JOSÉ EDUARDO BARBOSA MARQUES JÚNIOR

**Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na
placenta de cães e bovinos**

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. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1778
FMVZ

Marques Júnior, José Eduardo Barbosa

Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e de bovinos / José Eduardo Barbosa Marques Júnior. — São Paulo: J. E. B. Marques Júnior, 2006.
140 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Placenta. 2. Cães. 3. Bovinos. 4. Sistema VEGF. 5. Western blotting. I. Título.

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

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão temporal do sistema VEGF na placenta bovina e canina durante a gestação", protocolo nº685/2005, utilizando 16 vacas (material coletado em matadouro) e 12 cães (material coletado em Clínicas Veterinárias), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paula Papa de Carvalho, 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 "Temporal expression of the VEGF system in the bovine and canine placenta during the pregnancy", protocol number 685/2005, utilizing 16 cows and 12 dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Paula Papa de Carvalho, 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, 31 de maio de 2005

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARQUES JÚNIOR, José Eduardo Barbosa

Título: Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e bovinos

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: _____

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos meus pais, **Eduardo e Dora**, por estarem sempre presentes em todas as etapas desta trajetória e pelo seu apoio incondicional as minhas aspirações;

Aos meus irmãos, **Fábio e Lilian**, por serem sempre amigos;

A minha namorada, **Patricia**, por estar sempre ao meu lado e compartilhar tanto as dificuldades como as vitórias deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Prof^a. Dr^a. Paula de Carvalho Papa**, minha orientadora, por todos os ensinamentos e lições que compartilhou comigo durante estes anos, e pelo exemplo dado, tanto como pessoa como pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

A **Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino**, coordenadora do curso de pós-graduação, pela oportunidade de realizar este trabalho;

Aos professores **Francisco Javier Hernandez-Blazquez** e **Ubiratan Fabres Machado**, por terem disponibilizado seus laboratórios durante a execução dos experimentos;

Aos meus amigos, **Bruno, Fábio, Luis Fernando e Rosa**, que mesmo longe sempre estiveram me apoiando;

A **Adriana** e a **Monique**, por toda a ajuda e pelo incentivo que me deram para que eu entrasse no Mestrado;

A todos que auxiliam durante as coletas e processamento do material: **Laura, Danila, Carlos Eduardo (Cadu), Fernando, Eduardo, Carolina, Thiago, Vanessa, Alex e Liza Margareth**;

A todo pessoal do **ICB**, **Rodrigo, Rosana, Melissa, Maristela, Monalisa, Paula, Patricia, Ana Cláudia, Ana Bárbara, Elaine, Guilherme, Paulo e Robson**, pelo apoio e paciência que tiveram comigo durante a realização dos experimentos de Western Blotting.

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

A **Clinica Veterinária Clinição** e a todos os seus funcionários, pela colaboração na obtenção do material desta pesquisa;

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

Aos funcionários do Departamento, **Maicon e Jaqueline**, pelo auxílio durante todo esse período;

A todos os colegas de pós-graduação, **Thais, Thalita, Andréia, Gabriela, Ricardo entre outros**, com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos;

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa.

Muito Obrigado

RESUMO

MARQUES JÚNIOR, J. E. B. **Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e de bovinos.** [Comparative study of the VEGF system temporal distribution in the bovine and canine placenta]. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A família dos VEGFs é a principal responsável pela angiogênese aumentando a neovascularização e a permeabilidade da interface endometrial/placentária. O estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e de bovinos, que apresentam diferenças tanto na sua estrutura como na sua função, pode contribuir para esclarecer o papel deste sistema ao longo da gestação. Amostras da cinta placentária de cadelas (nos dias 20, 40 e 60 de gestação) foram coletadas assim como amostras de placentomas bovinos (dias 90, 150, 210 e 270 da gestação). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C até serem homogeneizadas, ou fixadas em solução de formol tamponado e embebidas em paraplast usando os procedimentos convencionais. Foi realizado Western Blotting para a quantificação do sistema VEGF utilizando-se anticorpos específicos combinados com um sistema amplificador de quimio-luminescência: ECL[®]. A imuno-histoquímica para a localização do Flt-4 canino foi realizada de acordo com o método ABC, utilizando o Nova Red[®] como cromógeno. Na placenta bovina, o VEGF apresentou uma alta expressão no início da gestação seguida por queda que se manteve deste até o termo. O Flt-1, o KDR e o Flt-4 demonstraram uma alta expressão no início e no meio da gestação, e um declínio em sua expressão ao final da mesma. Na placenta canina, a proteína do VEGF e do Flt-1 apresentaram uma elevada expressão no início da gestação, a qual diminuiu na

metade e assim se manteve até o final da gestação, enquanto o KDR demonstrou uma alta expressão no início e no meio da gestação, e um decréscimo em sua expressão próximo ao termo. A proteína do Flt-4 foi localizada nas regiões do labirinto placentário, do corion frouxo e do alantocorion e sua expressão variou nos diferentes compartimentos ao longo da gestação. A expressão similar do sistema VEGF e do Flt-4 em ambas as espécies estudadas sugere que estas proteínas apresentem funções similares tanto na placenta bovina como canina.

Palavras-chave: Placenta. Cães. Bovinos. Sistema VEGF. Western blotting.

ABSTRACT

MARQUES JÚNIOR, J. E. B. **Comparative study of the VEGF system temporal distribution in the bovine and canine placenta.** [Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e de bovinos]. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The VEGF family is known to be responsible for the angiogenesis increasing blood vessels number and permeability in the endometrial/placental interface. A comparative study of VEGF system temporal distribution in canine and bovine placentas, which present very well described differences in structure and function, will contribute to better define the role of this system along pregnancy. Samples from placental belt of pregnant bitches (on days 20, 40 and 60) were collected as well as bovine placentomes samples (from days 90, 150, 210, 270 of gestation). All samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until processed, or fixed in buffered formalin solution and embedded in paraplast using conventional procedures. Western Blotting for VEGF system quantification was carried out using specific antibodies combined to an amplification quimio-luminescence system: ECL[®]. Immunohistochemistry for canine Flt-4 demonstration was performed according to the ABC method using NovaRed[®] as chromogen. In the bovine placenta, VEGF demonstrate a higher expression in early gestation, which decreased at mid-gestation and remained so until term. Flt-1, KDR and Flt-4 demonstrated a constant expression in early and mid-gestation, and a decrease in the end of pregnancy. In the dog placenta, VEGF and Flt-1 proteins show an increased expression in early gestation, and a decreased expression at mid and late gestation; while KDR demonstrated an increased expression at early and mid-gestation, and a decreased

expression near term. Flt-4 protein is localized in placental labyrinth, chorion and allantochorion. Similar expressions of these proteins in both species, that present considerable differences in placenta structure and function, suggest that VEGF system and Flt-4 play similar roles in the bovine and canine placenta.

Key words: Placenta. Dog. Bovine. VEGF System. Western blotting.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografias da localização da proteína do Flt-4 na placenta de cadelas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-Flt-4. **A-C**: Controles Negativos de 20, 40 e 60 dias, respectivamente; **D-F**: Camadas Placentárias de 20, 40 e 60 dias, respectivamente; **G-I**: Vasos Sanguíneos em placentas de 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Barras: 40µm em **A-F** e 10 µm em **G-I**. Seta Cheia = Epitélio Fetal, Seta Vazia = Célula Endotelial..... 85
- Figura 2 - Fotomicrografias da localização da proteína do Flt-4 na placenta de cadelas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal Anti-Flt-4. **A**: Alantocorion 20 dias; **B**: Alantocorion 40 dias; **C**: Alantocorion 60 dias; **D**: Corion Frouxo 20 dias; **E**: Corion Frouxo 40 dias; **F**: Corion Frouxo 60 dias; **G**: Labirinto Placentário 20 dias; **H**: Labirinto Placentário 40 dias; **I**: Labirinto Placentário 60 dias. Barra:10 µm. Seta Cheia = Epitélio Fetal..... 87

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Análise da proteína VEGF em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **1A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/100 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **1B:** Gráfico representando o conteúdo da total do VEGF, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos..... 64
- Gráfico 2 - Análise da proteína VEGF em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **2A:** Gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/100 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **2B:** Gráfico representando o conteúdo total do VEGF expresso em UA/g de tecido de cada animal testado..... 65
- Gráfico 3 - Análise da proteína Flt-1 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **3A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **3B:** Gráfico representando o conteúdo da total do Flt-1, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos..... 67
- Gráfico 4 - Análise da proteína Flt-1 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **4A:** Gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **4B:** Gráfico representando o conteúdo total do Flt-1 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado..... 68
- Gráfico 5 - Análise da proteína KDR em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **5A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **5B:** Gráfico representando o conteúdo da total do KDR, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos..... 70
- Gráfico 6 - Análise da proteína KDR em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **6A:** Gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **6B:** Gráfico representando o conteúdo total do KDR expresso em UA/g de tecido de cada animal testado..... 71
- Gráfico 7 - Análise da proteína Flt-4 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **7A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do Flt-4 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **7B:** Gráfico representando o conteúdo total do Flt-4, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos..... 73
- Gráfico 8 - Análise da proteína Flt-4 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **8A:** Gráfico representando o conteúdo do Flt-4 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **8B:** Gráfico representando o conteúdo total do Flt-4 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado..... 74

Gráfico 9 -	Análise da proteína VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 9A: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. 9B: Gráfico representando o conteúdo total do VEGF, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.....	76
Gráfico 10 -	Análise da proteína VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 10A: Gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. 10B: Gráfico representando o conteúdo total do VEGF expresso em UA/g de tecido de cada animal testado.....	77
Gráfico 11 -	Análise da proteína Flt-1 em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 11A: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. 11B: Gráfico representando o conteúdo total do Flt-1, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.....	79
Gráfico 12 -	Análise da proteína Flt-1 em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 12A: Gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. 12B: Gráfico representando o conteúdo total do Flt-1 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado.....	80
Gráfico 13 -	Análise da proteína KDR em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 13A: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. 13B: Gráfico representando o conteúdo da total do KDR, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média ± EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.....	82
Gráfico 14 -	Análise da proteína KDR em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). 14A: Gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. 14B: Gráfico representando o conteúdo total do KDR expresso em UA/g de tecido de cada animal testado.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituição dos géis de poliacrilamida para eletroforese - São Paulo - 2006.....	53
Tabela 2 -	Descrição dos anticorpos utilizados nos experimentos - São Paulo - 2006.....	60
Tabela 3 -	Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta bovina tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006.....	88
Tabela 4 -	Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta canina tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006.....	88
Tabela 5 -	Análise das proteínas do sistema VEGF em placenta bovina nas diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias), tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006.....	139
Tabela 6 -	Análise das proteínas do sistema VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias), tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
CL	corpo lúteo
CRE	cAMP response element
DNA	ácido desoxirribonucléico
ECL	enhanced chemiluminescence
EPM	erro padrão médio
ERK1/2	extracellular-regulated kinase-1/2
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FGFR	receptor para o fator de crescimento fibroblástico
Flt	Fms-like tyrosine kinase
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
KDR	kinase insert domain containing receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
NO	óxido nítrico
PBS	solução tampão fosfato
PLGF	Placental growth factor
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis
UA	unidades arbitrárias
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR	receptor para o fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	27
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3.1	Placentação.....	30
3.2	Desenvolvimento das Membranas Fetais.....	30
3.3	Tipos de Placenta.....	32
3.3.1	Placenta Bovina.....	32
3.3.2	Placenta Canina.....	34
3.4	Vasculogênese e Angiogênese Placentária.....	34
3.5	A Relação do VEGF e seus receptores com a Vascularização Placentária.....	38
3.6	Receptores do VEGF.....	41
3.7	Localização do sistema VEGF nas diferentes espécies.....	44
4	MATERIAL E MÉTODO.....	49
4.1	Amostras de placentas bovina e canina e métodos de coleta para Imuno-histoquímica de Western Blotting.....	49
4.1.1	Amostras de placenta canina para Imuno-histoquímica de Western Blotting.....	49
4.1.2	Amostras de placenta bovina para Western Blotting.....	50
4.1.3	Coleta dos materiais para Western Blotting.....	50
4.1.4	Coleta dos materiais para Imuno-histoquímica.....	50
4.2	Extração das proteínas para Western Blotting.....	51
4.3	Determinação da concentração de proteínas totais.....	52
4.4	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	53
4.5	Transferência Eletroforética.....	54
4.6	Enhanced Chemiluminescence (ECL).....	54
4.7	Autorradiografia e Densitometria Óptica (D.O.).....	56
4.8	Preparo do material para inclusão em Histosec®.....	56
4.9	Imuno-histoquímica para o Flt-4 na placenta canina.....	57
4.10	Análise Estatística.....	59

4.11	Anticorpos do VEGF e de seus receptores, Flt-1, KDR e Flt-4.....	60
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Quantificação do VEGF na placenta bovina.....	63
5.2	Quantificação do Flt-1 na placenta bovina.....	66
5.3	Quantificação do KDR na placenta bovina.....	69
5.4	Quantificação do Flt-4 na placenta bovina.....	72
5.5	Quantificação do VEGF na placenta canina.....	75
5.6	Quantificação do Flt-1 na placenta canina.....	78
5.7	Quantificação do KDR na placenta canina.....	81
5.8	Imunolocalização do Flt-4 na placenta canina.....	84
5.8.1	Reação para o Flt-4 nas diferentes fases da gestação na placenta canina.....	86
5.9	Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta bovina e canina.....	88
6	DISCUSSAO.....	91
7	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS.....	114
	APÊNDICE.....	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das membranas fetais é um tema estudado desde os tempos antigos (NEEDHAM, 1934). A importância da vascularização para este desenvolvimento foi reconhecida há 32 anos em ovelhas (STEGEMAN, 1974) e, desde então, inúmeros estudos têm apontado problemas de estabelecimento e/ou manutenção da vascularização como os causadores de distúrbios placentários e mesmo gestacionais (DI NARO et al., 2003; FERRELL, 1989; MYERS et al., 1982; REYNOLDS et al., 2002; REYNOLDS; REDMER, 1995; REYNOLDS, REDMER, 2001; WOOTTON et al., 1977; VONNAHME et al., 2001).

A placenta dos mamíferos é o órgão pelo qual os gases respiratórios, nutrientes e resíduos são trocados entre os sistemas materno e fetal. Assim, as trocas placentárias suprem todas as demandas metabólicas para o crescimento e desenvolvimento embrionário. As taxas de fluxo sanguíneo placentário são dependentes da vascularização e a angiogênese é, portanto, um dos pontos críticos para o sucesso do desenvolvimento de uma gestação saudável.

De fato, o aumento da resistência vascular e a redução do fluxo sanguíneo uterino podem ser usados no prognóstico de gestações de alto risco e estão associados com retardo do crescimento fetal (REYNOLDS; REDMER, 2001). O recente desenvolvimento de modelos animais de gestações comprometidas, incluindo aquelas resultantes da nutrição materna (tanto restrição como excesso), fetos múltiplos, stress ambiental (calor e alta altitude), e o efeito dos tipos de raça

materna e fetal já indicam que a redução no desenvolvimento vascular placentário e na expressão de fatores angiogênicos são provavelmente a principal causa do desenvolvimento fetal reduzido (REYNOLDS et al., 2005).

O desenvolvimento vascular da placenta é iniciado pela vasculogênese e subsequentemente controlado pela angiogênese, seja esta com a formação de árvore vilosa ou não (GEVA et al., 2002; ZYGMUNT et al., 2003). A angiogênese é requerida para o desenvolvimento da unidade materno-fetal durante a implantação e a placentação em ruminantes (LEISER et al., 1997), podendo sofrer distúrbios após a fertilização *in vitro* (BERTOLINI; ANDERSON 2002; MILES et al., 2004) e clonagem (DE SOUSA et al., 2001; HILL et al., 2000).

Os principais fatores envolvidos na angiogênese placentária são as famílias do Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) e angiopoietinas (FERRARA; DAVIS-SMITH, 1997; KLAGSBRUN; D'AMORE, 1991).

Na placenta hemochorial humana, a proteína do VEGF foi demonstrada no cito- e no sinciotrofoblasto (CLARK et al., 1996; DUNK; AHMED, 2001; JACKSON et al., 1994) e no trofoblasto extraviloso (SHIRAISHI et al., 1996). O VEGF foi demonstrado na placenta hemochorial ou útero de animais experimentais e de laboratório, como o camundongo (BREIER et al., 1995) e o rato (WATANABE et al., 1998), assim como na placenta do visão (WHINTER; DANTZER, 2001). Poucos estudos focaram espécies de relevância econômica como suínos (CHARNOCK-JONES et al., 2001; WINTHER et al., 1999; VONNAHME; FORD, 2001), ovelhas (BOGIC et al., 2001; MILLAWAY et al., 1989) e recentemente os bovinos (PFARRER

et al., 2006), com placentas do tipo epiteliocorial. Estudos da expressão destes fatores em placentas do tipo endoteliocorial, de animais domésticos como o cão, ainda não foram realizados.

Segundo Barone (1976) a placenta da cadela pode ser descrita como zonária, endoteliocorial e labiríntica. Björkman (1976) a descreveu como sendo zonária e portadora de vilos coriônicos que ocupam o anel placentário (ou cinta placentária). Esse se relaciona ao saco coriônico e ao endométrio. Adicionalmente todas as placentas examinadas por Leiser e Kohler (1983) são designadas como possuidoras de fluxo contracorrente.

A placenta definitiva dos bovinos é do tipo corioalantoideana, na qual a membrana coriônica é conectada à circulação fetal pelos vasos alantoideanos (LEISER; KAUFMANN, 1994). Na placenta cotiledonária dos bovinos (BJÖRKMAN, 1976; LEISER; KAUFMANN, 1994) as áreas de interação materno-fetal se tornam mais intensas em pontos especializados, onde áreas não glandulares pré-formadas do endométrio (carúnculas) associam-se a membrana corioalantoideana (cotilédone fetal) formando estruturas denominadas placentomas (KAUFMANN; BURTON, 1994; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000).

