

Aline Rodrigues Lorenzon Ojea

**Expressão e possível função do Fator 2
derivado de células estromais (SDF2)
na gestação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Versão Original

São Paulo

2014

RESUMO

LORENZON-OJEA, A.R. **Expressão e possível função do Fator 2 derivado de células estromais (SDF2) na gestação.** 2014 190 f. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O fator 2 derivado de células estromais, SDF2 (do inglês *Stromal cell derived factor 2*) é um gene de função ainda desconhecida, conservado em mamíferos e descrito primeiramente por Hamada et al. (1996). Neste estudo, observamos que a proteína Sdf2 de camundongo possui a alta similaridade de sequência em relação ao SDF2-like(L)1 humano e murino e de estrutura preditiva também similar em relação ao SDF2-like de *Arabidopsis thaliana*. A proteína mostrou-se sublocalizada no retículo endoplasmático e apresentou ampla distribuição nos tecidos e órgãos de camundongos. O mapeamento da expressão de Sdf2 ao longo da gestação humana e de camundongo nos mostrou que a proteína está presente em todas as etapas e compartimentos da placenta, com expressão em diversos tipos celulares. Nossos resultados sugerem que o SDF2 participa dos processos de diferenciação de células trofoblásticas humanas e murinas de maneira oposta. Em humanos, onde o processo é dependente da ativação de caspase-8 observou-se um aumento da expressão de SDF2. Em camundongos, onde o processo é por endoreduplicação, houve diminuição da expressão da proteína. A participação do SDF2 na via de estresse de retículo endoplasmático (RE) nas células trofoblásticas também foi analisada. Fatores adversos que podem levar à perda da homeostase do RE e levar a um acúmulo de proteínas mal enoveladas geram o fenômeno conhecido como Estresse de RE. O estresse de RE ativa a via de Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR, em inglês *Unfolded Protein Response*), que atua em diferentes vias de sinalização para aumentar a produção de chaperonas, a degradação das proteínas mal enoveladas e a diminuição da produção de novas proteínas. Estas respostas aumentam as chances de sobrevivência celular. Se, no entanto, a célula não recuperar sua homeostase, vias que levam à apoptose serão ativadas. A geração de estresse de RE pelo agente tunicamicina alterou significativamente a expressão de SDF2. Além disso, o silenciamento do gene SDF2 alterou a expressão dos principais fatores de controle de sobrevivência e apoptose da UPR. Desta forma, estes achados sugerem que o SDF2 desempenha um papel na regulação de sobrevivência/apoptose das células trofoblásticas pela via UPR.

Palavras-chave: SDF2. Estresse de Retículo Endoplasmático. Trofoblasto. Sobrevivência Celular. Apoptose. Placenta.

ABSTRACT

LORENZON-OJEA, A.R. **Expression and possible function of Stromal cell derived factor 2 (SDF2) in gestation.** 2014 190 p. [Ph.D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The stromal cell derived factor 2 (SDF2) was first described by Hamada et al.(1996), is well conserved in mammals but its function is still unknown. In this study, we observed the predicted aminoacid sequence of Sdf2 is similar to human and mouse SDF2L1 sequence and the predicted Sdf2 structure is similar to SDF2-like from *Arabidopsis thaliana*. The protein is sublocalizes in the ER and it is widely expressed in mouse tissue and organs. The expression of Sdf2 throughout human and mouse gestation showed the protein is present in all gestational phases and compartments analysed and it is expressed by several cell types in the placenta. In trophoblast functional assays, SDF2 showed opposite expression patterns in human and mouse differentiation processes. In humans, where the process is dependent of caspase-8 activation, the protein is upregulated. In mouse, the process is dependent of endoreduplication, the protein is downregulated. The participation of SDF2 in Endoplasmic Reticulum (ER) stress in trophoblastic cells was also evaluated. Adverse environmental conditions may lead to disruption of ER homeostasis causing accumulation of unfolded/misfolded proteins in ER, a phenomenon known as ER stress. ER stress activates the Unfolded Protein Response (UPR) that acts in several signaling cascades to improve chaperone production, misfolded protein degradation and to downregulate new protein production. These responses increase the capacity of cells to maintain alive even in stress conditions. Whether cells fail to restore homeostasis, the UPR activates apoptosis. We were able to observe that when gene silencing assays were used for SDF2, modifications in UPR cell survival/apoptosis markers were observed. In conclusion, we propose that SDF2 is playing a role in ER stress cell survival/apoptosis control in trophoblast cells.

Keywords: SDF2. Endoplasmic Reticulum Stress. Trophoblast. Cell survival. Apoptosis. placenta.

A capacidade de se reproduzir é o cerne da sobrevivência de todas as espécies. Diversos tipos de estratégias reprodutivas apareceram ao longo da evolução, sendo que para cada uma delas, diferentes especializações fisiológicas também contribuíram para o sucesso reprodutivo.

Nos animais vivíparos (maioria dos mamíferos), onde o desenvolvimento embrionário ocorre dentro do organismo materno, a formação da placenta é crucial para o estabelecimento das relações materno-fetal.

A placenta é um órgão transitório, encontrada em mamíferos da infra classe Eutheria (ELLIOT; CRESPI, 2009), responsável primordialmente pela nutrição, proteção e trocas (gasosas, nutricionais e de excreção) entre mãe e feto. A placenta é estruturalmente composta por células de origem materna e de origem fetal – porção materna e fetal da placenta respectivamente. De acordo com a forma de interação da porção fetal (cório – células trofoblásticas associadas ao mesoderma extraembrionário) com a porção materna (endométrio), a placenta pode ser classificada em três tipos: epiteliocorial, endoteliocorial e hemocorial (ELLIOT; CRESPI, 2009; SIMMONS, 2014).

Em humanos e roedores a placentação é do tipo hemocorial – o sangue materno mantém contato direto com células fetais (células trofoblásticas) – a placenta possui formato discóide e a região da interface materno-fetal é labiríntica em roedores e, vilosa em humanos (BERNIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006; SIMMONS, 2014).

A placenta é um órgão complexo e de alta demanda energética, que desempenha atividades funcionais da maioria dos órgãos fetais (únicas exceções são o aparelho locomotor e sistema nervoso central fetal) desde o começo do desenvolvimento até o momento do parto. Dentre estas atividades se destacam as trocas gasosas, absorção molecular, função excretora (balanço hídrico, regulação de pH), síntese e secreção de hormônios e proteínas regulatórias, hematopoiese e função imunológica (BERNIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006). O controle das funções placentárias é complexo, inclui um amplo espectro vias de sinalização, hormônios, fatores de crescimento e proteínas regulatórias e, é essencial para o adequado desenvolvimento do embrião/feto. Muitos são os fatores já conhecidos que podem comprometer o desenvolvimento da placenta e conseqüentemente do feto: carência de

nutrientes, distúrbios glicêmicos, infecções virais e bacterianas, desordens hipertensivas, tabagismo, alcoolismo e doenças autoimunes entre muitos outros (BERNIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006). Evidências recentes mostram que essas intercorrências e suas alterações da interface materno-fetal estão associadas a patologias na vida adulta, dentre elas diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade, asma e doenças alérgicas (TEDNER et al., 2012; VO; HARDY, 2012), o que reforça a importância de estudos dos mecanismos que controlam a formação da placenta e a regulação da interface materno-fetal.

O Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto tem estudado diversos aspectos da fisiologia das células trofoblásticas em roedores e humanos, em diferentes fases do processo de formação da placenta. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo (HOSHIDA et al., 2007, 2008) analisaram a expressão gênica do cone ectoplacentário (estrutura precursora da placenta em camundongos, composta por células trofoblásticas com características altamente invasivas e células proliferativas precursoras da zona juncional da placenta) utilizando uma membrana de macroarranjos de quimiocinas inflamatórias (*GE Array O Series, MM-15 Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array, 96 genes*). Esse estudo mostrou que o gene do *Fator 2 derivado de células estromais (Sdf2)* era um dos genes de maior expressão.

O gene do *SDF2* foi primeiramente descrito por Hamada e colaboradores (1996) a partir de uma linhagem de células estromais de camundongo (ST2). A partir da análise inicial da sequência preditiva de aminoácidos do *SDF2* tanto humana quanto murina (similaridade de sequência preditiva de aminoácidos em 92.4%), a proteína foi descrita como secretada, devido à ausência de um sinal de retenção no retículo endoplasmático (KDEL/HDEL) em sua porção C-terminal (HAMADA et al., 1996). A função e expressão da proteína em mamíferos são desconhecidas.

O *SDF2* possui alta similaridade (78%) com um gene parálogo, o *SDF2L1* (fator 1 semelhante ao fator 2 derivado de células estromais, do inglês: *Stromal Derived Fator 2 Like 1*) humano e de camundongo e também com a proteína semelhante a *SDF2 (SDF2-like)* de *Arabidopsis thaliana* (39%). Ambas proteínas participam de um

processo conhecido como UPR (do inglês, *unfolding protein response*) ou resposta de proteínas mal enoveladas.

A UPR pode ser desencadeada quando as células se deparam com um ambiente adverso (hipóxia, hiperglicemia, privação de nutrientes, perturbação do estado de redox, regulação de Ca^{2+} exacerbada, infecção viral, falha em modificações pós-traducionais entre outros) capaz de perturbar sua homeostase. Neste contexto, pode ocorrer um acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen no retículo endoplasmático, gerando um fenômeno conhecido como estresse de retículo endoplasmático (RE) (BACK; KAUFMAN, 2012; MEI et al., 2013; WALTER; RON, 2011), que por sua vez ativa a UPR. A UPR ativa uma série de vias de sinalização que têm como resposta imediata tentar reestabelecer a homeostase celular, reduzindo o acúmulo e agregação de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE (WALTER; RON, 2011). Esta resposta inclui a redução da síntese de novas proteínas, aumento da produção de chaperonas (para auxiliar o enovelamento das proteínas existentes no lúmen do RE) e aumento da capacidade de degradação das proteínas mal enoveladas (LIN et al., 2007). Se, no entanto, este mecanismo não reverter o estado de estresse celular, a própria via UPR pode ativar um processo de morte celular (apoptose), evitando que a célula afetada sintetize e secrete para o meio externo proteínas não funcionais (LIN et al., 2007).

