LIZA MARGARETH MEDEIROS DE CARVALHO SOUSA

**Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo
de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados**

São Paulo
2007

LIZA MARGARETH MEDEIROS DE CARVALHO SOUSA

**Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo
de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1862
FMVZ

Sousa, Liza Margareth Medeiros de Carvalho
Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a produção de estrógenos *in vitro*
em células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados
/ Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa. – São Paulo : L. M. M. C.
Sousa, 2007.
125 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa

1. bFGF. 2. VEGF. 3. Estrógenos. 4. Placenta bovina. 5. Clones.
I. Título.

ERRATA

SOUSA, L. M. M. C. Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados. **[VEGF and bFGF effects on P450 aromatase expression of cultivated placental cells from cloned and non-cloned bovines]**. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha	2	1	Sobre as produção de estrógenos in vitro	Sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo
Catalográfica				
8	1	4	125f	117 f.
9	1	4	125f	117 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) sobre a produção de estrógenos em células placentárias de bovinos clonados e não clonados", protocolo nº 858/2006, utilizando 20 (vinte) bois (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on estrogen production of bovine placental cells derived from cloned and non-cloned gestations", protocol number 858/2006, utilizing 20 (twenty) 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, 02 de março de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
EMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUSA, Liza Margareth Medeiros de Carvalho

Título: Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	Instituição:
Assinatura	Julgamento
Prof. Dr.	Instituição:
Assinatura	Julgamento
Prof. Dr.	Instituição:
Assinatura	Julgamento

A meus pais, João e Elizabeth, que sempre me ensinaram que não tem bens mais valiosos que a educação e a importância de viver com humildade, dignidade e perseverança.

A meu esposo, Viran, pelo incentivo, companheirismo e respeito incondicionais.

À minha irmã, Juliana, amiga sempre presente.

A meus filhotes, Anastácia, Bibi, Pepê (cadêlinhas) e Miguel (gatinho), meus companheirinhos.

“Obrigada por tudo... Amo todos vocês.”

AGRADECIMENTOS

Sem a valiosa ajuda direta e indireta dessas pessoas e instituições, abaixo relacionadas, jamais conseguiríamos realizar um trabalho desse porte e completar mais esta importante etapa de nossa vida. Erguemos, assim, as nossas preces aos Santos Protetores do Maranhão, capitaneados pelo Glorioso São José de Ribamar, para, junto ao Senhor dos Mundos, intercederem com suas bênçãos de Paz, Amor e realizações dos projetos pessoais para todos vocês...

Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa, minha orientadora, que me recebeu de braços abertos e me deu a oportunidade de iniciar minha vida acadêmica em um laboratório bem equipado e preocupado com o bem público, onde se procura sempre justificar, em forma de publicações de qualidade, todo o suporte financeiro recebido.

Prof^a. Dr^a. Alana Lislea de Sousa, minha orientadora de graduação, por ser exemplo de retidão, ética e profissionalismo, especialmente por ter despertado em mim o desejo contínuo de atualização e aprendizado;

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

Prof. Dr. Porfírio Candanedo Guerra pelos constantes ensinamentos e por todo tempo a mim dispensado;

Professores **José Roberto Kfoury Jr., Francisco Javier Hernandez-Blazquez, Cláudio Alvarenga, Ubiratan Fabres Machado e José Buratini Jr** e ao pessoal de seus laboratórios por terem disponibilizado a infra-estrutura e pela colaboração, imprescindíveis para a execução dos experimentos;

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

Prof. Dr. Bernd Hoffmann, pela doação das amostras para o radioimunoensaio;

Prof. Dr. Mário Binelli, pelo auxílio com a validação da técnica de radioimunoensaio e pelo tempo a mim dispensado;

Prof. Dr. Terry Mayhew, pelos ensinamentos a respeito do método de contagem celular através da Estereologia;

Danila, Laura, Van, Alex, Cadu, Luciana, Fernando, Eduardo, Mariana e Vanessa Uemura, meus colegas de laboratório, um muitíssimo obrigado não apenas pela fundamental ajuda em todas as etapas desse trabalho, mas acima de tudo, pela companhia, os momentos agradáveis de convivência e amizade.

Senhor **André Luiz Nogueira**, proprietário do **Frigorífico Mantiqueira LTDA** e a todos os funcionários, que viabilizaram a obtenção do material desta pesquisa;

Edinaldo (Índio) e Diogo, funcionários do setor, pela ajuda e pela disponibilidade durante a realização dos experimentos;

Maicon e Jaqueline, pela simpatia e auxílio durante todo esse período;

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro concedido a mim, através da bolsa de Mestrado, e ao projeto temático Jovem Pesquisador, sem o qual não seria possível a conclusão deste trabalho científico.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste projeto...

Muito obrigada!

RESUMO

SOUSA, L. M. M. C. Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados. **[VEGF and bFGF effects on P450 aromatase expression of cultivated placental cells from cloned and non-cloned bovines]**. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fibroblástico básico (bFGF) são reguladores importantes do desenvolvimento e função placentária. Os efeitos destes na expressão da enzima esteroidogênica aromatase P450 (P450arom) na placenta bovina em diferentes estágios gestacionais (90 a 270 dias) foram avaliados através de imunocitoquímica. Além disso, comparou-se a influência destes entre células placentárias de bovinos clonados e não clonados aos 270 dias. A aromatase P450 foi localizada exclusivamente no citoplasma das células trofoblásticas gigantes e sua expressão foi menor aos 150 dias de gestação, em relação às demais idades ($p < 0,05$). O VEGF (50 ng/ml) influenciou significativamente a expressão da P450arom aos 150 e 270 dias, enquanto o bFGF (10 ng/ml) foi efetivo em estimular essa expressão particularmente no final da gestação (270 dias). Os dois fatores combinados (bFGF+VEGF) inibiram a expressão da P450arom no terço inicial (90 dias), mas, por outro lado, estimularam-na aos 150 e 270 dias ($p < 0,05$). Nos clones, a expressão da P450arom, nos grupos controle e VEGF, foi semelhante a dos animais não clonados aos 270 dias de gestação, porém, o bFGF e os dois fatores combinados inibiram-na significativamente ($p < 0,05$). Em todos os grupos analisados, a expressão da P450arom apresentou característica ascendente em função dos dias de cultivo, atingindo concentração máxima após 96 horas de incubação. Assim, o presente estudo demonstrou efeitos distintos e estágio-específicos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na secreção de estrógenos na placenta bovina via modulação da expressão da aromatase P450 *in vitro*. Conclui-se que estes fatores de crescimento agem como potentes moduladores de enzimas esteroidogênicas e que, sob as condições de cultivo estabelecidas, as células placentárias de bovinos clonados apresentam padrão de resposta distinto quando comparadas com células de bovinos não clonados de mesma idade gestacional.

Palavras-chave: Fatores de Crescimento. Aromatase. Placenta. Bovinos. Clones.

ABSTRACT

SOUSA, L. M. M. C. **VEGF and bFGF effects on P450 aromatase expression of cultivated placental cells from cloned and non-cloned bovines.** [Efeitos do VEGF e do bFGF sobre a expressão da aromatase P450 em cultivo de células placentárias provenientes de bovinos clonados e não clonados]. 2007. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are important regulators of placental development and function. Their effects on the steroidogenic enzyme aromatase P450 (P450arom) expression from bovine placenta at different gestational stages (90 – 270 days) were evaluated by immunocytochemistry. Moreover, we compared the effects of these growth factors on P450arom expression between cloned and non cloned bovine placental cells. P450arom was localized exclusively in trophoblast giant cells cytoplasm, and its expression reached lowest levels at day 150 of gestation in comparison to the remaining evaluated gestational stages. VEGF (50 ng/mL) influenced significantly P450arom expression at days 150 and 270, whereas bFGF (10 ng/mL) was effective in stimulating P450arom expression particularly during late gestation (day 270). The two factors combined (bFGF+VEGF) inhibited P450arom expression during early gestation (day 90), but, in contrast, stimulated it at days 150 and 270 of pregnancy ($P<0.05$). In cloned bovine placental cells, P450arom expression was similar to non-cloned cells in the control and VEGF groups, however, bFGF and both factors together inhibited it significantly ($P<0.05$). In all groups analyzed, P450arom expression presented rising pattern over the duration of the culture, reaching maximal values at 96 hours of incubation. Thus, the present study demonstrated distinct and stage-specific effects of these growth factors on bovine placenta P450arom expression *in vitro*. We concluded that these growth factors act as potent steroidogenic enzymes regulators, and, under the established culture conditions, placental cells from cloned bovines presented distinct answer pattern compared to non cloned placental cells at the same gestational stage.

Key words: Growth factors. Aromatase. Placenta. Bovine. Cloned cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Camadas teciduais da barreira materno-fetal da placenta sinepiteliocorial dos bovinos, identificando-se o processo de fusão das células trofoblásticas gigantes binucleadas ao epitélio uterino (*). Vm. vaso materno; TCm. tecido conectivo materno; TCf. tecido conectivo fetal; Vf. vaso fetal. Adaptado de Leiser; Kaufmann (1994).....	27
Figura 2 -	Principais vias da esteroidogênese. A síntese de estrógenos segue principalmente a via Δ -5 (quadros azuis). P450scc: <i>cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450</i> ; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteróide-dehidrogenase/isomerase; P450c17 α : 17 α -hidroxilase/C17,20-liase; P450arom: aromatase citocromo P450. Adaptado de Schuler et al. 1994.....	30
Figura 3 -	Representação esquemática do gene Cyp19 (aromatase) bovino. Adaptado de Fűrbass et al. (1997).....	41
Figura 4 -	Representação esquemática da placa de cultura com 96 poços contendo os grupos experimentais estabelecidos (controle – bFGF+VEGF) e os respectivos tempos de tratamento (24 – 96 horas). As amostras contidas nas fileiras de 1 a 4 foram destinadas à dosagem protéica (células) e ao radioimunoensaio (meio de cultivo) e as da 5ª fileira, à imunocitoquímica.....	50
Figura 5 -	Paralelismo entre as curvas do kit e a construída com soro bovino inativado.....	54
Figura 6 -	Paralelismo entre as curvas do kit e a construída com meio de cultivo.....	56
Figura 7 -	Células placentárias de 90 dias de gestação do grupo controle. Representação do frame utilizado para contagem das células aromatase P450 positivas (setas). O frame contém linhas de inclusão (pontilhadas) e de exclusão (cheias). As células positivas são contadas se: 1. estiverem contidas no interior do frame e 2. não estiverem interceptadas pelas linhas de exclusão.....	59
Figura 8 -	Fotomicrografias da expressão da proteína da aromatase P450 na placenta de bovinos. Reações de imunocitoquímica	

utilizando o anticorpo policlonal C90995-14. A: Controle negativo. B e C: células placentárias de animais não clonados aos 90 e 150 dias de gestação, tratadas com os dois fatores combinados (bFGF+VEGF), após 48 horas de incubação, respectivamente. Observar nos detalhes a reação citoplasmática positiva para a proteína nas células trofoblásticas gigantes (setas cheias) e a reação negativa nas células trofoblásticas mononucleares (flechas). Barra: 30µm.....	65
Figura 9 - Fotomicrografias da expressão da proteína da aromatase P450 em células placentárias de bovinos não clonados (A) e clonados (B) aos 270 dias de gestação, tratadas com bFGF, após 48 horas de incubação. Reações de imunocitoquímica utilizando o anticorpo policlonal C90995-14. Observar nos detalhes a reação citoplasmática positiva para a proteína nas células trofoblásticas gigantes (setas cheias) e a reação negativa nas células trofoblásticas colunares (flechas). Barra: 30µm.....	66
Figura 10 - Expressão da P450 arom (cél/m ²) nas células placentárias bovinas controle ao longo da gestação (90 -270 dias). Valores expressos em escala logarítmica. Asterisco representa diferença estatisticamente significativa (p<0,05).....	67
Figura 11 - Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da P450 arom (cél/m ²) nas células placentárias bovinas aos 90 (A) e 150 (B) dias de gestação após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. ^{ab} : p<0,05 entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. *: p<0,05 dos respectivos grupos ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05.....	68
Figura 12 - Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da P450 arom (cél/m ²) nas células placentárias bovinas aos 210 (A) e 270 (B) dias de gestação após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. ^{abc} : p<0,05 entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. *: p<0,05 dos respectivos grupos ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05.....	69
Figura 13 - Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (cél/m ²) nas células placentárias bovinas após 24 horas de incubação. 90 – 270 dias: idades gestacionais. Valores expressos em escala logarítmica. *: p<0,05 entre os respectivos grupos ao longo da gestação. Valores sem identificação: p>0,05.....	70

Figura 14 - Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (cél/s/mm ²) nas células placentárias bovinas após 48 (A) e 96 (B) horas de incubação. 90 – 270 dias: idades gestacionais. Valores expressos em escala logarítmica. *: p<0,05 entre os respectivos grupos ao longo da gestação. Valores sem identificação: p>0,05.....	71
Figura 15 - Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (cél/s/mm ²) nas células placentárias de bovinos clonados, aos 270 dias de gestação, após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. ^{abc} : p<0,05 entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. *: p<0,05 entre os respectivos grupos ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05.....	72
Figura 16 - Expressão da aromatase P450 (cél/s/mm ²) nas células placentárias bovinas controle (A) e tratadas com VEGF (B) de animais clonados e não clonados aos 270 dias de gestação. 24 – 48 horas: tempos de tratamento. Valores expressos em escala logarítmica. Valores sem identificação: p>0,05.....	73
Figura 17 - Expressão da aromatase P450 (cél/s/mm ²) nas células placentárias bovinas tratadas com bFGF (A) e com os dois fatores juntos (B) aos 270 dias de gestação de animais clonados e não clonados. 24 – 48 horas: tempos de tratamento. Valores expressos em escala logarítmica. ^{ab} : diferença estatisticamente significativa (p<0,05). Valores sem identificação: p>0,05.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade (%) das células placentárias bovinas em diferentes idades gestacionais e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2007	61
Tabela 2 - Conteúdo protéico (mg/ml) 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, 2007	63
Tabela 3 - Expressão da aromatase P450 (céls/mm ²) das células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e os dois fatores combinados (bFGF + VEGF) em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2007	110
Tabela 4 - Coeficientes de variação (%) das células placentárias aromatase P450 positivas dos grupos controle e tratados com os fatores de crescimento bFGF e VEGF ao longo do período de cultivo, em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em clones. São Paulo, 2007.....	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Protocolo para dosagem de proteína	51
Quadro 2 -	Protocolo para dosagem de sulfato de estrona.....	53
Quadro 3 -	Reatividade cruzada (%) de vários esteróides com anti-soro sulfato de estrona utilizado para o radioimunoensaio. Fonte: GENESE Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos, www.gendiag.com.br	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANG	angiopoietinas
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina sérica bovina
COOH	Terminal carboxila
DHEA	17OH-pregnenolona dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de 17OH-pregnenolona dehidroepiandrosterona
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbeco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPM	Erro padrão médio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGFR	Receptor para o fator de crescimento fibroblástico
Flt	Fms-like tyrosine kinase
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropinas
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HLGAGs	Glicosaminoglicanos heparino-miméticos
HSD	hidroxiesteróide - desidrogenase
HSPG	Proteoglicanos contendo sulfato de heparina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
INR	Elementos iniciadores ricos em pirimidina

IVF	Fertilização <i>in vitro</i>
KDa	kilodaltons
KDR	kinase insert domain containing receptor
LH	Hormônio luteinizante
LOS	Large offspring syndrome
MAPK	Quinase mitógeno-ativada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NF-IL6	Fator nuclear interleucina-6
NH ₂	Terminal amino
NSB	Ligações não específicas
NT	Transferência nuclear
PAGs	Glicoproteínas associadas à gestação
P450 arom	Aromatase citocromo P450
P450 c17 α	17 α - hidroxilase
P450 scc	Cytochrome P450 cholesterol side-chain
PIGF	Fator de crescimento placentário
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RTKs	Receptores tirosina-quinase
SF-1	Fator esteroideogênico-1
TFIID	Fator transcricional IID
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
USF	Ubiquitous upstream stimulating factor
UTR	Untranslated region
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 A PLACENTA BOVINA	26
3.2 ESTEROIDOGÊNESE PLACENTÁRIA	28
3.3 FATORES DE CRESCIMENTO E ESTEROIDOGÊNESE	31
3.3.1 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e seus receptores	31
3.3.2 Fatores de Crescimento Fibroblástico (FGFS) e seus receptores	33
3.3.3 Esteroidogênese modulada por fatores de crescimento	35
3.4 MECANISMOS MODULADORES DE EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS	36
3.4.1 O gene Cyp19	39
3.5 CLONES	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 CULTIVO CELULAR	47
4.1.1 Isolamento das células placentárias	48
4.1.2 Concentração e viabilidade celular	48
4.1.3 Adição dos fatores bFGF e VEGF	49
4.1.4 Coleta das amostras cultivadas	49
4.3 PROTEÍNAS TOTAIS	50
4.4 DOSAGEM DE SULFATO DE ESTRONA	52

4.4.1 Validação da técnica.....	52
4.4.2 Radioimunoensaio.....	53
4.4.3 Análise dos ensaios.....	54
4.5 IMUNOCITOQUÍMICA PARA AROMATASE CITOCROMO P450.....	56
4.5.1 Estimativa do número total da aromatase citocromo P450 positivas <i>in vitro</i>	57
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5 RESULTADOS	61
5.1 PROTEÍNAS TOTAIS.....	62
5.2 ENSAIOS HORMONAIS.....	64
5.3 EFEITO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DA AROMATASE CITOCROMO P450.....	64
5. 3.1 Expressão da aromatase por células de animais clonados e não clonados aos 270 dias de gestação.....	72
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE	110
ANEXOS	113

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A placenta bovina, além de promover as trocas fisiológicas entre mãe e feto, sintetiza e secreta hormônios esteróides, tais como os estrógenos e a progesterona (P_4). Contudo, os mecanismos que regulam o funcionamento e atividade desta, principalmente no que diz respeito ao processo de esteroidogênese, ainda não estão completamente esclarecidos. Até o presente momento, sabe-se que a produção hormonal por tipos celulares específicos pode ser regulada diferentemente em tecidos que contêm populações celulares heterogêneas e este conceito é particularmente relevante no que concerne à placenta dos bovinos, a qual apresenta considerável heterogeneidade celular (WIMSATT, 1951; WOODING, 1983).