Pesquisas demonstram de forma clara o papel do VEGF no aumento do número e da permeabilidade dos vasos sanguíneos da interface endométrio-placentária, resultando assim em aumento da capacidade de transferência de nutrientes do compartimento materno para o fetal (VONNAHME et al, 2001). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos maiores agentes

estimuladores da angiogênese devido a sua potente atividade mitogênica em células endoteliais. Nove isoformas do VEGF-A com propriedades biológicas específicas já foram identificadas em tecidos humanos, com, respectivamente, 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 e 206 aminoácidos (BATES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003). Outros membros da família do VEGF são: VEGF-B (OLOFSSON et al., 1996; PAAVONEN et al., 1996), VEGF-C (PAAVONEN et al., 1996), VEGF-D (ACHEN et al., 1998), VEGF-E (MEYER et al., 1999; OGAWA et al., 1998), VEGF-F (YAMAZAKI et al., 2005; SUTO et al., 2005) e fator de crescimento placentário (PIGF) (PARK et al., 1994). As atividades biológicas dos VEGF-A são mediadas pela sua ligação com receptores de tirosina kinase de alta afinidade, VEGFR-1 e VEGFR-2 (FERRARA, 2001). Também formam ligação com o VEGFR-1 o VEGF-B e PIGF (ZACHARY; GLIKI, 2001), enquanto o VEGF-C e VEGF-D tem alta afinidade com o VEGFR-2 (WISE et al., 1999; ZACHARY; GLIKI, 2001). Além das células endoteliais outros tipos celulares, incluindo trofoblásticas, uterinas, epiteliais e da glândula uterina, expressam VEGF e/ou os seus receptores sugerindo funções adicionais durante o desenvolvimento placentário (WHINTER et al., 1999; WHINTER; DANTZER, 2001).

O presente estudo quantificou a expressão da proteína do VEGF-A e seus receptores específicos, VEGFR-1, VEGFR-2 no tecido placentomal bovino e no tecido da cinta placentária de cadelas, desde a sua implantação até o período peripartal. Além disso, foi quantificado o VEGFR-3, receptor específico para o VEGF-C e VEGF-D (JUSSILA; ALITALO, 2002; WISSMANN; HOCKER, 2002) uma vez que este receptor tem sido descrito como presente em células do trofoblasto (DUNK; AHMED, 2001). A partir da avaliação quantitativa e comparativa do perfil de expressão do sistema VEGF na placenta de bovinos e cães, pode-se inferir sobre a

importância temporal de expressão nos dois tipos placentários distintos, epitélio ou endoteliocorial.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Hipotetizou-se que a expressão protéica do VEGF e seus receptores varia ao longo da gestação na placenta bovina e canina e que a expressão deste sistema se comporta de maneira semelhante em ambas espécies.

Para testar esta hipótese foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- quantificação do VEGF no tecido placentário, em diferentes fases da gestação das espécies bovina e canina;
- quantificação dos receptores do VEGF: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR e VEGFR-3/Flt-4 no tecido placentário, em diferentes fases da gestação das espécies bovina e canina.
- comparação entre o perfil de expressão em ambas as espécies ao longo da gestação

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O reconhecimento de que as membranas fetais devem ser importantes para o desenvolvimento embrionário e fetal, sem dúvida, é resultado da observação de que estas membranas fetais ocorrem em todos os vertebrados, e de fato, placentação de algum tipo ocorre em todas classes e subclasses de vertebrados, com exceção dos cyclostomata, aves e monotrêmata (MOSSMAN, 1937).

O estudo da placenta humana ou de embriões humanos foi confinado a descrições anatômicas até o advento da bioquímica e os métodos de cultura de tecido no início do século 20 (MOSSMAN, 1937). Assim, modelos animais tem sido o tema central do estudo da placenta desde os princípios, e muito do conhecimento da anatomia e fisiologia placentária que se tem atualmente continua sendo derivado de estudos comparativos em animais (BARRON, 1959).

Uma característica singular do desenvolvimento precoce dos mamíferos é a provisão de nutrientes do organismo materno por intermédio da placenta. A placenta desempenha muitas funções e substitui o trato gastrintestinal do feto, os pulmões, os rins, o fígado e as glândulas endócrinas. Em aditamento, a placenta separa os organismos materno e fetal, assegurando o desenvolvimento em separado do feto (JAINUDEEN; HAFEZ, 1995).

3.1 Placentação

A placenta pode ser definida como a íntima aposição ou fusão das membranas fetais aos tecidos maternos com a finalidade de executar trocas fisiológicas (MOSSMAN, 1937). Por meio deste órgão acontece o transporte dos nutrientes e dos resíduos metabólicos entre os sistemas materno e fetal (REYNOLDS; REDMER, 2001).

A placentação consiste na forma com que as membranas fetais vêm a se desenvolver e a se associarem ao endométrio (BJÖRKMAN, 1976). Neste processo de desenvolvimento da placenta estão relacionadas quatro estruturas membranosas: o corion, o âmnio, o saco vitelino e o alantóide (LEISER; KAUFMANN, 1994).

3.2 Desenvolvimento das Membranas Fetais

O zigoto tem a sua formação resultante da fusão dos gametas feminino e masculino (BJÖRKMAN, 1976). Depois de sucessivas divisões mitóticas (estágio de mórula) este desenvolve uma cavidade central (blastocelo) e passa para o estágio de blastocisto (SCHALAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

No primeiro momento, o blastocisto é uma estrutura unilaminar que tem como característica a presença de uma massa celular interna, circundada por uma parede composta apenas por células ectodérmicas, que é chamada de trofoblasto (SLOSS;

DUFTY, 1980). A massa celular interna e o trofoblasto são dois tipos celulares especializados que originarão o embrião e os componentes fetais da placenta (RAMSEY, 1982).

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

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

3.3 Tipos de Placenta

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

3.3.1 Placenta Bovina

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

Na placenta cotiledonária dos bovinos (classificação de interdigitação materno-fetal) (BJÖRKMAN, 1976; LEISER; KAUFMANN, 1994) as áreas de interação materno-fetal se tornam mais intensas em pontos especializados, onde áreas não glandulares pré-formadas do endométrio (carúnculas) associam-se com a membrana corioalantoideana (cotilédone fetal) formando estruturas denominadas placentomas (KAUFMANN; BURTON, 1994; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000), que correspondem a união da carúncula materna com o cotilédone fetal.

As áreas intercotiledonárias são relativamente menos vascularizadas e formadas pela associação microvilar do endométrio a uma membrana

corioalantoideana lisa (BJÖRKMAN, 1976; KAUFMANN; BURTON, 1994; SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000). Nestas áreas podem ser encontradas aréolas, pequenas áreas onde o corioalantóide circunda glândulas uterinas (WOODING; FLINT, 1994) e a nutrição histiotrófica pode ser observada, ou seja, as células trofoblásticas absorvem as secreções glandulares através da fagocitose ou pinocitose (RAMSEY, 1982).

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

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

3.3.2 Placenta Canina

Segundo Barone (1976), a placenta dos caninos é zonata (zonária), endoteliocorial e labiríntica. A sua organização característica é estabelecida a partir da metade da gravidez, ou seja, a partir do 1º mês após a fecundação. Na zona anular assenta-se o folheto externo do alantóide, o qual se une ao córion no 20º dia no caso de gestações em cães. A partir daí os vilos do trofoblasto desenvolvem-se de modo considerável formando lamelas que se aprofundam muito no endométrio. Björkman (1976) descreveu a placenta dos carnívoros como sendo zonária e portadora de vilos coriônicos que ocupam o anel placentário. Este se relaciona ao saco coriônico e ao endométrio. Adicionalmente todas as placentas examinadas por Leiser e Kohler (1983) são designadas como possuidoras de fluxo contracorrente.

3.4 Vasculogênese e Angiogênese Placentária

O crescimento de vasos sanguíneos tem papel vital durante o desenvolvimento embrionário e também em diversos processos fisiológicos e patológicos (GOLDENBERG, 1995). Durante a formação vascular dois processos podem ser citados: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é caracterizada pelo desenvolvimento capilar a partir da diferenciação de células precursoras de origem mesenquimal, sendo um processo envolvido na formação dos vasos ocorrido durante a embriogênese. A angiogênese consiste na formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e, além de ser

indispensável durante o desenvolvimento embrionário e fetal, está envolvida em diversos processos normais e patológicos durante a vida pós-natal (DÍAZ-FLORES; GUTIÉRREZ; VARELA, 1994).

A placentação ou processo de formação placentária é caracterizado por extensiva angiogênese, tanto na parte materna quanto na fetal e é acompanhado por acentuado aumento no fluxo sanguíneo uterino e umbilical. O estabelecimento de circulações funcionais, materna e fetal, é um dos primeiros eventos que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e placentário. Foi demonstrado que o grande aumento das trocas placentárias característico da segunda metade da gestação depende primariamente do crescimento acentuado de leitos vasculares placentários e do resultante aumento do fluxo sanguíneo umbilical e uterino (REYNOLDS; REDMER, 1995). Também foi relatado que um aumento da resistência vascular uterina ou um fluxo sanguíneo uterino diminuído podem ser usados como apontadores de gestação de risco e estão associados com retardo no crescimento fetal (HARRINGTON et al., 1997; NORTH et al., 1994; TRUDINGER et al., 1985).

A rede capilar materna se origina a partir de vasos pré-existentes no endométrio (angiogênese), enquanto no compartimento fetal os primeiros vasos extra-embrionários são formados a partir de células precursoras sanguíneas (vasculogênese) situadas no mesoderma que compõe a parede do saco vitelino e alantóide, seguido pelo contínuo crescimento destes vasos sanguíneos (angiogênese) (YLLERA; ALEXANDRE-PIRES; CIFUENTES, 2003).

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

A direção do microfluxo sanguíneo materno-fetal pode influenciar de maneira importante às trocas de substâncias entre mãe e feto. Vários arranjos podem ser identificados, desde o tipo concorrente, no qual os fluxos sanguíneos materno e fetal fluem no mesmo sentido, até o mais eficiente sistema contracorrente, no qual os fluxos se encontram em direções opostas. Os demais sistemas de fluxos, multiviloso e de corrente cruzada, ocupam posições intermediárias entre os fluxos concorrente e contracorrente em relação à eficiência de trocas materno-fetais (KAUFMANN; BURTON, 1994).

Está claro que a placenta representa um papel fundamental no fornecimento de metabólitos demandados pelo feto, no entanto, ainda que o crescimento placentário diminua durante a última metade da gestação, a função placentária aumenta drasticamente para suportar a taxa de crescimento exponencial do feto (FERREL, 1989; METCALFE; STOCK; BARRON; 1988; REYNOLDS; REDMER, 1995). Em bovinos e ovinos, o fluxo de sangue uterino aumenta aproximadamente

de 3 a 4 vezes do meio ao final da gestação (REYNOLDS; REDMER, 1995; REYNOLDS et al., 1986; ROSENFELD, 1974).

Recentemente, sofisticados métodos de análise por computação gráfica foram criados para estabelecer o padrão do desenvolvimento vascular placentário na ovelha. O leito capilar placentário materno se desenvolve primariamente pelo aumento do tamanho dos capilares, com apenas um pequeno aumento no número de capilares e na densidade de superfície. Em contraste, a microvasculatura da placenta fetal se desenvolve primariamente pelo aumento dos ramos, resultando em um grande aumento no número de capilares e na densidade de superfície. Estas observações ajudam a entender o grande aumento relativo no fluxo de sangue umbilical e a maior chegada de nutrientes para o feto que ocorre durante a metade final da gestação (REYNOLDS et al., 2005).

Sabe-se que é a capacidade funcional placentária e não o peso da placenta que está correlacionada com a taxa de crescimento fetal (REYNOLDS et al, 2005). Um exemplo disto é a correlação do desenvolvimento vascular placentário e a expressão de fatores angiogênicos com o tamanho do feto em diversas linhagens de porcos domésticos (VONNAHME; WILSON; FORD, 2001). De maneira similar, o desenvolvimento da vascularização placentária ao invés do peso placentário per se é altamente correlato com o peso fetal em duas linhagens de ovelhas (romanov e columbia) que diferem dramaticamente quanto as taxas de fertilidade (ARNOLD et al., 2001).

Desta forma, fatores que possam influenciar os processos de vasculogênese e angiogênese nos tecidos maternos e fetais durante a placentação, e o resultante aumento no fluxo sanguíneo uterino e umbilical, têm grande impacto no crescimento e desenvolvimento fetal e também na sobrevivência neonatal (REYNOLDS; REDMER, 1995). Recentes observações levaram à identificação das famílias do VEGF, FGF e angiopoietinas como as principais envolvidas na regulação da vascularização placentária (REYNOLDS; REDMER, 2001).

3.5 A Relação do VEGF e seus receptores com a Vascularização Placentária

A complexidade do desenvolvimento da célula endotelial indica que sua regulação deva envolver muitos fatores de crescimento e diferenciação de tecido específicos que podem se ligar e ativar receptores endoteliais (ACHEN et al., 1998).

O VEGF é um mitógeno específico para células endoteliais, estimulando a proliferação (DULL et al., 2001; LANG et al., 2001) e migração (BERNATCHEZ; SOKER; SIROIS, 1999) destas células, regulando também o desenvolvimento vascular sob condições normais (CAO et al., 2004; FRASER et al., 2000) e patológicas (DVORAK et al., 1991). Além de sua atividade mitogênica, o VEGF é o estimulador específico da permeabilidade vascular bem como da produção e migração das proteases produzidas pelas células endoteliais, passos críticos no processo de angiogênese (REYNOLDS; REDMER, 2001).

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

Inicialmente isolado e purificado a partir de meio de cultura de células foliculares da pituitária de bovinos (FERRARA; HENZEL, 1989), o fator de crescimento VEGF-A (VEGF) é o primeiro e melhor descrito membro da família dos VEGFs, que além desta, contém diversas proteínas, incluindo o VEGF-B (OLOFSSON et al., 1996; PAAVONEN et al., 1996), VEGF-C (PAAVONEN et al., 1996), VEGF-D (ACHEN et al., 1998), VEGF-E (MEYER et al., 1999; OGAWA et al., 1998), VEGF-F (YAMAZAKI et al., 2005; SUTO et al., 2005) e fator de crescimento placentário (PIGF) (PARK et al., 1994). Até o momento foram identificadas nove isoformas da proteína VEGF-A com 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 e 206 aminoácidos (BATES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003). Essas isoformas têm funções distintas, mas complementares na angiogênese devido a suas diferentes ligações com sulfato de heparina e neurofilinas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMMELA et al., 2005).

O VEGF-A é uma molécula chave na indução da angiogênese e vasculogênese, causa proliferação, brotamento, migração e formação tubular das células do endotélio vascular. O gene do VEGF-A está localizado no cromossomo 6p21,3 e na espécie humana é codificado por 8 exons separados por 7 introns. (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). O VEGF induz angiogênese em uma variedade de condições fisiológicas e patológicas, incluindo embriogênese, formação do corpo lúteo, crescimento tumoral, cicatrização de ferimentos, crescimento vascular placentário e angiogênese compensatória no coração (REYNOLDS et al, 2002, 2005; REYNOLDS; REDMER, 1995, 2001).

Durante a embriogênese, o VEGF atua como um mediador autócrino e parácrino, associado a angiogênese que ocorre durante os estágios embrionários iniciais, o desenvolvimento do cérebro, rim, músculo esquelético e diversos compartimentos mesodérmicos (AITKENHEAD et al., 1998).

Na placenta, o VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante, embora também sejam identificadas as proteínas contendo 121, 145, 189 e 206 aminoácidos neste tecido (CHEUNG, 1997; CHEUNG et al., 1995; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; SHARKEY et al., 1993, TAMMELA et al., 2005). A localização da proteína no tecido placentário indica seu papel autócrino e parácrino na modulação da angiogênese coordenada e progressiva presente na placenta durante a gestação. Também participa da manutenção da integridade e do estado diferenciado dos vasos e regulação da permeabilidade capilar (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2000; CHEUNG et al., 1995; SHARKEY et al., 1993; VONNAHME; WILSON; FORD, 2001; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001).

Estudos knockout no visão tem sugerido que o VEGF₁₆₅ é provavelmente a maior isoforma responsável pelas ações do VEGF-A (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMMELA et al., 2005).

3.6 Receptores do VEGF

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

O receptor Flt-1 é expresso em células do endotélio vascular assim como nos pericitos, trofoblasto placentário, osteoblastos, monócitos/macrófagos, células mesangiais renais e também em algumas células tronco hematopoéticas (ZACHARY; GLIKI, 2001), além de se ligar ao VEGF-A, VEGF-B e PlGF com alta afinidade. O VEGFR-1 transmite sinais mitogênicos fracos em células do endotélio vascular, mas ele é conhecido por formar um heterodímero com o VEGFR-2, que possui fortes propriedades sinalizadoras em células do endotélio vascular (HUANG et al., 2001). O Flt-1 é associado à quimiotaxia de monócitos e recrutamento e

sobrevivência das células progenitoras derivadas da medula óssea. A expressão do VEGFR-1 é regulada positivamente durante a angiogênese e também pela hipóxia, diferente do que ocorre com o VEGFR-2 e o VEGFR-3. Uma forma solúvel do VEGFR-1 (sVEGFR-1), formada pelo domínio extracelular do VEGFR-1, é capaz de inibir as ações do VEGF em humanos e visões e já foi associado à pré-eclampsia (MAYNARD et al., 2003).

O VEGFR-2 se liga ao VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D, sendo o receptor primário dos sinais do VEGF nas células do endotélio vascular (WISE et al., 1999; ZACHARY; GLIKI, 2001). O caminho da sinalização do VEGFR-2 é crucial para ativar os efeitos dos VEGFs incluindo vasodilatação, migração de células endoteliais e proliferação. Fora das células endoteliais, o VEGFR-2 é também expresso em células progenitoras endoteliais circulantes, células do ducto pancreático, células progenitoras da retina, e megacariócitos (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). Os receptores Flt-1 e KDR são expressos predominantemente em células endoteliais, mas alguns poucos outros tipos celulares podem expressar um ou ambos tipos de receptores, sugerindo outras funções celulares desempenhadas pelo VEGF. Ambos são expressos nas células trofobláticas (AHMED et al., 1997, DUNK, C.; AHMED, 2001; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001) e células do músculo liso uterino humano (BROWN et al., 1997).

O terceiro receptor para VEGF (cujos ligantes específicos são VEGF-C e VEGF-D), também denominado de VEGFR-3 ou Flt-4, é altamente correlato aos receptores Flt-1 e KDR (YAN et al., 1998). O Flt-4 está presente em todo o endotélio durante o desenvolvimento, mas em adultos ele se torna restrito a células do

endotélio vascular linfático e a certas células do endotélio vascular fenestradas dos vasos sanguíneos (KAIPAINEN et al, 1995; WITMER et al., 2001). Dunk e Ahmed (2001) descreveram a expressão deste receptor em células endoteliais e trofoblásticas.

A interação do VEGF com seus receptores, Flt-1 e KDR, ocorre através de dois domínios distintos da molécula de VEGF. Esses domínios de ligação estão localizados em terminações opostas do monômero de VEGF. Esse arranjo espacial está de acordo com observações de que mutações que atingem o sítio de ligação do VEGFR-2 têm efeito mínimo sobre o sítio de ligação com o VEGFR-1 e vice-versa (KEYT et al., 1996). O receptor VEGFR-1 pode ser ativado pelas isoformas 165 e 189 do VEGF-A (PLOUET et al., 1997; POLTORAK et al., 1997). O VEGFR-2 é ativado pelas isoformas contendo 121, 145 e 165 aminoácidos (POLTORAK et al., 1997) e pela isoforma 189; esta última pode ser liberada de maneira lenta após a exposição à heparina e heparinases ou de modo rápido através da clivagem pela plasmina ou pela uroquinase na Carboxila-Terminal (PLOUET et al., 1997).

Na placenta, a localização dos receptores 1 e 2 tem sido observada em diversos tipos celulares, indicando que, além das propriedades angiogênicas, o VEGF apresenta funções adicionais, podendo atuar de maneira parácrina e autócrina em eventos ocorridos durante o estabelecimento e desenvolvimento placentário (CHEUNG, 1995; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001).

Camundongos que não apresentavam os genes codificadores dos receptores para VEGF (Flt-1 e KDR) apresentaram defeitos na vasculogênese fetal e placentária e morreram antes da metade da gestação (FONG et al., 1995). Da mesma forma, embriões de camundongos “knockout” homozigóticos para o gene do VEGF morreram na metade da gestação apresentando sérios defeitos cardiovasculares, além de desenvolvimento anormal da vasculatura extra-embriônica, inclusive placenta e saco amniótico (FERRARA et al., 1996). Estudos de desenvolvimento e “knockout” sugerem que a sinalização do VEGFR-3 é essencial para o desenvolvimento de vasos sanguíneos durante o estágio de embrião.

3.7 Localização do sistema VEGF nas diferentes espécies

Foi demonstrado que o VEGF está associado a angiogênese que ocorre durante o desenvolvimento dos ventrículos cerebrais e glomérulos renais (DUMONT et al., 1995), estando ainda envolvido na resposta angiogênica da membrana corioalantoideana nas galinhas (LEUNG et al., 1989), da córnea de coelhos (PHILIPS et al., 1994), da íris de primatas (TOLENTINO et al., 1996) e de ossos de coelhos (CONNOLLY et al., 1989). Especificamente na placenta, a participação deste fator na angiogênese foi descrita em bovinos (PFARRER et al., 2006), em camundongos (BREIER et al., 1995), no visão (WHINTER, DANTZER, 2001), em ratos (WATANABE et al., 1998), em suínos (WINTHER et al., 1999), em ovinos (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2001, MILLAWAY et al., 1989) e em humanos (AHMED et al., 1995; SHARKEY et al., 1993).

Na placenta humana e de primatas a expressão do VEGFR-2 é restrita às células endoteliais, enquanto o VEGFR-1 foi detectado em células do sinciotrofoblasto (HELSKE et al., 2001; WULFF et al., 2002). Em ovinos, o VEGF é identificado em células citotrofoblásticas, em epiteliais maternas e do músculo liso dos vasos maternos e fetais (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2001). Na placenta dos suínos e visão, ambos os receptores são detectados nas células endoteliais maternas e fetais e também nas células trofoblásticas (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). Na placenta humana o VEGFR-3 é expresso no endotélio de vasos sanguíneos, em células da decídua materna e do sinciotrofoblasto (DUNK; AHMED, 2001; HELSKE et al., 2001), bem como em células do microvilo que envolve o trofoblasto (HELSKE et al., 2001). De acordo com Dunk e Ahmed (2001) a diminuição da expressão do VEGFR-3 pode contribuir para o desenvolvimento anormal dos vilos placentários. Além disso, a localização do VEGFR-1 em células do endométrio, glândulas endometriais e estroma uterino de roedores, indica que este possa modular a decidualização do endométrio no período de implantação embrionária (YI et al., 1999).

Na placenta bovina, Campos (2005) localizou o VEGF e o VEGFR-2 nas diversas idades gestacionais (90, 150, 210 e 270 dias) no citoplasma das células do epitélio e do estroma materno, e em células do epitélio fetal o VEGFR-1 foi localizado no citoplasma de células do epitélio e estroma maternos, células do epitélio e estroma fetais e células endoteliais aos 90, 150 e 210 dias de gestação. Pfarrer et al. (2006) localizaram as proteínas do VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 no

endométrio, trofoblasto e vasos sanguíneos de placentônios sinepiteliocoriais e áreas interplacentomais de bovinos, desde o início da implantação até o termo.

Estudos *in vitro* utilizando células da granulosa de suínos demonstraram que o VEGF apresentou efeito modulatório sobre a esteroidogênese, influenciando tanto a produção de estradiol-17 β como progesterona, sugerindo que o fator tenha um papel modulatório sobre a atividade funcional destas células (GRASSELLI et al., 2002).

Estudos demonstram a relação espaço-temporal da expressão do VEGF e a proliferação de vasos sanguíneos que ocorrem durante os ciclos reprodutivos das fêmeas, indicando ser o VEGF um mediador do crescimento cíclico de vasos sanguíneos que ocorre no útero durante o ciclo estral (KARURI; KUMAR; MUKHOPADHYAY, 1998), da proliferação de capilares que acompanha o crescimento folicular e da angiogênese e manutenção da função capilar no corpo lúteo (BERISHA et al., 2000; OTANI et al., 1999). Berisha et al. (2000) afirmam que todos os componentes do sistema VEGF foram encontrados no corpo lúteo (CL) bovino durante o ciclo estral e prenhez. A concentração da proteína VEGF no CL bovino foi significativamente mais alta na fase inicial, acompanhada de um decréscimo na fase luteínica final, especialmente depois da regressão do CL. Em bovinos, a expressão do sistema VEGF é uma distribuição espaço-temporal durante a gestação (DANTZER; LEACH; LEISER, 2000).

Além das ações predominantes em células endoteliais, a localização dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 em outros tipos celulares sugerem que estes

podem desempenhar outras funções nestas células. Estudos indicam a participação do VEGFR-1 mediando a migração de monócitos (BARLEON et al., 1996), a maturação de precursores megacariocíticos (CASELLA et al., 2003) e a proliferação de células mesangiais renais (TAKAHASHI et al., 1995). Em cadelas a presença de receptores de VEGF em células neoplásicas indica a participação do VEGF como modulador autócrino destas células. Em tumores malignos, o VEGF contribui para o crescimento neoplásico através da indução da angiogênese e estimulação da proliferação de células neoplásicas (RESTUCCI et al., 2004).

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

No presente trabalho, foram realizados experimentos utilizando as técnicas e western blotting e de imuno-histoquímica no tecido placentário bovino e canino, quantificando as proteínas do sistema VEGF nas diferentes fases da gestação de ambas as espécies.

4.1 Amostras e placenta bovina e canina e métodos de coleta para Imuno-histoquímica e Western Blotting

Foram coletadas amostras da cinta placentária de cadelas prenhes (dias 20, 40 e 60), assim como amostras de placentomas bovinos (dias 90, 150, 210 e 270 da gestação).

4.1.1 Amostras de placenta canina para Imuno-histoquímica e Western Blotting

A cinta placentária de cadelas em idade gestacional de 20, 40 e 60 dias (*n*: 4 por grupo), determinada a partir da data da cobertura, foram coletadas após realização de cesariana.

4.1.2 Amostras de placenta bovina para Western Blotting

Os placentônios de diferentes fases da gestação aos (90, 150, 210 e 270 (ou termo) dias), *n*: 4 por grupo, foram coletados em abatedouro na cidade de São José dos Campos / SP, de acordo com a medida atlanto-coccígea.

4.1.3 Coleta dos materiais para Western Blotting

Logo após a excisão dos ovários e útero, o material foi processado para obtenção das regiões do cinturão da placenta, em cadelas, e placentônios, em vacas. Estas foram separadas dos fetos e em seguida injetadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) com a finalidade de se retirar grande parte do sangue contido no interior do tecido, reduzindo possíveis interferências nos resultados. Todos os tecidos, após a coleta, foram fracionados em amostras (0,3 g) para extração de proteínas totais, as quais foram utilizadas em *Western blotting* e então congelados em nitrogênio líquido até o processamento.

4.1.4 Coleta dos materiais para Imuno-histoquímica

Após a retirada dos fetos, os úteros foram abertos por uma incisão, com exposição dos anexos fetais. Três amostras da cinta placentária foram coletadas

aleatoriamente e lavadas com solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,2 e em seguida fixadas com formol tamponado a 4% por 24 horas a 4°C. As amostras foram lavadas em PBS para retirada do excesso do fixador e novamente imersas em PBS por 24 horas a 4°C, antes do início do processo de inclusão.

4.2 Extração das proteínas para Western Blotting

A proteína total das amostras de cadelas, regiões do cinturão da placenta, e de vacas, placentônios, foram homogeneizadas em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN) a 24.000 rpm durante 30s em tampão de homogeneização (Tris HCl 10mM; EDTA 1,0mM; sacarose 250mM) em proporção de 1:6 (peso e volume). Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 1000 g durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então separado e o precipitado ressuspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido à nova centrifugação a 1000 g por 10 minutos, a 4°C. Juntos, os dois sobrenadantes foram submetidos a uma ultracentrifugação a 150.000 g durante 75 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento ressuspenso em tampão de homogeneização e estocado a - 20 °C até sua utilização.

No caso das amostras de placentônios bovinos (0,2g cada) para determinação do VEGF, as mesmas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e depois diluídas em tampão de lise (20 mmol/litro HEPES (pH 7,4), 5 mmol/litro EDTA, 5 mmol/litro dithiothreitol, 1% glicerina, 1% Tween 20 para cada 10 ml de

tampão). Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 20.000 g durante 5 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante separado e estocado a - 70 °C até sua utilização.

4.3 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Preparou-se uma curva padrão de albumina sérica bovina de 0,05 a 1,0 mg/ml para posterior cálculo dos conteúdos de proteína de cada amostra. Os padrões e amostras (100µl) foram acrescidos de 1 ml de uma solução de NaCO₃ (2%), NaOH (0,4%) e CuSO₄, 5H₂O (0,5%), em proporção 50:1 e incubadas a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se solução de fenol Folin Ciocalteau (75 µl) para incubação por 30 minutos a 37°C, seguida de leitura em espectrofotômetro, a 750nm.

Conhecidas as concentrações de proteínas totais das amostras, as mesmas foram submetidas ao *Western Blotting*, sendo utilizadas alíquotas de 80 e 60 µg de proteínas totais, respectivamente, para as espécies canina e bovina, para quantificação do VEGF e de seus receptores Flt-1, KDR e Flt-4.

4.4 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel

Electrophoresis)

Foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (LAEMMLI, 1970) e modificado por Garfin (1990), o qual envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos (Tabela 1):

a) - Gel de empacotamento (*Stacking gel*) = 6%T; 2,7%C.

b) - Gel de separação (*Resolving gel*) = 10%T; 2,7%C.

Antes da aplicação no gel, as amostras foram acrescidas de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05M, *bromofenol blue* 0,05%, SDS 9%) com 6% de 2-mercaptoetanol, 1:1, conforme o volume total, e fervidas por 3 minutos.

Tabela 1 - Constituição dos géis de poliacrilamida para eletroforese - São Paulo - 2006

Gel de Empacotamento	Gel de Separação
Acrilamida 5,8%	Acrilamida 9,7%
Bisacrilamida 0,16%	Bisacrilamida 0,3%
Tris hcl 150 mm ph6,8	Tris hcl 375 mm ph 8,9
Edta 2,5 mm	Edta 2 mm
Sds 0,1%	Sds 0,125%
Temed 0,05%	Temed 0,05%
Persulfato de amônio 0,06%	Persulfato de amônio 0,05%

Iniciou-se a eletroforese (em tampão Tris HCl 25mM, glicina 190mM, SDS 0,1%, EDTA 2mM, pH 8,3) com a corrida no *stacking gel* sob voltagem constante

(75 mV) até que ocorresse o empacotamento das amostras, o que pode ser observado na transição dos géis. Posteriormente, aplicou-se corrente constante de 60 mA para a corrida no gel de separação por aproximadamente 6 horas.

Em cada um dos experimentos, sempre foi utilizado um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (marcadores), o que possibilita a localização da proteína em estudo, e um controle, amostra de 150 dias de placenta bovina, com a mesma quantidade de proteínas totais que as outras amostras.

4.5 Transferência Eletroforética

Após a separação das frações protéicas no gel de poliacrilamida foi realizada sua transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), sob corrente constante de 40 mA, durante 16 horas, a 4°C, em tampão Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3.

A qualidade da transferência foi verificada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Coomassie.

4.6 Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi submetida ao procedimento de imunodeteção de proteínas específicas, seguido de quantificação da quimioluminescência por densitometria, conforme as etapas a seguir:

a) bloqueio em PBS pH 7,2 (NaCl 0,8%; Na₂HPO₄, (12H₂O) 0,115%; KCl 0,02%; KH₂PO₄ 0,02%), acrescido de leite em pó desnatado (5%), durante 60 min, à temperatura ambiente, sob agitação constante;

b) incubação na mesma solução contendo o anticorpo diluído (anti-VEGF 1:200, anti-Flt-1 1:800, anti-KDR 1:500 ou anti-Flt-4 1:500), durante 3 horas, a 37°C. Na incubação com o anti-VEGF nas amostras bovinas o tempo de exposição foi de 24 horas, a 4°C;

c) lavagens com 10ml de PBS-T (PBS 1X + Tween 20, 0,1%) à temperatura ambiente, para retirar o excesso de anticorpo primário;

d) incubação de 1 hora, em temperatura ambiente, em PBS/BSA 1% contendo anticorpo secundário (anti-Ig de coelho), ligado a HRP (*horseradish peroxidase*), na diluição de 1:10000 (Amersham International Buckinghamshire, UK - Ac NIF-824);

e) lavagens em PBS-T para remoção do excesso de Ac/HRP;

f) reação de quimioluminescência: adição da solução (1:1) dos reagentes de detecção A e B (ECL™ Western Blotting Analysis System, RPN 2108) e incubação por 2 minutos sob agitação constante.

4.7 Autorradiografia e Densitometria Óptica (D.O.)

A membrana foi imediatamente exposta a filme de RX (Hyperfilm - Amersham, Buckinghamshire, UK), a temperatura ambiente, durante 1 a 15 minutos. No caso de experimentos com o anti-VEGF e as amostras bovinas, o tempo de exposição junto ao filme foi de 12 horas, a temperatura de 4° C. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX e solução fixadora e reforçadora GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, BR).

A intensidade dos *blots* foi avaliada por densitometria óptica utilizando-se o software Image Master 1D Prime (Pharmacia Biotech, Uppsala, SW) e o resultado numérico foi expresso em unidades arbitrárias (UA). Depois de descontado o background do filme, as amostras foram normalizadas a partir da média de DO das duplicatas, espécie bovina, ou quadruplicatas, espécie canina, de cada gel.

4.8 Preparo do material para inclusão em Histosec®

Em temperatura ambiente o material foi desidratado em uma série crescente de etanol: etanol 70° overnight, etanol 90° por 1 hora e 2 séries de etanol absoluto

de 1 hora cada. Em seguida as amostras foram diafanizadas em xilol em 2 séries de 1 hora cada. Após a diafanização, as amostras foram imersas em 2 banhos com Histosec[®] (Merck, Alemanha) por 1 hora em estufa a 60°C e incluídos na mesma parafina com auxílio de suportes de metal. Após a polimerização da parafina os blocos foram identificados e armazenados em geladeira até a sua utilização.

4.9 Imuno-histoquímica para o Flt-4 na placenta canina

Cortes de 5µm foram feitos e colocados sobre lâminas tratadas com APES (aminopropiltriethoxisilano) em estufa a 37°C por 24 horas. As lâminas foram desparafinizadas em 2 banhos com xilol de 10 minutos cada, seguida de reidratação em uma série decrescente de etanol: 2 banhos em etanol absoluto de 5 minutos cada, etanol 96° e 70° também por 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram imersas em água destilada por 5 minutos e tampão citrato em temperatura ambiente pelo mesmo período. As lâminas foram então submetidas a 3 banhos em tampão citrato (fervente) por 5 minutos cada, no microondas em potência máxima, e resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 3% de peróxido de hidrogênio P.A. em metanol previamente resfriado por 20 minutos a -20°C, e as lâminas imediatamente lavadas em PBS 3 vezes por 5 minutos. Outro bloqueio de reações cruzadas foi feito utilizando-se soro equino diluído 1:10, por 20 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente.

O anticorpo primário anti-Flt-4 foi utilizado na diluição de 1:400. Os cortes controles receberam PBS ao invés do anticorpo primário. A incubação com o anticorpo primário foi feita em câmara úmida a 4°C por 20 horas, no mínimo, sem ultrapassar as 24 horas. Após a incubação com o anticorpo primário as lâminas foram lavadas com PBS, 3 vezes de 5 minutos.

A incubação com o anticorpo secundário universal (Vector Laboratories, Alemanha, BA-1400) na diluição de 1:200 foi feita por 20 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS, 3 vezes de 5 minutos, e incubadas com complexo avidina-biotina ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Alemanha) por 45 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos, e coradas com Nova Red (Vector Laboratories, Alemanha) por 5 minutos, e finalmente lavadas em água destilada 2 vezes por 10 minutos.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, por 30 segundos, lavadas em água corrente por 15 minutos e recobertas com lamínula utilizando-se glicerina tamponada, e depois armazenadas em geladeira por no mínimo 48 horas. A análise dos resultados foi feita em microscópio óptico em aumento de 400 vezes e as imagens fotografadas em aumento de 400 e 200 vezes foram obtidas através do programa KS400.

O tipo celular observado foi o epitélio fetal, sendo distribuídos os seguintes escores para cada tipo celular em cada campo observado: escore 1 para ausência

de reação, escore 2 para reação fraca, escore 3 para reação moderada e escore 4 para reação forte.

4.10 Análise Estatística

O valor das amostras dentro de cada um dos grupos foi analisado por um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), avaliando se existia uma distribuição normal entre os indivíduos do mesmo grupo. A média ($n = 4$) dos valores obtidos em unidades arbitrárias (UA), como a média do conteúdo total de proteína em UA por grama de tecido (UA/g de tecido) foram confrontadas por análises de variância de uma via para dados independentes, seguidas por um teste de Newman-Kewls. Além desta avaliação, estes valores também foram analisados em um teste de correlação de Pearson. Os testes foram realizados com o programa GraphPad Prism versão 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

O conteúdo total de proteína em UA por grama de tecido (UA/g de tecido) é obtido utilizando-se a concentração protéica de cada amostra, seu peso e a sua relação UA/ μ g de proteína total submetida à eletroforese.

4.11 Anticorpos do VEGF e de seus receptores, Flt-1, KDR e Flt-4

Para a localização das proteínas, tanto na Imuno-histoquímica como no Western Blotting, foram utilizados anticorpos comerciais policlonais (Santa Cruz Biotechnonology, Inc) (tabela 2) nas seguintes diluições para Western Blotting: VEGF (1:200), Flt-1 (1:800), KDR (1:500) e Flt-4 (1:500), e na concentração para imuno-histoquímica de 1:300 no Flt-4 canino.

Tabela 2 - Descrição dos anticorpos utilizados nos experimentos - São Paulo - 2006

Anticorpo	Tipo	Hospedeiro	Seqüência	Nº de Catálogo
Anti-VEGF	Policlonal	Coelho	Terminação N do VEGF-A humano	VEGF (A-20): sc-152
Anti-Flt-1	Policlonal	Coelho	Terminação carboxila do Flt-1 humano	Flt-1 (C-17): sc-316
Anti-KDR	Policlonal	Coelho	Terminação carboxila do KDR murino.	Flk-1 (C-20): sc-315
Anti-Flt-4	Policlonal	Coelho	Terminação carboxila Flt-4 humano	Flt-4 (C-20): sc-321

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

As proteínas do VEGF, Flt-1, KDR e Flt-4 foram quantificadas na placenta bovina e canina através da técnica de Western Blotting, posterior análise dos blots por meio de densitometria óptica (software Image Master 1D Prime, Pharmacia Biotech, Uppsala, SW). A técnica de Western Blotting não pode ser otimizada para quantificação da expressão do Flt-4 na placenta canina e foi, apenas neste caso, substituída pela técnica qualitativa de imuno-histoquímica para verificação da expressão desta proteína ao longo da gestação de cães.

A média ($n = 4$) dos valores obtidos em unidades arbitrárias (UA) por 60 ou 80 μg de proteínas totais para as espécies bovina e canina, respectivamente, estão representadas nos gráficos: **1A, 3A, 5A, 7A, 9A, 11A e 13A**, enquanto o valor relativo a cada amostra está representado nos gráficos: **2A, 4A, 6A, 8A, 10A, 12A e 14A**. Nos experimentos com a proteína VEGF, na espécie bovina, foi utilizada uma concentração de 100 μg de proteína total por amostra. O cálculo para o conteúdo total de proteína em UA por grama de tecido está representado em relação às médias dos grupos nos gráficos: **1B, 3B, 5B, 7B, 9B, 11B e 13B** e em relação a cada amostra nos gráficos: **2B, 4B, 6B, 8B, 10B, 12B e 14B**.

A expressão do Flt-4 na placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias) está representada nas figuras **1** (Controle Negativo, Camadas Placentárias e Vasos Sanguíneos) e **2** (Alantocorion, Labirinto Placentário e Corion Frouxo).

5.1 Quantificação do VEGF na placenta bovina

O VEGF, na placenta bovina, em UA/ 100 µg de proteínas totais (Gráfico **1A**), apresenta uma expressão aparentemente crescente na fase inicial da gestação (90 e 150 dias), enquanto no período final da gestação (aos 210 e 270 dias) a proteína demonstra uma expressão constante. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Quando esses valores são considerados em UA/ g de tecido (Gráfico **1B**) a expressão do VEGF aos 90, 150 dias mantém-se constante e decresce aos 210 dias ($p < 0.01$) assim permanecendo até 270 dias.

As amostras, tanto em UA/ 100 µg de proteínas totais (Gráfico **2A**) como em UA/ g de tecido (Gráfico **2B**), apresentaram uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 1 - Análise da proteína VEGF em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **1A**: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/100 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **1B**: Gráfico representando o conteúdo total do VEGF expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Gráfico 2 - Análise da proteína VEGF em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **2A**: Gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/100 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **2B**: Gráfico representando o conteúdo total do VEGF expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.2 Quantificação do Flt-1 na placenta bovina

No tecido placentário bovino, em termos de UA/ 60 µg de proteínas totais (Gráfico **3A**), a proteína do Flt-1 mostra uma expressão crescente na metade inicial da gestação (90 e 150 dias) que permanece constante aos 210 dias e decai aos 270 dias ($p < 0.01$).

Ao analisar estes valores em UA/ g de tecido (Gráfico **3B**), a expressão do Flt-1 aos 90 e 150 dias apresenta-se de modo crescente, decrescendo aos 210 e 270 dias ($p < 0.01$).

As amostras, em UA/ 60 µg de proteínas totais (Gráfico **4A**), não demonstraram uma expressão normal nos grupos de 150 e 210 dias, enquanto as amostras, em UA/ g de tecido (Gráfico **4B**), mostraram uma expressão normal ($p < 0.05$) em cada um dos grupos estudados.

Gráfico 3 - Análise da proteína Flt-1 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **3A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **3B:** Gráfico representando o conteúdo total do Flt-1, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Gráfico 4 - Análise da proteína FIt-1 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **4A**: Gráfico representando o conteúdo do FIt-1 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **4B**: Gráfico representando o conteúdo total do FIt-1 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.3 Quantificação do KDR na placenta bovina

O KDR, na placenta bovina, quando analisado em UA/ 60 μ g de proteínas totais (Gráfico **5A**), demonstra uma expressão crescente na metade inicial da gestação (90 ($p < 0.01$) e 150 dias), enquanto no período final da gestação (aos 210 e 270 dias ($p < 0.05$)) a proteína apresenta uma expressão decrescente.

Na avaliação destes valores em UA/ g de tecido (Gráfico **5B**), a expressão do KDR aos 90 e 150 ($p < 0.01$) dias mostra-se de modo crescente, seguido por um decréscimo aos 210 ($p < 0.05$) e 270 ($p < 0.01$) dias.

As amostras, em UA/ 60 μ g de proteínas totais (Gráfico **6A**) e em UA/ g de tecido (Gráfico **6B**), demonstraram uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 5 - Análise da proteína KDR em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **5A**: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **5B**: Gráfico representando o conteúdo total do KDR, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Gráfico 6 - Análise da proteína KDR em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **6A**: Gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **6B**: Gráfico representando o conteúdo total do KDR expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.4 Quantificação do Flt-4 na placenta bovina

Na placenta bovina, em UA/ 60 µg de proteínas totais (Gráfico **7A**), o Flt-4 apresenta uma expressão aparentemente constante nos três quartos iniciais da gestação (90, 150 e 210 dias), enquanto no quarto final da gestação (270 dias) a proteína demonstra uma expressão decrescente, entretanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Quando estes valores são considerados em UA/ g de tecido (Gráfico **7B**), a expressão do Flt-4 aos 90 e 150 dias mantém-se constante e decresce aos 210 ($p < 0.01$) e 270 ($p < 0.05$) dias.

Na avaliação das amostras, tanto em UA/ 60 µg de proteínas totais (Gráfico **8A**) como em UA/ g de tecido (Gráfico **8B**), foi encontrada uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 7 - Análise da proteína FIt-4 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **7A**: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FIt-4 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **7B**: Gráfico representando o conteúdo total do FIt-4, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Gráfico 8 - Análise da proteína FIt-4 em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias). **8A**: Gráfico representando o conteúdo do FIt-4 expresso em UA/60 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **8B**: Gráfico representando o conteúdo total do FIt-4 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.5 Quantificação do VEGF na placenta canina

No tecido placentário canino, o VEGF, em UA/ 80 µg de proteínas totais (Gráfico **9A**), apresenta uma expressão decrescente ao longo de toda a gestação (20, 40 e 60 ($p < 0,01$) dias).

Quando estes valores são considerados em UA/ g de tecido (Gráfico **9B**), a expressão do VEGF aos 20 e 40 ($p < 0,01$) dias apresenta-se de modo decrescente e assim permanece até os 60 ($p < 0,01$) dias.

As amostras, tanto em UA/ 80 µg de proteínas totais (Gráfico **10A**) como em UA/ g de tecido (Gráfico **10B**), demonstraram uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 9 - Análise da proteína VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **9A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **9B:** Gráfico representando o conteúdo total do VEGF, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

Gráfico 10 - Análise da proteína VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **10A**: Gráfico representando o conteúdo do VEGF expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **10B**: Gráfico representando o conteúdo total do VEGF expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.6 Quantificação do Flt-1 na placenta canina

O Flt-1, na placenta canina, em UA/ 80 μ g de proteínas totais (Gráfico **11A**), apresenta uma expressão decrescente aos 20, 40 e 60 ($p < 0,01$) dias de gestação.

Quando estes valores são considerados em UA/ g de tecido (Gráfico **11B**), a expressão do Flt-1 aos 20 e 40 dias apresenta-se de modo decrescente e assim permanece até os 60 ($p < 0,01$) dias.

As amostras dos grupos de 20 e 40 dias, em termos de UA/ 80 μ g de proteínas totais (Gráfico **12A**), não apresentaram uma distribuição normal, enquanto as amostras em UA/ g de tecido (Gráfico **12B**), demonstraram uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 11 - Análise da proteína FIt-1 em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **11A:** Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do FIt-1 expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **11B:** Gráfico representando o conteúdo total do FIt-1, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

12A Flt-1 Placenta Canina

12B Flt-1 Placenta Canina

Gráfico 12 - Análise da proteína Flt-1 em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **12A**: Gráfico representando o conteúdo do Flt-1 expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **12B**: Gráfico representando o conteúdo total do Flt-1 expresso em UA/g de tecido de cada animal testado.

5.7 Quantificação do KDR na placenta canina

O KDR, na placenta canina, em UA/ 80 μ g de proteínas totais (Gráfico **13A**), apresenta uma expressão crescente aos 20 e 40 ($p < 0.01$) dias, e decai aos 60 ($p < 0.01$) dias de gestação.

Quando estes valores são considerados em UA/ g de tecido (Gráfico **13B**), a expressão do KDR aos 20 e 40 ($p < 0,01$) dias apresenta-se de modo crescente e decresce aos 60 ($p < 0,01$) dias.

As amostras, em de UA/ 80 μ g de proteínas totais (Gráfico **14A**) e em UA/ g de tecido (Gráfico **14B**), demonstraram uma expressão normal ($p < 0.05$) dentro de cada um dos grupos estudados.

Gráfico 13 - Análise da proteína KDR em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **13A**: Blots ilustrativos e gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese. **13B**: Gráfico representando o conteúdo total do KDR, expresso em UA/g de tecido. As barras representam a média $\pm$ EPM de 4 animais. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos

14A KDR Placenta Canina

14B KDR Placenta Canina

Gráfico 14 - Análise da proteína KDR em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias). **14A**: Gráfico representando o conteúdo do KDR expresso em UA/80 µg de proteínas totais submetidas à eletroforese de cada animal testado. **14B**: Gráfico representando o conteúdo total do KDR expresso em UA/g de tecido de cada animal testado

5.8 Imunolocalização do Flt-4 na placenta canina

A localização tecidual do Flt-4 foi feita através do teste de imuno-histoquímica (Figuras **1** e **2**), onde foi observada a localização da proteína no citoplasma das células do epitélio fetal em todas as fases da gestação estudadas (Figura **1** - **D**, **E**, **F**). Além disso, observou-se a localização da proteína testada em células endoteliais (Figura **2** - **G**, **H**, **I**).

Figura 1 - Fotomicrografias da localização da proteína do Flt-4 na placenta de cadelas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal anti-Flt-4. **A-C**: Controles Negativos de 20, 40 e 60 dias, respectivamente; **D-F**: Camadas Placentárias de 20, 40 e 60 dias, respectivamente; **G-I**: Vasos Sanguíneos em placentas de 20, 40 e 60 dias, respectivamente. Barras: 40µm em **A-F** e 10 µm em **G-I**. Seta Cheia = Epitélio Fetal, Seta Vazia = Célula Endotelial

5.8.1 Reação para o Flt-4 nas diferentes fases da gestação na placenta canina

Aos 20 e 40 dias de gestação (Figura 2), na região do alantocorion (Figura 2 - **A, B**) e do labirinto placentário (Figura 2 - **G, H**), a proteína apresenta uma reação forte, enquanto aos 60 dias de gestação temos uma reação moderada no alantocorion (Figura 2 - **C**) e labirinto placentário (Figura 2 - **I**). No corion frouxo, a reação é moderada aos 20 (Figura 2 - **D**) e aos 40 (Figura 2 - **E**) dias e forte aos 60 (Figura 2 - **F**) dias de gestação.

Figura 2 - Fotomicrografias da localização da proteína do Flt-4 na placenta de cadelas. Reações de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal Anti-Flt-4. **A:** Alantocorion 20 dias; **B:** Alantocorion 40 dias; **C:** Alantocorion 60 dias; **D:** Corion Frouxo 20 dias; **E:** Corion Frouxo 40 dias; **F:** Corion Frouxo 60 dias; **G:** Labirinto Placentário 20 dias; **H:** Labirinto Placentário 40 dias; **I:** Labirinto Placentário 60 dias. Barra:10 μ m.Seta Cheia = Eritélio Fetal.

5.9 Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta bovina e canina

Na placenta bovina (Tabela 3), a proteína do VEGF, em UA/ 100 µg de proteínas totais, apresentou uma correlação positiva com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,6157$. Na análise entre os receptores, em UA/ 60 µg de proteínas totais, foi encontrada correlação positiva entre o Flt-1 com o KDR, $p < 0.05$, $r: 0,6151$ e com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,8164$, e do KDR com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,6343$.

Ao longo da gestação, na placenta bovina (Tabela 3), quando analisado em UA/ g de tecido, o VEGF apresentou correlações positivas com o Flt-1, $p < 0.05$, $r: 0,6159$, e com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,8459$. Quando foram analisados os receptores entre si, o Flt-1 demonstrou uma correlação positiva com o KDR, $p < 0.05$, $r: 0,6151$, e com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,8164$, enquanto o KDR apresentou correlação positiva com o Flt-4, $p < 0.05$, $r: 0,5372$.

Na placenta canina (Tabela 4), em UA/ 80 µg de proteínas totais, o VEGF apresentou correlação positiva com o Flt-1, $p < 0.05$, $r: 0,9904$, e com o KDR, $p < 0.05$, $r: 0,5635$. Quando os receptores foram analisados entre si foi encontrada correlação positiva entre o Flt-1 e o KDR, $p < 0.05$, $r: 0,5841$.

Na análise da proteína do VEGF (Tabela 4), em UA/g de tecido, na placenta canina foi encontrada correlação positiva entre o VEGF e o Flt-1, $p < 0.05$, $r: 0,9434$.

Tabela 3 - Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta bovina, tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006

Correlação	UA/ proteínas totais		UA/ g de tecido	
	r	p	r	p
VEGF x Flt-1	0,3140	0,1776	0,6159	0,0038
VEGF x KDR	0,4344	0,0556	0,3463	0,1347
VEGF x Flt-4	0,6157	0,0039	0,8459	P < 0.001
Flt-1 x KDR	0,6151	0,0039	0,6739	0,0011
Flt-1 x FLT-4	0,8164	P < 0.001	0,8274	P < 0.001
KDR x Flt-4	0,5372	0,0146	0,6343	0,0027

Tabela 4 - Correlação entre o VEGF e os seus receptores ao longo da gestação na placenta canina, tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006

Correlação	UA/ proteínas totais		UA/ g de tecido	
	r	p	r	p
VEGF x Flt-1	0,9904	P < 0.001	0,9434	P < 0.001
VEGF x KDR	0,5635	0,0287	0,3839	0,1578
Flt-1 x KDR	0,5841	0,0222	0,3056	0,2681

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi estudada a expressão do VEGF e de seus receptores (Flt-1, KDR, e Flt-4) no tecido placentário bovino e canino, sendo encontradas variações na apresentação do sistema VEGF nos diferentes estágios da gestação estudados. Na placenta bovina, a maior expressão do VEGF e dos seus receptores (Flt-1, KDR e Flt-4) ocorreu na metade inicial gestação (90 e 150 dias), seguido de um declínio próximo ao termo. Na placenta canina, o VEGF e o Flt-1 apresentaram uma elevada expressão no início da gestação e um decréscimo nos dois terços finais da gestação, enquanto o KDR apresentou uma alta expressão na metade inicial da gestação e uma redução próxima ao termo. O Flt-4 demonstrou uma forte reação no alantocorion e no labirinto placentário nos dois terços iniciais da gestação, e no corion frouxo no final da gestação.

Os resultados dos experimentos deste trabalho, na placenta bovina e canina, estão de acordo com o que é dito na literatura sobre a presença do sistema VEGF no tecido placentário de diversas espécies ao longo da gestação: humanos (AHMED et al., 1995; DEMIR et al., 2004; SHARKEY et al., 1993; WULFF et al., 2002) bovinos (PFARRER et al., 2006); camundongos (BREIER et al, 1995); ovinos (ARNOLD et al, 2001; BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2001, MILLAWAY et al, 1989); ratos (WATANABE et al, 1998); suínos (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999); visão (WINTHER; DANTZER, 2001). Em complemento a sua localização na placenta, também foi descrito que o sistema VEGF atua localmente de forma autócrina e/ou parácrina e estimula a formação e manutenção do leito vascular placentário (WINTHER;

AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). Além destas funções, acredita-se que este sistema module a função de células placentárias não relacionadas à vascularização, como as células trofoblásticas gigantes e as células trofoblásticas mononucleares (PFARRER et al., 2006; WINTHER; DANTZER, 2001). Neste contexto, a caracterização e a quantificação conjunta da expressão protéica do VEGF e dos seus receptores tanto na placenta canina (endoteliocorial e labiríntica) como na placenta dos ruminantes (sinepteliocorial e vilosa), realizada neste trabalho, contribui para a melhor caracterização do papel deste sistema nestes dois diferentes tipos placentários.

Na placenta, o VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante do VEGF-A, embora também sejam identificadas as proteínas contendo 121, 145, 189 e 206 aminoácidos (CHEUNG, 1997; CHEUNG et al., 1995; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; SHARKEY et al., 1993, TAMMELA et al., 2005). A presença específica destas isoformas na placenta foi levada em consideração na escolha do anticorpo anti-VEGF utilizado neste trabalho (VEGF (A-20) sc-152 Santa Cruz Biotechnonology, Inc) que reconhece as isoformas 165 e 189 (HOUCK et al., 1991). No caso do anticorpo contra o Flt-4 (Flt-4 (C-20): sc-321, Santa Cruz Biotechnonology, Inc), este se mostrou eficiente apenas nos experimentos de Western Blotting realizados com a espécie bovina e não nos experimentos realizados com a espécie canina. Uma das hipóteses formuladas para a falha no reconhecimento podem estar associadas às diferenças encontradas entre o Flt-4 humano (ORLANDINI et al., 2006; PAJUSOLA et al., 1992) e o Flt-4 canino (RID: 1161176466-26761-171435979204.BLASTQ4), homologia de 89%), onde foram observadas diferenças em 11 aminoácidos na região da terminação carboxila, a mesma utilizada para a confecção do anticorpo. As mesmas

alterações não foram encontradas na comparação entre o Flt-4 humano (ORLANDINI et al., 2006; PAJUSOLA et al., 1992) e o Flt-4 bovino (RID: 1162758086-21532-177161168759. BLASTQ4, homologia de 91%). A escolha dos anticorpos contra o Flt-1 e KDR levaram em consideração a metodologia utilizada por Campos (2005) e Pfarrer et al. (2006), sendo que ambas demonstraram eficiência nos experimentos de imuno-histoquímica para a espécie bovina e, no presente trabalho, esses anticorpos também foram capazes de reconhecer as proteínas em questão para a espécie canina. Essa compatibilidade entre as espécies (bovina, canina e humana) foi comprovada através da comparação entre as proteínas dos receptores Flt-1 e KDR (Flt-1 Humano - WU et al., 2006 x Flt-1 Canino RID: 1162758636-8304-141862769282. BLASTQ4, homologia de 89%; Flt-1 Humano x Flt-1 Bovino: RID: 1162758961-14702-3501631629. BLASTQ2, homologia de 92%; KDR Humano x KDR Canino: RID: 1162759219-19751-136846568525. BLASTQ4, homologia: 93%; KDR Humano x KDR Bovino: RID: 1162759798-29337-189025229212. BLASTQ4, homologia: 92%)

Os resultados obtidos nos permitem desenvolver várias associações com a literatura sobre o papel do sistema VEGF na placenta, e estas irão se centrar nos perfis da expressão deste sistema em ambas as espécies, estando embasadas nas diferenças estatísticas encontradas nas proteínas estudadas, quando foram consideradas em termos de UA/g de tecido. Todavia, antes da análise das médias, cabe salientar a variação encontrada em alguns dos grupos, como na expressão do Flt-1 na placenta bovina entre as amostras de 150 e 210 dias, e na placenta canina entre as amostras de 20 e 40 dias, grupos estes que não apresentaram uma distribuição normal, o que pode estar relacionado à diferença de regime alimentar

entre os indivíduos do experimento. Este raciocínio tem como base o fato das amostras terem sido coletadas durante campanhas de castração, no caso de cadelas, e em abatedouros, no caso de vacas, o que restringiu o nosso acesso ao histórico dos animais. Essa provável diferença alimentar pode levar à variação na expressão dos fatores estudados, o que já foi demonstrado por Arnold et al. (2001) em estudo realizado com ovelhas jovens, no qual foi observada uma queda de 50% na expressão do mRNA do Flt-1 e do KDR em animais que tiveram sua dieta reduzida a 60% dos níveis recomendados pelo NRC durante o segundo e terceiro terços de gestação. Em um estudo realizado com ovelhas jovens, Redmer et al. (2005) demonstrou uma menor expressão do mRNA do VEGF e do Flt-1 na placenta de animais que receberam uma dieta de elevado valor energético, quando estas foram analisadas aos 81 dias de gestação. Além destes trabalhos, existem outros que demonstraram a influência de outros fatores, como stress térmico (REGNAULT et al., 2002, 2003), idade materna (BOROWICZ et al., 2005) alta altitude e conseqüente hipóxia crônica (MAYHEW et al., 2004; WHEELER et al., 2002, estudo realizado na Bolívia) na expressão dos fatores angiogênicos na placenta (REYNOLDS et al., 2005 b).

No presente estudo, a expressão do VEGF na placenta bovina apresentou um perfil decrescente nos três quartos iniciais da gestação (90, 150 e 210 dias; $p < 0,01$) que se manteve no mesmo nível no quarto final da gestação. Apesar do uso de uma abordagem qualitativa por Campos (2005), a autora descreve a expressão do VEGF na placenta bovina em todas as idades gestacionais estudadas, tanto nas células do epitélio e estroma maternos quanto em células do epitélio fetal, embasando assim os dados apresentados no presente trabalho. Pfarrer et al. (2006) também descreveram

uma forte imuno-reação do VEGF do início até a metade da gestação em células trofoblásticas gigantes bovinas. A presença da proteína do VEGF ao longo da gestação indica a sua importância no estabelecimento da função placentária, com a sua maior expressão na fase inicial da gestação (90 e 150 dias) altamente relacionada ao desenvolvimento do leito vascular placentário e o seu decréscimo na fase final da gestação (210 e 270 dias), na qual sua expressão estaria relacionada com a manutenção deste leito (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999; WINTHER; DANTZER, 2001). Estando de acordo com esta hipótese, temos a queda na expressão do VEGF observada neste trabalho a partir da metade da gestação, que ocorre no mesmo período (6º mês de gestação) no qual a arquitetura vascular placentária bovina mostra-se totalmente desenvolvida (PFARRER et al., 2001). Além disso, Sharkey et al. (1993) sugerem que o VEGF teria a função de regular a permeabilidade vascular na placenta humana próxima do termo, uma vez que a extensiva angiogênese do início não mais seria necessária.

Na placenta canina, o VEGF apresentou uma expressão decrescente nos dois terços iniciais da gestação (20 e 40 dias) e constante no terço final da gestação (60 dias) ($p < 0,01$). A maior expressão do VEGF durante o início da gestação concorda com o trabalho de Aitkenhead et al. (1998), que considera o VEGF como um mediador autócrino e parácrino, associado a angiogênese durante a embriogênese. Em um estudo qualitativo na placenta endoteliocorial do visão, Winther e Dantzer (2001) relataram a expressão do VEGF no início e no meio da gestação no sinciotrofoblasto e no citotrofoblasto, nas células endoteliais da microvasculatura materna e fetal. Os autores também descreveram a presença do VEGF ao longo da gestação nas células do mesênquima fetal e no epitélio glandular materno. A

localização do VEGF nas células endoteliais, onde o efeito mitogênico deste fator é amplamente conhecido (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003), vai de encontro aos resultados descritos neste trabalho, que mostram uma maior expressão da proteína no período inicial da gestação. Essa maior expressão sugere a atuação do VEGF, por meio da sua interação com o seu receptor KDR (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; MEYER; CLAEISSON-WELSH, 2006), na sinalização do início da angiogênese na placenta endoteliocorial, que é um dos responsáveis pela proliferação de células endoteliais fetais e materno-fetais neste período (WINTHER; DANTZER, 2001). A observação do VEGF em células não-endoteliais sugere que este sistema pode ser responsável por outras funções na placenta, como a diferenciação celular e o aumento da permeabilidade no epitélio uterino e nas membranas fetais (trofoblasto), afetando o desenvolvimento e o crescimento placentário (Winther; Dantzer, 2001). De acordo com esta linha de pensamento, um estudo realizado na placenta hemocorial humana (JACKSON et al., 1994), evidenciou a localização do VEGF no citotrofoblasto durante o primeiro trimestre da gestação, e no segundo e terceiro trimestres no sinciotrofoblasto.

Além das ações do VEGF, cabe também explorar os mecanismos que regulam a sua expressão gênica e protéica, sendo o fator mais estudado a hipóxia (DOR, et al.; 2001; TAMELA et al., 2005; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005). Todavia outros mecanismos também são citados: os fatores de crescimento, a mutação da P53, o estrógeno, o TSH (hormônio tireóideo estimulante), os promotores tumorais e o NO (óxido nítrico) (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; TAMELA et al., 2005; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005). O mecanismo de regulação transcriptional da hipóxia está bem estabelecido, sendo o HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) o

mediador chave nas respostas da mesma (SEMENZA, 2002; VAPEL, 2004). O HIF-1 consiste de duas subunidades o HIF-1 α e o HIF-1 β , o HIF-1 α é uma proteína citoplasmática responsável aos níveis de oxigênio, enquanto o HIF-1 β é uma proteína nuclear expressa independentemente da tensão de oxigênio. Em resposta a hipóxia, o HIF-1 α é estabilizado e translocado para o núcleo, onde forma um heterodímero com o HIF-1 β originando a forma ativa da proteína do HIF-1 (BYRNE et al., 2005; VAPEL, 2004). A HIF-1 ativa se liga a específicos elementos responsivos a hipóxia (HREs) na região promotora do gene do VEGF, o que por sua vez aumenta transcrição do VEGF (BYRNE et al., 2005; SEMENZA, 2002; TAMELA et al., 2005; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005; VAPEL, 2004). Uma outra proteína envolvida na indução da expressão do VEGF pela hipóxia é o HuR (proteína de estabilização do mRNA), que se liga e estabiliza o mRNA do VEGF e promove a sua transferência para o citoplasma (LEVY et al., 1998). Diversos estudos na placenta humana (JAUNIAUX et al., 2001; RODESCH et al., 1992; SOOTHILL et al., 1986) estabeleceram que a tensão de oxigênio, na oitava semana de gestação, no espaço intervilo é menor que 20 mmHg, mas, após a décima segunda semana de gestação, a tensão de oxigênio é maior que 50 mmHg. As tensões aumentam gradualmente, atingindo o seu máximo de 60 mmHg aproximadamente na décima sexta semana de gestação, seguido de um declínio gradual para 45 mmHg até o termo (JAUNIAUX et al., 2001; RODESCH et al., 1992). Deve ser dito que os valores mensurados no primeiro trimestre são baixos, entretanto estes são valores de gestações normais e, por isso, não podem ser descritos como hipóxia, sendo a descrição mais precisa a de uma baixa tensão de oxigênio (CHARNOCK-JONES et al., 2004). A partir destes dados é possível tecer uma relação com os resultados obtidos neste trabalho: o VEGF, em ambas as espécies estudadas, apresentou uma

alta expressão no início da gestação e metade da gestação e decaiu no terço final. A tensão de oxigênio acompanhou a expressão do VEGF, exceto na fase inicial da gestação quando esta se apresentou baixa, momento no qual o leito vascular ainda encontrava-se em formação e a perfusão tecidual ainda não havia atingido sua capacidade máxima.

Em seu trabalho na placenta bovina a autora Campos (2005) localizou a proteína do VEGFR-1 no citoplasma de células do epitélio e estroma maternos, células do epitélio e estroma fetais e células endoteliais aos 90, 150 e 210 dias de gestação; todavia aos 270 dias de gestação as células do estroma fetal mostraram reação negativa para a proteína. Pfarrer et al. (2006) relataram a presença do Flt-1 em células trofoblásticas gigantes próximas à placa coriônica do placentoma bovino ao longo de toda a gestação. O presente trabalho quantificou a expressão desta proteína na placenta bovina, demonstrando uma expressão crescente entre 90 e 150 dias de gestação, e decrescente entre 210 e 270 dias ($p < 0.01$). A quantificação do Flt-1 aos 270 dias de gestação no presente trabalho foi possível em virtude do placentoma ser constituído por quatro grandes grupos celulares e não apenas por células do estroma fetal, nas quais este receptor não foi expresso em placentas de termo (Campos, 2005). Uma técnica que poderá vir a esclarecer as diferenças quantitativas de expressão entre os distintos grupos celulares é a técnica de microdissecção a laser (EMMERT-BUCK et al., 1996). Esta técnica torna possível, através da identificação microscópica das células de interesse no tecido intacto, a extração de tipos celulares específicos e a subsequente extração do seu RNA, permitindo a análise deste material por técnicas de hibridização microarray (WANG et al., 2006). O que forneceria dados gênicos característicos de cada um dos tipos

celulares estudados e permitiria uma comparação precisa com os resultados proteícos.

O Flt-1 na placenta canina apresenta uma maior expressão aos 20 dias de gestação, seguida de uma queda aos 40 dias e manutenção da sua expressão até 60 dias de gestação ($p < 0.01$). Em concordância com os nossos achados, um estudo de Winther e Dantzer (2001) na placenta endoteliocorial do visão, também demonstraram a presença do Flt-1 em células da microvasculatura materna e fetal e células trofoblásticas, mas com uma diferença temporal na localização destas células. No início da gestação a localização primária do Flt-1 é o sinciotrofoblasto, enquanto nos estágios subseqüentes da gestação a proteína se concentra nas células da microvasculatura materna e fetal e no citotrofoblasto (WINTHER; DANTZER, 2001). Na placenta humana, a proteína do Flt-1 foi encontrada expressa em células trofoblásticas vilosas e extravilosas (AHMED et al., 1997; CLARK et al., 1996). Em gestações normais na placenta humana, o trofoblasto fetal invade a decídua materna e remodela as artérias espirais, convertendo elas em vasos de baixa resistência, já em gestações complicadas pela pré-eclampsia, esta invasão de células trofoblásticas é inadequada, resultando em uma baixa perfusão placentária e hipóxia (HELSKE et al., 2001; LIM et al., 1997; ZHOU et al., 1998). A expressão do mRNA do VEGFR-1 é regulada positivamente de duas a três vezes em condições de hipóxia e pela ativação de macrófagos (CLAUSS et al., 1996; GERBER et al., 1997; NOMURA et al., 1995). Quando são comparados os valores da expressão do Flt-1 na placenta canina, com os valores normais de tensão de oxigênio no espaço intervilloso ao longo da gestação (JAUNIAUX et al., 2001; RODESCH et al., 1992; SOOTHILL et al., 1986), podemos observar que o VEGFR-1 se comporta de acordo

com o que é descrito na literatura, mostrando uma alta expressão em baixas tensões de oxigênio e decaindo quando exposto a altas tensões de oxigênio.

As funções do Flt-1 na placenta estão relacionadas a manutenção e fina regulação da formação dos vasos sanguíneos, recrutamento de células endoteliais progenitoras e modulação da atividade angiogênica na placenta, enquanto que o KDR atua em ações mitogênicas, angiogênicas e de ampliação da permeabilidade vascular (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; MEYER; RAHIMI, 2003; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). Em complemento a essas funções, estudos de Hirashima et al. (2006) demonstraram, tanto na placenta humana como na do rato, que a maior parte da proteína Flt-1 produzida é a forma solúvel ou sFlt-1, que atua como um antagonista da ação do VEGF e que pode ser secretada na corrente sanguínea. Por isso, é sugerido que o Flt-1 derivado do trofoblasto pode agir como um modulador da influência angiogênica da placenta, atuando se os níveis de VEGF se elevarem anormalmente na placenta (HIRASHIMA et al, 2006). Em um recente estudo, Nevo et al. (2006) afirmaram que a expressão placentária do sFlt-1 é aumentada tanto fisiológica quanto patologicamente por baixos níveis de oxigênio. Este efeito induzido pelo oxigênio é mediado pelo fator de transcrição HIF-1 (LI et al., 2005), o mesmo que regula a expressão do VEGF em condições de hipóxia (BYRNE et al., 2005; VAPEL, 2004). No presente trabalho, tanto na placenta bovina quanto na canina, uma correlação positiva do VEGF com o Flt-1 ($r = 0,6159$, $p < 0.05$ e $r = 0,9434$, $p < 0.05$, respectivamente) foi encontrada ao longo da gestação. Esta alta correlação corrobora com a importância da relação entre o VEGF e o VEGFR-1 e sugere que a interação entre o sFlt-1 e o VEGF seja necessária para a regulação negativa da angiogênese durante a metade inicial da gestação nas duas espécies.

Estudos em camundongos knockout VEGFR-1^{-/-}, que vieram a morrer no oitavo dia embrionário devido a proliferação exagerada de células endoteliais e a desorganização dos vasos sanguíneos (FONG et al., 1995) comprovam a importância deste receptor.

Na placenta bovina, a correlação encontrada ($r = 0,6159$, $p < 0.05$) entre o VEGF e o Flt-1 é condizente com a expressão decrescente do VEGF e crescente do Flt-1 na metade inicial da gestação (90 e 150 dias). Um comportamento semelhante também é observado na espécie canina, no entanto a correlação positiva encontrada entre o VEGF e o Flt-1 é mais alta ($r = 0,9434$, $p < 0.05$). Esses dados sugerem que a angiogênese da placenta canina seja mediada principalmente pelo Flt-1 antes do término do primeiro terço (20 dias de gestação). Park et al. (1994) inicialmente propuseram que o VEGFR-1 poderia não ser primariamente um receptor para a mediação de um sinal mitogênico, mas sim um receptor de decodificação, capaz de regular de maneira negativa a atividade do VEGF no endotélio vascular, através da prevenção da ligação do VEGF com o VEGFR-2. Entretanto, essa decodificação poderia estar acontecendo não apenas pela forma completa do VEGFR-1, ligada à membrana, mas também pela forma solúvel do Flt-1 (CARMELIET, 2001). Tal possibilidade se baseia em estudos realizados por Maynard et al. (2003), que encontraram um aumento na expressão do sFlt-1 no tecido placentário de mulheres com um quadro de pré-eclampsia, e também em estudos de Li et al. (2005) que demonstraram um aumento na expressão do sFlt-1 em células trofoblásticas cultivadas em condições de hipóxia. Além disso, estudos de Tsatsaris et al. (2003) na placenta humana sugerem dois diferentes mecanismos patofisiológicos associados com a pré-eclampsia e com as duas formas do Flt-1: o primeiro seria

decorrente de uma alta produção da competitiva forma solúvel do Flt-1 que poderia levar a uma supressão na ação do VEGF e do PlGF e o segundo de uma baixa regulação da forma do receptor Flt-1 ligada à membrana, o que poderia resultar em desenvolvimento útero-placentário deficiente. Estes estudos permitiriam uma explicação condizente para a alta expressão encontrada no Flt-1 na placenta canina aos 20 dias de gestação, fase em que o receptor atuaria como um modulador da ação angiogênica do VEGF, que também demonstra uma alta expressão durante este mesmo período, reduzindo a disponibilidade do VEGF para a ligação com o VEGFR-2 (TSATSARIS et al., 2003). No caso da expressão do Flt-1 na placenta bovina, a sua alta expressão nos três quartos iniciais da gestação (90, 150 e 210 dias) teria no primeiro momento (90 dias) a função moduladora na angiogênese, mas depois (aos 150 e 210 dias) o receptor passaria a atuar como um mantenedor da mudança da angiogênese de uma formação de árvore vilosa, para uma não vilosa, através da competição com o VEGFR-2 (MAYHEW et al., 2004), de modo semelhante ao que acontece neste mesmo período da gestação na placenta hemocorial humana (MAYHEW et al., 2004; KAUFMANN et al., 2004). Todavia o anticorpo utilizado neste trabalho não é específico para a forma solúvel do Flt-1, visto que região carboxila terminal deste receptor difere daquela apresentada pelo receptor transmembrânico, ambos codificados por splice alternativo de RNA (ORECHIA et al., 2003). A utilização de um anticorpo específico para a forma solúvel poderia esclarecer a expressão da mesma nas espécies estudadas.

Pfarrer et al. (2006) localizaram a proteína do VEGFR-2 no trofoblasto e no epitélio uterino na região de formação do placentoma. A maior reação do VEGFR-2 em todo o placentoma foi observada no epitélio uterino nas extremidades do septo

materno, aonde o crescimento da parte materna ocorre. A imunoreatividade e a variação espaço-temporal mostraram declínio nas células mononucleares trofoblásticas, mas a reatividade permaneceu nas células gigantes trofoblásticas e no epitélio materno até a metade inicial da gestação (PFARRER et al., 2006), o que indica que o VEGF e o VEGFR-2 são importantes para a maturação inicial e para o crescimento das células trofoblásticas mononucleares. A presença do VEGFR-2 na área de crescimento do placentoma (PFARRER et al., 2003, 2006) concede suporte para a sua importância no desenvolvimento das carúnculas dos placentomas bovinos. Como já foram demonstradas as características de quimiotaxia do VEGF para as células endoteliais (YOSHIDA; ANAND-APTE; ZETTER, 1996), a ligação do VEGF com o VEGFR-2 no trofoblasto e no epitélio uterino bovino podem atrair células endoteliais e assim propagar a angiogênese, o crescimento placentomal e a troca materno-fetal. Confirmando esta função específica do KDR, estudos (ROUSSEAU et al., 2000) demonstram que o VEGF aumenta a migração celular in vitro por meio do VEGFR-2, mas não por meio do VEGFR-1. Uma reação citoplasmática positiva para a proteína do VEGFR-2 também foi observada por Campos (2005) em células do epitélio e estroma maternos, células do epitélio e estroma fetais e células endoteliais em todas as idades gestacionais investigadas (90, 150, 210 e 270 dias). Ambos os estudos concordam com os resultados obtidos neste trabalho, no qual a expressão do KDR se apresenta de forma crescente ($p < 0,05$) na metade inicial da gestação (90 e 150 dias), e se torna decrescente na fase final da gestação (210 e 270 dias), demonstrando a importância deste receptor no desenvolvimento primário dos placentomas no início da gestação.

Neste trabalho a expressão do KDR, na placenta canina, se apresenta de forma crescente entre os dias 20 e 40 e decresce aos 60 dias de gestação ($p < 0.01$). Em acordo com estes resultados, de maneira semelhante ao que já foi descrito para o VEGF na placenta do visão, os autores Winther e Dantzer (2001), encontraram ao longo da gestação a alta expressão do KDR nas células da microvasculatura materna e fetal. Além disso, os mesmos autores (WINTHER; DANTZER, 2001), também descrevem a elevada expressão do VEGFR-2 na metade inicial da gestação, tanto no sinciotrofoblasto como no citotrofoblasto, passando a proteína a se restringir apenas ao citotrofoblasto próximo ao termo. Tais achados são condizentes com os resultados encontrados no presente trabalho, e permitem tecer similaridades entre as duas espécies. A atividade mitogênica das células endoteliais da microvasculatura da placenta materna é muita intensa no começo da gestação no visão (WINTHER et al., 1999), adicionalmente a remodelação das paredes dos vasos, caracterizada pelo aparecimento das células periendoteliais, é muito intensa no meio da gestação, indo ambas as descrições ao encontro da expressão crescente do KDR durante este período. Além disso, no final da gestação a atividade mitogênica das células endoteliais materno-fetais decai dramaticamente (WINTHER et al., 1999; WINTHER; DANTZER, 2001), assim como a presença das células periendoteliais nas paredes dos vasos, estando de acordo com a queda na expressão do VEGFR-2 observada no período final da gestação na placenta canina. Em um estudo na placenta de sagüis, Wulff et al. (2002) demonstraram que no início da gestação (7 a 10 semanas) o mRNA do KDR está expresso em altos níveis nas células mesenquimais do trofoblasto. Como já foi descrito por Bernatchez et al. (1999), é nesta região que acontece a diferenciação das células endoteliais para a formação dos capilares fetais, processo onde a ação do KDR é requerida. Ainda no

estudo de Wulff et al., (2002), eles observaram a redução na expressão do KDR nos capilares fetais no período do meio da gestação, o que pode ocorrer após a diferenciação das células endoteliais e o início da formação dos capilares na placenta fetal. Os achados deste estudo, também são condizentes com o perfil crescente do VEGFR-2 na metade inicial da gestação e com o seu decréscimo próximo ao termo, o que poderia evidenciar uma função semelhante do receptor à que foi descrita na placenta dos sagüis, visto que WINTHER e DANTZER (2001), também encontraram o KDR, durante o mesmo período, tanto no sinciotrofoblasto como no citotrofoblasto.

Em ambas as espécies, bovina e canina, a maior expressão do KDR na fase inicial da gestação confirma o seu papel como mediador da ação mitogênica e angiogênica do VEGF, o que pode ser comprovado por estudos (SHALABY et al., 1995) com ratos VEGFR-2^{-/-} que apresentaram morte embrionária ente os dias 8 e 9, devido à ausência do crescimento de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos, assim como uma extrema redução na hematopoiese. Além disso, estudos (PARENTI et al., 1998; PEDRAM et al., 1998) demonstram que o VEGF estimula a síntese de DNA e a proliferação celular via o VEGFR-2 e a ERK1/2 (extracelular-regulated kinase-1/2). A via da MAPK (mitogen activated protein kinase) também está envolvida no processo de proliferação celular em resposta ao VEGF, sendo possivelmente o KDR o receptor que media esta ativação (KROLL; WALTENBERGER, 1997). O VEGF também induz a migração celular pela ativação de fatores como a FAK (focal adhesion kinase) e Paxilin e também pela via da PI3 Kinase/Akt (phosphatidilinositol 3-kinase), com a ativação da FAK mediada pela região C-terminal do VEGFR-2 (QI; CLAESSION-WELSH, 2001). Através da

utilização de formas mutantes do VEGF (GILLE et al., 2001) foi determinado que apenas a ativação do VEGFR-2 e não do VEGFR-1 resulta na fosforização da p38, e migração celular endotelial. Shen et al. (1998) sugeriram que o VEGF regula positivamente a expressão do seu próprio receptor KDR através da sua ligação com o mesmo: foram tratadas células endoteliais dos capilares do córtex da adrenal bovina com VEGF e estas aumentaram a transcrição do gene do KDR, e subsequentemente a expressão do receptor KDR na superfície celular. Kappel et al. (1999) mostraram que a sequência regulatória do gene VEGFR-2 não está apenas presente na região não codificada 5', mas também na região 3' do primeiro intron, sendo os dois sítios necessários para a regulação da expressão gênica do VEGFR-2 em células endoteliais vasculares (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). Estes mecanismos são condizentes com a correlação positiva encontrada entre o VEGF e o VEGFR-2 na placenta canina ($r: 0.5635$, $p < 0.05$) nos experimentos deste trabalho, e vão de encontro ao que é dito na literatura sobre o KDR ser o principal fator das ações mitogênicas, angiogênicas e de ampliação da permeabilidade vascular do VEGF (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; MEYER; RAHIMI, 2003; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006), além de reforçar que foi proposto por Shen et al. (1998) sobre a regulação positiva do VEGF sobre o VEGFR-2.

Os resultados deste trabalho demonstram a expressão do Flt-4 de forma constante na placenta bovina aos 90 e 150 dias ($p < 0,05$), seguido por um decréscimo na sua expressão aos 210 e 270 dias de gestação ($p < 0,05$). Esse comportamento da proteína está de acordo ao que foi descrito por Veikkola et al. (2001), quando eles sugerem ter o VEGFR-3 um papel essencial no desenvolvimento dos vasos sanguíneos até a metade inicial da gestação, e com os

achados de Dumont et al. (1998) que relatam a importância do Flt-4 na angiogênese embrionária, demonstrando que camundongos knockout para o VEGFR-3 falham em desenvolver uma vasculatura adequada e morrem no 9º dia embrionário. Resultados estes, que vão de encontro a alta expressão do Flt-4 observada na metade inicial da gestação, mesmo período onde também foi encontrado uma elevada expressão do KDR. As células linfáticas endoteliais representam uma forma diferenciada das células endoteliais, todavia o processo de diferenciação do endotélio para artérias, veias e linhagens linfáticas ainda não é bem compreendido em nível molecular (ILJIN et al., 2001). Recentes evidências sugerem que as artérias e veias são geneticamente determinadas nos primeiros estágios da vasculogênese (ADAMS et al., 1999; WANG et al., 1998). Entretanto, ainda é desconhecido precisamente em qual estágio os vasos linfáticos são determinados. Uma das possibilidades é que o VEGF-C e o VEGF-D, expressos pelas células da musculatura lisa das artérias e das veias, estejam envolvidos no controle da formação dos vasos linfáticos em torno dos sanguíneos (PARTANEN et al., 2001). Após a formação vascular fetal, na continuidade do desenvolvimento da gestação, a maior parte dos receptores Flt-4 se restringiriam ao leito endotelial venoso (KAIPAINEN et al., 1993, 1995), o que poderia explicar a menor expressão desta proteína encontrada na metade final da gestação (210 e 270 dias). É possível supor que a partir do Flt-4 presente no endotélio venoso, por meio da ação do VEGF-C e do VEGF-D, como proposto por Partanen et al. (2001), se inicie a formação dos vasos linfáticos, visto que no final da gestação e na vida adulta a presença deste receptor se restringe a este tecido (ILJIN et al., 2001; KAIPAINEN et al., 1993, 1995). Nos estágios subseqüentes da embriogênese (OLIVER; DETMAR, 2002), a expressão do VEGFR-3 não é mais encontrada nas células vasculares endoteliais, mas permanece nas células linfáticas

endoteliais (KAIPAINEN et al., 1993, 1995; TAIPALE et al., 1999). Estudos de Veikkola et al. (2001) evidenciaram que apenas a sinalização do VEGFR-3 é suficiente para gerar todos os sinais secundários envolvidos no desenvolvimento de vasos linfáticos funcionais in vivo, o que torna importante a caracterização da localização e da expressão deste receptor. Os genes do VEGFR-3 humano e do camundongo, incluindo as suas extensões promotoras, já foram caracterizados, e estudos para a identificação dos elementos promotores que controlam a expressão vascular e linfática do VEGFR-3 estão em andamento (ILJIN et al., 2001; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006). A partir dos estudos acima, pode-se hipotetizar que o Flt-4 na placenta participe ativamente no desenvolvimento vascular até a metade inicial da gestação, e depois contribui para a formação das células percursoras linfáticas do feto (ILJIN et al., 2001; KAIPAINEN et al., 1993, 1995; TAIPALE et al., 1999).

Os resultados obtidos neste trabalho, na placenta canina, evidenciaram nas regiões do alantocorion e do labirinto placentário uma reação forte do Flt-4 aos 20 e 40 dias de gestação e uma reação moderada aos 60 dias, já no corion frouxo foram observadas reações moderadas nos dois terços iniciais da gestação (20 e 40 dias) e uma reação forte no terço final (60 dias). Estudos com camundongos (KAIPAINEN et al., 1995; KUKK et al., 1996) demonstraram que a expressão do Flt-4 começa a partir do 8º - 9º dia embrionário, sendo o mRNA deste receptor localizado nos angioblastos do mesenquima, na veia cardinal, nas veias sinusoidais periféricas, no endotélio das lacunas venosas, e no alantóide. A localização do Flt-4 na região do alantóide e nas células endoteliais permite traçar um paralelo com a forte reação encontrada para a mesma proteína no alantocorion e no labirinto placentário aos 20

dias de gestação. O estudo de Veikolla et al. (2001) salienta a importância do VEGFR-3, ao lado do VEGFR-2, no desenvolvimento vascular até a metade da gestação. Embasando esta hipótese, os estudos de Kaipainen et al. (1993, 1995), complementam que durante a continuidade do desenvolvimento do camundongo a maior parte da expressão do mRNA do VEGFR-3 gradualmente se torna restrita ao endotélio venoso, período onde encontramos uma forte reação imuno-histoquímica da proteína nas regiões do alantocorion e do labirinto placentário (40 dias de gestação). Esta é a mesma fase na qual a placenta canina apresenta o saco alantóide com uma desenvolvida vasculatura e abundantes vasos sanguíneos que partem do cordão umbilical para o feto, vasos estes que formarão a vasculatura do saco vitelínico (MIGLINO et al., 2006).

Em mamíferos, a maioria das perdas embrionárias (30% dos óvulos fertilizados na maior parte das espécies, incluindo bovinos, é algo em torno de 50%) ocorre durante o início da prenhez (EDEY, 1969; SHORT, 1984). Na espécie bovina, taxas de 90% de fertilização são seguidas por índices de nascimento de apenas 50-60%, com a maioria das perdas causadas pela morte embrionária no começo da gestação (MAURER; CHENAULT, 1983; SREENAN; DISKIN, 1984), fato que compromete pesadamente a reprodução bovina. Uma das razões para tais perdas pode ser uma insuficiência na função e/ou desenvolvimento da vasculatura da região de contato materno-fetal, como foi demonstrado em embriões de camundongos knockouts com um alelo simples para o VEGF (CARMELIET et al., 1996; FERRARA et al., 1996) e para o VEGFR-2 (SHALABY et al., 1995), e em camundongos knockouts para o VEGFR-1 (FONG et al., 1999). Levando-se em consideração estes estudos, se faz necessário um melhor entendimento dos fatores envolvidos na

implantação embrionária, principalmente aqueles responsáveis pela vasculogênese e posterior angiogênese placentária como é o caso do VEGF e dos seus receptores (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006; TAMMELA et al., 2005), para então serem desenvolvidas técnicas e meios para melhorar estes índices reprodutivos. Além disso, o envolvimento do sistema VEGF em quadros de pré-eclampsia e outras complicações na gravidez (SEMENZA, 2002; VAPEL, 2004) e de inúmeras patologias, principalmente neoplasias malignas (FERRARA, 2002, 2004; HURWITZ et al., 2004), o transforma em uma possível esperança para a criação de terapias contra estas doenças. Recentemente (FERRARA, 2004; HURWITZ et al., 2004) um grande estudo de fase 3 comprovou evidências de que a inibição do VEGF, usando bevacizumab (Genentech® Inc) em combinação com quimioterapia, pode gerar substanciais benefícios clínicos, incluindo o aumento no tempo de sobrevivência de pacientes com metástase de câncer colon-retal previamente sem tratamento. Tal fato confere ao bevacizumab (Genentech® Inc), um anticorpo de neutralização do VEGF, o status de primeiro agente antiangiogênico aprovado pela Food and Drug Administration na terapia contra o câncer (FERRARA, 2004). Além dessa linha de pesquisa, outras atividades do VEGF podem ter interessantes implicações clínicas. Por exemplo, com base nas principais funções exercidas pelo VEGF na angiogênese e na formação dos ossos endocondrais (KABBINAVAR et al., 2003), este fator poderia ser aplicado no aumento da revascularização e da cura de fraturas e outras condições esqueléticas (CARANO; FILVAROFF, 2003).

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a expressão do VEGF e seus receptores varia ao longo da gestação tanto na placenta canina quanto bovina;
- o perfil de expressão das proteínas estudadas na placenta bovina e canina ao longo da gestação pode ser considerado o mesmo para as duas espécies.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHEN, M. G.; JELTSCH, M.; KUKK, E.; MAKINEN, T.; VITALI, A.; WILKS, A. F.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, Australia, v. 95, n. 2, p. 548-553, 1998.

ADAMS, R. H.; WILKINSON, G. A.; WEISS, C.; DIELLA, F.; GALE, N. W.; DEUTSCH, U.; RISAU, W.; KLEIN, R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. **Genes Dev**, [S.l], v. 13, p. 295–306, 1999.

AHMED, A.; LI, X. F.; DUNK, C.; WHITTLE, M. J.; RUSHTON, D.I.; ROLLASON, T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. **Growth Factors**, UK, v. 12, p. 235-243, 1995.

AHMED, A.; DUNK, C.; KNISS, D.; WILKES, M. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. **Lab. Invest.**, UK, v. 76, n. 6, p. 779-791, 1997.

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

ARNOLD, D. R.; KIRSCH, J. D.; KRAFT, K. C.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Relationship among placental vascularity, fetal growth, and offspring number in sheep. **J Anim Sci**, North Dakota, v. 79, p. 90, 2001. Supplement 2, Abstract 258.

ARNOLD, D. R.; SCHEAFFER, A. N.; REDMER, D. A.; CATON, J. S.; REYNOLDS, L. P. Effect of nutrient restriction on placental vascularity and fetal growth in sheep. **Biol Reprod**, North Dakota, v. 64, p. 352, 2001. Supplement 1.

BARLEON, B.; SOZZANI, S.; ZHOU, D.; WEICH, H. A.; MANTOVANI, A.; MARME, D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial

growth factor (VEGF) es mediated via the VEGF receptor Flt-1. **Blood**, Germany, v. 87, p. 3336-3343, 1996.

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

BARONE, R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. In: Barone, R. **Tome troisième. splancnologia**, [S.l.; s.n.], 1976, fasc. II, p. 453-496.

BARRON, D. H. **Epilogue**: Oxygen supply to the human fetus, a symposium, Oxford: Blackwell, 1959, 350 p.

BATES, D. O; HARPER, S. J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul. Pharmacol.** , UK, v. 39, p. 225–237, 2002.

BERISHA, B.; SCHAM, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSRAINER, R. Expression and Tissue concentration of Vascular Endothelial Growth Factor, its receptors, and Localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**. Germany, n. 63, p. 1106-1114, 2000.

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

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

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

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

BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; JOHNSON, J. L.; REYNOLDS, L. P. The effect of maternal age (age at first pregnancy) on placental expression of the major angiogenic factors and their receptors. **J Soc Gynecol Invest**, USA, v. 12, P. 327, 2005.

BREIER, G.; CLAUSS, M.; RISAU, W. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. **Dev Dyn**, Germany, v. 204, p. 228-239, 1995.

BROWN, L. F.; DETMAR, M.; TOGNAZZI, K.; ABU-JAWDEH, G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. **Lab. Invest.**, USA, v. 76, n. 2, p. 245-255, 1997.

BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J. Cell. Mol. Med.**, Irlanda, v. 9, n. 4, p.777-794, 2005.

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, 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; VINCENTI, V.; COMPERNOLLE, V.; DE MOL, M.; WU, Y.; BONO, F.; DEVY, L.; BECK, H.; SCHOLZ, D.; ACKER, T.; DIPALMA, T.; DEWERCHIN, M.; NOEL, A.; STALMANS, I.; BARRA, A.; BLACHER, S.; VANDENDRIESSCHE, T.; PONTEN, A.; ERIKSSON, U.; PLATE, K. H.; FOIDART, J. M.; SCHAPER, W.; CHARNOCK-JONES, D. S.; HICKLIN, D. J.; HERBERT, J. M.; COLLEN, D.; PERSICO, M. G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in a pathological conditions. **Nat Med**, [S.l.], v. 7, p. 573-583, 2001

CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G.; POLLEFEYT, S.; KIECKENS, L.; GERTSENSTEIN, M. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. **Nature**, [S.I.] v. 380, p. 435-439, 1996.

CARANO, R. A.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **DRUG DISCOV TODAY**, [S.I.], v. 8, p. 980-989, 2003.

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

CHARNOCK-JONES, D. S.; CLARK, D. E.; LICENCE, D.; DAY, K.; WOODING, F. B.; SMITH, S. K. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. **Reproduction**, UK, v. 122, n. 5, p. 753-760, 2001.

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

CHEUNG, C. Y. Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. **J. Soc. Gynecol. Invest**, St Louis, v. 4, p. 169-177, 1997.

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

CLARK, D. E.; SMITH, S. K.; SHARKEY, A. M.; CHARNOK-JONES, D. S. Localization of VEGF and Expression of its Receptors Flt-1 and KDR in Human Placenta Throughout Pregnancy. **Hum Reprod**, UK, v. 11, p. 1090-1098, 1996.

CLAUSS, M.; WEICH, H.; BREIER, G.; KNIES, U.; ROCKL, W.; WALTENBERGER, J.; RISAU, W. The vascular endothelial growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of Placenta

growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **J. Biol. Chem**, [S.I.], v. 271, p. 17629–17634, 1996.

CONNOLLY, D. T.; HEUVELMAN, D. M.; NELSON, R.; OLANDER, J. V.; EPPLEY, B. L.; DELFINO, J. J.; SIEGEL, N. R.; LEIMGRUBER, R. M.; FEDER, J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **J. Clin Invest.**, St Louis, v. 84, p. 1470-1478, 1989.

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

DANTZER, V.; LEACH, L.; LEISER, R. Angiogenesis and placental vasculature--a workshop report. **Placenta**, Denmark, suppl. 21 A, p. 69-70, 2000.

DE SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation Of Gestational Deficiencies In Cloned Sheep Fetuses And Placentae. **Biol Reprod**, UK, v. 65, p. 23-30, 2001.

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

DEMIR, R.; KAYISLIA, U. A.; SEVALA, Y.; CELIK-OZENCIA, C.; KORGUNA, E. T.; DEMIR-WEUSTENB, A. Y.; HUPPERTZC, B. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. **Placenta**, [S.I.], v. 25, p. 560–572, 2004.

DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; VARELA, H. Angiogenesis: An update. **Histology and Histopathology: Cellular and Molecular Biology**, Murcia, v. 9, n. 4, p. 807-943, 1994.

DI NARO, E.; RAI0, L.; GHEZZI, F.; FRANCHI, M.; ROMANO, F.; ADDARIO, V. D.; Longitudinal umbilical vein blood flow changes in normal and growth retarded fetuses. **Acta Obstet Gynecol Scand**, Switzerland, v. 82, p. 1061, 2003.

DOR, Y.; PORAT, R.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. **Am. J. Physiol.**, [S.I.], v. 280, p. 1367-1374, 2001.

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

DUMONT, D. J.; FONG, G. H.; PURI, M. C.; GRADWOHL, G.; ALITALO, K.; BREITMAN, M. L. Vascularization of the mouse embryo: a study of Flk-1, Tek, Tie and vascular endothelial growth factor expression during development. **Dev. Dyn.**, Canada, v. 203, p. 80-92, 1995.

DUMONT, D. J.; JUSSILA, L.; TAIPALE, J. cardiovascular failure in mouse embryos deficient in vegf receptor-3. **Science**, [S.I.], v. 282, p. 946–949, 1998.

DUNK, C.; AHMED, A. Expression of VEGF-C and activation of its receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 in trophoblast. **Histol. Histopathol.**, UK, v. 16, n. 2, p. 359-375, 2001.

DVORAK, H. F.; SIOUSSAT, T. M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; NAGY, J. A.; SOTREL, A.; MANSEAU, E. J.; VAN DE WATER, L.; SENGHER, D. R. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. **J. Exp. Med.**, Massachusetts, v. 174, n. 5, p.1275-1278, 1991.

EDEY, T. N. Prenatal mortality in sheep: a review. **Anim Breeders Abstr.**, [S.I.], v. 37, p. 173–190, 1969.

EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R.F.; SMITH, P.D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection. **Science**, [S.I.], v. 274, p. 998-1001, 1996.

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

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, New York, v. 280, p.1358–1366, 2001.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, São Francisco, v. 25, p. 581–611, 2004.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat Rev Câncer**, [S.l.], v. 2, p. 795–803, 2002.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O'SHEA, K. S.; POWELL-BRAXTON, L.; HILLAN, K. J.; MOORE, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, California, p. 439-442, 1996.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr. Ver.**, New York, v. 18, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**. New York, v. 9, p. 669–676, 2003.

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

FERRELL, C. L. Placental regulation of fetal growth. In: CAMPION D. R.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J., Ed. **Animal Growth Regulation**. New York: Plenum, 1989. p. 1-19.

FONG, G. H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, Canada, v. 376, p. 66-70, 1995.

FONG, G. H.; ZHANG, L.; BRYCE, D. M.; PENG, J. Increased hemangioblast commitment, not vascular desorganization, is the primary defect in Flt-1 knock-out mice. **Development**, Canada, v. 126, p. 3015-3025, 1999.

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

GARFIN, D. E. One dimensional gel eletrophoresis. **Methods Enzimol**, USA, v. 182, p. 425- 441, 1991.

GERBER, H. P.; CONDORELLI, F.; PARK, J.; FERRARA, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia, **J. Biol. Chem.**, USA, v. 272, p. 23659–23667, 1997.

GEVA, E.; GINZINGER, D.G.; ZALOUDEK, C.J.; MOORE, D.H.; BYRNE, A.; JAFFE, R. B. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. **J Clin Endocrinol Metab**, USA, v. 87, p. 4213–4224, 2002.

GILLE, H.; KOWALSKI, J.; LI, B.; LECOUTER, J.; MOFFAT, B.; ZIONCHECK, T. F.; PELLETIER, N.; FERRARA, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR- 1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. **J Biol Chem.**, [S.I.], v. 276, p. 3222–3230, 2001.

GOLDBERG, M. A.; SCHNEIDER, T. J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, Massachusetts, v. 269, n. 6, p. 4355-4359, 1994.

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

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

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. **Reprod. Dom. Anim.**, Italy, v. 37, p. 362-368, 2002.

HARRINGTON, K.; CARPENTER, R.G.; GOLDFRAD, C.; CAMPBELL, S. Transvaginal ultrasound of the uteroplacental circulation in the early prediction of pre-eclampsia and intrauterine retardation. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, UK, v. 104, p. 674-681, 1997.

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

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol Reprod**, USA, v. 63, p.1787-1794, 2000.

HIRASHIMA, M.; LU, Y.; BYERS, L.; ROSSANT, J. Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. **PNAS**, Canadá, v. 100, n. 26, p. 15637–15642, 2006.

HIRATSUKA, S.; MINOWA, O.; KUNO, J.; NODA, T.; SHIBUYA, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 4, p. 9349-9354, 1998.

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

HUANG, K.; ANDERSSON, C.; ROOMANS, G. M.; ITO, N.; CLAEISSON-WELSH, L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Sweden, v. 33, p. 315–324, 2001.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, H.; HELM, W.; BERLIN, J.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; ROGERS, B.; ROSS, R.; BARON, A.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med**, USA, v. 350, p. 2335–2342, 2004.

ILJIN, K.; KARKKAINEN, M. J.; LAWRENCE, E. C.; KIMAK, M. A.; UUTELA, M.; TAIPALE, J.; PAJUSOLA, K.; ALHONEN, L.; HALMEKYTO, M.; FINEGOLD, D. N.; FERRELL, R. E.; ALITALO, K. VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms, **FASEB J.**, [S.l.], v. 15, p. 1028–1036, 2001.

JACKSON, M. R.; CARNEY, E. W.; LYE, S. J.; RITCHIE, J. W. Localization of two angiogenic growth factors (PDGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. **Placenta**, Canada, v. 15, p. 341-353, 1994.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 1 ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. p. 217-240.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.; BURTON, G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks gestation. **Am J Obstet Gynecol**, [S.l.] v. 184, p. 998–1003, 2001.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular Growth Factors and Lymphangiogenesis. **Physiol. Rev.**, Finland, v. 82, p. 673-700, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S.l.] v. 227, n.259, p. 680-685, 1970.

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

LANGE, T.; GUTTMANN-RAVIV, N.; BARUCH, L.; MACHLUF, M.; NEUFELD, G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. **J. Biol. Chem.** Israel, v. 278, p.17164-17169, 2003.

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

LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **J Anat**, Germany, v. 191, p. 517-527, 1997.

LEISER, R.; KOHLER, T. The blood vessels of the cat girdle placenta. Observations on corion casts, scanning electron microscopical and histological studies. **Anatomy and Embryology**, Germany, v. 170, p. 210-216, 1983.

LEUNG, D. W.; CACHIANES, G.; KUANG, W. J.; GOEDDEL, D. V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, San Francisco, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LEVY, N. S.; CHUNG, S.; FURNEAX, H.; LEVY, A. P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. **J Biol Chem**, [S.I.], v. 273, p. 6417-6423, 1998.

LI, H.; GU, B.; ZHANG, Y.; LEWIS, D. F.; WANG, Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from human placenta. **Placenta**, USA, v. 26, p. 210-217, 2005.

LIM, K.; ZHOU, Y.; JANATPOUR, M. Human cytotrophoblast differentiation/invasion in abnormal preeclampsia. **Am. J. Pathol.**, [S.I.], v. 151, p. 1809-1818, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDA, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 193, p. 265-75, 1951.

MAURER, R. R.; CHENAULT, J. R. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. **J Anim Sci**, [S.I.], v. 56, p. 1186-1189, 1983.

MAYNARD, S. E.; MIN, J. Y.; MERCHAN, J.; LIM, K. H.; LI, J.; MONDAL, S.; LIBERMANN, T. A.; MORGAN, J. P.; SELLKE, F. W.; STILLMAN, I. E.; EPSTEIN, F. H.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J. Clin. Invest.**, USA, v. 111, p. 649-658, 2003.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P. Aspects of human feto-placental vasculogenesis and angiogenesis III. Changes in complicated pregnancies. **Placenta**, v. 25, p. 127-139, 2004.

METCALFE, J.; STOCK, M. K.; BARRON, D.H. Maternal physiology during gestation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.; EWING, J. J., Ed. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 2145-2176.

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

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

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

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. A.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, article in press, 2006.

MILLAWAY, D. S.; REDMER, D. A.; KIRSCH, J. D.; ANTHONY, R. V.; REYNOLDS, L. P. Angiogenic activity of maternal and fetal placental tissues of ewes throughout gestation. **J Reprod Fertil**, North Dakota, v. 86, p. 689-696, 1989.

MYERS, S. A.; SPARKS, J. W.; MAKOWSKI, E. L.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F. C.; Relationship between placental blood flow and placental and fetal size in guinea pig. **Am J Physiol**, [S.I.], v. 243, p. 404-409, 1982.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contrib. Embryol. Carnegie Inst.**, [S.I.], v. 26, p. 128-246, 1937.

NEEDHAM, J. **A history of embryology**. Cambridge: The University Press, 1934, 259 p.

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

NEVO, O.; SOLEYMANLOU, N.; WU, Y.; XU, J.; KINGDOM, J.; MANY, A.; ZAMUDIO, S.; CANIGGIA, I. Increased Expression of sFlt-1 in *In Vivo* and *In Vitro* Models of Human Placental Hypoxia is Mediated by HIF-1. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, USA, article in press, 2006.

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

NORTH, R. H.; FERRIER, C.; LONG, D.; TOWNEND, K.; KINCAID-SMITH, P. Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. **Obstet. Gynecol.**, Australia, v. 83, p. 378-386, 1994.

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

OLIVER, G.; DETMAR, M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature, **Genes Dev.**, [S.I.], v. 16, p. 773– 783, 2002.

OLOFSSON, B.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; VON EULER, G.; JOUKOV, V.; SAKSELA, O.; ORPANA, A.; PETTERSSON, R. F.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U.;

Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells (angiogenesis and endothelium mitosis). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Sweden, v. 93, p. 2576-2581, 1996.

ORLANDINI, M.; SPREAFICO, A.; BARDELLI, M.; ROCCHIGIANI, M.; SALAMEH, A.; NUCCIOTTI, S.; CAPPERUCCI, C.; FREDIANI, B.; OLIVIERO, S. Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. **J. Biol. Chem.**, [S.I.], v. 281, n. 26, p. 17961-17967, 2006.

ORECCHIA, A.; LACAL, P. M.; SCHIETROMA, C.; MOREA, V.; ZAMBRUNO, G.; FAILLA, C. M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin. **Journal of Cell Science**, Italia, v. 116, p. 3479-3489, 2003.

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

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**, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, 1994.

PAAVONEN, K.; HORELLI-KUITUNEN, N.; CHILOV, D.; KUKK, E.; PENNANEN, S.; KALLIONIEMI, O.; PAJUSOLA, K.; OLOFSSON, B.; ERIKSSON, U.; JOUKOV, V.; PALOTIE, A.; ALITALO, K. Novel Human Vascular Endothelial Growth Factor Genes VEGF-B and VEGF-C Localize to Chromosomes 11q13 and 4q34, Respectively. **Circulation**, Finland, v. 93, p. 1079-1082, 1996.

PAJUSOLA, K.; APRELIKOVA, O.; KORHONEN, J.; KAIPAINEN, A.; PERTOVAARA, L.; ALITALO, R.; ALITALO, K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. **Cancer Res.**, [S.I.], v. 52, n. 20, p. 5738-5743, 1992.

PARENTI, A.; MORBIDELLI, L.; CUI, X. L.; DOUGLAS, J. G.; HOOD, J. D.; GRANGER, H. J.; LEDDA, F.; ZICHE, M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2

activation in postcapillary endothelium. **J Biol Chem.**, [S.I.], v. 273, p. 4220–4226, 1998.

PARTANEN, T.; AROLA, J.; SAARISTO, A.; JUSSILA, L.; ORA, A.; MIETTINEN, M.; STACKER, S. A.; ACHEN, M. G.; ALITALO, K. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. **FASEB J.** [S.I.], v. 14, p. 2087–2096, 2000.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; LEVIN, E. R. Extracellular signalregulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. **J Biol Chem.**, [S.I.], v. 273, 26722–26728, 1998.

PFARRER, C.; EBERT, B.; MIGLINO, M. A.; KLISCH, K.; LEISER R. The three-dimensional feto-maternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. **Journal of Anatomy**, London, v. 198, n. 5. p. 561-602, 2001.

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

PFARRER, C.; RUZIWA, S.; 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**, Germany, v. 27, n. 8, p. 889-898, 2006.

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

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. **Journal of Biological Chemistry**, France, v. 272, n. 20, p. 13390-13396, 1997.

POLTORAK, Z.; COHEN, T.; SIVAN, R.; KANDELIS, Y.; SPIRA, G.; VLODAVSKY, I.; KESHET, E.; NEUFELD, G. VEGF145, a secreted vascular

endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, Israel, v. 272, n. 11, p. 7151-7158, 1997.

QI, J. H.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. **Exp Cell Res.**, [S.I.], v. 263, p. 173–182, 2001.

KABBINAVAR, F.; HURWITZ, H. I.; FEHRENBACHER, L.; MEROPOL, N. J.; NOVOTNY, W. F.; LIEBERMAN, G.; GRIFFING, S.; BERGSLAND, E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**, São Francisco, v. 21, p. 60–65, 2003.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V. W.; FANG, G. H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc Natl Acad Sci USA**, Finland, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; PAJUSOLA, K. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. **J Exp Med**, Finland; v. 178, p. 2077–2088, 1993

KAPPEL, A.; RONICKE, V.; DAMERT, A.; FLAMME, I.; RISAU, W.; BREIER, G. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor- 2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. **Blood**, [S.I.], v. 93, p. 4284– 4292, 1999.

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

KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis II. Changes during pregnancies. **Placenta**, v. 25, p. 114-126, 2004.

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

KEYT, B.; BERLEAU, L.; NGUYEN, H.; HEINSHON, H.; CHEN, H.; VANDLER, R.; FERRARA, N. The carboxyl-terminal domain (III-165) of VEGF is critical for mitogenic potency. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v. 271, p. 7788-7795, 1996.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annu. Rev. Physiol.**, Massachusetts, v. 53, p. 217, 1991.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. **J Biol Chem.**, [S.I.], v. 272, p. 32521–32527, 1997.

KUKK, E.; LYMBOUSSAKI, A.; TAIRA, S.; KAIPAINEN, A.; JELTSCH, M.; JOUKOV, V.; ALITALO, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. **Development**, [S.I.], v. 122, p. 3829–3837, 1996.

RAMSEY, E. M. **The placenta: human and animal**. 1. ed. New York: Praeger Publishers, 1982. 187 p.

REDMER, D. A.; AITKEN, R. P.; MILNE, J. S.; REYNOLDS, L. P.; WALLACE, J. M. Influence of maternal nutrition on mRNA expression of placental angiogenic factors and their receptors in ovine adolescent pregnancy. **Biol Reprod**, United Kingdom, v. 72, p. 1004-1009, 2005.

REGNAULT, T. R.; DE VRIJER, B.; GALAN, H. L.; DAVIDSEN, M. L.; TREMBLER, K. A.; BATTAGLIA, F.C.; WILKENING, R. B.; ANTHONY, R.V. The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PIGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. **J Physiol**, USA, v. 550, p. 641-656, 2003.

REGNAULT, T. R.; ORBUS, R. J.; DE VRIJER, B.; DAVIDSEN, M. L.; GALAN, H. L.; WILKENING, R. B.; ANTHONY, R.V. Placental expression of VEGF, PIGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). **Placenta**, USA, v. 23, p. 132-144, 2002.

RESTUCCI, B.; BORZACCHIELLO, G.; MAIOLINO, P.; MARTANO, M.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, O. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flk-1 in Canine Mammary Tumours. **J. Comp. Path.**, Italy, v. 130, 99–104, 2004.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; JONHSON, M. L.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; WALLACE, J. M.; CATON, J. S.; REDMER, D. A. Animal Models of Placental Angiogenesis. **Placenta**. North Dakota, v. 26, p. 689-708, 2005.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; JOHNSON, M. L.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; CATON, J. S. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. **J Physiol**, North Dakota, v. 565, n. 1, p. 43-58, 2005 b.

REYNOLDS, L. P.; FERRELL, C. L.; ROBERTSON, D. A.; FORD, S. P. Metabolism of the gravid uterus, foetus and uteroplacenta at several stages of gestation in cows. **J. Agric. Sci.** North Dakota, v. 106, p. 437-444, 1986.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system: pathological implications. **Int J Exp Pathol**, North Dakota, v. 83, p. 151-164, 2002.

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

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **J Anim Sci**, North Dakota, v. 73, p. 1839-1851, 1995.

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

RODESCH, F.; SIMON, P.; DONNER, C.; JAUNIAUX, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. **Obstet Gynecol**, [S.I.], v. 80, p. 283-285, 1992.

ROSENFELD, C. R.; MORRISS, F. H.; MAKOWSKI, E. L.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F.C. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. **Gynecol. Invest.**, [S.I.], v. 5, p. 252-268, 1974

ROUSSEAU, S.; HOULE, F.; KOTANIDES, H.; WITTE, L.; WALTENBERGER, J.; LANDRY, J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stressactivated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. **J Biol Chem**, [S.I.], v. 275, p.10661-10672, 2000.

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

SEMENZA, G. Signal transduction to hipóxia factor 1. **Biochem Pharmacol**, [S.I.], v. 64, p. 993-998, 2002.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCHI, T. P.; GERTSENSTEIN M.; WU, X. F.; BREITMAN, M. L. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, London, v. 376, p. 62–66, 1995.

SHARKEY, A. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BOOCOOCK, C. A.; BROWN, K. D.; SMITH, S. K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. **J. Reprod. Fertil.**, UK, v. 99, p. 609-615, 1993.

SHEN, B. Q.; LEE, D. Y.; GERBER, H. P.; KEYT, B. A.; FERRARA, N.; ZIONCHECK, T. F. Homologous up=regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by Vascular endothelial growth factor in vitro. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 45, n. 6, p. 29979-29985, 1998.

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

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, Japão, v. 312, p. 549– 560, 2006.

SHIRAISHI, S.; NAKAGAWA, K.; KINUKAWA, N.; NAKANO, H.; SUEISHI, K.; Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. **Placenta**, Japan, v. 17, p. 111-121, 1996.

SHORT, R. V. Species differences in reproductive mechanisms. In: Austin, C. R.; Short, R. V. **Reproduction in Mammals**, livro 4, 2 ed., Grã Bretanha: Cambridge University Press; 1984, p. 380.

SOOTHILL, P. W.; NICOLAIDES, K. H.; RODECK, C. H.; CAMPBELL, S. Effects of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy. **Fetal Therapy**, [S.I.], v. 1, p. 168–175, 1986.

SLOSS, V.; DUFTY, J. H. Pregnancy and gestation. **Handbook of Bovine Obstetrics**. 1. ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1980, p. 30-68.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. **Vet Rec**, [S.I.] v. 112, 517-521, 1983.

STEGEMAN, J. H. J. Placental development in the sheep and its relation to fetal development. **Bijdragen Tot De Dierkunde (Contrib Zool)**, Germany, v. 44, p. 3-72, 1974.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. **J. Biol. Chem.**, Japan, v. 280, p. 2126–2131, 2005.

TAIPALE, J.; MAKINEN, T.; ARIGHI, E.; KUKK, E.; KARKKAINEN, M.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. **Curr Top Microbiol Immunol**, [S.I.], v. 237, p. 85–96, 1999.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, Tokyo, v. 109, p.227-241, 2005.

TAKAHASHI, T.; SHIRASAWA, T.; MIYAKE, K.; YAHAGI, Y.; MARUYAMA, N.; KASAHARA, N.; KAWAMURA, T.; MATSUMURA, O.; MITARAI, T.; SAKAI, O. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and culture glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. **Biophys. Res. Commun.**, Japan, v. 209, p. 218-226, 1995.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovasc. Res.** Finland, v. 65, p. 550–563, 2005.

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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 187, n. 3, p. 1579-86, 1992.

TOLENTINO, M. J.; MILLER, J. W.; GRAGOUDAS, E. S.; CHATZISTEFANOU, K.; FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. VEGF is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a non-human primate. **Arch. Ophthalmol.**, USA, v. 114, p. 964-970, 1996.

TRUNDINGER, B. J.; GILES, W. B.; COOK, C. M. Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, [S.I.], v. 92, p. 39-45, 1985.

TSATSARIS, V.; GOFFIN, F.; MUNAUT, C.; BRICHANT, J. F.; PIGNON, M. R.; NOEL, A.; SCHAAPS, J. P.; CABROL, D.; FRANKENNE, F.; FOIDART, J. M. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. **J Endocrinol Metab**, França, v. 88, n. 11, p. 5555-5563, 2003.

VAPPEL, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. **Oncologist**, [S.I.], v. 9, p. 10-17, 2004.

VEIKKOLA, T.; JUSSILA, L.; MAKINEN, T.; KARPANEN, T.; JELTSCH, M.; PETROVA, T. V.; KUBO, H.; THURSTON, G.; MCDONALD, D. M.; ACHEN, M. G.; STACKER, S. A.; ALITALO, K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. **The Embryo Journal**, [S.I.], v. 20, n. 6, p. 1223 -1231, 2001.

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

ZACHARY, I.; GLIKI, G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. **Cardiovasc. Res.**, UK, v. 49, p. 568–581, 2001.

ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; DAMSKY, C. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications of endovascular invasion in normal pregnancy and in preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.**, [S.I.], v. 39, p. 197-213, 1998.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MUNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O. D. Angiogenesis And Vasculogenesis In Pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Germany, v. 110, p. 10-18, 2003. Supplement 1.

WAKIYA, K.; BEGUE, A.; STEHELIN, D.; SHIBUYA, M. A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene, **J. Biol. Chem**, [S.I.], v. 271, p. 30823– 30828, 1996.

WANG, H.; OWENS, J. D.; SHIH, J. H.; LI, M. C.; BONNER, R. F.; MUSHINSKI, J. F. Histological staining methods preparatory to laser capture microdissection significantly affect the integrity of the cellular RNA. **BMC Genomics**, USA, v. 6, p. 97-105, 2006.

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

WANG, H. U.; CHEN, Z. F.; ANDERSON, D. J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. **Cell**, [S.I.], v. 93, p. 741–753, 1998.

WATANABE, A.; YASUMIZU, T.; HOSHI, K.; KATOH, R.; KAWAOI, A.; SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor expression in the rat uterus and placenta throughout pregnancy. **Acta Histochem Cytochem**, Japan, v. 31, p. 419-426, 1998.

WHEELER, T.; ANTHONY, F. W.; YOUNG, D. A.; MOORE, L. G.; ZAMUDIO, S. Maternal circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in high altitude pregnancy. **J Soc Gynecol Invest**, USA, v. 9, p. 301, 2002.

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**, Denmark, 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**, Denmark, v. 22, n. 5, p. 457-465, 2001.

WISE, L. M.; VEIKKOLA, T.; MERCER, A. A.; SAVORY, L. J.; FLEMING, S. B.; CAESAR, C.; VITALI, A.; MAKINEN, T.; ALITALO, K.; STACKER, S. A. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, New Zealand, v. 96, p. 3071-3076, 1999.

WISSMANN, C.; HOCKER, M. VEGF-C, VEGF-D and VEGF-receptor 3: novel key regulators of lymphangiogenesis and cancer metastasis. **Z Gastroenterol**, Germany, v. 40, p. 853-856, 2002.

WITMER, A. N.; VAN BLIJSWIJK, B. C.; DAÍ, J.; HOFMAN, P.; PARTANEN, T. A.; VRENSSEN, G. F.; SCHLINGEMANN, R.O. VEGFR-3, in adult angiogenesis. **J. Pathol.**, The Netherlands, v. 195, n. 4, p. 490-497, 2001.

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

WOOTTON, M. C.; FADYEN, R. I. R.; COOPER, J. E. Measurement of placental blood flow in the pig and its relation to placental and fetal weight. **Biol Neonate**, [S.I.], v. 31, p. 333-339, 1977.

WU, Y.; HOOPER, A. T.; ZHONG, Z.; WITTE, L.; BOHLEN, P.; RAFII, S.; HICKLIN, D. J. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. **Int J Cancer**., USA, v. 119, p. 1519-1529, 2006.

WULFF, C.; WILSON, H.; DICKSON, S. E.; WIEGAND, S. J.; FRASER, H. M. Hemocorial placentation in the primate: Expression of vascular endothelial growth

factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p. 802-812, 2002.

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**, Japan, v. 44, p. 8858–8864, 2005.

YAN, Z.; NEULEN, J.; RACZEK, S.; WEICH, H. A.; KECK, C.; GRUNWALD, K.; BRECKWOLDT, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecol. Endocrinol.**, Germany, v. 12, n. 3, p. 149-153, 1998.

YI, X. J.; JIANG, H. Y.; LEE, K. K.; O, W. S.; TANG, P. L.; CHOW, P. H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic im1plantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Cell Tissue Res**, [S.I.], v. 296, n. 2, p. 339-349, 1999.

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

YOSHIDA, A.; ANAND-APTE, B.; ZETTER, B. R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. **Growth Factors**, [S.I.], v. 13, p. 57-64, 1996

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 5 - Análise das proteínas do sistema VEGF em placenta bovina em diferentes fases da gestação (90, 150, 210 e 270 dias), tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006

Amostra	UA/ proteínas totais				UA/ g de tecido			
	VEGF	Flt-1	KDR	Flt-4	VEGF	Flt-1	KDR	Flt-4
90 dias	0,9667	0,9640	1,1076	0,8109	1,0195	1,0232	1,2636	0,7928
90 dias	1,0333	1,0360	0,8924	1,1891	1,1338	0,9768	0,7364	1,2072
90 dias	0,8351	0,9630	0,8934	0,9525	1,4405	1,2182	0,9566	0,8513
90 dias	1,1649	1,0370	1,1066	1,0475	1,1980	0,7818	1,0434	1,1487
150 dias	1,1323	1,4890	1,9009	0,9147	1,2513	1,4575	1,8972	0,9809
150 dias	1,1515	0,9613	1,5169	1,2215	1,1223	1,0629	1,7646	0,9041
150 dias	0,7563	1,3339	1,3617	0,8989	0,9976	1,0314	1,5140	1,0645
150 dias	1,1873	0,8608	1,4225	1,2081	1,1179	1,1317	1,4746	1,1565
210 dias	0,8996	0,9474	1,4003	1,0835	0,7977	1,4686	1,3648	1,0526
210 dias	1,0747	1,4257	1,7578	0,8460	0,7522	1,5119	1,5253	0,7368
210 dias	0,8672	1,0159	1,6445	1,0250	0,8515	0,7829	1,2148	0,7653
210 dias	1,1941	1,3518	1,5005	1,0182	0,7049	0,4307	1,3003	0,8506
270 dias	0,7408	0,4018	1,0940	0,6638	0,7000	0,3588	0,8317	0,5685
270 dias	0,9876	0,4378	1,3496	0,7086	0,7773	0,3077	1,1521	0,4982
270 dias	1,1514	0,6807	1,0382	0,8725	0,6082	0,5256	1,2076	0,7299
270 dias	1,2901	0,4274	1,3159	0,9849	0,8159	0,3734	0,7552	0,7665

APÊNDICE B

Tabela 6 - Análise das proteínas do sistema VEGF em placenta canina em diferentes fases da gestação (20, 40 e 60 dias), tanto em proteínas totais submetidas à eletroforese, como em UA/g de tecido - São Paulo - 2006

Amostra	UA/ proteínas totais			UA/ g de tecido		
	VEGF	Flt-1	KDR	VEGF	Flt-1	KDR
20 dias	0,8662	0,9073	1,1847	0,8666	0,7524	1,1875
20 dias	1,1338	1,0927	0,8153	1,1334	1,1011	0,8125
20 dias	1,1319	0,8021	1,1848	0,8916	1,0685	1,1341
20 dias	0,8681	1,1979	0,8152	1,1084	1,0780	0,8659
40 dias	0,7531	0,9913	1,7777	0,5369	0,5949	1,2624
40 dias	0,7143	0,7114	2,0373	0,7498	0,4878	1,5342
40 dias	0,9126	0,6558	1,9682	0,5367	0,4911	1,2258
40 dias	0,9505	0,8984	2,2890	0,7374	0,5644	1,4976
60 dias	0,5074	0,4882	0,3858	0,3656	0,5640	0,3980
60 dias	0,4037	0,3966	0,3840	0,5467	0,4894	0,4801
60 dias	0,5025	0,3592	0,3998	0,5582	0,3482	0,3966
60 dias	0,5963	0,3706	0,2768	0,7623	0,4453	0,2500