0,497	0,718	0,341	0,337
	4	0,380	0,310	0,351	0,683	0,587	0,600	0,604	0,519	1,700	0,723	-	-
2	1	1,507	0,734	1,672	0,929	1,064	1,620	1,405	0,899	1,694	1,400	1,087	1,338
	2	0,738	1,141	1,962	2,552	0,660	2,574	3,140	0,351	0,950	1,163	0,911	1,188
	3	0,898	1,417	3,851	1,955	1,985	2,552	1,456	0,496	0,832	2,202	0,824	2,073
	4	0,936	1,334	1,513	-	-	-	0,740	1,313	0,696	1,380	1,222	-
3	1	0,803	0,627	0,888	0,950	0,263	0,592	0,877	0,435	0,752	-	0,580	0,646
	2	0,290	0,459	1,043	1,472	0,241	0,327	1,054	0,690	1,235	0,594	0,624	0,331
	3	0,701	0,454	0,520	1,142	0,352	0,347	1,651	0,525	0,362	0,454	0,464	-
	4	0,475	0,316	0,993	1,186	0,179	0,756	1,394	0,601	0,622	0,276	0,330	0,432
Média		0,686	0,698	1,240	1,139	0,583	1,014	1,320	0,601	0,842	1,021	0,659	0,828
Erro padrão		0,07	0,06	0,19	0,13	0,10	0,09	0,21	0,07	0,14	0,13	0,04	0,09

Quadro 15 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 90 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 13

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	-	0,544	0,273	0,163	0,207	0,288	0,125	0,193	0,500	0,090	0,219	0,099
	2	0,228	0,390	0,310	0,238	0,159	0,273	0,178	0,210	0,241	0,114	0,150	0,110
	3	0,284	0,181	0,343	0,199	0,234	0,337	0,181	0,169	0,353	0,132	0,136	0,095
	4	0,535	0,248	0,478	0,578	0,250	0,366	2,661	0,310	0,186	0,184	-	-
2	1	0,527	0,938	1,329	0,533	0,921	1,452	1,287	0,664	0,983	0,475	0,525	0,946
	2	0,483	0,779	0,794	0,570	0,820	1,052	0,521	1,080	1,023	0,478	0,797	1,049
	3	1,110	1,271	0,958	0,651	0,766	1,601	1,178	0,391	1,662	0,684	0,867	0,951
	4	0,652	0,567	1,210	2,209	0,983	0,735	1,473	1,348	0,811	0,566	0,943	1,214
3	1	0,817	0,403	0,721	0,795	-	0,738	0,775	0,833	0,289	0,346	0,304	0,397
	2	0,477	0,294	0,665	0,606	0,273	0,825	0,358	-	0,510	0,298	0,314	0,282
	3	0,393	0,486	0,404	1,504	0,441	0,444	0,165	1,664	0,738	0,327	0,771	0,229
	4	0,557	0,586	0,890	1,841	0,491	0,403	0,275	0,984	0,379	0,364	0,356	0,340
Média		0,551	0,557	0,698	0,824	0,504	0,709	0,765	0,713	0,640	0,338	0,489	0,519
Erro padrão		0,06	0,05	0,05	0,16	0,02	0,07	0,22	0,10	0,07	0,01	0,05	0,02

Quadro 16 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 150 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 14

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,359	1,961	0,901	1,659	0,494	0,888	4,537	0,781	0,711	1,648	0,922	1,201
	2	0,895	3,021	0,449	2,290	1,307	0,839	0,818	1,784	1,422	2,481	0,951	0,536
	3	0,510	2,869	1,223	1,575	0,952	1,100	1,440	1,521	1,865	3,024	1,042	0,455
	4	0,779	2,360	1,954	3,368	0,911	1,796	1,020	1,301	0,962	2,685	-	-
2	1	0,263	0,468	0,388	0,322	0,309	0,474	0,977	0,351	0,297	1,166	0,598	0,384
	2	0,283	0,554	0,228	0,320	0,317	0,365	1,082	0,300	0,238	0,318	0,186	0,258
	3	0,201	0,359	0,611	0,311	0,221	0,303	0,926	0,382	0,572	0,678	0,306	0,702
	4	0,505	0,550	0,366	0,373	0,340	0,429	0,913	0,254	0,305	1,142	0,834	-
3	1	0,270	0,303	0,879	0,269	0,231	0,327	0,269	0,309	0,246	0,271	0,264	0,138
	2	0,125	0,420	0,203	0,409	0,217	0,141	0,151	0,566	0,375	-	0,468	0,000
	3	0,220	0,263	0,282	0,264	0,292	0,216	-	0,339	-	-	0,200	0,157
	4	0,248	0,605	0,443	0,192	0,198	0,301	0,165	0,346	0,520	0,236	-	0,263
Média		0,388	1,144	0,660	0,946	0,482	0,598	1,118	0,686	0,683	1,365	0,577	0,410
Erro padrão		0,04	0,08	0,11	0,13	0,05	0,07	0,32	0,07	0,1	0,15	0,06	0,08

Quadro 17 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos aos 210 dias de gestação, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 15