Os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fibroblástico básico (bFGF) são importantes reguladores do desenvolvimento e função placentários, sendo os principais responsáveis pelo evento da angiogênese, ou seja, pela formação de vasos sangüíneos a partir de vasos preexistentes e assim, pelo desenvolvimento contínuo do leito vascular. A localização destes e de seus respectivos receptores em células de origem não endotelial, tem levado inúmeras pesquisas a considerar a importância dos mesmos como agentes moduladores de outras funções fisiológicas, muito além da proliferação celular endotelial (JABLONKA-SHARIFF et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1997; WINTHER et al., 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). Um exemplo dessa atividade é a capacidade de tais fatores influenciarem a produção de hormônios esteróides em células esteroidogênicas tanto *in vivo* (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; BERISCHA et al., 2000; SUGINO et al., 2000; SCHAMS et al., 1999) quanto *in vitro* (FAUSER; BAIRD; HSUEH, 1988; RAESIDE et al., 1988; MURONO; WASHBURN, 1990; SORDOILLET et al., 1992; LI; JONHSON, 1993; YAMOTO; SHIKONE; NAKANO, 1993; VERNON; SPICER, 1994; KOBAYASHI et al., 2001; GRASSELLI et al., 2002; CAMPOS, 2005).

Na placenta bovina, os estrógenos exercem um importante papel na manutenção da prenhez (WENDORF et al., 1983) e na sinalização do início do trabalho de parto (HOFFMANN et al., 1979; THORBURN; CHALLIS, 1979). Seu processo de síntese inicia-se a partir do colesterol mitocondrial e utiliza substratos

andrógenos, tais como a androstenediona, que são convertidos em estrógenos pela enzima aromatase citocromo P450 (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001). O Estradiol (E_2) e a Estrona (E_1) são os principais representantes, porém, a E_1 é imediatamente conjugado em sulfato de estrona (E_1SO_4 ; LIGGINS; THORBURN, 1994) o qual tem sido considerado um prático indicador da função placentária, muito utilizado em diagnósticos gestacionais (HOLDSWORTH et al., 1982; HUNG; PRAKASH, 1990) e na predição do número de fetos (DOBSON et al., 1993; TAKAHASHI et al., 1997).

Desse modo, na tentativa de elucidar uma dentre as inúmeras ações dos fatores de crescimento, o presente trabalho tem como intuito estudar a expressão da enzima esteroidogênica aromatase P450 em células placentárias bovinas ao longo da gestação sob influência ou não do bFGF e do VEGF sobre a produção de estrógenos, de maneira a contribuir para o esclarecimento de questões inerentes a perdas embrionárias, abortos e insuficiência placentária, as quais são de suma importância ao processo de reprodução e clonagem animal.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente estudo testou a hipótese de que os fatores de crescimento bFGF e VEGF modulam a expressão da enzima aromatase P450 e conseqüentemente a secreção de estrógenos nas células placentárias bovinas ao longo do período gestacional. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Localizar e quantificar a expressão da enzima aromatase citocromo P450 nas células placentárias de animais não clonados aos 90, 150, 210 e 270 dias de gestação e aos 270 dias em animais clonados.
- Avaliar os efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF sobre a expressão da aromatase P450 nestas células; e,
- Confrontar os resultados entre animais clonados e não clonados aos 270 dias de gestação e analisar se os efeitos exercidos pelos fatores foram semelhantes.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura são abordados temas referentes à morfologia placentária na espécie bovina, bem como aos aspectos relacionados aos eventos de síntese hormonal e angiogênese placentária. Em seguida, os fatores de crescimento VEGF e bFGF, bem como seus receptores, e a relação destes com a esteroidogênese são caracterizados. Por último, são relatados os principais mecanismos moduladores de enzimas esteroidogênicas bem como as particularidades inerentes à placentação em bovinos clonados.

3.1 A PLACENTA BOVINA

A palavra *placenta*, como termo médico, tem origem diversa. Deriva do grego *plakoûta*, acusativo de *plakous*, nome que se dava na Grécia a um bolo arredondado e achatado (SKINNER, 1961). A raiz *plak*, de origem indo-européia, indica forma achatada (WATKINS, 1981) e em latim, *placenta* também tinha a acepção de bolo chato (TORRINHA, 1942).

Nos bovinos, o período inicial de gestação é caracterizado pela presença de uma placenta vitelina funcional, a qual 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).

Desse modo, a placenta bovina é do tipo **corioalantóica**, devido à fusão do córion com o alantóide, os quais, juntos com o âmnio, constituem as membranas extra-embrionárias fetais; **cotiledonária**, por apresentar múltiplos cotilédones separados, os quais formam projeções vilosas que se interdigitam com os recessos existentes na superfície das carúnculas maternas (MOSSMAN, 1987; LEISER;

KAUFMANN, 1994; WOODING; FLINT, 1994); e, **sinepiteliocorial**, definida pelo número de membranas ou camadas celulares que separam as circulações materna e fetal. Nesse tipo de placenta, seis camadas (endotélio materno, tecido conectivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conectivo fetal, endotélio fetal) podem ser identificadas separando as circulações (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Após a implantação do embrião, o epitélio trofoblástico bovino passa a ser constituído por dois tipos celulares distintos (WIMSATT 1951; GREENSTEIN et al., 1958): as células trofoblásticas colunares (CTC), as quais são mononucleadas e apresentam características típicas de células epiteliais, formando a zona de contato materno-fetal, e as células trofoblásticas gigantes (CTG), cuja maioria é binucleada e não apresenta características morfológicas de células epiteliais (WOODING; FLINT, 1994). Acredita-se que essas células são originárias de células trofoblásticas mononucleadas através de mitose acitocinética simples, ou seja, por uma seqüência de mitoses com duplicação cromossômica e cariocinese, sem citocinese correspondente (KLISH et al., 1999). Durante o desenvolvimento, as células trofoblásticas gigantes migram do epitélio coriônico e invadem o epitélio endometrial com o intuito de carrear moléculas complexas do feto para a mãe (Figura 1). A relevância funcional desse processo, o qual leva a classificação da placenta dos ruminantes como sinepiteliocorial (WOODING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994), é o transporte direto de substâncias mediadoras através da barreira placentária e sua liberação no interior do compartimento materno (WOODING; FLINT, 1994).

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

3.2 ESTEROIDOGÊNESE PLACENTÁRIA

O processo de síntese de hormônios esteróides tem início com o transporte do colesterol presente no citoplasma para a membrana mitocondrial interna, movimento este regulado pela proteína esteroidogênica regulatória aguda (HERRMANN; SCHOLMERICH; STRAUB, 2002; SUGAWARA; FUJIMOTO, 2004). No interior das mitocôndrias, o colesterol é convertido a pregnenolona (P_5) por um complexo enzimático especializado que inclui a *cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450* ($P450_{scc}$) e outras enzimas acessórias (HALL, 1984). O processamento adicional da pregnenolona para ativar esteróides requer enzimas ligadas ao retículo endoplasmático liso, tais como a 3β -hidroxiesteróide-dehidrogenase/isomerase (3β -HSD) e a aromatase citocromo P450 (CARLONE; RICHARDS, 1997; SIMPSON; DAVIS, 2001), constituindo, assim, as vias esteroidogênicas Δ_4 e Δ_5 (Figura 2).

Na via Δ_4 , a pregnenolona é convertida a progesterona pela ação da 3β -HSD, e a progesterona, por sua vez, é convertida a androstenediona pela 17α -hidroxilase/C17, 20 - liase ($P450_{c17\alpha}$). Por outro lado, na via Δ_5 , a pregnenolona é convertida a dehidroepiandrosterona (DHEA) pela ação da $P450_{c17\alpha}$, e a dehidroepiandrosterona é convertida a androstenediona pela enzima 3β -HSD (ALBRECHT; PEPE, 1990, 1998; SCHULER et al., 1996). A androstenediona é utilizada pelas células trofoblásticas como precursor dos estrógenos (ALBRECHT; PEPE, 1998), cuja conversão é catalisada pelo complexo enzimático aromatase citocromo P450 (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

O complexo aromatase P450 é responsável por se ligar ao substrato esteroidal C19, a androstenediona e a testosterona são os mais comuns, e catalisar uma série de reações levando a formação do anel fenólico A, característico dos estrógenos, com concomitante perda do grupo metil C19 na forma de ácido fórmico. Associada a essa enzima está uma flavoproteína, a NADPH-citocromo P450 redutase que é responsável por transferir redutores equivalentes do NADPH para qualquer forma microsomal da aromatase P450 com a qual tenha contato (SIMMONS et al., 1985). Enquanto a redutase é produto de um gene simples, a

P450arom é membro de uma superfamília que contém, até o presente momento, mais de 220 membros caracterizados pertencentes a 36 famílias de genes (NELSON et al., 1993). Dentro disso, a P450 arom é o único membro da família 19, designada Cyp19. Essa denominação baseia-se no fato de que o grupo angular metil C19 é o sítio de ligação do oxigênio. Para cada mol de esteróide C19 metabolizado, a reação da aromatase utiliza três moles de oxigênio e três de NADPH (THOMPSON; SIITERI, 1974).

Nos bovinos, o sulfato de estrona (E_1SO_4), a estrona (E_1) e o estradiol-17 β , estrógeno não conjugado, são os principais estrógenos placentários produzidos durante o segundo e o terceiro trimestre de gestação (HOFFMANN; GOES DE PINHO; SCHULER, 1997; ZHANG ET AL., 1999). A porção cotiledonária do placentoma é o principal sítio de síntese e conjugação de estrógenos durante o período gestacional (HOFFMANN et al., 1979; ROBERTSON; KING, 1979; SCHULER et al., 1994). A conversão de E_1 e E_1SO_4 e suas concentrações no plasma sanguíneo materno são controladas por enzimas localizadas na porção caruncular dos placentomas, a estrógeno-sulfotransferase e a esteróide sulfatase (HOFFMANN; SCHULER, 2002; GREVEN et al., 2007). Os níveis detectáveis de E_1SO_4 podem ser identificados inicialmente nos fluídos fetais aos 33 dias de gestação, e na circulação materna a partir de 70 dias (ELEY; THATCHER; BAZER, 1979). As concentrações de E_1 e E_1SO_4 , no plasma materno, são praticamente iguais no momento próximo ao fim da gestação (ELEY; THATCHER; BAZER, 1979; HOFFMANN; GOES DE PINHO; SCHULER, 1997). Apesar de o sulfato de estrona não ser biologicamente ativo no receptor nuclear de estrógenos, quando comparado com a atividade moderada da estrona e do $E_2\beta$ altamente ativo (HOFFMANN; SCHULER, 2002), a mensuração das concentrações de E_1SO_4 e a avaliação de suas funções nos fornece uma estimativa indireta de E_1 . Durante a última semana de gestação, as concentrações de E_1SO_4 e $E_2\beta$ no plasma sanguíneo se elevam gradativamente e chegam ao platô no dia do parto ($20,4 \pm 2,1$ e $1,07 \pm 0,08$ ng/ml, respectivamente (HOFFMANN; WAGNER; GIMENEZ, 1976). Esse aumento pré-parto é resultante da elevação da atividade das enzimas P450c17 α e P450arom (HOEDEMAKER et al., 1990; TSUMAGARI et al., 1993) induzida pelo aumento do cortisol fetal originário da ativação do eixo hipófise-adrenal fetal (HOEDEMAKER et al., 1990).

Embora a produção de estrógenos tenha início logo nos primeiros dias de gestação (HOFFMANN et al., 1997), o foco no papel biológico dos estrógenos placentários nos bovinos tem sido limitado principalmente ao período de preparação do trato genital para o momento do parto e da glândula mamária para a lactação vindoura. Com a detecção da alta expressão do receptor nuclear de estrógeno- α (ER- α ; SCHULER et al., 2002) e da enzima esteróide sulfatase no estroma e células epiteliais carunculares, o papel dos estrógenos conjugados como moduladores do crescimento, diferenciação e função nas carúnculas tem sido considerado (GREVEN et al., 2007), e sua subsequente flutuação vem sendo utilizada como prognóstico do status do desenvolvimento da função feto-placentária e conseqüentemente apontada como indicador da viabilidade fetal (ZHANG et al., 1999).

Figura 2 – Principais vias da esteroidogênese. A síntese de estrógenos segue principalmente a via Δ -5 (quadros azuis). P450scc: *cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450*; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteróide-dehidrogenase/isomerase; P450c17 α : 17 α -hidroxilase/C17,20-liase; P450arom: aromatase citocromo P450. Adaptado de Schuler, 1994

3.3 FATORES DE CRESCIMENTO E ESTEROIDOGENESE

Uma breve descrição dos fatores de crescimento VEGF e bFGF, bem como de seus receptores, se faz necessária para justificar a utilização dos mesmos no presente trabalho.

3.3.1 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e seus receptores

A família VEGF é constituída por diversas proteínas identificadas por letras (VEGF-A a F; PAAVONEN et al., 1996; ACHEN et al., 1998; MEYER et al., 1999; SUTO et al., 2005; YAMAZAKI et al., 2005) e pelo fator de crescimento placentário (PIGF; PARK et al., 1994). O VEGF nativo ou VEGF-A consiste em uma glicoproteína homodimérica básica de 45 kDa, ligante de heparina, codificada por um único gene e com habilidade de promover o crescimento das células endoteliais derivadas de artérias, veias e linfáticos (FERRARA, 2004). Além disso, o VEGF possui ação na regulação da permeabilidade capilar através do aumento da condutividade hidráulica em microvasos isolados pela elevação do influxo de cálcio (DVORAK et al., 1995; BATES CURRY, 1997), na modulação da angiogênese placentária, manutenção da integridade e do estado diferenciado dos vasos (CHEUNG et al., 1995).

Embora as células endoteliais sejam os alvos primários do VEGF, vários estudos têm reportado uma consistente e apreciável atividade mitogênica em outros tipos celulares tais como as células epiteliais da retina (GUERRIN et al., 1995), dos ductos pancreáticos (OBERG-WELSH et al., 1997) e células de Schwann (SONDELL et al., 1999).

Existem cinco isoformas da proteína VEGF bovina, resultantes de arranjos transcricionais alternativos, das quais três (VEGF₁₂₀, VEGF₁₄₅ e VEGF₁₆₅) são solúveis e exercem seus efeitos de maneira parácrina, enquanto as duas isoformas

maiores (VEGF₁₈₈ e VEGF₂₀₅) estão associadas à membrana celular e atuam de forma autócrina (FERRARA et al., 1992; NG et al., 2006). O transcrito primário do VEGF deriva de um simples gene organizado em oito exons separados por sete introns. Arranjos transcricionais alternativos envolvem os exons 6 e 7, enquanto os aminoácidos codificados pelos exons 1, 5 e 8 são conservados em todas as isoformas (WELLMANN et al., 2001).

Os receptores tirosina-quinase (RTKs) que medeiam as atividades biológicas do VEGF são o VEGFR-1/Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase – 1*; DE VRIES et al., 1992) e o VEGFR-2/KDR (*Kinase insert domain containing region*; TERMAN et al., 1992). Ambos são caracterizados por possuírem sete domínios imunoglobulina - miméticos em sua porção extracelular, uma região transmembrânica única e uma sequência tirosina-quinase interrompida pelo domínio de inserção a quinase em sua porção intracelular (SHIBUYA et al., 1990). Um outro membro da mesma família de RTKs é o VEGFR-3/Flt-4 (*Fms-like tyrosine kinase – 4*; KAIPAINEN et al., 1995), que ao invés de atuar como receptor do VEGF-A, se liga ao VEGF-C e ao VEGF-D (KARKHAINEN et al., 2002). Além desses RTKs, o VEGF interage com a família de co-receptores, as neutrofilinas (FERRARA, 2004).

A interação do VEGF com seus receptores, Flt-1 e KDR, ocorre através de dois domínios distintos presentes na molécula de VEGF. Esses domínios de ligação estão localizados em terminações opostas do monômero de VEGF. O Flt-1 pode ser ativado pelas isoformas 165 e 188 do VEGF-A (PLOUET et al., 1997; POLTORAK et al., 1997), enquanto o KDR é ativado pelas isoformas contendo 120, 145, 165 (POLTORAK et al., 1997) e 188 aminoácidos, sendo esta liberada lentamente após exposição à heparina e heparinases ou de maneira rápida através de clivagem pela plasmina ou pela uroquinase na terminação carboxila (PLOUET et al., 1997).

No placentoma, o VEGF-A e seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 foram localizados no epitélio uterino e nos trofoblastos bem como no tecido vascular e glândulas uterinas. A presença do sistema VEGF na interface materno-fetal e na vasculatura indica que o VEGF bovino deve ter: (1) funções clássicas na angiogênese e permeabilidade vascular, (2) propriedade de fator de crescimento, facilitando as trocas materno-fetais via ação parácrina, (3) atividade quimiotática no

endotélio capilar, (4) influência autócrina na migração das células trofoblásticas gigantes (PFARRER et al., 2006), e (5) provável ação modulatória na função trofoblástica (DANTZER; WINTHER, 2001), mais especificamente na esteroidogênese (CAMPOS, 2005).

3.3.2 Fatores de Crescimento Fibroblástico (FGFS) e seus receptores

Os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) são polipeptídios pequenos, que compartilham características estruturais comuns. Compõem uma família de aproximadamente 25 membros, numerados de 1 a 25 (KATOH; KATOH, 2005), que induzem a atividade mitogênica, quimiotática e angiogênica em células de origem mesodérmica e neuroectodérmica (BASILICO; MOSCATELLI, 1992). As características que definem a família FGF são a forte afinidade a heparina e aos glicosaminoglicanos heparino-miméticos (HLGAGs; BURGESS; MACIAG, 1989), bem como uma seqüência central de 140 aminoácidos altamente homólogos entre os diferentes membros. Apesar da nomenclatura, o uso dessas iniciais não implica que todos esses fatores têm atividades estimuladoras de fibroblastos, mas pertencem à mesma família por estarem estruturalmente relacionados (ZHU et al., 1991).

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 (RENKO et al., 1990; BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991; YU et al., 1993; DAVIS et al., 1997), provavelmente secretada pelas células através de mecanismo ativo de exocitose, independentemente do mecanismo de secreção via retículo endoplasmático e complexo de Golgi (MIGNATTI; MORIMOTO; RIFKIN, 1992; FLORKIEWICZ et al.,

1995). O bFGF liberado pela célula se associa às proteoglicanas contendo sulfato de heparina (HSPG), presentes nas superfícies celulares e matriz extracelular (AVIEZER et al., 1994), através de processos proteolíticos 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 (BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997; ARESE et al., 1999), enquanto as isoformas de alto peso molecular apresentam localização nuclear (RENKO et al., 1990; BUGLER; AMALRIC; PRATS, 1991; YU et al., 1993; DAVIS et al., 1997) e permanecem associadas às células, sendo responsáveis por efeitos intrácrinos independentes da ativação dos receptores (BIKFALVI et al., 1995; DAVIS et al., 1997; ARESE et al., 1999).

Os FGFs exercem seus efeitos mitogênicos e angiogênicos nas células-alvo através de sinalização via receptores tirosina-quinase da superfície celular. Cinco genes distintos codificam os receptores de alta afinidade que interagem com os membros dessa família (FGFR-1 a 5) (SLEEMAN et al., 2001) e são caracterizados por possuírem um domínio extracelular, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático com atividade tirosina quinase. A porção extracelular compreende três domínios imunoglobulina-miméticos, D1, D2 e D3 (ou I, II e III; STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999).

Arranjos transcricionais alternativos no exon III possibilitam a formação de três isoformas do FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 (IIIa, IIIb e IIIc), as quais apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs. O FGF-1 pode ativar todas as variantes, enquanto o bFGF ativa preferencialmente as isoformas c (COLEMAN, 2003). O quinto receptor do FGF difere dos demais, pois é composto por uma proteína de membrana e um domínio extracelular constituído por 16 cisteínas (STAUBER; DIGABRIELE; HENDRICKSON, 1999).

O bFGF é produzido pelos tecidos placentários materno e fetal ao longo de toda gestação (RIDER; PIVA, 1998; ZHENG et al., 1998) indicando ser o seu papel fundamental para a diferenciação de tecidos vasculares e não vasculares derivados do mesoderma (YAMAGUCHI et al., 1994; REYNOLDS et al., 2000).

Na placenta bovina, a proteína do bFGF foi localizada tanto no citoplasma de células dos epitélios e estromas materno e fetal bem como em células endoteliais. Já os receptores FGFR-1 e FGFR-2 foram observados tanto no citoplasma quanto no núcleo de células dos epitélios e estromas materno e fetal e em células endoteliais, enquanto o FGFR-3 apresentou localização predominantemente nuclear em todas as células ao longo do período gestacional (90 a 270 dias; CAMPOS, 2005). Segundo Pfarrer et al., (2006), a localização específica de membros da família FGF, nos bovinos, são as células trofoblásticas gigantes, indicando que estas, além de exercerem a função clássica de produção hormonal, exerçam também outros papéis importantes como a regulação do crescimento, diferenciação e angiogênese placentária.

Existe uma íntima relação entre o bFGF e os diferentes membros da família VEGF durante a angiogênese, linfangiogênese e vasculogênese. Várias evidências experimentais apontam a possibilidade de o bFGF regular indiretamente a neovascularização através da ativação do sistema VEGF/VEGFR (AUGUSTE et al., 2001; SHEGHEZZI et al., 1998; TILLE et al., 2001; GABLER et al., 2004; KANDA et al., 2004).

3.3.3 Esteroidogênese modulada por fatores de crescimento

Estudos *in vitro* demonstram que os fatores de crescimento VEGF e bFGF apresentam efeitos modulatórios sobre a esteroidogênese em células de várias espécies animais. Tanto o VEGF quanto o bFGF têm influência na produção de estradiol-17 β e de progesterona em células da granulosa de suínos (GRASSELLI et al., 2002) e aumentam a produção de progesterona na fase inicial do corpo lúteo em bovinos (KOBAYASHI et al., 2001). O bFGF modula a esteroidogênese induzida pelo hormônio folículo estimulante (FSH), inibindo a produção de estradiol-17 β e de progesterona em células da granulosa de bovinos (VERNON; SPICER, 1994), e de ratos (YAMOTO et al., 1993), bem como a produção de androstenediona em células da granulosa de galinhas (LI; JOHNSON, 1993).

Também foi demonstrado que tanto o VEGF quanto o bFGF atuam de maneira parácrina e/ou autócrina na placenta bovina estimulando a produção de progesterona em determinadas fases da gestação. Além disso, observou-se que a placenta bovina de gestações de fetos clonados apresenta padrão diferente de produção de progesterona, bem como resposta distinta frente aos fatores de crescimentos citados (CAMPOS, 2005).

Até o presente momento não existem relatos sobre a possível influência destes fatores sobre a produção dos estrógenos na placenta. Embora os estudos demonstrem o efeito destes na esteroidogênese do ovário e do corpo lúteo, os mesmos não elucidam completamente se tal efeito é mediado por ações diretas sobre as enzimas no momento da síntese hormonal e/ou por mecanismos que estejam ligados indiretamente a esse processo. Por exemplo, 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 P450 17α -hidroxilase (LI; JOHNSON, 1993). Em contrapartida, o aumento da produção de progesterona na fase inicial do corpo lúteo de bovinos é possivelmente mediado pelo estímulo da secreção luteínica de angiotensina II e prostaglandina 2α induzida tanto pelo VEGF quanto pelo bFGF (KOBAYASHI et al., 2001).

3.4 MECANISMOS MODULADORES DE EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS

No organismo, existem sinais moleculares capazes de penetrar nas células e modificar seu comportamento mediante o controle da atividade de alguns de seus genes. Entre os principais expoentes se encontram hormônios do tipo esteróides (estrógenos, andrógenos, progesterona e corticóides), tiroxina, ácido retinóico, dentre outros. Essas substâncias hidrofóbicas se difundem através da membrana plasmática, unem-se aos seus receptores intracelulares, os quais sofrem mudanças em sua conformação passando à forma dimérica, e então a segmentos reguladores

específicos de determinados genes. Desta forma, agem como ativadores ou, mais raramente, como inativadores gênicos. Nestes casos, se o produto dos genes ativados for um sistema enzimático, por exemplo, obter-se-á uma resposta celular poucos minutos após a chegada do hormônio. Comumente, os genes ativados se expressam inicialmente em proteínas que atuam como fatores de transcrição para um segundo grupo de genes específicos. Falamos então de genes de resposta inicial, no primeiro caso, e genes de resposta tardia, no segundo (HIB, 2003).

A via da adenilciclase é a via metabólica clássica responsável pela resposta celular frente à ação de vários hormônios. A ativação dessa enzima pela proteína G se traduz em uma rápida produção de AMPc a partir do ATP. A produção e o acúmulo intracelular de AMPc, em resposta a um sinal externo, no caso um hormônio, não são suficientes por si só para modificar o comportamento celular, sendo necessário a ativação de uma cascata citosólica de proteínas denominadas quinase A. Esta quinase é capaz de fosforilar e ativar diferentes substratos nos distintos tipos celulares, o que explica os múltiplos efeitos que produz o AMPc (HIB, 2003).

No córtex adrenal bovino, por exemplo, a transcrição dos genes das hidroxilases esteroidais, como o Cyp17, que codifica a enzima 17 α -hidroxilase/C17, 20 - liase (P450c17 α), é controlada pelo ACTH via AMPc e ativação da proteína quinase A. Tal regulação é coordenada por dois processos distintos: a resposta aguda envolve uma rápida mobilização do colesterol proveniente dos estoques intracelulares no interior das mitocôndrias, onde a primeira etapa da síntese hormonal é catalisada pela P450scc e, na resposta crônica, o ACTH, liberado pela hipófise, regula a transcrição gênica das hidroxilases (LUND et al., 1997).

As células trofoblásticas sintetizam esteróides, mas demonstram variabilidade em sua ativação. A manutenção de diferenciação do fenótipo das células trofoblásticas sinciciais em humanos, incluindo a expressão da P450scc, parece ser influenciada também pela via adenilciclase/AMPc/cíclico/proteína quinase A (STRAUSS et al., 1992), porém, as células trofoblásticas em bovinos e roedores não

respondem satisfatoriamente a esses mesmos moduladores (YAMAMOTO et al., 1995).

A esteroidogênese na placenta bovina difere daquela observada em outros tecidos, como o ovário, por não ser modulada por nucleotídeos cíclicos como mensageiros intracelulares (ULLMANN; REIMERS, 1989; SHEMESH et al., 1994). Estudos demonstram que o cálcio (Ca^{++}) atua como segundo mensageiro na sinalização do estímulo esteroidogênico (ULLMANN; REIMERS, 1989; SHEMESH et al., 1994), o qual é também modulado pela proteína quinase C (SHALEM et al., 1988; SHEMESH et al., 1989) e calmodulina (ULLMANN; REIMERS, 1989; SHEMESH et al., 1994). Além disso, a regulação da esteroidogênese na placenta bovina continua não esclarecida, já que ainda não foram identificados hormônios trópicos específicos. Nesse caso, atribui-se o controle de produção hormonal a níveis relativos e arranjos tecido-específicos de enzimas esteroidogênicas (IZHAR; PASMANIK; SHEMESH, 1992; SCHULER et al., 2006).

3.4.1 O gene Cyp19

Como mencionado anteriormente (item 3.2), a síntese de estrógenos, a partir de precursores andrógenos, é catalisada pela aromatase citocromo P450, a qual é codificada pelo gene Cyp19 (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001). Nos bovinos, esse gene foi mapeado na banda q2.6 do cromossomo 10 (GOLDAMMER et al., 1994) e a extensão de seu *locus* não pôde ser determinada com precisão, mas sabe-se que o mesmo excede 56 kilobases (FÜRBASS et al., 1997). Os principais sítios de expressão do Cyp19 são as gônadas (MASTERS et al., 2003; MENDELSON et al., 2005) e, em humanos e em alguns ungulados, a placenta (SIMPSON et al., 1994; CORBIN et al., 1995; HINSHELWOOD et al., 1995; FÜRBASS et al., 1997; DELARUE et al., 1998; VANSLOW et al., 1999; SCHULER et al., 2006). Contudo, durante o desenvolvimento, diferenciação e, em menor extensão, ao longo da vida adulta, os transcritos do Cyp19 têm sido encontrados em vários órgãos como pele, tecido adiposo (LUEPRASITSAKUL; LONGCOPE, 1991), cérebro (HARADA et al., 1992; LEPHARD et al., 1992) e glândulas adrenais (CONLEY et al., 1996).

Em humanos, a expressão do Cyp19 em cada um desses tecidos é regulada por seqüências promotoras específicas únicas situadas *upstream* dos também tecido-específicos exons 1, os quais são alternativamente arranjados em um sítio comum localizado *upstream* do códon inicial de tradução no exon 2 (SIMPSON et al., 1997), resultando em variantes transcricionais com diferentes regiões 5' não traduzidas, as quais são reguladas por hormônios e via segundos mensageiros distintos (CLYNE et al., 2004). Porém, as seqüências que codificam a proteína da aromatase P450 permanecem idênticas (exons 2 – X; MENDELSON et al., 2005). Desse modo, em humanos, a expressão da aromatase no ovário é regulada pelo FSH, o qual atua, através do AMPc, via região promotora II (MICHAEL et al., 1995; SIMPSON et al., 2000), enquanto na placenta a região promotora I.1 regula a aromatase em resposta aos retinóides (SUN et al., 1998). Por outro lado, o promotor I.4 é responsável pela expressão do Cyp19 no tecido adiposo sob o controle de glicocorticóides, citocinas classe 1 ou fator de necrose tumoral – α (TNF α ; ZHAO et al., 1995a,b; ZHAO et al., 1996). Embora os exons 1 alternativos não estejam

traduzidos, sua presença no RNAm maduro permite a identificação da região promotora específica utilizada para derivação de um dado transcrito.

As espécies domésticas que expressam a aromatase citocromo P450 em suas placentas – ruminantes, eqüinos, e suínos - também utilizam seqüências promotoras placenta-específicas para regular a expressão do gene Cyp19 por meio de arranjos transcricionais alternativos (HINSHELWOOD et al., 1995). Na placenta bovina, foram detectadas duas principais variantes do Cyp19: uma tem início com o exon 1.1 e a outra, com o exon 1.3 (Figura 3; FÜRBASS et al., 1997). No entanto, a seqüência posicionada *upstream* do exon 1.1 foi identificada como a região promotora responsável pela expressão do gene Cyp19 na placenta, denominada promotor 1.1 (P1.1) (HINSHELWOOD et al., 1995; FÜRBASS et al., 1997; VANSLOW et al., 1999; KALBE et al., 2000). O P1.1 apresenta somente 39% de similaridade seqüencial com o promotor placentário I.1 do gene aromatase humano (HINSHELWOOD et al., 1995) mas, nenhuma com o promotor placentário 1.5 do gene ovino (VANSLOW et al., 1999). Além disso, a localização dos mesmos é bem distinta: enquanto as regiões promotora bovina e humana estão situadas em posição consideravelmente distal ao sítio inicial de tradução, 20 e 40 kilobases, respectivamente (BRUNNER et al., 1998; KAMAT et al., 1999), no ovino esta se localiza próxima a esse sítio, na posição 0,2 kb, quase se sobrepondo à região promotora específica do ovário (VANSLOW et al., 1999). Isso indica que as regiões promotoras específicas da placenta do gene Cyp19 não são homólogas entre as espécies, sugerindo que a expressão da aromatase na placenta não se conservou, e sim, desenvolveu-se de modo independente em alguns momentos durante a evolução, mesmo em espécies tão próximas como o bovino e o ovino (FÜRBASS et al., 2001).

Figura 3 – Representação esquemática do gene Cyp19 (aromatase) bovino. cDNA: desenho esquemático representando o principal transcrito placentário contendo o exon 1.1 com a terminação 5' não traduzida (5' UTR). A região codificadora é delineada pelos códons ATG (início) e TAA (final) e as margens dos exons são indicadas com linhas brancas. Gene: estrutura genômica do Cyp19 com a região codificadora (exons 2-10) e dois 5' UTRs (exons 1.1 e 1.3), representados pelas barras verticais (sem escala). As margens entre os exons e introns foram determinadas pela comparação das seqüências genômicas e do cDNA, respectivamente. Mapa: a região genômica ancorando o exon 1.1 e parte do gene estendendo-se os exons 1.3 a 10 foram fisicamente mapeados pela análise de restrição de vários clones Adaptado de Fűrass et al., (1997)

O início do processo de transcrição consiste em um dos eventos mais importantes para a regulação da expressão gênica e é mediado por três tipos de RNA polimerases – denominadas I, II e III – as quais são específicas por transcreverem um único grupo de genes (HIB, 2003). A regulação da expressão gênica encontra-se associada à estrutura cromatínica (FELSENFELD et al., 1996; KADONAGA, 1998), a qual sofre influência do processo de metilação do DNA que, por sua vez, é determinado pela ação de enzimas específicas, as DNA metilases (NAN et al., 1998; BHATTACHARYA et al., 1999). A metilação do DNA está associada com a heterocromatina, ou seja, com a cromatina mais condensada, e, conseqüentemente, com a inatividade transcricional. No entanto, na inativação de um gene, o número de metilações tem menos influência do que o lugar em que se encontram, pois a metilação do DNA ao nível da seqüência promotora pode abolir a atividade de um gene, enquanto muitas metilações em sua região codificadora não a

alteram. Além disso, um gene pode estar metilado em um tipo celular, mas não em outro (HIB, 2003).

O P1.1 encontra-se hipometilado nos cotilédones e metilado nas carúnculas, testículos e corpo lúteo (FÜRBASS et al., 2001), indicando que os cotilédones, e não as carúnculas, apresentam intensa atividade da aromatase durante o período gestacional e o parto (TSUMAGARI et al., 1993). Além disso, em um estudo da distribuição específica das variantes transcricionais do Cyp19 bovino, quantidades abundantes dos transcritos do exon 1.1 foram encontradas na placenta contendo os cotilédones, em detrimento às baixas concentrações encontradas nos testículos e corpo lúteo (FÜRBASS et al., 1997).

A região P1.1 placentária é um exemplo de promotor em que há a perda do elemento TATA resultando em vários sítios iniciais de transcrição situados em uma extensão de 2023 bp. O sítio inicial de transcrição 2 é o preferencial devido à presença de elementos iniciadores ricos em pirimidina (INR), os quais, na ausência do elemento TATA, são essenciais para o posicionamento da RNA polimerase II (FÜRBASS et al., 1997). Tais elementos são reconhecidos por proteínas de ligação – INR, cuja interação com componentes do maquinário de transcrição geral fornece meios através dos quais pode ser formado um competente complexo transcricional (WEIS; REINBERG, 1992). Desse modo, os sítios de ligação para o ativador hélice-giro-hélice USF (*ubiquitous upstream stimulating factor*) são interessantes, uma vez que este interage cooperativamente com uma proteína de ligação – INR (ROY et al., 1991) e medeia a união do fator transcricional IID (TFIID) com um promotor deficiente de TATA, nesse caso o P1.1 (BUNGERT et al., 1992). Os USFs 1 e 2 são conhecidos por atuarem tanto como ativadores transcricionais (GAO et al., 2003; NOWAK et al., 2005) quanto repressores de vários genes alvos, incluindo o Cyp19 na placenta humana (JIANG; MENDELSON, 2005).

Além disso, apesar dos principais promotores placenta-específicos humanos e bovinos (PI.1 e P1.1) não estarem relacionados, ambos contêm sítios de ligação para o fator nuclear responsável pela expressão da interleucina-6 (NF-IL6), o qual é

membro da família de fatores transcricionais CEBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) caracterizado por conter um domínio do tipo cremalheira de leucina (*basic-leucine zipper domain*) requisitado para a formação de dímeros e união ao DNA (AKIRA et al., 1990), e um elemento hexamérico simples (AGGTCA), o qual é idêntico ao meio-sítio para receptor nuclear de estrógenos e é local de ligação para o fator esteroideogênico – 1 (SF-1), também conhecido como Ad4BP (*adrenal 4-binding protein*; LALA et al., 1992; MOROHASHI et al., 1992). Primeiramente, o SF-1 foi identificado pela habilidade de se ligar e coordenar a expressão de vários genes codificadores de enzimas esteroideogênicas (LYNCH et al., 1993; MOROHASHI et al., 1993; PARKER; SCHIMMER, 1997; RUST et al., 1998) e subsequentemente, foi demonstrado que o mesmo pertence à família de receptores hormonais nucleares (HONDA et al., 1993), a qual representa um grupo de fatores transcricionais que medeiam a ação de diversos ligantes incluindo hormônios esteróides, vitamina D e retinóides (MANGELSDORF et al., 1995).

No SF-1, dois domínios transativadores foram identificados: o AF-2, responsável pela ligação dos co-ativadores, provendo função essencial para a atividade constitutiva do SF-1 (LUND et al., 2002) e o AF-1, o qual é regulado pela fosforilação da quinase mitógeno-ativada (MAPK) e está envolvido nas interações com os vários cofatores e na estabilização da função do domínio AF-2 (CRAWFORD et al., 1997; HAMMER et al., 1999; DESCLOZEAUX et al., 2002).

Na complexidade dos mecanismos regulatórios do processo de transcrição, os efeitos multifacetados de hormônios e fatores de crescimento no desenvolvimento e funções teciduais foram relatados. Por exemplo, as células foliculares bovinas estão sob controle cíclico do FSH e do LH em combinação com a insulina e/ou fator de crescimento insulino-mimético-1 (IGF-1; MCARDLE et al., 1991; STEWART et al., 1995). A ativação sinérgica pelo LH e IGF-1 provém o estímulo para a diferenciação luteínica das células foliculares (CAMPBELL et al., 1998; RICHARDS et al., 2002) e, durante este evento, alguns genes induzidos ou up-regulados, tais como os genes codificadores das enzimas esteroideogênicas P450 e da proteína esteroideogênica regulatória aguda (StAR) parecem ser controlados pela interação entre o SF-1 e o sítio de ligação específico nas regiões promotoras (LALA et al., 1992; IVELL et al., 1999). Porém, segundo Walther et al. (2006), um outro mecanismo está envolvido na

regulação dos genes controlados pelo SF-1 nas células bovinas da teca. Nesse caso, a função do SF-1 é reduzida para a provisão dos sítios embarcadouros dos co-ativadores e provavelmente uma interconexão existente entre as vias MAP quinase e AMPc/proteína quinase A constitui a via metabólica não clássica para a ação de hormônios e fatores de crescimento.

Até o presente momento, não existem relatos sobre a ação do bFGF e do VEGF na modulação da aromatase e, apesar de todas essas introspecções sobre os papéis dos vários fatores identificados na região promotora P1.1 do gene Cyp19, os mecanismos através dos quais os mesmos exercem seus efeitos sobre a expressão da aromatase na placenta bovina continuam obscuros e precisam ser esclarecidos.

3.5 CLONES

Um dos avanços mais significativos na agropecuária foi a produção de proles viáveis através da clonagem (WILMUT et al., 1997), para a qual foram desenvolvidas tecnologias de reprodução assistida como ovulação múltipla, transferência de embrião e mais recentemente, a fertilização *in vitro* (IVF) e a transferência nuclear (NT; BUCZINSKI et al., 2007). No entanto, tais métodos têm sido associados com vários problemas de saúde para o recém-nascido e para a mãe substituta (MELLO et al., 2003; FECTEAU et al., 2005). A síndrome do filhote grande (*large offspring syndrome* - LOS) caracterizada pelo aumento do período gestacional e tamanho demasiado do feto e dos placentomas, bem como a hidropsia dos fluidos fetais (hidroalantóide e hidrânio) têm sido comumente relatados em gestações clonadas (SCHIMDT et al., 1996; HILL et al., 1999; CHAVATTE-PALMER et al., 2000; MELLO et al., 2003). Distúrbios na mãe também têm impacto no feto (BASCHAT; HARMAN, 2001; GREENWOOD; BELL, 2003), pois, ao contrário da LOS, a insuficiência placentária resulta no retardo de crescimento intra-uterino e em nascimentos prematuros (BERTOLINI; ANDERSON, 2002; HEYMAN et al., 2002; GREENWOOD; BELL, 2003).

O método empregado para a obtenção dos clones utilizados neste estudo foi a transferência nuclear de células somáticas adultas (NT), na qual o núcleo (DNA) de uma célula somática é transferido para um oócito em metáfase II enucleado, para a geração de um indivíduo geneticamente idêntico à célula somática doadora (WILMUT et al., 1997). A eficiência dessa técnica é muito baixa, com menos de 6% dos embriões NT reconstruídos se tornando filhotes vivos (HILL et al., 2000). Embora as maiores perdas aconteçam nos primeiros 14 dias após a transferência dos blastocistos clonados, a principal causa da subsequente perda fetal parece estar associada com deficiências funcionais da placenta (HILL et al., 1999), as quais têm sido atribuídas à falhas no processo de reprogramação dos sinais epigenéticos (KONO, 1998; YOUNG; FAIRBURN, 2000; XUE et al., 2002).

O crescimento e diferenciação placentários são regulados por mecanismos que envolvem numerosos sinais endócrinos e/ou parácrinos, como os fatores de crescimento. De fato, a expressão de alguns desses fatores, tais como o VEGF, bFGF (CAMPOS, 2005) e IGF-I (RAVELICH et al., 2004) apresenta-se alterada e possivelmente modulam disfunções placentárias em gestações NT.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados: 1 - placentomas provenientes de vacas aos 90 (n=3), 150 (n=3) e 210 (n=3) dias de gestação coletados em um frigorífico local¹; 2 - placentomas de vacas parturientes (270 dias; n=3) obtidos através de cesarianas realizadas na Clínica de Ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP; e, 3 – placentomas de gestações de animais clonados (270 dias; n=3) obtidos de cesáreas realizadas em fazenda particular situada no município de Tambaú, São Paulo.

As idades gestacionais referentes aos fetos obtidos no frigorífico foram determinadas pela mensuração do comprimento crânio-caudal, distância traçada por uma linha entre a fossa atlanto-occipital e a primeira vértebra coccígea (*Crown Rump*; Anexo A; SLOSS; DUFTY, 1980).

No momento da coleta, os placentomas foram lavados em solução fisiológica a 0,9%, armazenados em solução tampão fosfato (PBS) livre de íons Ca^{++} e Mg^{++} suplementada com antibiótico e antifúngico² (Anexo B – item A), e transportados em gelo ao laboratório para serem processados.

4.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo foi realizado em condições assépticas sob fluxo laminar. Para os procedimentos, utilizamos o meio de Eagle modificado por Dulbecco³ (DMEM, *Low glucose*; Anexo B – item B), pH entre 7,2 – 7,4, autoclavado por 15 minutos a 121°C, suplementado com soro fetal bovino³ a 10% inativado a 56°C por 30 minutos, soluções de L-Glutamina³ a 0,3%, HEPES 280mM³ e bicarbonato de sódio³ (NaHCO_3) a 7,5%, previamente filtradas em película de 0,20 μm de diâmetro, e

¹ Frigorífico Mantiqueira Ltda, São José dos Campos, São Paulo.

² Sigma-Aldrich Inc. USA.

³ Sigma-Aldrich Inc. USA.

solução de antibiótico e antifúngico³ (100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina e 250 µg de anfotericina B).

4.1.1 Isolamento das células placentárias

As amostras de placentomas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm e as células placentárias totais (maternas e fetais) foram isoladas mecanicamente através de passagem por uma rede com poros de 150 *mesh*⁴, acoplada a um becker, e lavadas em meio de cultivo por três ciclos seqüenciais de centrifugação (1200 rpm a 4°C por 5 minutos).

4.1.2 Concentração e viabilidade celular

Após o isolamento celular, procedeu-se a determinação da concentração e viabilidade das amostras utilizando-se o método de exclusão por Azul de Trypan⁵ (Anexo B – item C). Para tal, homogeneizaram-se 20 µl da suspensão celular em 20 µl da solução de Azul de Trypan e realizou-se a contagem em hematocitômetro.

A concentração celular foi determinada pela contagem das células em 5 campos diagonais, sendo o total de células vivas multiplicado por 5 (25 campos), por 2 (diluição do corante) e por 10⁴ (profundidade da câmera e correção por ml), enquanto a viabilidade da amostra foi determinada pela relação entre a quantidade de células vivas (não coradas) e os números totais de células, descartando-se as suspensões celulares com viabilidade inferior a 34%.

⁴ Merck Sharp & Dohme, GER.

⁵ Sigma-Aldrich Inc., USA.

4.1.3 Adição dos fatores bFGF e VEGF

As células viáveis, na concentração de 5×10^6 células por 300 μ l de meio de cultura, foram cultivadas em placas de poliestireno com 96 poços em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37,5°C.

Decorridas 24 horas iniciais, todos os poços (n=72) foram lavados duas vezes com meio de cultivo para retirada de células não viáveis e/ou não aderidas. Adicionou-se pregnenolona 10^{-7} M⁶ (20 μ l/ml), VEGF⁷ (50 ng/ml), bFGF⁸ (10 ng/ml,) e os dois juntos (n=12 poços/tratamento; Figura 4), estabelecendo-se assim quatro grupos experimentais:

- Grupo 1 (controle): ao qual foi adicionado somente pregnenolona (20 μ l);
- Grupo 2: adicionou-se bFGF e pregnenolona (20 μ l);
- Grupo 3: adicionou-se VEGF (100 μ l) e pregnenolona (20 μ l); e,
- Grupo 4: adicionou-se bFGF (100 μ l), VEGF (100 μ l) e pregnenolona (20 μ l).

4.1.4 Coleta das amostras cultivadas

Respectivamente 24, 48 e 96 horas depois de adicionados os fatores e o precursor, as amostras de meio de cultivo foram coletadas e congeladas a -20°C para serem submetidas ao radioimunoensaio. As células pertencentes a cada grupo, contidas nos poços, foram coletadas pela adição de 100 μ l de tripsina a 0,5%⁹ seguida de incubação a 37,5°C por 10 minutos. A inativação da tripsina se deu pela adição de 100 μ l de meio de cultivo e o completo destacamento celular foi realizado mecanicamente por sucessivas pipetagens. As amostras foram coletadas,

⁶ 5-PREGNEN-3 β -OL-20-ONE, Sigma-Aldrich Inc. USA.

⁷ GF025, VEGF₁₆₅ recombinante humano, Chemicon International Inc. CA.

⁸ 18 kDa, GF003, bFGF recombinante humano

centrifugadas¹⁰ para formação de *pellets* (1800 rpm por 15 minutos a 4°C) os quais foram armazenados a -20°C para dosagem do conteúdo protéico; a cada experimento, 12 poços (3 para cada grupo) foram reservados e lâminas preparadas (esfregaço) para realização de imunocitoquímica e quantificação da expressão da enzima aromatase citocromo P450.

Figura 4 – Representação esquemática da placa de cultura com 96 poços contendo os grupos experimentais estabelecidos (controle – bFGF+VEGF) e os respectivos tempos de tratamento (24 – 96 horas). As amostras contidas nas fileiras de 1 a 4 foram destinadas à dosagem protéica (células) e ao radioimunoensaio (meio de cultivo) e as da 5ª fileira, à imunocitoquímica

4.2 PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi mensurada através do método descrito por Lowry et al. (1951), tendo como padrão de referência a albumina sérica bovina¹¹ (BSA), a partir da qual foi preparada uma curva-padrão com concentrações decrescentes de proteína (1,0; 0,75; 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 mg/ml) em tampão de homogeneização (Anexo B – item D).

⁹ GIBCO, UK.

¹⁰ Rotina 46®, Hettich Zentrifugen, GER.

¹¹ Sigma-Aldrich Inc. USA.

Os *pellets* celulares foram ressuspensos em 300 µl de tampão de homogeneização e lisados em sonicador¹² (12 segundos, pulsos: 4 on 2 off, amplitude 25%). Para 100 µl de amostra em tubo de borosilicato 12 x 75 mm, foram adicionados 1 ml de solução de sulfato de cobre (CuSO₄) alcalina (Anexo B – item D) com posterior agitação em vórtex. Seguiu-se incubação a 37°C por 10 minutos e posteriormente pipetagem de 75 µl de reagente Folin-Ciocalteu¹³; nova agitação em vórtex e incubação a 37°C por 30 minutos (Quadro 1). A mensuração da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro¹⁴ a 670 nm. A concentração de proteína (mg/ml) foi obtida pela relação entre as médias das leituras nas amostras e as médias da leitura da curva padrão (subtraídas da média de ligações não específicas), multiplicando-se por 2 (diluição da amostra).

Tubos	Tampão de Homogeneização	Padrões	Amostras	Sol. de CuSO₄	Reagente Folin-Ciocalteu
Branco	100 µl	----	----	1 ml	75 µl
Curva-padrão	----	100 µl	----	1 ml	75 µl
Experimental	50 µl		50 µl	1 ml	75 µl

Quadro 1 – Protocolo para dosagem de proteína

¹² Vibra Cell®, Sonics & Materials, USA.

¹³ Reativo comercial diluído 1:4.

¹⁴ SB-190, CELMTEC, BRA.

4.3 DOSAGEM DE SULFATO DE ESTRONA

O primeiro passo para determinação das concentrações de sulfato de estrona em meio de cultivo foi a validação do método. Para tal, utilizamos kits comerciais DSL-5400¹⁵ e curvas-padrão construída a partir de E_1SO_4 liofilizado¹⁶. Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos em porcentagem de hormônio marcado precipitado em relação ao total de hormônio marcado utilizado nos ensaios (%b/TOT).

4.3.1 Validação da técnica

Para validar a técnica, primeiramente diluímos o E_1SO_4 liofilizado em etanol (1000 ng/1 ml). A partir dessa solução, duas curvas-padrão foram elaboradas: em uma, a solução foi diluída em soro de bovino não prenehe inativado a 60°C por 30 minutos; e, na outra, a solução foi diluída em meio de cultivo (DMEM), ambas na concentração de 1µl/1ml. Os pontos das curvas-padrão foram construídos com as mesmas concentrações crescentes de sulfato de estrona indicadas pelo kit¹⁵ (0,05; 0,2; 1; 5; 25 e 80 ng/ml). Após construção das três curvas, ou seja, a do kit, a do soro e a do meio de cultivo, realizou-se o radioimunoensaio.

¹⁵ Diagnostic Systems Laboratories Inc. USA.

¹⁶ Estrone -3-Sulfate Potassium Salt, Sigma-Aldrich Inc. USA.

4.3.2 Radioimunoensaio

Os ensaios foram realizados utilizando-se a atividade total (TOT) e as ligações não específicas (NSB) do E₁SO₄ radioativo [I-125] como valores de referência e conforme a seqüência descrita no quadro 2.

Tubos	DMEM	Padrões	Amostras	E ₁ S [I-125]	1º anticorpo
Total (TOT)	-----	-----	-----	500 µl	-----
Ligações não específicas (NSB)	200 µl	-----	-----	500 µl	-----
Referência (b0)	100 µl	-----	-----	500 µl	100 µl
Curva-padrão	-----	100 µl	-----	500 µl	100 µl
Amostras	-----	-----	100 µl	500 µl	100 µl
Controle	-----	-----	100 µl	500 µl	100 µl

Quadro 2 - Protocolo para dosagem de E₁SO₄

Após homogeneização e incubação em temperatura ambiente por 3 horas sob agitação, 1 ml do líquido de precipitação (2º anticorpo) foi adicionado em todos os tubos (com exceção dos tubos denominados de Total). Decorridos 10 minutos de incubação em temperatura ambiente (25°C), os tubos foram centrifugados¹⁷ (exceto os tubos Total; 3000 rpm por 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante decantado. As amostras foram submetidas à leitura em contador de radiação gama¹⁸ e os resultados foram calculados através do programa Riasmart[®] do mesmo, subtraindo-se as contagens médias por minuto (cpm) dos tubos de ligações não específicas (NSB) de todas as médias de leitura das curvas.

Assim, a relação de ligações pela atividade total (b/TOT) e de ligações pela contagem média de soro ou meio (b/b0) para cada padrão foi calculada da seguinte forma:

$$\%b/TOT = \frac{\text{Contagem média das amostras} - \text{Contagem NSB}}{\text{Contagem total média}} \times 100$$

¹⁷ Rotina 46®, Hettich Zentrifugen, GER.

¹⁸ Cobra-II, Auto-Gamma®, Packard, UK.

$$\%b/b_0 = \frac{\text{Contagem média dos padrões} - \text{Contagem NSB} \times 100}{\text{Contagem média do soro ou meio (0ng/ml)} - \text{Contagem NSB}}$$

4.3.3 Análise dos ensaios

Apesar do traçado da curva-padrão de soro ter se apresentado de forma paralela à curva-padrão do kit, observou-se que a mesma gerou ligações não específicas (NSB) bastante altas (27%), as quais permitem leituras confiáveis somente em concentrações maiores que 5 e menores que 25 ng/ml (Figura 5).

Figura 5 – Paralelismo entre as curvas do kit e a construída com soro bovino inativado

A sensibilidade teórica, ou limite de detecção mínimo do kit, calculado pela média menos dois desvios padrão de 16 replicatas do padrão sulfato de estrona 0 pg/ml é de 0,01 ng/ml e, a reatividade cruzada do anti-soro, especificidade, foi medida contra os seguintes componentes¹⁹ (Quadro 3):

¹⁹ Dados fornecidos pelo fabricante: Diagnostic Systems Laboratories Inc. USA.

COMPONENTES	% REATIVIDADE CRUZADA
Estrone-sulfato	100
Estrona	4.9
Estrona glucuronide	3.4
17 β -Estradiol 3-sulfato	1.0
17 β -Estradiol	0.3
17 β -Estradiol glucuronide	0.1
5-Androsten-3 β -ol-17-ona (DHA)	ND *
Δ -Androsten-3, 17-diona (androstenediona)	ND
5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol 3-glucuronide	ND
5 α -Androstan-3 α -ol-17-1 sulfato sódico	ND
5 α -Androstan-3 α -ol-17-1 glucuronide (androsterona glucuronide)	ND
5 α -Androstan-3 β -ol-17-1 glucuronide (epiandrosterona glucuronide)	ND
5 β -Androstan-3 α -ol-17-1 sulfato sódico	ND
Hidrocortisona	ND
Progesterona	ND
4-Pregnen-21-ol-3,20-diona	ND
5-Androsten-3 β -ol-17-1 sulfato (dehidroisoandrosterona-3-sulfato)	ND
4-Estren-17 β -ol-3-ona	ND
1,4-Pregnadien-11 β , 17 α ,21-triol-3,20-diona (prednisolone)	ND
5 α -Androstan-3 α -ol-17-ona (androsterona)	ND
17 α -Hidroxiprogesterona	ND
Corticosterona	ND
5 β -Androstan-3 β -ol-17-ona	ND
Norethindrona	ND
Medroxiprogesterona acetato	ND

*ND = Não Detectável.

Quadro 3 – Especificidade do anti-soro sulfato de estrona. Fonte: GENESE Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos, www.gendiag.com.br

Já as curvas do kit e a construída com meio de cultivo apresentaram ligações não específicas baixas, 1,5% e 1,2%, respectivamente, e paralelismo bastante aceitável entre elas, especialmente entre as concentrações 1 e 80 ng/ml (Figura 6), o que significa que os reagentes inclusos no kit são válidos para a determinação de níveis de sulfato de estrona em amostras bovinas diluídas em meio de cultivo.

Figura 6 – Paralelismo entre as curvas do kit e a construída com meio de cultivo

4.4 IMUNOCITOQUÍMICA PARA AROMATASE CITOCROMO P450

As lâminas preparadas a partir das células cultivadas foram submetidas a imunocitoquímica. Primeiramente, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio²⁰ a 1% diluída em metanol por 30 minutos em freezer. Para reduzir ligações inespecíficas do segundo anticorpo, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos em solução de soro eqüino²¹ em PBS (1:10). O anticorpo primário anti aromatase²² (1:100) foi aplicado sobre as lâminas que sofreram incubação por 20 horas a 4°C. Após lavagem com tampão ICC (Anexo B – item E), as células foram incubadas com o anticorpo secundário²³ (1:200) por 30 minutos e lavadas novamente com ICC (3 x 15 min). Em seguida, um complexo peroxidase-estreptovidina-biotina²⁴ foi aplicado por 45 minutos à temperatura ambiente para amplificação do sinal de reação e as células foram novamente lavadas com ICC.

²⁰ Labsynt LTDA, BRA.

²¹ Vector Laboratories Inc. USA.

²² C9095-14, anticorpo policlonal aromatase citocromo P450 anti-humano e coelho, 1:100; US Biological, USA.

²³ BA-1400, anti-coelho e camundongo, IgG, produzido em cavalo; 1:200; US Biological, USA.

²⁴ Vectastasin-Elite-ABC-Kit®. Vector Laboratories Inc. USA

A reação foi evidenciada por incubação em NovaRed²⁵ por aproximadamente 10 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água destilada (2 x 10 min), contra-coradas com hematoxilina de Harris²⁶ por 50 segundos (3:1; Anexo B – item F), lavadas em água corrente por 15 minutos e então montadas utilizando-se glicerina²⁶. Como controle positivo utilizou-se corpo lúteo bovino e, como negativo, uma lâmina do grupo 1 (controle) de 90 dias sobre a qual se pipetou ICC ao invés do anticorpo primário.

4.5 ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS AROMATASE CITOCROMO P450 POSITIVAS *IN VITRO*

Para quantificar o número total de células aromatase positivas sob os diferentes tratamentos, utilizamos o teste de contagem de pontos (MAYHEW, 1991; RUTLAND et al., 2005), o qual consiste em um método planimétrico clássico para análise de cortes histológicos e requer um sistema-teste ou grade composto por um conjunto de linhas ou pontos, arranjados de forma regular ou aleatória, que é sobreposto à imagem (AMENABAR et al., 2003). O sistema-teste permite a determinação da proporção de volume ou área de uma dada estrutura através da contagem dos pontos que a tocam (DICKSON et al., 2003).

A análise da imagem depende de variáveis como forma, orientação, área e volume (HAMILTON; ALLEN, 1995) e a mensuração de área de objetos microscópicos pode ser realizada diretamente por microscopia de luz, em imagens projetadas por um projetor ou em imagens digitais (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

A análise quantitativa das células placentárias bovinas foi realizada da seguinte maneira: três imagens foram capturadas aleatoriamente de cada lâmina utilizando-se um microscópio óptico²⁷ com objetiva 20X. As imagens foram captadas por câmera digital, acoplada ao microscópio, reproduzidas a uma magnificação final

²⁵ NovaRedTM. Vector Laboratories Inc. USA.

²⁶ Alkimia, BRA.

de 1300X e enviadas ao computador para análise através do programa Zeiss KS400²⁸ versão 3.0.

De acordo com o protocolo proposto por Mayhew (1991), um sistema teste constituído por dezesseis *frames* com área-teste de 0,0042 mm² foi sobreposto em cada imagem. Para cada imagem, os pontos tocando a área correspondente às células aromatase positivas foram contados (Figura 7) e a média dessa contagem de pontos foi determinada para cada esfregaço (média de 3 imagens) e a área do poço da placa de cultivo foi utilizada como área de referência (A(ref) = 32,15 mm²). A partir desses dados foram calculados:

1. A área total A(tot) ocupada pelas células P450arom positivas corrigida pela magnificação final:

$$A(tot) = A(fra) \times N(fra)/mag^2 \text{ mm}^2$$

2. A densidade numérica (N_A) de células P450arom positivas contidas nas respectivas áreas:

$$N_A = \sum Q(ce)/A(tot) \text{ 1/mm}^2$$

3. E, o número total (N) de células P450arom positivas contidas nos poços da placa de cultivo:

$$N = A(ref) \times Q(cell)/A(tot) \text{ céls/mm}^2$$

Onde, N(fra) = número total de frames contidos no sistema-teste; mag² = magnificação final da fotomicrografia, elevado ao quadrado; $\sum Q(ce)$ = número de pontos tocando a área ocupada pelas células aromatase P450 positivas. A estimação de variância através do coeficiente de variação (CV = DP/média) foi realizada para otimização do método (MILLER et al., 1997).

²⁷ OLYMPUS BX60, Olympus América Inc.

²⁸ Carl Zeiss GMT, GER.

Figura 7 - Células placentárias de 90 dias de gestação do grupo controle. Representação do frame utilizado para contagem das células aromatase P450 positivas (setas). O frame contém linhas de inclusão (pontilhadas) e de exclusão (cheias). As células positivas são contadas se: 1. estiverem contidas no interior do frame e 2. não estiverem interceptadas pelas linhas de exclusão

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conteúdo protéico foi expresso como média $\pm$ EPM de quatro replicatas de cinco experimentos e a expressão da aromatase P450 foi determinada como média $\pm$ EPM de três replicatas de cinco experimentos. Cada experimento foi repetido três vezes. O efeito dos tratamentos, no decorrer da gestação e do cultivo, foi avaliado utilizando-se o teste de Friedman (não paramétrico), enquanto os dados obtidos de animais clonados e não clonados foram confrontados pelo t de Student seguido pela Correção de Welsh. Todos os testes foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

Para a realização dos cultivos, a viabilidade celular foi estimada. A tabela 1 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 1 – Viabilidade (%) das células placentárias bovinas em diferentes idades gestacionais e aos 270 dias de gestação em animais clonados. São Paulo, 2007

Idades Gestacionais (dias)	Animais	Viabilidade celular (%)	Média (%)
90	1	45	61
	2	74	
	3	64	
150	1	42	51,5
	2	40,5	
	3	72	
210	1	34	40
	2	44	
	3	42	
270	1	72	72,6
	2	78	
	3	68	
270 (clones)	1	42	59
	2	68	
	3	67	

5.1 PROTEÍNAS TOTAIS

As concentrações de conteúdo protéico (mg/ml) das células placentárias bovinas (Tabela 2) foram determinadas para serem utilizadas como fator de correção da produção hormonal para evitar resultados sub ou superestimados, ou seja, os dados referentes às concentrações de E_1SO_4 seriam expressos em relação ao conteúdo protéico (ng/mg).

Nas condições de cultivo estabelecidas, não foram observadas diferenças na concentração de proteínas totais das células placentárias controle de bovinos não clonados no decorrer da gestação (90 – 270 dias) e aos 270 dias de gestação em bovinos clonados, em nenhum dos tempos de incubação analisados (24 – 96 horas). Além disso, os fatores de crescimento bFGF e VEGF não exerceram influência sobre o conteúdo protéico ($p > 0.05$).

Tabela 2 - Conteúdo protéico (mg/ml) de células placentárias bovinas controle e tratadas com bFGF, VEGF e bFGF+VEGF ao longo do período de cultivo, em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em clones - São Paulo - 2007

Idade gestacional (dias)	Grupos Experimentais	Tempo de tratamento (horas)		
		24	48	96
90	Controle	0,089 ± 0,02*	0,105 ± 0,02	0,119 ± 0,02
	bFGF	0,078 ± 0,03	0,105 ± 0,02	0,132 ± 0,02
	VEGF	0,090 ± 0,02	0,121 ± 0,01	0,114 ± 0,01
	bFGF+VEGF	0,092 ± 0,01	0,109 ± 0,01	0,124 ± 0,03
150	Controle	0,146 ± 0,05	0,347 ± 0,08	0,276 ± 0,11
	bFGF	0,221 ± 0,11	0,311 ± 0,06	0,354 ± 0,23
	VEGF	0,180 ± 0,08	0,391 ± 0,18	0,321 ± 0,17
	bFGF+VEGF	0,182 ± 0,08	0,366 ± 0,12	0,332 ± 0,10
210	Controle	0,131 ± 0,05	0,419 ± 0,32	0,221 ± 0,10
	bFGF	0,169 ± 0,12	0,261 ± 0,17	0,232 ± 0,12
	VEGF	0,154 ± 0,11	0,260 ± 0,16	0,243 ± 0,11
	bFGF+VEGF	0,196 ± 0,07	0,182 ± 0,11	0,277 ± 0,17
270	Controle	0,151 ± 0,09	0,273 ± 0,04	0,152 ± 0,02
	bFGF	0,132 ± 0,06	0,132 ± 0,06	0,159 ± 0,10
	VEGF	0,140 ± 0,09	0,240 ± 0,07	0,303 ± 0,14
	bFGF+VEGF	0,126 ± 0,08	0,266 ± 0,05	0,183 ± 0,06
270 (clones)	Controle	0,030 ± 0,00	0,067 ± 0,00	0,242 ± 0,22
	bFGF	0,025 ± 0,00	0,080 ± 0,01	0,200 ± 0,19
	VEGF	0,031 ± 0,00	0,119 ± 0,00	0,224 ± 0,20
	bFGF+VEGF	0,028 ± 0,00	0,086 ± 0,03	0,204 ± 0,18

*Valores representam média ± EPM de três experimentos de animais não clonados em diferentes idades gestacionais (n = 12; 4 poços por grupo) e de clones aos 270 dias de gestação (n = 3; 4 poços por grupo).

5.2 ENSAIOS HORMONAIS

Por motivos de greve alfandegária, não recebemos os kits encomendados em janeiro até o presente, portanto, não foi possível analisar a produção de sulfato de estrona *in vitro* pelas células placentárias bovinas ao longo da gestação em animais não clonados e aos 270 dias em clones, tampouco analisar o comportamento dessas células frente aos diversos tratamentos e tempos de incubação.

5.3 EFEITO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DA ENZIMA AROMATASE CITOCROMO P450

A proteína da aromatase citocromo P450 foi localizada no citoplasma das células trofoblásticas gigantes em todos os animais estudados (Figuras 8 e 9) e, no decorrer da gestação dos bovinos não clonados, sua expressão no grupo controle (não tratado com os fatores) foi menor aos 150 dias em relação ao terço inicial (90 dias; $1,35 \times 10^{10} \pm 0,20$ vs. $6,15 \times 10^9 \pm 0,47$), conforme demonstrado nas figuras 8 (foto) e 10 (gráfico).

Nas tabelas 3 e 4 (Apêndice A) estão contidos o número total e o correspondente coeficiente de variação (CV) de células placentárias bovinas aromatase P450 positivas dos grupos controle e tratados com os fatores de crescimento bFGF e VEGF, ao longo do cultivo. Ao analisarmos a interação tratamentos aplicados e tempo de incubação, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), observamos que: 1 – o VEGF estimulou a expressão da P450arom aos 150 dias, após 96 horas de incubação ($5,67 \times 10^9 \pm 0,00$ vs $4,05 \times 10^9 \pm 0,09$; Figura 14B) e aos 270, após 24 horas ($3,85 \times 10^6 \pm 0,01$ vs $1,78 \times 10^6 \pm 0,01$; Figura 15B); 2 – nos grupos tratados com bFGF houve estímulo somente aos 270 dias e após 48 horas de incubação ($2,88 \times 10^6 \pm 0,00$ vs. $8,03 \times 10^5 \pm 0,01$; Figura 15B); e, 3 – os dois fatores combinados (bFGF + VEGF), inibiram a P450arom aos 90 dias, após 48 horas ($3,13 \times 10^6 \pm 0,91$ vs. $3,15 \times 10^7 \pm 0,58$; Fig. 14A), porém, aos 150 e 270 dias,

houve o estímulo da P450 após 48 ($1,66 \times 10^6 \pm 0,01$ vs. $9,50 \times 10^4 \pm 0,43$; Fig.14A) e 24 horas ($4,88 \times 10^6 \pm 0,01$ vs. $1,78 \times 10^6 \pm 0,01$; Figura 15B), respectivamente.

Também pôde ser observado que, em todas as idades gestacionais, a expressão da aromatase P450 nas células placentárias aumentou em função dos dias de cultivo (Tabela 3; Apêndice B), atingindo concentração máxima no período 96 horas tanto nos grupos controle quanto nos tratados com os fatores de crescimento (Figuras 10 a 12).

Figura 8 - Fotomicrografias da expressão da proteína da aromatase P450 em células placentárias de bovinos não clonados aos 90 (A) e 150 dias de gestação (B), tratadas com bFGF+VEGF, após 48 horas de incubação. Reações de imunocitoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-aromatase C90995-14. Observar nos detalhes a reação citoplasmática positiva para a proteína nas células trofoblásticas gigantes (setas cheias) e a reação negativa nas células trofoblásticas mononucleares (flechas). Barra: 30 μ m

Figura 9 - Fotomicrografias da expressão da proteína da aromatase P450 em células placentárias de bovinos não clonados (A) e clonados (B) aos 270 dias de gestação, tratadas com bFGF, após 48 horas de incubação. C: controle negativo. Reações de imunocitoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-aromatase C90995-14. Observar nos detalhes a reação citoplasmática positiva para a proteína nas células trofoblásticas gigantes (setas cheias) e a reação negativa nas células trofoblásticas colunares (flechas). Barra: 30μm

Figura 10 – Expressão da P450 arom (célis/mm²) nas células placentárias bovinas controle ao longo da gestação (90 -270 dias). Valores expressos em escala logarítmica. Asterisco representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 11 – Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da P450 arom (cél/s/mm²) nas células placentárias bovinas aos 90 (A) e 150 (B) dias de gestação após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. ^{ab}: p<0,05 entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. *: p<0,05 dentro de um mesmo grupo ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05.

Figura 12 – Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da P450 arom (cél/s/mm²) nas células placentárias bovinas aos 210 (A) e 270 (B) dias de gestação após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. ^{abc}: p<0,05 entre os grupos no mesmo tempo de tratamento. *: p<0,05 dentro de um mesmo grupo ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05

Ao considerarmos a interação tratamentos aplicados e idade gestacional, em relação aos 90 dias ($p < 0,05$), observamos que: 1 – após 24 horas de incubação, a expressão da aromatase P450 diminuiu nos grupos tratados com bFGF aos 150 ($3,95 \times 10^5 \pm 0,13$ vs. $2,05 \times 10^7 \pm 0,13$) e 210 dias ($1,48 \times 10^6 \pm 0,78$ vs. $2,05 \times 10^7 \pm 0,13$; Figura 13); 2 – após 48 horas, a P450arom diminuiu nos grupos controle ($9,50 \times 10^4 \pm 0,43$ vs. $3,15 \times 10^7 \pm 0,58$), bFGF ($1,53 \times 10^5 \pm 0,59$ vs. $4,53 \times 10^7 \pm 1,10$) e VEGF ($1,34 \times 10^4 \pm 0,22$ vs. $4,60 \times 10^7 \pm 1,33$) aos 150 dias e nos grupos bFGF ($1,91 \times 10^4 \pm 0,33$ vs. $4,53 \times 10^7 \pm 1,10$) e VEGF ($3,32 \times 10^5 \pm 1,50$ vs. $4,60 \times 10^7 \pm 1,33$) aos 210 dias (Figura 14A); e, 3 – após 96 horas, houve diminuição significativa da mesma aos 150 dias, tanto no grupo controle ($4,05 \times 10^9 \pm 0,09$ vs. $1,84 \times 10^{11} \pm 0,47$) quanto nos grupos tratados com bFGF ($3,51 \times 10^9 \pm 0,06$ vs. $2,24 \times 10^{11} \pm 0,63$) e os dois fatores juntos ($1,51 \times 10^8 \pm 0,00$ vs. $9,15 \times 10^9 \pm 0,54$; Figura 14B), respectivamente.

Figura 13 – Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (células/mm²) nas células placentárias bovinas após 24 horas de incubação. 90 – 270 dias: idades gestacionais. Valores expressos em escala logarítmica. *: $p < 0,05$ dentro de um mesmo grupo ao longo da gestação. Valores sem identificação: $p > 0,05$

Figura 14 – Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (células/mm²) nas células placentárias bovinas após 48 (A) e 96 (B) horas de incubação. 90 – 270 dias: idades gestacionais. Valores expressos em escala logarítmica. *: $p < 0,05$ dentro de um mesmo grupo ao longo da gestação. Valores sem identificação: $p > 0,05$

5.3.1 Expressão da aromatase por células de animais clonados e não clonados aos 270 dias de gestação

Nos clones, assim como nos animais não clonados, a expressão da aromatase P450 nas células placentárias aumentou em função dos dias de cultivo, atingindo concentração máxima após 96 horas de tratamento, tanto no grupo controle quanto nos tratados com bFGF, VEGF e os dois fatores juntos. No entanto, os fatores não influenciaram a expressão da enzima dentro de um mesmo intervalo de tempo de cultivo em relação ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15 – Efeitos dos fatores de crescimento bFGF e VEGF na expressão da aromatase P450 (células/mm²) nas células placentárias de bovinos clonados, aos 270 dias de gestação, após 24, 48 e 96 horas de incubação. Valores expressos em escala logarítmica. *: p<0,05 dentro de um mesmo grupo ao longo do cultivo. Valores sem identificação: p>0,05

Ao considerarmos a interação tratamentos aplicados e tempo de incubação, observamos que, nos clones, não houve diferença entre a expressão da aromatase P450 nas células placentárias nos grupos controle e VEGF após 24, 48 e 96 horas de tratamento, em relação aos animais não clonados de mesma idade gestacional (Figura 16).

Figura 16 – Expressão da aromatase P450 (cél/s/mm²) nas células placentárias bovinas controle (A) e tratadas com VEGF (B) de animais clonados e não clonados aos 270 dias de gestação. 24 – 96 horas: tempos de tratamento. Valores expressos em escala logarítmica. Valores sem identificação: $p > 0,05$.

Porém, nos grupos tratados com bFGF e com os dois fatores juntos, a expressão da aromatase P450 foi menor nos animais clonados após 48 ($1,76 \times 10^5 \pm 0,17$ vs $2,88 \times 10^6 \pm 0,00$), conforme demonstrados nas figuras 9 (foto) e 17A (gráfico) e 24 horas de tratamento ($1,46 \times 10^5 \pm 0,28$ vs $4,88 \times 10^6 \pm 0,01$), respectivamente, em relação aos animais não clonados de mesma idade gestacional (Figura 17B).

Figura 17 – Expressão da aromatase P450 (célis/mm²) nas células placentárias bovinas tratadas com bFGF (A) e com os dois fatores juntos (B) aos 270 dias de gestação de animais clonados e não clonados. 24 – 48 horas: tempos de tratamento. Valores expressos em escala logarítmica. ^{ab}: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores sem identificação: $p > 0,05$

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento VEGF e bFGF são apontados como reguladores autócrinos/parácrinos do desenvolvimento placentário bovino (REYNOLDS; REDMER, 2001). Neste estudo, avaliamos o papel dos mesmos testando seus efeitos sobre a expressão da enzima aromatase P450 em células placentárias bovinas de quatro idades gestacionais (90, 150, 210 e 270 dias). Além disso, comparamos a influência destes fatores sobre células placentárias provenientes de bovinos clonados e de não clonados aos 270 dias de gestação. Para tal, as células placentárias totais foram cultivadas, isto é, todos os tipos celulares presentes nos compartimentos materno e fetal da placenta bovina foram inclusos, de modo a preservar as relações intercelulares, uma vez que várias funções placentárias, dentre elas a esteroidogênese, são dependentes da comunicação celular (GEISERT; CONLEY, 1998).

Durante os experimentos, foram observadas porcentagens distintas de viabilidade celular (40 a 72,6%), apesar de todos terem sido conduzidos sob as mesmas condições de cultivo e concentração de células viáveis (5×10^6 células/poço). Essas diferenças podem ser decorrentes do intervalo de tempo entre a coleta do material e o início do processamento ou mesmo estar relacionadas às características individuais do tecido placentário utilizado (DAVIS, 1994).

A regulação da produção de progesterona e estrógenos placentários é um evento crítico durante a gestação, uma vez que a ação coordenada desses hormônios é essencial para a progressão normal da mesma (ALBRECH; PEPE, 1998). Em bovinos, o sulfato de estrona é quantitativamente o estrógeno placentário mais importante secretado durante a gestação (HOFFMANN; GOES DE PINHO; SCHULER, 1997; HOFFMANN; SCHULER, 2002), servindo como substrato para a formação de estrógenos biologicamente ativos via ação da enzima esteróide-sulfatase (StS; GREVEN et al., 2007). Devido ao *pool* circulante de E_1SO_4 ser conceitualizado como reserva de estrógenos lentamente metabolizada, o mesmo assume importância marcante no monitoramento do desenvolvimento feto-

placentário e na predição do número de fetos (HUNG; PRAKASH, 1990; HIRAKO et al., 2003).

A mensuração da concentração sérica de sulfato de estrona é comumente determinada por meio de uma metodologia convencional complexa e demorada, que envolve várias etapas como extração, hidrólise, reextração e determinação indireta do E_1SO_4 via mensuração de E_1 (SCHULER; HARTUNG; HOFFMANN, 1994; MATAMOROS et al., 1994; HOFFMANN; GOES DE PINHO, 1997). No presente estudo, foi estabelecido um método simples e direto para a determinação das concentrações de sulfato de estrona em meio de cultivo, utilizando-se um kit comercial. Contudo, os reagentes inclusos no mesmo eram otimizados para determinação hormonal em soro humano e, desse modo, foi necessária a preparação de curvas-padrão diluídas em soro bovino e em meio de cultivo, submissão das mesmas ao radioimunoensaio, assim como comparação com a curva-padrão do kit para análise da relação entre elas. Observamos que a curva-padrão diluída em soro bovino apresentou ligações não específicas (NSB) consideravelmente altas (27%), visto que o máximo permitido é 7% (dados do fabricante), ou seja, houve uma grande quantidade de ligação entre o antígeno radioativo utilizado com outros estrógenos presentes no soro bovino, o que interferiu, por reação cruzada, na mensuração hormonal, resultando em concentrações anormais de hormônios na curva, o que poderia ocasionar a interpretação errônea de futuros dados. Para a dosagem de sulfato de estrona em soro bovino, o kit não se mostrou eficaz e o melhor método permanece o convencional, no qual o hormônio de interesse é isolado e assim, os resultados são mais confiáveis (SCHULER; HARTUNG; HOFFMANN, 1994; MATAMOROS et al., 1994; HOFFMANN; GOES DE PINHO, 1997). Por outro lado, a curva de meio de cultivo apresentou porcentagem de ligação não específica baixa (1,2%), ou seja, não houve maiores interferências por parte de outros estrógenos que porventura estivessem presentes na amostra, indicando que o sistema apresentado é válido para mensurar o sulfato de estrona em meio de cultivo. Outros parâmetros de validação como a precisão inter-ensaio, determinada através de duplicatas da mesma amostra dentro do mesmo, a precisão intra-ensaio, usando a análise de replicatas da mesma amostra em diferentes ensaios e a acurácia, i.e., a quantia exata de hormônio presente na amostra,

determinada por comparação de dados de imunoensaios com outros métodos tais como gravimetria, cromatografia líquido-gasosa ou espectrofotometria de massa (BREUER et al., 1976; MOSS et al., 1976; BORDON et al., 1990), não puderam ser determinadas, dada a impossibilidade de continuidade dos experimentos.

Em humanos, a produção de estrógenos e progesterona é controlada por alguns hormônios placentários. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH; SILER-KHODR et al., 1987), a gonadotrofina coriônica (HCG; CHAUDHARY et al., 1992) e a activina A (SONG et al., 1996) têm sido apontados como estimulantes dessa produção, enquanto a prolactina (BARNEA et al., 1989a), o hormônio do crescimento (hGH; BARNEA et al., 1989b), o fator de crescimento insulino-mimético-I (IGF-I; NESTLER, 1987) e o IGF-II exercem efeito duplo na síntese de hormônios esteróides: estimulando a produção de progesterona e inibindo a produção de estradiol (NESTLER, 1990).

A regulação da esteroidogênese na placenta bovina, diferentemente da dos humanos, ainda permanece obscura, já que hormônios trópicos específicos não foram identificados (SCHULER et al., 2006). Alguns pesquisadores sugerem que o aumento na concentração sangüínea de estrógenos no período pré-parto seja estimulado pelo cortisol produzido pelas glândulas adrenais do feto (THORBURN; CHALLIS, 1979; SENGGER, 2003) e baseados em experimentos *in vitro* em ovinos e bovinos, outros pesquisadores concluíram que os glicocorticóides estimulam enzimas envolvidas na síntese de estrógenos, tais como a 17 α -hidroxilase, C-17,20 liase e aromatase P450 (HOEDEMAKER et al., 1990). Acredita-se, então, que as principais alterações na capacidade de síntese hormonal pela placenta nessas espécies, durante o período gestacional, sejam moduladas por níveis relativos e arranjos específicos dessas enzimas esteroidogênicas (SCHULER et al., 2006).

Através de imunocitoquímica, constatou-se no presente estudo que a enzima aromatase citocromo P450 é expressa ao longo do período gestacional exclusivamente pelas células trofoblásticas gigantes e que o sinal encontra-se distribuído por todo o citoplasma. Estes resultados corroboram com dados apresentados por Mendelson et al., (1985), os quais relatam que a P450arom

localiza-se no retículo endoplasmático de todas as células nas quais é expressa, e com Schuler et al., (2006) que demonstraram distinções funcionais, em termos de capacidade esteroidogênica, entre as células trofoblásticas mononucleadas e trofoblásticas gigantes, uma vez que estas últimas expressam a P450arom e aquelas a P45017 α , sugerindo a compartimentalização, em nível celular, da regulação de síntese hormonal na placenta bovina.

O presente estudo indica que a aromatase também é alvo para os fatores de crescimento bFGF e VEGF na placenta bovina. Observou-se que tanto o bFGF quanto o VEGF exerceram efeito duplo na expressão da aromatase, ora estimulando ora inibindo, dependendo da fase gestacional, sugerindo que a atividade desta é regulada por ambos os fatores, em consonância com outros, expressos diferentemente de acordo com a fase gestacional (RAVELICH et al., 2004, 2006). Tal comportamento também foi observado por Campos (2005), ao pesquisar a influência destes sobre a produção de progesterona em células placentárias bovinas, sob as mesmas condições de cultivo.

O bFGF e o VEGF exercem seus efeitos mitogênicos e angiogênicos nas células-alvo pela ligação e ativação de seus respectivos receptores, os quais possuem domínios tirosina-quinase citoplasmáticos (DE VRIES et al., 1992; Terman et al., 1992; SLEEMAN et al., 2001). Uma vez ativados, os receptores dão início à cascata de fosforilação protéica por intermédio de várias quinases, levando a uma série de respostas celulares. Uma dessas famílias é a de proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPK) p44 e p42. A MAPK é fosforilada e ativada pela quinase-MAPK (MAPK kinase) no citosol, se transloca para o núcleo e subsequente estimula a transcrição de genes de primeira resposta (BLENIS, 1993). Segundo Needle et al., (2007) hormônios de crescimento como insulina, IGF-I e EGF (fator de crescimento epidermal) modulam a síntese hormonal no corpo lúteo e a expressão de enzimas esteroidogênicas via amplificação ou regulação da ação de hormônios gonadotrópicos e/ou AMP cíclico. Os mesmos autores observaram, em células luteínicas de camundongo, que a atividade dos receptores tirosina quinase estimulam a produção de progesterona via AMP cíclico, independente da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK). No entanto, foi descrito que a esteroidogênese

na placenta bovina não é modulada por nucleotídeos cíclicos como segundo mensageiros (ULLMANN; REIMERS, 1989; SHEMESH et al., 1994), sugerindo que a modulação por fatores de crescimento neste processo se dá ou de modo independente ou via transcrição gênica.

A expressão da aromatase é controlada por seqüências promotoras específicas para cada tecido na qual ela é expressa (TODA et al., 1995; SIMPSON et al., 1997; SHOZU et al., 1998). Na placenta bovina, mais especificamente na porção cotiledonária do placentoma, foi identificada a seqüência promotora P1.1 do gene Cyp19 que codifica a aromatase (HINSHELWOOD et al., 1995; FÜRBASS et al., 1997; VANSLOW et al., 1999; KALBE et al., 2000). No interior do P1.1 foi identificado um elemento denominado SF-1, o qual também é regulado pela fosforilação da MAPK quinase e está envolvido na interação com vários cofatores (CRAWFORD et al., 1997; HAMMER et al., 1999; DESCLOZEUX et al., 2002). É provável que a ativação da cascata MAPK pelo bFGF e VEGF interaja com a região promotora P1.1, via elemento SF-1, para regular a transcrição do gene Cyp19 e conseqüentemente a expressão da aromatase na placenta bovina, e assim modular a síntese de estrógenos, porém, para comprovar essa hipótese, mais estudos são necessários.

Além disso, em todos os grupos analisados, a expressão da aromatase nas células placentárias aumentou em função dos dias de cultivo, atingindo concentração máxima após 96 horas de incubação. Comportamento semelhante foi observado por Fonseca (informação verbal²⁹) ao verificar que a produção de progesterona em células placentárias bovinas, sob as mesmas condições de cultivo, aumentou em todos os períodos gestacionais analisados com exceção do grupo de 90 dias. É provável que o aumento do precursor, nesse caso a pregnenolona, tenha ocasionado a elevação dos níveis de expressão da 3 β -HSD no estudo de Fonseca e o possível aumento de precursores de estrógenos tenha desencadeado o aumento da aromatase no presente estudo, corroborando com dados fornecidos por Elbeltagy et al., (2007) ao observarem que a adição de DHEAS em cultivo primário de células

²⁹ Informação fornecida por Fonseca em São Paulo, em 2006.

da granulosa humana aumenta a expressão da aromatase e de 3 β -HSD, bem como a produção de estrona e estradiol.

Neste trabalho, observou-se que a expressão da aromatase citocromo P450 pelas células placentárias bovinas de 270 dias provenientes de animais clonados, no grupo de células denominado de controle, i.e., não submetido aos fatores de crescimento, não diferiu daquela observada na mesma idade gestacional em animais não clonados. Ao analisarmos a interação dos tratamentos, observamos que o padrão de resposta ao tratamento com o VEGF foi semelhante em relação aos animais não clonados, porém, nas células tratadas com bFGF e com os dois fatores combinados a expressão da P450arom foi significativamente menor ($p < 0,05$).

Todos os clones utilizados no presente estudo eram derivados do mesmo processo de clonagem, i.e., transferência nuclear de células somáticas adultas (NT), o qual está associado com inúmeras anormalidades incluindo o crescimento demasiado da placenta e macrossomia fetal (HILL et al., 2000). Nós especulamos que o crescimento, desenvolvimento e função anormais dos placentomas de animais oriundos de NT tenha resultado em alterações na capacidade de resposta frente ao tratamento com os fatores de crescimento quando comparadas às células de animais não clonados. Estudos demonstram que as principais alterações observadas durante a gestação dos animais clonados estariam relacionadas especialmente ao processo de reprogramação nuclear (KONO, 1998; YOUNG; FAIRBURN, 2000), levando a modificação 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, Campos (2005) observou diferenças em relação à expressão protéica do VEGF, bFGF e seus receptores quando comparados os animais clonados e não clonados, além de diferenças de expressão gênica do sistema do VEGF-A (informação verbal³⁰) podendo estas estarem relacionadas as diferentes respostas obtidas durante os cultivos celulares. Ressalta-se também que, apesar do bFGF requisitar o sistema VEGF para promover seus efeitos e vice-versa, ambos retêm propriedades biológicas distintas exercendo diferentes efeitos biológicos nas células-alvo (PRESTA et al., 2005). É provável que,

³⁰ Informação fornecida por Campos em São Paulo, em 2007.

devido ao crescimento anormal relacionado às células dos placentomas NT, o bFGF tenha atuado de maneira compensatória, inibindo a expressão da aromatase P450 e conseqüentemente, reduzindo a taxa de proliferação e diferenciação celular modulada por estrógenos (LI; JOHNSON, 1993).

Em suma, o presente estudo demonstra que a enzima aromatase citocromo P450 localiza-se exclusivamente no citoplasma das células trofoblásticas gigantes ao longo da gestação (90 – 270 dias), conferindo evidências adicionais sobre a organização a nível celular para a síntese hormonal na placenta bovina e, embora as concentrações de sulfato de estrona não tenham sido mensuradas, os fatores de crescimento bFGF e VEGF provavelmente influenciam a síntese de estrógenos nas células placentárias bovinas via modulação da expressão da aromatase. Tal influência pode ser de natureza amplificadora ou inibitória, dependendo da fase gestacional. Além disso, observou-se que as células placentárias de bovinos clonados apresentam semelhanças na expressão da P450 em relação às células de animais não clonados na mesma idade gestacional (270 dias), porém, sob influência do bFGF, após 48 horas de incubação, e dos dois fatores combinados (bFGF+VEGF) após 24 horas, a expressão da P450arom foi menor nas células dos clones, sugerindo diferenças na ativação da expressão do gene Cyp19 nestas placentas. Assim, a “dissecação” da sequência promotora P1.1 do gene Cyp19 contribuiria para a elucidação dos mecanismos transcricionais através dos quais o bFGF e o VEGF modulariam a expressão da aromatase e a síntese de estrógenos na placenta bovina.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, o presente trabalho demonstra que os fatores de crescimento bFGF e VEGF atuam localmente na placenta bovina, não apenas como reguladores essenciais da angiogênese, mas também como potentes moduladores da síntese de estrógenos via enzima aromatase P450, o que lhes confere papel fundamental no desenvolvimento e função placentária. Além disso, sob as condições de cultivo estabelecidas, as células placentárias de bovinos clonados apresentam padrão de resposta distinto, frente a esses fatores, quando comparadas com células de bovinos não clonados de mesma idade gestacional.

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 kinase VEGF receptor 2 (Flk-1) and VEGF receptor-3 (Flt-4). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95 n. 2, p. 548-553, 1998.
- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro. Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction, Inglaterra: Elsevier, v.1, p. 127, 2004.
- AKIRA, S.; ISSHIKI, H.; SUGITA, T.; TANABE, O.; KINOSHITA, S.; NISHIO, Y.; NAKAJIMA, T.; HIRANO T.; KISHIMOTO T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **The EMBO Journal**, v. 9, p.1897-1906, 1990.
- ALBRECHT, E. D.; PEPE, G. J. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 11, p. 124–150, 1990.
- ALBRECHT, E. D.; PEPE, G. J. Secretion and metabolism of steroids in primate mammals during pregnancy. In: BAZERAZER, F. W. (edEd.). **The Endocrinology of Pregnancy**. New Jersey: Humana Press, 1998. p. 319-351.
- AMENÁBAR, J. M.; HUGO, F. N.; FOSSATI, A. M. C.; PADILHA, D. M. P. The use of stereology as a method in histological research. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 44, p. 62-65, 2003.
- 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**, v. 10, n. (5), p. 1429-1444, 1999.
- 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 independently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 505-514, 1999.
- AUGUSTE, P.; GURSEL, D. B.; LEMIERE, S.; REIMERS, D.; CUEVAS, P.; CARCELLER, F.; et al. descrever os demais autores. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth

by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. **Cancer Research**, v. 61, p.1717–1726, 2001.

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**, v. 79, n. (6), p.1005-1013, 1994.

BARNEA, E. R.; FARES, F.; SHAHAR, K. Stimulatory effect of prolactin on human placental progesterone secretion at term in vitro: possible inhibitory effect on oestradiol secretion. **Placenta**, v. 10, p. 37-49, 1989a.

BARNEA, E. R.; PERLMAN, R.; BICK, T.; HOCKBERG, Z. Effects of human growth hormone upon term placental hormone secretion in vitro. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 27, p. 133-136, 1989b.

BASCHAT, A. A.; HARMAN, C. R. Antenatal assessment of the growth restricted fetus. **Current Opinion of Obstetrics and Gynecology**, v.13, p.161–168, 2001.

BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Advanced Cancer Research**, v. 59, p.115-165, 1992.

BATES, D. O.; CUI, T. G.; DOUGHTY, J. M.; WINKLER, M.; SUGINO, M.; SHIELDS, J.D.; PEAT, D.; GILLATT, D.; HARPER, S. J. VEGF (165)b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. **Cancer Research**, v. 62, p. 4123–4131, 2002.

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

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

BHATTACHARYA, S. K.; RAMACHANDANI, S.; CERVONI, N.; SZYF, M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. **Nature**, v. 397, p. 579 -583, 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**, v. 129, n. (1), p. 233-243, 1995.

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

BLÉNIS, J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 90, p. 5899-5992, 1993.

BREUER, H.; HAMMER, D.; KRÜSKEMPER, H. L. **Methods of Hormone Assay**. Alemanha: Stuttgart, 1976. 520 p.

BRUNNER, R. M.; GOLDAMMER, T.; FÜRBASS, R.; VANSLOW, J.; SCHWERIN, M. Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber FISH. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 82, p. 37-40, 1998.

BUZINSKI, S. M. C.; FECTEAU, G.; LEFEBVRE, R. C.; SMITH, L. C. Fetal well-being assessment in bovine near-term gestations: Current knowledge and future perspectives arising from comparative medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p.178–183, 2007.

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

BUNGERT, J.; KOBER, F.; DÜRING, F.; SEIFART, K. H. Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, p.885–898, 1992.

BURDON, R. H.; KNIPPERBERG, P. H.; CHARD, T. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: an introduction for radioimmunoassay and related techniques**. 4 ed. Inglaterra: Elsevier, 1990. 288 p.

BURGESS, W. H.; MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 575-606, 1989.

CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T.; WEBB, R. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 69-77, 1998.

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**. 2005; 193 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

CARLONE, D. L.; RICHARDS, J. S. Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 292-304, 1997.

CHAUDHARY, J.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, C. Regulation of progesterone secretion in human syncytiotrophoblast in culture by human chorionic gonadotropin. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. (3-4), p. 425-32, 1992.

CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RENARD JP. Clonage et physiopathologies de la gestation associées. **Gynecologie, Obstetrique and Fertilité**, v. 28, p. 633–642, 2000.

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.

CLYNE, C. D.; KOVACIC, A.; SPEED, C. J.; ZHOU, J.; PEZZI, V.; SIMPSON, E. R. Regulation of aromatase expression by the nuclear receptor LHR-1 in adipose tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n.(1-2), p. 39-44, 2004.

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

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; BROWNE, P.; MAPES, S. M.; PLACE, N. J.; HUGHES, A. L.; GLICKMAN, S. E. Placental Expression and Molecular Characterization of Aromatase Cytochrome P450 in the Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*). **Placenta**, 2006.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HINSHELWOOD, M. M.; LIU, Z.; SIMPSON, E. R.; FORD, J. J.; HARADA, N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 497–505, 1996.

CONLEY, A. J.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 121, p. 685-695, 2001.

CORBIN, C. J.; KHALIL, M. W.; CONLEY, A. J. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 113, p. 29-37, 1995.

CRAWFORD, P. A.; POLISH, J. A.; GANPULE, G.; SADOVSKY, Y. The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 1626-1635, 1997.

DANTZER, V.; WINTHER, H. Histological and immunohistochemical events during placentation in pigs. **Reproduction Supplement**, v. 58, p. 209-222, 2001.

DAVIS, J. M. **Basic Cell Culture: a Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 319 p.

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**, v. 29, n. (4), p. 1061-1072, 1997.

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**, v. 255, n. 5047, p. 989-991, 1992.

DELARUE, B.; BREARD, E.; MITTRE, H.; LEYMARIE, P. Expression of two aromatase cDNAs in various rabbit tissues. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 64, p. 113-119, 1998.

DESCLOZEAUX, M.; KRYLOVA, I. N.; HORN, F.; FLETTERICK, R. J.; INGRAHAM, H. A. Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 7193-7203, 2002.

DICKSON, J. M.; WEAVERS, H. M.; MITCHELL, N.; WINTHER, E. M.; WILKINSON, I. D.; VANBEEK, E. J.; GRIFFITHS, P. D. Choice of cross size in stereology – a cautionary note. **Neuroradiology**, v. 45, p. 896-899, 2003.

DOBSON, H.; ROWAN, T. G.; KIPPAX, I. S.; HUMBLLOT, P. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. **Theriogenology**, v. 40, p. 411-425, 1993.

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**, v. 174, n. 5, p. 1275-1278, 1991.

ELBELTAGY, K.; HONDA, K.I.; OZAKI, K.; MISUGY, T.; TOKUYAMA, O.; KIMURA, M.; KIRA, Y.; ISHIKO, O. In vitro effect of dehydroepiandrosterone sulfate on steroid receptors, aromatase, cyclooxygenase-2 expression, and steroid hormone production in preovulatory human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, 2007.

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

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

PECTEAU, M. E.; PALMER, J. E.; WILKINS, P. A. Neonatal care of high-risk cloned and transgenic calves. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 21, p. 637-653, 2005.

FELSENFELD, G.; BOYES, J.; CHUNG, J.; CLARK, D.; STUDITZKY, V. Chromatin structure and gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 93, p. 9384-9388, 1996.

FERRARA, N. Vascular Endothelial growth factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. (4), p. 581-611, 2004.

FERRARA, N.; HAUKE, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the vascular growth factor family of proteins. **Endocrine Reviews**, v. 13, p. 18-32, 1992.

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**, v. 162, n. (3), p. 388-399, 1995.

FÜRBASS, R.; KALBE, C.; VANSLOW, J. Tissue-specific expression of the bovine aromatase encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. **Endocrinology**, v. 138, p. 2813-2819, 1997.

FÜRBASS, R.; SAID, H. M.; SCHWERI, M.; VANSLOW, J. Chromatin structure of the bovine Cyp19 promoter 1.1. DnaseI hypersensitive sites and DNA hypomethylation correlate with placental expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1222-1227, 2001.

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 of Domestic Animals**, v. 39, p. 321-327, 2004.

GAO, E.; WANG, Y.; ALCORN, J. L.; MENDELSON, C. R. Transcription factor USF2 is developmentally regulated in fetal lung and acts together with USF1 to induce SP-

A gene expression. **The American Journal of Physiology**, v. 284, p. L1027–L1036, 2003.

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

GOLDAMMER, T.; GUERIN, G.; BRUNNER, R. M.; VANSELOW, J.; FÜRBASS, R.; SCHWERIN, M. Chromosomal mapping of the bovine aromatase gene (cyp19) and an aromatase pseudogene to chromosome 10 and syntenic group U5. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 826–827, 1994.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 95-114, 1987.

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 of Domestic Animals**, v. 37, p. 362-368, 2002.

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

GREENWOOD, P. L.; BELL, A. W. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. **Reproductive Supplement**, v. 61, p. 195–206, 2003.

GREVEN, H.; KOWALEWSKI, M. P.; HOFFMANN, B.; GEYER, J.; REX-HAFFNER, M.; UGELE, B.; SCHULER, G. Bovine placental steroid sulphotase: molecular cloning and expression pattern in placentomes during gestation and at parturition. **Placenta**, p. 1-9, 2007.

GUERRIN, M.; MOUKADIRI, H.; CHOLLET, P.; MORO, F.; DUTT, K.; MALECAZE, F.; PLOUET, J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 164, p. 385–394, 1995.

HALL, P.F. Cellular organization for steroidogenesis. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 53–95, 1984.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. **Quantitative clinical pathology**. Falta local: Blackwell Science, p. 11-22, 1995. p. 11-22.

HAMMER, G. D.; KRYLOVA, I.; ZHANG, Y.; DARIMONT, B. D.; SIMPSON, K.; WEIGEL, N. L.; INGRAHAM, H. A. Phosphorylation of the nuclear receptor SF- 1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. **Molecular Cell**, v. 3, p. 521-526, 1999.

HARADA, N.; YAMADA, K.; FOIDART, A.; BALTHAZART, J. Regulation of aromatase cytochrome P450 (estrogen synthetase) transcripts in the quail brain by testosterone. **Molecular Brain Research**, v. 15, p. 19-26, 1992.

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**, v. 966, p. 166-186, 2002.

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

HIB, J. Estrutura dos genes. In: DE ROBERTIS JR., E. M. F.; HIB, J.; PONZIO, R. **Biologia Celular celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 268-308.

HILL, J.R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). **Theriogenology**, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

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.; WESTTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 6, p. 1787-1794, 2000.

HINSHELWOOD, M. M.; LIU, Z.; CONLEY, A. J.; SIMPSON, E. R. Demonstration of tissue-specific promoters in nonprimate species that express aromatase P450 in placentae. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1151-1159, 1995.

HOEDEMAKER, M.; WESTON, P. G.; WAGNER, W. C. Influence of cortisol and different steroidogenic pathways on estrogen synthesis by the bovine placenta. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. (7), p. 1012-5, 1990.

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**, v. 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**, v. 23, p. 309-320, 2002.

HOFFMANN, B.; WAGNER, W. C.; GIMENEZ, T. Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 126-33, 1976.

HOFFMANN, B.; WAGNER, W. C.; HIXON, J. E.; BAHR, J. Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 253-266, 1979.

HOLDSWORTH, R. J.; HEAP, R. B.; BOOTH, J. M.; HAMOM, M. A rapid direct radioimmunoassay for the measurement of oestrone sulfate in the milk of dairy cows and its use in pregnancy diagnosis. **The Journal of Endocrinology**, v. 95, p. 7-12, 1982.

HONDA, S. I.; MOROHASHI, K. I.; NOMURA, M.; TAKEYA, H.; KITAJAMA, M.; OMURA, T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 7494—7502, 1993.

HUNG, N. N.; PRAKASH, B. S. Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulfate in karan Swiss cows and Murrah buffaloes. **The British Veterinary Journal**, v. 146, p. 449-456, 1990.

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

IVELL, R.; BATHGATE, R.; WALTHER, N. Luteal peptides and their genes as important markers of ovarian differentiation. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 207-216, 1999.

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

JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Cellular proliferation and fibroblast growth factors in the corpus luteum during early pregnancy in the ewe. **Growth Factors**, v.1, p. 15-23, 1997.

JIANG, B.; MENDELSON, C. R. O₂ Enhancement of Human Trophoblast differentiation and *hCYP19* (Aromatase) Gene Expression Are Mediated by

Proteasomal Degradation of USF1 and USF2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 8824–8833, 2005.

KADONAGA, J. T. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. **Cell**, v. 92, p. 307-313, 1998.

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**, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995.

KALBE, C.; FÜRBASS, R.; SCHWERIN, M.; VANSLOW, J. Cis-acting elements regulating the placenta-specific promoter of the bovine Cyp19 gene. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 265-273, 2000.

KAMAT, A.; GRAVES, K. H.; SMITH, M. E.; RICHARDSON, J. A.; MENDELSON, C. R. A 500-bp region, approximately 40 kb upstream of the human Cyp19 (aromatase) gene, mediates placenta-specific expression in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 4575-4580, 1999.

KARKKAINEN, M. J.; MAKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. E2–E5, 2002.

KATOH, Y.; KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification on FGF-25. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n. (4), p. 767-770, 2005.

KLISCH, K.; HECHT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER R. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 20, p. 451-458, 1999.

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

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

LALA, D. S.; RICE, D. A.; PARKER, K. L. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. **Molecular Endocrinology**, v. 6, p. 1249–1258, 1992.

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

LEPHARD, E. D.; SIMPSON, E. R.; McPHAULMCPHAUL, M. J.; KILGORE, M. W.; WILSON, J. D.; OJEDA, S. R. Brain aromatase cytochrome P450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat. **Molecular Brain Research**, v. 16, p. 187-192, 1992.

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**, v. 6, p. 1293-1302, 1993.

LIGGINS, G. C.; THORBURN, G. D. Initiation of Parturitionparturition. In: **Marshall's Physiology physiology of rReproduction**. Lamming, London: Pregnancy and Lactation, . Lamming, London, 1994. p. 863-1002.

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

LUEPRASITSAKUL, P.; LONGCOPE, C. Aromatase activity in human adipose tissue stromal cells; the effect of fetal bovine serum fractions on dexamethasone-stimulated aromatization. **The Journal and Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. (3), p. 353-357, 1991.

LUND, J.; BAKKE, M.; MELLGREN, G.; MOROHASHI, J-I.; DOSKELAND, S-O. Transcriptional regulation of the Cyp17 gene by cAMP. **Steroids**, v. 62, p. 43-45, 1997.

LUND, J.; BORUD, B.; MELLGREN, G.; AESOY, R.; HOANG, T.; JACOB, A. L.; BAKKE, M. Differential regulation of SF-1-cofactor interactions. **Endocrine Research**, v. 28, p. 505-513, 2002.

LYNCH, J. P.; LALA, D. S.; PELUSO, J. J.; LUO, W.; PARKER, K. L.; WHITE, B. A. Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. **Molecular Endocrinolgy**, v. 7, p. 776—786, 1993.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. Quantitative methods in morphology. **EDUERJ**, p. 60-69, 1995.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, p. 835-839, 1995.

MASTERS, P.; KENDALL, N. R.; CAMPBELL, B. K. Temporal relationships between FSH receptor, type 1 insulin-like growth factor receptor, and aromatase expression during FSH-induced differentiation of bovine granulosa cells maintained in serum-free culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 203, n. (1-2), p. 117-127, 2003.

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**, v. 3, p. 486-492, 1994.

MAYHEW, T. M. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, v. 76, p. 639– 665, 1991.

MCARDLE, C. A.; KOHL, C.; RIEGER, K.; GRONER, I.; WEHRENBURG, U. Effects of gonadotropins, insulin and insulin-like growth factor I on ovarian oxytocin and progesterone production. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 78, p. 211-220, 1991.

MELLO, M. R.; CAETANO, H. V.; MARQUES, M. G.; et al. Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, p. 1485–1489, 2003.

MENDELSON, C. R.; JIANG, B.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; HINSHELWOOD, M. M. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 25-33, 2005.

MENDELSON, C. R.; WRIGHT, E. E.; EVANS, C. T.; PORTER, J. C.; SIMPSON, E. R. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 243, p. 480-491, 1985.

MEYER, M.; CLAUSAS, 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**, v. 18, n. (2), p. 363-374, 1999.

MICHAEL, M. D.; KILGORE, M. W.; MOROHASHI, K.; SIMPSON, E. R. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (*CYP19*) gene in the ovary. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 13561—13566, 1995.

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**, v. 151, n. (1), p. 81-93, 1992.

MILLER, P. B.; CHARLESTON, J. S.; BATTAGLIA, D.E.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R. An Accurate, Simple Method for Unbiased Determination of Primordial Follicle Number in the Primate Ovary. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 909-915, 1997.

MOROHASHI, K. I.; ZANGER, U. M.; HONDA, S. I.; HARA, M.; WATERMAN, M. R.; OMURA, T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Molecular Endocrinology**, v. 7, p. 1196—1204, 1993.

MOROHASHI, K.; HONDA, S.; INOMATA, Y.; HANDA, H.; OMURA, T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 17913-17919, 1992.

MOSS, A. J.; DALRYMPLE, G. V.; BOYD, C. M. **Practical Radioimmunoassay**. Saint Louis: Mosby Company, 1976. 158 p.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate Fetal Membranes**. New Jersey: Rutgers University Press, 1987. 387 p.

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**, v. 168, n. 1, p. 248-253, 1990.

NAN, X.; NG, H.-H.; JOHNSON, C. A.; LAHERTY, C. D.; TURNER, B. M.; EISENMAN, R. N.; BIRD, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v. 393, p. 386-389, 1998.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J.; GUENGERICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O.; OKUDA, K.; NEBERT, D. W. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, -early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA and Cell Biology**, v. 12, p. 1-51, 1993.

NESTLER, J. E. Insulin-like growth factor II is a potent inhibitor of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts. **Endocrinology**, v. 127, n. (5), p. 2064-70, 1990.

NESTLER, J. E. Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, v. 121, p. 1845-1852, 1987.

NG, Y.S.; KRILLEKE, D.; SHIMA, D.T. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*, v. 312, p. 527–537, 2006.

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**, v. 1, p. 29-38, 2002.

NOWAK, M.; HELLEBOID-CHAPMAN, A.; JAKEL, H.; MARTIN, G.; DURAN-SANDOVAL, D.; STAELS, B.; RUBIN, E. M.; PENNACCHIO, L. A.; TASKINEN, M. R.; FRUCHART-NAJIB, J.; FRUCHART, J. C.. Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 1537–1548, 2005.

OBERG-WELSH, C.; SANDLER, S.; ANDERSSON, A.; WELSH, M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 126, p. 125—132, 1997.

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

ORNITZ, D. M.; XU, J.; COLVIN, J. S.; MCEWEN, D. G.; MACARTHUR, C. A.; COULIER, F.; et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 15292- – 15297, 1996.

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 localized to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. **Circulation**, v. 93, p. 1079-1082, 1996.

PARK, J. E.; CHEN, H. H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and

in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. (41), p. 25646-25654, 1994.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, v. 18, p. 361–377, 1997.

PFARRER, C. D.; RUZIWA, S. D.; WINTHER, H.; CALLESEN, H.; LEISER, R.; SCHAMS, D.; DANTZER, V. Localization of Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. **Placenta**, v. 27, n. (8), p. 889-898, 2006.

PFARRER, C. D.; WEISE, S.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; LEISER, R.; HOFFMANN, B.; SCHULER, G. Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF Receptors are Uniformly Expressed in Trophoblast Giant Cells During Restricted Trophoblast Invasion in Cows. **Placenta**, v. 27, n. (6-7), p. 758-770, 2006.

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**, 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 7151–7158, 1997.

PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 16, n. (2), p. 159-178, 2005.

RAVELICH, S. R.; BREIER, B. H.; REDDY, S.; KEELAN, J. A.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1, 2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 430-8, 2004.

RAVELICH, S. R.; SHELLING, A. N.; WELLS, D. N.; PETERSON, A. J.; LEE, R. S.; RAMACHANDRAN, A.; KEELAN, J. A. Expression of TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3 and the receptors TGF-betaRI and TGF-betaRII in placentomes of artificially inseminated and nuclear transfer derived bovine pregnancies. **Placenta**, v. 27(2-3), p.307-16, 2006.

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

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v. 12, p. 1-9, 2000.

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

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.; FALENDER, A. E.; LO, Y. K.; SHARMA, S. C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 195-220, 2002.

RIDER, V.; PIVA, M. Role of growth factors of uterine and fetal-placental origin during pregnancy. In: BAZERAZER, F. W. (edEd.), **The Endocrinology endocrinology of pPregnancy**. New Jersey: Humana Press, 1998. p. 83-1241.

ROBERTSON, H. A.; KING, G. J. Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 463-470, 1979.

ROY, A. L.; MEISTERERNST, M.; POGNONEC, P.; ROEDER, R. G. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription factor and the helix-loop-helix activator USF. **Nature**, v. 354, p. 245-248, 1991.

RUST, W.; STEDRONSKY, K.; TILLMANN, G.; MORLEY, S.; WALTHER, N.; IVELL R. The role of SF-1/Ad4BP in the control of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory (STAR) protein. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 189-200, 1998.

RUTLAND, C. S.; MUKHOPADHYAY, M.; UNDERWOOD, S.; CLYDE, N.; MAYHEW, T. M.; MITCHELL, C. A. Induction of intrauterine growth restriction by reducing placental vascular growth with the angioinhibin TNP-470. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. (6), p. 1164-1173, 2005.

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

SCHMIDT, M.; GREVE, T.; AVERY, B.; BECKERS, J. F.; SULON, J.; HANSEN, H. B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 527-529, 1996.

SCHULER, G.; HARTUNG, F.; HOFFMANN, B. Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 169-174, 1994.

SCHULER, G.; ÖZALP, G. R.; HOFFMANN, B.; HARADA, N.; BROWNE, P.; CONLEY, A. J. Reciprocal expression of 17 α -hydroxylase-C17, 20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. **Reproduction**, v. 131, p. 669-679, 2006.

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 parturition. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 976-982, 2002.

SEGHEZZI, G.; PATEL, S.; REN, C. J.; GUALANDRIS, A.; PINTUCCI, G.; ROBBINS, E. S.; et al. descrever os demais autores 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. **Journal of Cell Biology**, v. 141, p. 1659-16-73, 1998.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. New York: Current Conceptions, 2003. 368 p.

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 the site of the cholesterol side chain cleavage enzyme. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 29, p. 21-25, 1988.

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

SHIBUYIA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A. et al. descrever os demais autores Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v. 5, p. 519-524, 1990.

SHOZU, M.; ZHAO, Y.; SIMPSON, E. R. Estrogen biosynthesis in THP1 cells is regulated by promoter switching of the aromatase (CYP19) gene. **Endocrinology**, v. 138, p. 5125-5135, 1997.

SIMMONS, D. L.; LALLEY, P. A.; KASPER, C. B. Chromosomal assignments of gene coding for components of the mixed function oxidase svstem in mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 515-521, 1985.

SIMPSON, E. R.; DAVIS, S. R. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. **Endocrinology**, v. 142, p. 4589-4594, 2001.

SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W.; HINSHELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; ITO, Y. J.; FISHER, C. R.; MICHAEL, M. D.; MENDELSON, C. R.; BULUN, S. E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 342-355, 1994.

SIMPSON, E. R.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, K.; O'DONNELL, L.; JONES, M.; DAVIS, S. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 184—188, 2000.

SIMPSON, E. R.; ZHAO, Y.; AGARWAL, V. R.; MICHAEL, M. D.; BULUN, S. E.; HINSHELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S.; SUN, T.; FISHER, C. R.; QIN, K.; MENDELSON, C. R. Aromatase expression in health and disease. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 52, p. 185-213, 1997.

SKINNER, H. A. **The origin of medical terms**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1961. 328 p.

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**, v. 271, n. (2), p. 171-182, 2001.

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

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 5731–5740, 1999.

SONG, Y.; KEELAN, J.; FRANCE, J. T. Activin-A stimulates, while transforming growth factor beta 1 inhibits, chorionic gonadotrophin production and aromatase activity in cultured human placental trophoblasts. **Placenta**, v. 17, p. 603-610, 1996.

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**, v. 89, n. 1-2, p. 163-171, 1992.

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**, v. 97, n. 1, p. 49-54, 2000.

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, T. D.; KEEFER, B. E. Effects of insulinlike growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulinlike growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3719-3731, 1995.

STRAUSS III, J. F.; KIDO, S.; SAYEGH, R.; SAKURAGI, N.; GAFVELS, M. E. The cAMP signalling system and human trophoblast function. **Placenta**, v. 13, p. 389-403, 1992.

SUGAWARA, T.; FUJIMOTO, S. The potential function of steroid sulphotase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression. **The Biochemical Journal**, v. 380, p. 153-160, 2004.

SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE, A.; KATO, H. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. (10), p. 3919-3924, 2000.

SUN, T.; ZHAO, Y.; MANGELSDORF, D. J.; SIMPSON, E. R. Characterization of a region upstream of exon 1.1 of the human *CYP19* (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 1684—1691, 1998.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 2126-2131, 2005.

TAKAHASHI, T.; HIKARO, M.; TAKAHASHI, H.; PATEL, O. V.; TAKENOUCHI, N.; DOMEKI, I. Maternal plasma estrone sulfate profile during pregnancy in the cow; comparison between singleton and twin pregnancies. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, p. 287-288, 1997.

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**, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

THOMPSON, E. A. JR.; SIITERI, P. K. The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 5373-5378, 1974.

THORBURN, G. D.; CHALLIS, J.R. Endocrine control of parturition. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 863-918, 1979.

TILLE, J. C.; WOOD, J.; MANDRIOTA, S. J.; SCHNELL, C.; FERRARI, S.; MESTAN, J.; et al. 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**, v. 299, p. 1073—85, 2001.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T.; et al. descrever os demais autoresThe human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11947-11954, 1991.

TODA, K.; AKIRA, S.; KISHIMOTO, T.; SASAKI, H.; HASHIMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; SAGARA, Y.; SHIZUTA, Y. Identification of a transcriptional regulatory factor for human aromatase cytochrome P450 gene expression as nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6), a member of the CCAAT/enhancer-binding protein family. **European Journal of Biochemistry**, v. 231, p. 292–299, 1995.

TORRINHA, F. **Dicionário latino-português**. 3. ed. Porto: Gráficos Reunidos Ltda., 1942.

TSUMAGARI, S.; KAMATA, J.; TAKAGI, K.; TANEMURA, K.; YOSAI, A.; TAKEISHI, M. Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 631-636, 1993.

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

VANSESLOW, J.; ZSOLNAI, A.; FESÜS, L.; FÜRBASS, R.; SCHWERIN, M. Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, p. 318-324, 1999.

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**, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

WALTHER, N.; JANSEN, M.; AKBARY, W.; IVELL, R. Differentiation-specific action of orphan nuclear receptor NR5A1 (SF-1): transcriptional regulation in luteinizing bovine theca cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 64, 2006.

WATKINS, C. Indo-european roots. In: MORRIS, W. **The american heritage dictionary of the english-language**. Boston: Houghton Mifflin Co., 1981. 1535 p.

WEIS, L.; REINBERG, D. Transcription by RNA polymerase II: initiator directed formation of transcription-competent complexes. **FASEB Journal**, v. 6, p. 3300—3309, 1992.

WELLMANN, S.; TAUBE, T.; PAAL, K.; GRAF, V.; EINSIEDEL, H.; GEILEN, W.; SEIFERT, G.; ECKERT, C.; HENZE, G.; SEEGER, K. Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 654–660, 2001.

WENDORF, G. L.; LAWYER, M. S.; FIRST, N. L. Role of the adrenals in the maintenance of pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 281-287, 1983.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KING, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997.

WIMSATT, W. A. Observations of the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **The American Journal of Anatomy**, v. 89, p. 233-281, 1951.

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**, v. 20, 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**, v. 5, p. 457-465, 2001.

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

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: falta autor do livro **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4. ed. London: Lamming GE, v. III, part 1, 1994. v. III, pt 1, p. 233-460.

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L. V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216—220, 2002.

YAMAGUCHI, T. P.; HARPAL, K. et al. descrever os demais autores FGFR-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. **Genes Development**, v. 15, p. 3032-3044, 1994.

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 folliculogênese in the human ovary. **Gynecological Endocrinology**, v. 4, p. 223-230, 1997.

YAMAMOTO, T.; CHAPMAN, B. M.; CLEMENS, J. W.; RICHARDS, J. S.; SOARES, M. J. Analysis of cytochrome P-450 side-chain cleavage gene promoter activation during trophoblast cell differentiation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 113, p. 183-194, 1995.

YAMAZAKI, Y.; TOKUNAGA, Y.; TAKANI, K.; MORITA, T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. **Biochemistry**, v. 44, p. 8858-8864, 2005.

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

YOUNG, L. E.; FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 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**, v. 204, n. (2), p. 247-259, 1993.

ZHANG, W. C.; NAKAO, T.; MORIYOSHI, M.; NAKADA, K.; OHTAKI, T.; TANAKA, Y. Relationship of maternal plasma progesterone and estrone sulfate to dystocia in Holstein-Friesian heifers and cows. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 909-913, 1999.

ZHAO, Y.; AGARWAL, V. R.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the *CYP19* (aromatase) gene. **Endocrinology**, v. 137, p. 5739—5742, 1996.

ZHAO, Y.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Characterization of the sequences of the human *CYP19* (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 9, p. 340–349, 1995a.

ZHAO, Y.; NICHOLS, J. E.; BULUN, S. E.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. Aromatase *P450* gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 16449–16457, 1995b.

ZHENG, J.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D.; REYNOLDS, L. P. Characterization of heparin-binding endothelial mitogens produced by the ovine endometrium during early pregnancy. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, p. 89–96, 1998.

ZHU, X.; KOMIYA, H.; CHIRINO, A.; FAHAM, S.; FOX, G. M.; ARAKAWA, T.; HSU, B. T.; REES, D. C. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. **Science**, v. 251, p. 90–93, 1991.

Apêndices

APÊNDICE A

Tabela 3 – Expressão da P450arom (cél/m²) em células placentárias dos grupos controle e tratados com os fatores de crescimento bFGF e VEGF ao longo do período de cultivo, em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em clones - São Paulo - 2007

Idade Gestacional (dias)	Controle			bFGF*			VEGF			VEGF + bFGF		
	24**	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
90 dias	2,43E+05	4,64E+06	3,89E+10	2,02E+07	8,33E+05	3,48E+10	2,26E+06	3,28E+05	9,96E+10	1,31E+06	1,28E+05	1,49E+09
	1,24E+06	6,23E+07	2,24E+11	2,68E+07	7,43E+07	5,68E+11	5,53E+07	9,96E+07	2,27E+11	1,59E+07	8,43E+06	1,38E+10
	6,67E+05	2,77E+07	2,90E+11	1,45E+07	6,09E+07	6,96E+10	2,06E+05	3,81E+07	5,10E+10	5,27E+05	8,23E+05	1,22E+10
Média	7,15E+05	3,15E+07	1,84E+11	2,05E+07	4,53E+07	2,24E+11	1,93E+07	4,60E+07	1,26E+11	5,92E+06	3,13E+06	9,15E+09
Desvio Padrão	0,36	0,58	0,47	0,13	1,10	0,63	1,22	1,33	0,32	0,77	0,91	0,54
150 dias	4,94E+05	8,36E+04	4,05E+09	389015	1,24E+05	3,24E+09	3,02E+05	1,29E+04	5,67E+09	1,17E+06	1,66E+06	1,51E+08
	4,18E+05	2,52E+04	3,24E+09	5,10E+05	3,15E+05	4,05E+09	2,78E+05	2,01E+04	5,67E+09	2,84E+05	1,69E+06	1,51E+08
	5,86E+05	1,76E+05	4,86E+09	2,84E+05	2,17E+04	3,24E+09	3,34E+05	7,23E+03	5,67E+09	2,69E+06	1,64E+06	1,51E+08
Média	4,99E+05	9,50E+04	4,05E+09	3,95E+05	1,53E+05	3,51E+09	3,05E+05	1,34E+04	5,67E+09	1,38E+06	1,66E+06	1,51E+08
Desvio Padrão	0,07	0,43	0,09	0,13	0,59	0,06	0,04	0,22	0,00	0,49	0,01	0,00
210 dias	1,04E+05	7,92E+05	2,02E+10	1,01E+05	7,23E+03	1,46E+10	3,29E+04	9,29E+03	5,67E+09	3,72E+04	8,03E+05	5,52E+09
	6,67E+05	2,87E+06	5,83E+10	585933,75	1,70E+04	2,01E+11	8,65E+05	9,85E+05	1,52E+11	9,18E+05	2,63E+06	2,04E+09
	1,85E+06	1,78E+06	5,43E+10	3,74E+06	3,29E+04	8,26E+10	1,05E+06	1,16E+03	2,43E+09	8,10E+06	2,89E+04	4,28E+08
Média	8,74E+05	1,81E+06	4,43E+10	1,48E+06	1,91E+04	9,93E+10	6,50E+05	3,32E+05	5,34E+10	3,02E+06	1,15E+06	2,66E+09
Desvio Padrão	0,63	0,28	0,26	0,78	0,33	0,58	0,85	1,50	0,95	1,18	1,02	0,56
270 dias	1,75E+06	7,92E+05	3,48E+10	1,64E+06	2,86E+06	1,54E+10	3,80E+06	1,04E+06	2,43E+09	4,82E+06	1,58E+05	3,02E+08
	1,81E+06	8,03E+05	1,03E+11	1,85E+06	2,87E+06	1,80E+11	3,89E+06	9,96E+05	1,65E+11	4,94E+06	1,62E+05	2,57E+09
	1,78E+06	8,13E+05	6,88E+10	1821104,6	2,91E+06	9,72E+10	3,85E+06	1,02E+06	9,23E+10	4,89E+06	1,67E+05	1,44E+09
Média	1,78E+06	8,03E+05	6,88E+10	1,77E+06	2,88E+06	9,74E+10	3,85E+06	1,02E+06	8,67E+10	4,88E+06	1,62E+05	1,44E+09
Desvio Padrão	0,01	0,01	0,24	0,03	0,00	0,56	0,01	0,01	0,99	0,01	0,01	0,48
270 dias (clones)	7,92E+05	5,14E+04	7,94E+10	5,10E+05	1,12E+05	9,23E+10	4,40E+06	5,94E+04	1,98E+11	1,36E+05	1,58E+03	1,30E+10
	7,82E+05	1,36E+05	6,15E+10	1,58E+06	1,71E+05	7,53E+10	1,88E+06	5,27E+05	2,92E+10	2,38E+05	6,76E+05	1,69E+09
	8,13E+05	1,67E+06	9,72E+10	3,27E+06	2,43E+05	5,91E+10	4,25E+05	1,47E+06	4,05E+10	6,51E+04	8,04E+02	3,07E+09
Média	7,96E+05	6,20E+05	7,94E+10	1,79E+06	1,76E+05	7,56E+10	2,24E+06	6,86E+05	8,94E+10	1,46E+05	2,26E+05	5,94E+09
Desvio Padrão	0,01	0,78	0,10	0,41	0,17	0,10	0,51	0,71	0,45	0,28	1,61	0,46

*Tratamentos aplicados **Tempo de cultivo em horas.

APÊNDICE B

Tabela 4 – Coeficientes de variação (%) das células placentárias aromatase P450 positivas dos grupos controle e tratados com os fatores de crescimento bFGF e VEGF ao longo do período de cultivo, em diferentes idades gestacionais de animais não clonados e aos 270 dias de gestação em clones - São Paulo – 2007

Idade gestacional (dias)	Grupos experimentais	Tempo de tratamento (horas)		
		24	48	96
90	Controle	0,69*	0,92	0,7
	bFGF	0,13	0,86	1,33
	VEGF	1,62	1,08	0,72
	bFGF+VEGF	1,46	1,47	0,73
150	Controle	0,17	0,80	0,20
	bFGF	0,29	0,97	0,13
	VEGF	0,09	0,48	0,00
	bFGF+VEGF	0,88	0,01	0,00
210	Controle	1,02	0,57	0,47
	bFGF	1,34	0,68	0,95
	VEGF	0,83	1,70	1,60
	bFGF+VEGF	1,47	1,16	0,98
270	Controle	0,02	0,01	0,49
	bFGF	0,06	0,01	0,84
	VEGF	0,01	0,02	0,94
	bFGF+VEGF	0,01	0,03	0,79
Clones	Controle	0,02	1,47	0,22
	bFGF	0,78	0,37	0,22
	VEGF	0,90	1,05	1,06
	bFGF+VEGF	0,59	1,72	1,04

* Valores correspondentes às médias de contagens de pontos de cada esfregaço (média de 3 imagens), calculados pela fórmula $CV = DP/média$. CV = coeficiente de variação. DP = desvio padrão.

Anexos

ANEXO A

Medida fetal (cm)		Idade gestacional (dias)
1,4	$\pm 1,0$	30
7,0		60
15,6		90
24,4		120
38,9	$\pm 2,0$	150
52,9		180
68,1		210
84,2		240

Quadro 3 – *Crown Rump*: relação entre o comprimento crânio-caudal (cm) de fetos bovinos e a idade gestacional correspondente (dias), de acordo com Sloss; Dufty (1980)

ANEXO B - Reagentes e soluções

A Solução tampão fosfato livre de Ca^{++} e Mg^{++} (PBS)

Reagentes	Quantidades (g)
Cloreto de sódio (NaCl) ³¹	8
Cloreto de potássio (KCl) ²¹	0,2
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) ²¹	1,15
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) ²¹	0,2

Os reagentes foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2 – 7,4. A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121° C. Em seguida foi adicionado 10 ml da solução contendo antibiótico e antifúngico³² (100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina e 250 µg de anfotericina B).

B Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

1 DMEM²²

- 9,59 g de pó em 1000ml de H₂O MilliQ, autoclavado;

2 Bicarbonato de sódio (NaHCO_3 7,5%²²)

- 100ml H₂O destilada + 7,5g NaCO₃ autoclavado (separadamente)

3 L-Glutamina 0,3%²²

- 0,3g em 10 ml de H₂O MilliQ, filtrada em filtros de 0,20 µm.

4 Soro fetal bovino²², inativado a 56°C por 30 min antes do uso.

5 HEPES 280 mM²², filtrado em filtros de 0,20 µm.

- 2,6689 g em 40 ml de H₂O MilliQ ou 66,724 g em 1000 ml

³¹ Merck Sharp & Dohme, GER.

³² Sigma-Aldrich Inc, USA.

6 Solução estéril de antibiótico²² (10000 UI de penicilina, 10mg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B).

7 Hidróxido de sódio (NaOH²²)

- 8 g de NaOH em 200 ml de H₂O MilliQ

Para 1000ml de DMEM autoclavado, adicionar:

- 5ml NaHCO₃
- 20ml de L-Glut 0,3%
- 100ml soro fetal bovino
- 50ml HEPES 280mM
- 10ml da solução de antibiótico

Acertar pH usando NaOH 1M até ficar laranja avermelhado (pH 7,2 -7,4). Para a técnica de radioimunoensaio, o meio de cultivo utilizado não continha soro fetal bovino em sua composição.

C Azul de Trypan

A solução - uso do Azul de Trypan³³ foi preparada no momento do uso adicionando-se 200 µl de Azul de Trypan a 0,2% em 50 µl de cloreto de sódio a 4,25% (4,25g de NaCl + 100 ml de água ultrapura).

D Tampão de homogeneização

Reagentes ³⁴	Quantidades (g)
TRIS-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ . HCl)	0,6057
EDTA sódico (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)	0,1861
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	42,79

³³ Sigma-Aldrich Inc. USA.

³⁴ Merck Sharp & Dohme, GER.

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

E Solução de sulfato de cobre alcalina

1 Solução A

Reagentes²⁴	Quantidades (g)
Carbonato de sódio (Na_2CO_3)	10
Hidróxido de sódio (NaOH)	2
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,1

Os reagentes foram diluídos em 500 ml de água ultrapura. A solução foi utilizada somente 24 horas após o preparo, tempo este necessário para a decantação do tartarato de sódio e potássio.

2 Solução B

Reagente³⁵	Quantidade (gramas)
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5

O reagente foi diluído em 1000 ml de água ultrapura.

3 Solução C

A solução foi preparada adicionando-se 49 ml da solução A em 1 ml da solução B (50:1) no momento do uso.

³⁵ Merck Sharp & Dohme, GER.

F Tampão ICC

Reagentes ²⁵	Quantidades (g)
Cloreto de sódio (NaCl)	8
Cloreto de potássio (KCl)	0,2
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,2
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,2

Os reagentes foram diluídos em 1000 ml de água ultrapura, pH 7,2 - 7,4. Em seguida, adicionou-se 3 ml de Triton X-100³⁶ e a solução foi homogeneizada sob agitação.

G Hematoxilina de Harris³⁷ (3:1)

Para a diluição utilizaram-se três partes do reagente para 1 parte de água destilada.

³⁶ Merck Sharp & Dohme, GER.

³⁷ Alkimia, BRA.