O *SDF2L1* é um gene induzido por estresse de RE, membro da família de O-manosiltransferases em humanos e camundongos (FUKUDA et al., 2001) e, é descrito como parte integrante de diversos complexos de proteínas no RE com funções relacionadas ao controle de qualidade no dobramento de proteínas secretadas e de membranas em mamíferos (BIES et al., 2004; MEUNIER et al., 2002; TONGAONKAR; SELSTED, 2009). Já ao *SDF2-like* de *Arabidopsis* tem sido atribuído um papel no controle de qualidade na secreção de glicoproteínas e na ativação do estresse de RE (SCHOTT et al., 2010).

Alguns estudos têm mostrado que o estresse de RE afeta o desenvolvimento da placenta e está associado a algumas patologias da gestação. Em roedores, a exposição sistêmica prolongada ao estresse de RE durante diferentes fases da

gestação, gera fetos com restrição de crescimento intrauterino, partos prematuros, alterações morfológicas na placenta e também na síntese dos transportadores de glicose e no aumento dos níveis de progesterona, esse último possivelmente como um mecanismo de proteção à gestação (KAWAKAMI et al., 2014). Em humanos, marcadores de estresse de RE e da via UPR mostraram-se exacerbados em placentas a termo de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino (YUNG et al., 2008) e também em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia grave (BURTON; YUNG, 2011), o que indica que esta via poderia contribuir para as falhas de desenvolvimento da placenta nessas patologias. Nesse contexto, a ativação da via de estresse de RE na gestação pode gerar deficiências na produção de moléculas-chave (hormônios, fatores de crescimento e proteínas regulatórias) cruciais para o desenvolvimento e funções placentárias e, conseqüentemente pode participar no estabelecimento de doenças gestacionais.

Apesar da similaridade nas sequências preditivas da proteína SDF2 em relação ao SDF2L1 humano e murino e SDF2-like de *Arabidopsis*, a expressão e função do SDF2 ainda são desconhecidas.

Assim, com base na elevada expressão gênica do *Sdf2* em células trofoblásticas de camundongo, este estudo teve como proposta mapear a expressão do SDF2 ao longo da gestação murina e humana e investigar sua possível função. Além disso, considerando-se a similaridade na sequência e estrutura das proteínas SDF2L1 e SDF2-like de *Arabidopsis* com o SDF2, este estudo pretendeu também avaliar se essa proteína está relacionada à via de estresse de retículo durante o desenvolvimento placentário.

1- A proteína Sdf2 de camundongo possui alta similaridade de sequência com a proteína SDF2L1 humana e murina e de estrutura preditiva em relação ao SDF2-like de *Arabidopsis thaliana*.

2- O Sdf2 localiza-se no retículo endoplasmático e apresenta ampla distribuição em tecidos e órgãos de camundongos.

3- O mapeamento da expressão do SDF2 ao longo da gestação humana e de camundongo mostra que a proteína está presente em todas as etapas e compartimentos da placenta, com expressão em diversos tipos celulares. As diferenças de expressão encontradas em alguns compartimentos coincide com seu possível papel na via UPR.

4- O SDF2 participa dos processos de diferenciação de células trofoblásticas humanas e murinas de maneira oposta, possivelmente devido às características peculiares de cada processo. Quando a via segue em direção à ativação da apoptose (células humanas) a expressão de SDF2 aumenta; quando segue em direção à inibição da apoptose (células murinas) a expressão de Sdf2 diminui. Estes resultados são compatíveis com o possível papel do SDF2 na via UPR.

5- Ensaio funcionais de indução ao estresse de RE em células trofoblásticas indicam que o SDF2 está envolvido no processo de apoptose da via UPR.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, v. 166, n. 3, p. 263-274, 1983.

ABRAHAMSOHN, P.A., ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, v. 266, n. 6, p. 603-628, 1993.

AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1833, n. 11, p. 2430-2437, 2013.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 689-709, 2004.

ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P., HEMMINGS, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J.**, v. 15, n. 23, p. 6541-6551, 1996.

BACK, S. H., KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 81, p. 767-793, 2012.

BECHER, N., ADAMS WALDORF, K., HEIN, M., ULDBJERG, N. The cervical mucus plug: structured review of the literature. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 88, n. 5, p. 502-513, 2009.

BEHRMAN, S., ACOSTA-ALVEAR, D., WALTER, P. A CHOP-regulated microRNA controls rhodopsin expression. **J. Cell. Biol.**, v. 192, n. 6, p. 919-927, 2011.

BENIRSCHKE, K., KAUFMANN, P., BAERGEN, R. N. In: **Pathology of the human placenta**. 5th ed. New York: Springer-Verlag, p. 13-366, 2006.

BETZ, C., HALL, M. N. Where is mTOR and what is it doing there? **J. Cell. Biol.**, v. 203, n. 4, p. 563-574, 2013.

BEVILACQUA, E. M., ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. **J. Morphol.**, v. 198, n. 3, p. 341-351, 1988.

BEVILACQUA, E. M., ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Arch. Biol. Med. Exp.**, v. 22, n. 2, p. 107-118, 1989.

BEVILACQUA, E., LORENZON, A. R., BANDEIRA, C. L., HOSHIDA, M. S. Biology of the ectoplacental cone. In: CROY, B. A., YAMADA, A. T., DEMAYO, F. J., ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1st ed. USA: Elsevier, p. 113-124, 2014.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIES, C., BLUM, R., DUDEK, J., NASTAINCZYK, W., OBERHAUSER, S., JUNG, M., ZIMMERMANN, R. Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. **Biol. Chem.**, v. 385, n. 5, p. 389-395, 2004.

BILLINGTON, W. D. Biology of trophoblast. **Adv. Reprod. Physiol.**, v. 5, p. 27-66, 1971.

BLACK, S., KADYROV, M., KAUFMANN, P., UGELE, B., EMANS, N., HUPPERTZ, B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. **Cell Death Differ.**, v. 11, n. 1, p. 90-98, 2004.

BOLTON, V. N., OADES, P. J., JOHNSON, M. H. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 79, p. 139-163, 1984.

BORG, F., GRAVINO, G., SCHEMBRI-WISMAYER, P., CALLEJA-AGIUS, J. Prediction of preterm birth. **Minerva Ginecol.**, v. 65, n. 3, p. 345-360, 2013.

BOYD, J. D., HAMILTON, W. J. Cleavage, early development and implantation of the egg. In: PARKERS, A. S. **Marshall's Physiology of Reproduction**. 3rd ed. London: Logman, p. 1-126, 1952.

BROCARD, P. S., GIL-MOHAPEL, J., CHRISTIE, B. R. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Res. Rev.**, v. 67, n. 1-2, p. 209-225, 2011.

BURTON, G. J., YUNG, H. W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertens.**, v. 1, n. 1-2, p. 72-78, 2011.

CARTER, A. M. Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies--a review. **Placenta**, Suppl A:S31-37, 2000.

CHEN, S. H., BABICHEV, Y., RODRIGUES, N., VOSKAS, D., LING, L., NGUYEN, V. P. K. H., DUMONT, D. J. Gene expression analysis of Tek/Tie2 signaling. **Physiol. Genomics**, v. 22, p. 257-267, 2005.

CHOMICZZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J. M., BRENNER, S.E. WebLogo: A sequence logo generator, **Genome Res.**, v. 14, p. 1188-1190, 2004.

CROSS, J. C., WERB, Z., FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1508-1518, 1994.

CROSS, J. C., HEMBERGER, M., LU, Y., NOZAKI, T., WHITELEY, K., MASUTANI, M., ADAMSON, S. L. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 187, n. 1-2, p. 207-212, 2002.

CROWLEY-WEBER, C. L., DVORAKOVA, K., CROWLEY, C., BERNSTEIN, H., BERNSTEIN, C., GAREWAL, H., PAYNE, C. M. Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. **Chem. Biol. Interact.**, v. 145, n. 1, p. 53-66, 2003.

DAMSKY, C. H., FITZGERALD, M. L., FISHER, S. J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 89, n. 1, p. 210-222, 1992.

DANIAL, N. N., KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DEY, S. K., LIM, H., DAS, S. K., REESE, J., PARIA, B. C., DAIKOKU, T., WANG, H. Molecular cues to implantation. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 3, p. 341-373, 2004.

EDWARDS, A. K., JANZEN-PANG, J., PENG, A. R., TAYADE, C., CARNIATO, A., YAMADA, A. T., LIMA, P., TSE, D. Microscopy anatomy of the pregnant mouse uterus throughout gestation. In: CROY, B. A., YAMADA, A. T., DEMAYO, F. J., ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1st ed. USA: Elsevier, p. 43-68, 2014.

ELLIOT, M. G., CRESPI, B. J. Phylogenetic evidence for early hemochorial placentation in eutheria. **Placenta**, v. 30, n. 11, p. 949-967, 2009.

ENDERS, A. C., SCHLAFKE, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. **Am. J. Anat.**, v. 125, n. 1, p. 1-29, 1969.

ENDERS, A. C., LOPATA, A. Implantation in the marmoset monkey: expansion of the early implantation site. **Anat. Rec.**, v. 256, n. 3, p. 279-299, 1999.

FISHER, S. J. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 5, p. 53, 2004.

FUKUDA, S., SUMII, M., MASUDA, Y., TAKAHASHI, M., KOIKE, N., TEISHIMA, J., YASUMOTO, H., ITAMOTO, T., ASAHARA, T., DOHI, K., KAMIYA, K. Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, n. 1, p. 407-414, 2001.

GAO, H. J., ZHU, Y. M., HE, W. H., LIU, A. X., DONG, M. Y., JIN, M., SHENG, J. Z., HUANG, H. F. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss. **Mol. Biol. Rep.**, v. 39, n. 9, p. 9179-9186, 2012.

GENBACEV, O., BASS, K. E., JOSLIN, R. J., FISHER, S. J. Maternal smoking inhibits early human cytotrophoblast differentiation. **Reprod. Toxicol.**, v. 9, n. 3, p. 245-255, 1995.

GENBACEV, O., ZHOU, Y., LUDLOW, J. W., FISHER, S. J. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. **Science**, v. 277, p. 1669-1672, 1997.

GONÇALVES, C. R., ANTONINI, S., VIANNA-MORGANTE, A. M., MACHADO-SANTELLI, G. M., BEVILACQUA, E. Developmental changes in the ploidy of mouse implanting trophoblast cells in vitro. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 119, n. 3, p. 189-198, 2003.

GOSH, R., LIPSON, K. L., SARGENT, K., MERCURIO, A. M., HUNT, J. S., RON, D., URANO, F. Transcriptional regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9575, 2010.

GROENMAN, F. A., RUTTER, M., WANG, J., CANIGGIA, I., TIBBOEL, D., POST, M. Effect of chemical stabilizers of hypoxia-inducible factors on early lung development. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 293, n. 3, p. L557-567, 2007.

HAMADA, T., TASHIRO, K., TADA, H., INAZAWA, J., SHIROZU, M., SHIBAHARA, K., NAKAMURA, T., MARTINA, N., NAKANO, T., HONJO, T. Isolation and characterization of a novel secretory protein, stromal cell-derived factor-2 (SDF2) using the signal sequence trap method. **Gene**, v. 176, p. 211-214, 1996.

HANDWERGER, S. New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 323, p. 94-104, 2010.

HAO, L., VASSENA, R., WU, G., HAN, Z., CHENG, Y., LATHAM, K. E., SAPIENZA, C. The unfolded protein response contributes to preimplantation mouse embryo death in the DDK syndrome. **Biol. Reprod.**, v. 80, n. 5, p. 944-953, 2009.

HARRIS, L. K. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. **Placenta**, Suppl: S93-98, 2010.

HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: A Lab. Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. p. 92-137, 1988.

HEMBERGER, M., DEAN, W. First cell fate decisions in early development: towards establishment of the trophoblast lineage. In: CROY, B. A., YAMADA, A. T., DEMAYO, F. J., ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1st ed. USA: Elsevier, p. 95-106, 2014.

HETZ, C., BERNASCONI, P., FISHER, J., LEE, A. H., BASSIK, M. C., ANTONSSON, B., BRANDT, G. S., IWAKOSHI, N. N., SCHINZEL, A., GLIMCHER, L. H., KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 572-576, 2006.

HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HINDERSTEIN, W., KAHN, A., KOREN, Z. A modification of technique for obtaining the intact blastocyst from the uterus of 7 1/2 day gestational mouse. **Int. J. Fertil.**, v. 17, p. 72-74, 1972.

HOSHIDA, M. S., GORJÃO, R., LIMA, C., DAHER, S., CURI, R., BEVILACQUA, E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. **Placenta**, v. 28, p. 1059-1072, 2007.

HOSHIDA, M. Profiling expression patterns of interferon-gamma treated trophoblast cells by cDNA macroarray. **Placenta**, v. 29, n. 1, p. 103, 2008.

HOSOI, T., TAMUBO, T., HORIE, N., OKUMA, Y., NOMURA, Y., OZAWA, K. TEK/Tie2 is a novel gene involved in endoplasmic reticulum stress. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 114, n. 2, p. 230-233, 2010.

HU, D., CROSS, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 54, n. 2-3, p. 341-354, 2010.

HUPPERTZ, B., GHOSH, D., SENGUPTA, J. An integrative view on the physiology of human early placental villi. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 114, n. 1, p. 33-48, 2014.

HYODA, K., HOSOI, T., HORIE, N., OKUMA, Y., OZAWA, K., NOMURA, Y. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 340, n. 1, p. 286-290, 2006.

IMPERATORE, A., ROLFO, A., PETRAGLIA, F., CHALLIS, J. R., CANIGGIA, I. Hypoxia and preeclampsia: increased expression of urocortin 2 and urocortin 3. **Reprod. Sci.**, v. 17, n. 9, p. 833-843, 2010.

IWAWAKI, T., AKAI, R., KOHNO, K., MIURA, M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. **Nat. Med.**, v. 10, n. 1, p. 98-102, 2004.

IWAWAKI, T., AKAI, R., YAMANAKA, S., KOHNO, K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 106, n. 39, p. 16657-16662, 2009.

JAIN, A., OLOVSSON, M., BURTON, G. J., YUNG, H. W. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP(3) pathway: implications for placental pathophysiology in preeclampsia. **Am. J. Pathol.**, v. 180, n. 6, p. 2309-2320 2012.

JAIN, A. Endothelin-1-induced endoplasmic reticulum stress in disease. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 346, n. 2, p. 163-172, 2013.

JONES, T. B., BAILEY, B. A., SOKOL, R. J. Alcohol use in pregnancy: insights in screening and intervention for the clinician. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 56, n. 1, p. 114-123, 2013.

JORDÃO, B. P., TERRA, W. R., RIBEIRO, A. F., LEHANE, M. J., FERREIRA, C. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunohistochemical study. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, n. 4, p. 337-346, 1996.

KANG, H., ESCUDERO-ESPARZA, A., DOUGLAS-JONES, A., MANSEL, R. E., JIANG, W. G. Transcript analyses of stromal cell derived factors (SDFs): SDF-2, SDF-4 and SDF-5 reveal a different pattern of expression and prognostic association in human breast cancer. **Int. J. Oncol.**, v. 35, p. 205-211, 2009.

KATZ, S., ABRAHAMSOHN, P. A. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study. **Anat. Embryol.**, v. 176, n. 2, p. 251-258, 1987.

KAUFMANN, P., BLACK, S., HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biol. Reprod.**, v. 69, n. 1, p. 1-7, 2003.

KAWAKAMI, T., YOSHIMI, M., KADOTA, Y., INOUE, M., SATO, M., SUZUKI, S. Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 275, n. 2, p. 134-144, 2014.

KELLEY, L. A., STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.

LEE, S. I., KANG, K. L., SHIN, S. I., HERR, Y., LEE, Y. M., KIM, E. C. Endoplasmic reticulum stress modulates nicotine-induced extracellular matrix degradation in human periodontal ligament cells. **J. Periodontal Res.**, v. 47, n. 3, p. 299-308, 2012.

LIAN, I. A., LØSET, M., MUNDAL, S. B., FENSTAD, M. H., JOHNSON, M. P., EIDE, I. P., BJØRGE, L., FREED, K. A., MOSES, E. K., AUSTGULEN, R. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 823-829, 2011.

LIN, J. H., LI, H., YASUMURA, D., COHEN, H. R., ZHANG, C., PANNING, B., SHOKAT, K. M., LAVAIL, M. M., WALTER, P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. **Science**, v. 318, n. 5852, p. 944-949, 2007.

LIU, A. X., HE, W. H., YIN, L. J., LV, P. P., ZHANG, Y., SHENG, J. Z., LEUNG, P. C., HUANG, H. F. Sustained endoplasmic reticulum stress as a cofactor of oxidative stress in decidual cells from patients with early pregnancy loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 3, p. E493-497, 2011.

LORENZON-OJEA, A. R., CALDEIRA, W., RIBEIRO, A. F., FISHER, S. J., GUZZO, C. R., BEVILACQUA, E. Stromal cell derived factor-2 (Sdf2): A novel protein expressed in mouse. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 53C, p. 262-270, 2014.

LU, M., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S., ACOSTA-ALVEAR, D., KIMMIG, P., MENDEZ, A. S., PATON, A. W., PATON, J. C., WALTER, P., ASHKENAZI, A. Cell death. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. **Science**, v. 345, n. 6192, p. 98-101, 2014.

MA, X., FAN, L., MENG, Y., HOU, Z., MAO, Y. D., WANG, W., DING W., LIU J. Y. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 13, n. 8, p. 527-535, 2007.

MCMASTER, M., ZHOU, Y., SHORTER, S., KAPASI, K., GERAGHTY, D., LIM, K. H., FISHER, S. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. **J. Immunol.**, v. 160, n. 12, p. 5922-5928, 1998.

MEI, Y., THOMPSON, M. D., COHEN, R. A., TONG, X. Endoplasmic Reticulum Stress and Related Pathological Processes. **J. Pharmacol. Biomed. Anal.**, v. 1, n. 2, p. :1000107, 2013.

MELLER, M., VADACHKORIA, S., LUTHY, D. A., WILLIAMS, M. A. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. **Placenta**, v. 26, n. 8-9, p. 601-607, 2005.

MEUNIER, L., USHERWOOD, Y. K., CHUNG, K. T., HENDERSHOT, L. M. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. **Mol. Biol. Cell.**, v. 13, n. 12, p. 4456-4469, 2002.

MOORE, K. A., HOLLIEN, J. The unfolded protein response in secretory cell function. **Annu. Rev. Genet.**, v. 46, p. 165-183, 2012.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. In: **The developing human – Clinically oriented embryology**. 8th ed. Philadelphia, USA: Saunders, Elsevier, p. 22-143, 2008.

MURTHI, P., FITZPATRICK, E., BORG, A. J., DONATH, S., BRENNECKE, S. P., KALIONIS, B. GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 798-801, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. Edição em português – AAALAC e COBEA – Goiânia, 2003.

NORWITZ, E. R., SCHUST, D. J., FISHER, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 19, p. 1400-1408, 2001.

OIKAWA, D., IWAWAKI, T. Positive contribution of IRE1 α -XBP1 pathway to the expression of placental cathepsins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 433, n. 4, p. 426-431, 2013.

OSTERGAARD, L., SIMONSEN, U., ESKILDSEN-HELMOND, Y., VORUM, H., ULDBJERG, N., HONORÉ, B., MULVANY, M. J. Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmic stress proteins in human endothelial cells. **Proteomics**, v. 9, n. 19, p. 4457-4467, 2009.

OYADOMARI, S., MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ.**, v. 11, n. 4, p. 381-389, 2004.

PAFFARO, V. A. JR., BIZINOTTO, M. C., JOAZEIRO, P. P., YAMADA, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v. 24, n. 5, p. 479-488, 2003.

PANDOL, S. J., GORELICK, F. S., GERLOFF, A., LUGEA, A. Alcohol abuse, endoplasmic reticulum stress and pancreatitis. **Dig. Dis.**, v. 28, n. 6, p. 776-782, 2010.

PANG, S. C., JAZEN-PANG, J., TSE, M. Y., CROY, B. A., LIMA, P. D. A. The cycling and pregnant mouse: gross anatomy. In: CROY, B. A., YAMADA, A. T., DEMAYO, F. J., ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1st ed. USA: Elsevier, p. 3-20, 2014.

PARK, C. J., SHARMA, R., LEFEBVRE, B., CANLAS, P. E., RONALD, P. C. The endoplasmic reticulum-quality control component SDF2 is essential for XA21-mediated immunity in rice. **Plant. Sci.**, v. 210, p. 53-60, 2013.

PERONA, R. M., WASSARMAN, P. M. Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. **Dev. Biol.**, v. 114, n. 1, p. 42-52, 1986.

PIJNENBORG, R., BLAND, J. M., ROBERTSON, W. B., DIXON, G., BROSENS, I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. **Placenta**, n. 2, v. 4, p. 303-316, 1981.

RAI, A., CROSS, J. C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. **Dev. Biol.**, v. 387, n. 2, p. 131-141, 2014.

REPO, J. K., PESONEN, M., MANNELLI, C., VÄHÄKANGAS, K., LOIKKANEN, J. Exposure to ethanol and nicotine induces stress responses in human placental BeWo cells. **Toxicol. Lett.**, v. 224, n. 2, p. 264-271, 2014.

LAVERY, J. P., MILLER, C. E., KNIGHT, R. D. The effect of labor on the rheologic response of chorioamniotic membranes. **Obstet. Gynecol.**, v. 60, n. 1, p. 87-92, 1982.

RINALDI, S. F., CATALANO, R. D., WADE, J., ROSSI, A. G., NORMAN, J. E. Decidual neutrophil infiltration is not required for preterm birth in a mouse model of infection-induced preterm labor. **J. Immunol.**, v. 192, n. 5, p. 2315-2325, 2014.

SALAMONSEN, L. A., DIMITRIADIS, E., JONES, R. L., NIE, G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. **Placenta**, Suppl A:S76-85, 2003

SALVESEN, G. S., ASHKENAZI, A. Snapshot: caspases. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 476-476e1, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. In: **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANO, R., REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1833, n. 12, p. 3460-3470, 2013.

SCHOTT, A., RAVAUD, S., KELLER, S., RADZIMANOWSKI, J., VIOTTI, C., HILLMER, S., SINNING, I., STRAHL, S. Arabidopsis Stromal Cell Derived Factor2 (SDF2) is a crucial target of the Unfolded Protein Response in the Endoplasmic Reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 23, p. 18113-18121, 2010.

SCHÖNTHAL, A. H. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, n. 5, p. 653-666, 2013.

SCREEN, M., DEAN, W., CROSS, J. C., HEMBERGER, M. Cathepsin proteases have distinct roles in trophoblast function and vascular remodelling. **Development**, v. 135, n. 19, p. 3311-3320, 2008.

SHEIKH-ALI, M., SULTAN, S., ALAMIR, A. R., HAAS, M. J., MOORADIAN, A. D. Effects of antioxidants on glucose-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 87, n. 2, p. 161-166, 2010.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SCHEUNER, D., SONG, B., MCEWEN, E., LIU, C., LAYBUTT, R., GILLESPIE, P., SAUNDERS, T., BONNER-WEIR, S., KAUFMAN, R. J. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Mol. Cell.**, v. 7, n. 6, p. 1165-1176, 2001.

SIMMONS, D. G. Postimplantation development of the chorioallantoic placenta. In: CROY, B. A., YAMADA, A. T., DEMAYO, F. J., ADAMSON, S. L. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. 1st ed. USA: Elsevier, p. 143-162, 2014.

SIMMONS, D. G., FORTIER, A. L., CROSS, J. C. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. **Dev. Biol.**, v. ;304, p. 567–578, 2007.

SNELL, G. D., STEVENS, L. C. Early embryology. In: Green EL, editor. **Biology of the laboratory mouse**. New York: Blackstone, p. 205–245, 1966.

TEDNER, S. G., ÖRTQVIST, A. K., ALMQVIST, C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 42, n. 10, p. 1430-1447, 2012.

THOMPSON, E. W., SUNG, V., LAVIGNE, M., BAUMANN, K., AZUMI, N., AARON, A. D., CLARKE, R. LCC15-MB: a vimentin-positive human breast cancer cell line from a femoral bone metastasis. **Clin. Exp. Metastasis.**, v. 17, p. 193-204, 1999.

TONGAONKAR, P., SELSTED, M. E. SDF2L1, a component of the endoplasmic reticulum chaperone complex, differentially interacts with {alpha}-, {beta}-, and {theta}-defensin propeptides. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 9, p. 5602-5609, 2009.

ULLAH, Z., LEE, C. Y., LILLY, M. A., DEPAMPHILIS, M. L. Developmentally programmed endoreduplication in animals. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1501-1509, 2009.

VENDRELL, E., RIBAS, M., VALLS, J., SOLÉ, X., GRAU, M., MORENO, V., CAPELLÀ, G., PEINADO, M. A. Genomic and transcriptomic prognostic factors in R0 Dukes B and C colorectal cancer patients. **Int. J. Oncol.**, v. 30, p. 1099-1107, 2007.

VO, T., HARDY, D. B. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. **J. Cell. Commun. Signal.**, v. 6, n. 3, p. 139-153, 2012.

WALTER, P., RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081-1086, 2011.

WANG, H., LI, L., ZHAO, M., CHEN, Y. H., ZHANG, Z. H., ZHANG, C., JI, Y. L., MENG X. H., XU D. X. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced placental cellular stress response in mice. **J. Pineal. Res.**, v. 50, n. 4, p. 418-426, 2011.

WANG, F., REECE, E. A., YANG, P. Superoxide dismutase 1 overexpression in mice abolishes maternal diabetes-induced endoplasmic reticulum stress in diabetic embryopathy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 209, n. 4, p. 345.e1-7, 2013.

WANG, W. A., GROENENDYK, J., MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1843, n. 10, p. 2143-2149, 2014.

WANG, Y., HU, H., LI, H., MA, H., XU, F., QU, B. Effects of lead exposure on placental cellular apoptosis and endoplasmic reticulum stress in rats. **Chin. Med. J.**, v. 127, n. 9, p. 1744-1748, 2014.

WEST, J. R., BLAKE, C. A. Fetal alcohol syndrome: an assessment of the field. **Exp. Biol. Med.**, v. 230, n. 6, p. 354-6, 2005.

YUNG, H. W., KOROLCHUK, S., TOLKOVSKY, A. M., CHARNOCK-JONES, D. S., BURTON, G. J. Endoplasmic reticulum stress exacerbates ischemia-reperfusion-

induced apoptosis through attenuation of Akt protein synthesis in human choriocarcinoma cells. **FASEB J.**, v. 21, n. 3, p. 872-84, 2007.

YUNG, H., CALABRESE, S., HYNX, D., HEMMINGS, B. A., CETIN, I., CHARNOCK-JONES, D. S., BURTON, G. J. Evidence of placental translation inhibition and Endoplasmic Reticulum Stress in the etiology of Human Intrauterine Growth Restriction. **Am. J. Pathol.**, v. 173, n. 2, p. 451-462, 2008.

YUNG, H. W., CHARNOCK-JONES, D. S., BURTON, G. J. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17894, 2011.

YUNG, H. W., COX, M., TISSOT VAN PATOT, M., BURTON, G. J. Evidence of endoplasmic reticulum stress and protein synthesis inhibition in the placenta of non-native women at high altitude. **FASEB J.**, v. 26, n. 5, p. 1970-1981, 2012 a.

YUNG, H. W., HEMBERGER, M., WATSON, E. D., SENNER, C. E., JONES, C. P., KAUFMAN, R. J., CHARNOCK-JONES, D. S., BURTON, G. J. Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. **J. Pathol.**, v. 228, p. 554–564, 2012 b.

YUNG, H. W., COLLEONI, F., ATKINSON, D., COOK, E., MURRAY, A. J., BURTON, G. J., CHARNOCK-JONES, D. S. Influence of speed of sample processing on placental energetics and signalling pathways: implications for tissue collection. **Placenta**, v. 35, n. 2, p. 103-108, 2014.

ZHANG, J., CHEN, Z., SMITH, G. N., CROY, B. A. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell. Mol. Immunol.**, v. 8, p. 1–11, 2011.

ZYBINA, E. V., ZYBINA, T. G. Polytene chromosomes in mammalian cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 165, p. 53-119, 1996.