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,561	0,379	0,693	0,718	2,139	1,573	0,827	0,270	-	0,326	0,426	0,353
	2	0,707	0,990	0,486	0,544	0,567	0,286	0,902	0,313	0,897	1,159	0,359	1,213
	3	0,954	4,253	1,016	0,967	0,465	-	1,198	0,696	1,095	1,681	0,428	0,743
	4	1,257	0,557	0,254	0,779	0,377	0,672	0,251	0,358	0,592	1,242	0,656	1,096
2	1	4,086	3,389	-	1,150	3,414	3,726	2,117	5,002	2,822	2,539	2,777	2,377
	2	2,195	1,893	4,081	2,061	-	1,447	1,927	4,382	2,399	2,569	2,780	1,877
	3	2,457	1,382	1,962	2,851	-	2,901	1,710	5,448	4,886	2,467	4,096	3,937
	4	2,755	1,937	-	1,434	5,694	1,991	1,461	5,521	1,649	2,323	3,415	4,374
3	1	2,161	2,701	1,407	1,826	1,105	1,142	1,446	1,528	1,006	1,659	1,534	1,373
	2	1,810	1,508	2,680	1,042	1,431	1,301	1,219	3,155	1,535	2,737	1,666	1,153
	3	1,010	2,428	2,568	1,527	1,060	1,362	1,399	1,689	1,614	1,928	2,596	1,138
	4	1,358	1,002	1,148	1,828	1,785	1,014	1,387	1,551	1,436	1,552	2,122	1,621
Média		1,776	1,868	1,630	1,394	1,804	1,583	1,320	2,493	1,812	1,849	1,905	1,771
Erro padrão		0,17	0,36	0,26	0,14	0,28	0,21	0,08	0,16	0,26	0,13	0,13	0,21

Quadro 18 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 16

Experimentos	Repetições	Fase Gestacional					
		270 (animais clonados)			270 (animais não clonados)		
		24	48	96	24	48	96
1	1	0,884	0,647	1,840	0,561	0,379	0,693
	2	0,592	0,702	3,014	0,707	0,990	0,486
	3	1,203	0,994	0,633	0,954	4,253	1,016
	4	1,044	0,713	0,931	1,257	0,557	0,254
2	1	1,624	2,161	0,983	4,086	3,389	-
	2	2,154	1,998	0,869	2,195	1,893	4,081
	3	0,944	2,022	1,735	2,457	1,382	1,962
	4	1,964	0,527	0,792	2,755	1,937	-
3	1	1,902	1,495	2,597	2,161	2,701	1,407
	2	2,248	1,960	3,383	1,810	1,508	2,680
	3	1,754	1,772	1,788	1,010	2,428	2,568
	4	1,714	1,526	1,992	1,358	1,002	1,148
Média		1,502	1,376	1,713	1,776	1,868	1,630
Erro padrão		0,16	0,18	0,26	0,17	0,36	0,26

Quadro 19 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas do grupo controle em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados e não clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 17

Experimentos	Repetições	Grupos Experimentais											
		Controle			bFGF			VEGF			bFGF + VEGF		
		24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
1	1	0,884	0,647	1,840	1,194	0,684	0,586	1,005	0,946	-	1,400	1,563	-
	2	0,592	0,702	3,014	1,493	0,962	1,105	1,102	1,633	-	1,303	1,413	-
	3	1,203	0,994	0,633	0,700	0,766	1,007	-	-	-	-	-	-
	4	1,044	0,713	0,931	1,705	0,621	1,305	-	-	-	-	-	-
2	1	1,624	2,161	0,983	0,922	1,846	0,546	0,784	1,503	-	1,173	0,968	-
	2	2,154	1,998	0,869	-	2,019	0,919	1,141	1,937	-	-	1,952	-
	3	0,944	2,022	1,735	0,858	1,999	0,754	-	-	-	-	-	-
	4	1,964	0,527	0,792	1,591	1,969	0,438	-	-	-	-	-	-
3	1	1,902	1,495	2,597	1,971	1,727	2,320	2,154	2,024	2,164	1,774	2,775	2,086
	2	2,248	1,960	3,383	1,484	1,358	2,294	1,500	1,554	1,796	1,974	1,784	2,068
	3	1,754	1,772	1,788	2,067	0,827	2,139	1,695	1,284	2,003	0,773	1,836	1,959
	4	1,714	1,526	1,992	1,608	2,024	2,701	1,234	2,045		2,748	0,876	1,853
Média		1,502	1,376	1,713	1,418	1,400	1,343	1,327	1,616	1,988	1,592	1,646	1,992
Erro padrão		0,16	0,18	0,26	0,14	0,17	0,23	0,15	0,14	0,10	0,24	0,21	0,05

Quadro 20 - Concentração de progesterona (ng/mg de proteína) no meio de cultura de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF + VEGF em 3 diferentes experimentos de gestações aos 270 dias em animais clonados, quando cultivadas por 24, 48 e 96 horas

Apêndice 18

Idade Gestacional (dias)	Experimento	Grupos Experimentais			
		Controle	bFGF	VEGF	bFGF + VEGF
90	1	0,425	0,376	0,449	0,383
	2	1,246	1,383	0,955	1,332
	3	0,349	0,391	0,423	0,268
150	1	0,504	0,557	0,683	0,295
	2	0,683	0,742	0,729	0,656
	3	0,395	0,399	0,464	0,266
210	1	1,833	1,569	1,960	1,629
	2	0,567	0,594	0,762	0,885
	3	0,242	0,185	0,200	0,184
270	1	0,373	0,304	0,273	0,383
	2	1,027	0,884	1,017	1,083
	3	0,891	0,896	1,011	0,964
270 (animais clonados)	1	0,661	0,544	0,411	0,329
	2	0,627	0,608	0,398	0,382
	3	0,949	0,954	0,906	1,046

Quadro 20 - Produção de progesterona total (ng/mg) por grupo experimental (Controle, bFGF, VEGF e bFGF + VEGF) em 3 diferentes experimentos de gestações aos 90, 150, 210 e 270 dias em animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados