

GEILA MARIA ZANARDI

**DETECÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA GLICONEOGÊNESE NA
PLACENTA DE FÊMEAS BOVINAS**

LAGES – SC

2008

**DETECÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA GLICONEOGÊNESE NA
PLACENTA DE FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias, da Universidade do Estado
de Santa Catarina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Luiz Claudio Miletto

LAGES – SC

2008

GEILA MARIA ZANARDI

**DETECÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DA GLICONEOGÊNESE NA
PLACENTA DE FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Banca Examinadora:

Orientador(a):

Doutor, Luiz Claudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Doutor, Carlos André da Veiga Lima Rosa
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:

Doutor, Sergio Ceroni da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lages, SC 18/12/2008.

AGRADECIMENTOS

- ▶ Agradeço à **Universidade do Estado de Santa Catarina** que me proporcionou oportunidades para a realização deste trabalho.
- ▶ Ao Prof. **Dr. Luiz Claudio Miletti**, meu orientador, por sua compreensão, amizade e esmerada supervisão.
- ▶ À Profa. **Dra. Luciana Bertolini**, pelo apoio constante e incansável, e por sua amizade.
- ▶ Ao Prof. **Dr. Marcelo Bertolini** pela amizade e oportunidade de crescer profissionalmente.
- ▶ Ao Prof. **Dr. Alceu Mezzalira** pelo seu apoio e por ter disponibilizado o espaço físico para a criação do Laboratório de Biologia Molecular anexo ao Laboratório de Reprodução Animal.
- ▶ Ao Prof. **Dr. Altamir Guidolim** por ter disponibilizado a utilização do Laboratório de DNA – CAV-UDESC e seus equipamentos sempre que necessário.
- ▶ Ao bolsista de iniciação científica **Kaio César Simiano Tavares** por sua dedicação e companheirismo na parte experimental deste trabalho.
- ▶ À doutoranda **Patrícia Hermes Stoco** pela sua grande ajuda e dedicação.
- ▶ Ao Prof. **Dr. Edmundo Carlos Grisard** por ter disponibilizado a utilização de equipamentos do Laboratório de Parasitologia da UFSC.
- ▶ A todos os professores, mestrandos, bolsistas e estagiários do **Laboratório de Reprodução Animal** do CAV-UDESC.
- ▶ À **Capes** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

**O principal valor da vida é a dignidade;
A principal felicidade na vida é a alegria espiritual;
A principal esperança na vida é a paz;
A principal devoção na vida é beneficiar os seres.**

Autor desconhecido

RESUMO

Uma característica singular do desenvolvimento dos mamíferos é a provisão de nutrientes do organismo materno por intermédio da placenta. Para o feto, a placenta consiste na combinação, em apenas um órgão, de muitas atividades funcionais, que no adulto são separadas e, além disso, possui um intenso metabolismo. Este trabalho teve como objetivo verificar a expressão de enzimas chave na placenta bovina para a gliconeogênese, que consiste em uma via metabólica capaz de sintetizar D-glicose, utilizando-se compostos que não são carboidratos. Essa via se processa no fígado e é utilizada pelo organismo para manter os níveis glicêmicos normais em condições de jejum e de pós-absorção. Atualmente não existem estudos sobre a gliconeogênese na placenta bovina. Neste estudo foi avaliada a expressão gênica na placenta bovina de três enzimas gliconeogênicas: frutose-1,6-bisfosfatase (F1,6B), glicose-6-fosfatase (G6-P) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP-CK) nos três trimestres gestacionais. Para tanto, foram utilizados fragmentos de placentônios de 5 fêmeas bovinas para cada terço de gestação para a avaliação da expressão gênica das três enzimas gliconeogênicas após a transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os produtos de PCR amplificados obtidos para cada enzima na placenta bem como para o fígado de animal adulto, que foi utilizado como controle positivo, foram analisados em gel de agarose a 1%, purificados, clonados e seqüenciados para a confirmação da especificidade de amplificação. A análise da expressão gênica através do RT-PCR e o sequenciamento demonstrou a presença de mRNA para as três enzimas gliconeogênicas na placenta bovina nos três períodos gestacionais. Baseado em nossos resultados, é possível que a rota gliconeogênica ocorra no tecido placentário de bovinos durante a gestação. Porém, ainda são necessários mais estudos para a confirmação da ocorrência e importância temporal da gliconeogênese na placenta bovina.

PALAVRAS-CHAVE: Placenta, gliconeogênese, RNA, bovinos, metabolismo.

ABSTRACT

A singular feature during mammalian development is the provision of nutrients from the maternal system to the conceptus through the placenta. To the fetus, the placenta consists of a multi-functional organ with an intense metabolism, characterized in an adult as separated functions in multiple organs. This study aimed to verify the presence of key enzymes in the bovine placenta responsible for glyconeogenesis, which is a metabolic pathway used for D-glucose synthesis from non-carbohydrate compounds. Such pathway is common to the liver metabolism used to maintain glucose homeostasis in plasma, especially during fasting or post-prandial absorption. No studies on the occurrence of glyconeogenesis in the bovine placenta have been reported thus far. In this study, a qualitative gene expression analysis was carried out for three key glyconeogenic enzymes: fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6B), glucose-6-phosphatase (G6-P) e phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEP-CK) in the bovine placental tissue at three distinct gestation periods. For that, placentome fragments from 5 pregnant females from each period were used for the detection of transcripts for the three enzymes above by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Amplified PCR products obtained for each enzyme from the placenta and adult liver (positive control) were analyzed in 1% agarose gel, followed by purification, DNA cloning e sequencing for confirmation of amplification specificity. The RT-PCR analysis followed by DNA sequencing revealed the presence of all three glyconeogenic enzymes in the bovine placenta from all three gestational periods. Based on our results, the glyconeogenic pathway may occur in the placental tissue in cattle during pregnancy. However, more studies are still needed for the confirmation of the occurrence and temporal importance of the glyconeogenesis in the bovine placenta.

KEYWORDS: Placenta, glyconeogenesis, RNA, cattle, metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância

ATP - Adenosina Trifosfato

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

°C - Graus Celsius

cDNA - DNA complementar ao RNA

CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias

CIV – Cultivo in vitro

cm - centímetro

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético

F1,6-B – Frutose 1,6 - bifosfatase

FIV – Fertilização in vitro

GAPDH – Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase, do inglês *Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase*

g - Força da gravidade

G6-P – Glicose 6-fosfatase

GTE – Glicose, tris, EDTA

IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina, do inglês *insulin-like growth factor*

LB – Luria Bertani

LPL – Lipoproteína lipase

M - molaridade

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

mg - miligrama

ml - mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

nm - nanômetro

pb – Pares de bases

PBS - Solução tampão salina fosfato, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
pH - Potencial hidrogeniônico
PIV – Produção in vitro
pmol – picomol
PEP-CK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
RNA – Ácido ribonucléico
RT – PCR – Transcrição Reversa do PCR, do inglês *Reverse Transcriptase*
SBAG – Síndrome de bezerras absolutamente grandes
Taq polimerase - DNA polimerase de *Thermus aquaticus*
TBE – Tris Borato EDTA
TE – Tris EDTA
TN – Transferência nuclear
TRIS – Tris- hidroximetil aminometano
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês *very low density lipoproteins*
V - Volt
% - Porcentagem
 μg - micrograma
 μl – microlitro
 μM - micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
	2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
	3.1 PLACENTA BOVINA	14
	3.2 GLICONEOGÊNESE	20
	3.2.1 Etapas da gliconeogênese	21
	3.3 METABOLISMO MATERNO E PLACENTÁRIO DURANTE A GESTAÇÃO	24
	3.3.1 Metabolismo lipídico	25
	3.3.2 Metabolismo protéico	25
	3.3.3 Metabolismo glicídico	26
	3.4 CRESCIMENTO FETAL	27
	3.4.1 Alterações epigenéticas	28
	3.5 PROBLEMAS FETAIS EM CONCEPTOS ORIUNDOS DE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO IN VITRO (PIV) DE EMBRIÕES	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
	4.1 Coleta e preparação do extrato de tecido	33
	4.2 Extração do RNA total	34
	4.3 Quantificação do RNA total	35
	4.4 Síntese dos cDNAs	35
	4.5 PCR	36
	4.5.1 Projeção dos <i>primers</i>	36
	4.5.2 Eletroforese em gel de agarose	37
	4.5.3 Extração de DNA do gel de agarose	38
	4.6 Clonagem dos produtos de PCR	38
	4.6.1 Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio	38
	4.6.2 Reação de ligação	39
	4.6.3 Transformação	39
	4.6.7 Extração de DNA plasmidial	40
	4.6.8 Digestão dos clones selecionados	40
	4.7 – SEQUENCIAMENTO DE DNA	40
	4.7.1 Análises das seqüências obtidas	41
	5.1 Frutose 1,6 bifosfatase (F1,6-B)	42
	5.2 Glicose 6-fosfatase (G6-P)	43
	5.3 Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP-CK)	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a placenta controla a transferência de uma grande variedade de substâncias por vários processos, como a difusão simples e facilitada, transporte ativo, fagocitose e pinocitose. Além disso, a placenta desempenha muitas funções, tais como respiração, proteção, nutrição e produção de hormônios, substituindo o trato gastrointestinal, os pulmões, os rins, o fígado e as glândulas endócrinas do feto durante a gestação.

A forma definitiva da placenta é determinada pela distribuição das vilosidades sobre a superfície coriônica. Nos ruminantes, a placenta é do tipo cotiledonária e sinepiteliocorial. O tecido cotiledonário fetal forma vilos que se projetam em direção ao tecido caruncular materno, formando a unidade de interação materno-fetal, chamada de placentônio.

A placenta desempenha um papel central na regulação do crescimento fetal, devido ao seu envolvimento na regulação da oferta de substratos ao conceito, e a produção e transporte de hormônios, substratos e outras substâncias para o sistema materno, durante toda a prenhez. Metabolicamente, é importante reconhecer que a maioria dos metabólitos transferidas através da placenta são metabolizados e/ou produzidos pelos tecido placentário (FERREL, 1989).

Visto que a placenta é um órgão importante para a nutrição e desenvolvimento fetal em todos os mamíferos, haveria a possibilidade deste órgão possuir a via gliconeogênica como forma de produzir D-glicose, importante substrato para o conceito. A gliconeogênese é uma importante via metabólica que o organismo dispõe, para produzir D-glicose a partir de compostos que não são carboidratos. Sempre que os níveis de D-glicose sanguínea estiverem diminuídos, compostos como alanina, lactato, glicerol e ácido propiônico podem ser transformados em D-glicose através da via gliconeogênica para normalizar os níveis glicêmicos. Essa via é ativada em condições de jejum e no período pós-absortivo. Nos ruminantes, o ácido propiônico, derivado das fermentações de carboidratos no rúmen, é o principal composto gliconeogênico.

A síntese de glicose por gliconeogênese processa-se em sentido contrário ao da glicólise, utilizando quase todas as suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis. Dessa forma, a gliconeogênese difere da glicólise em três etapas que são: conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato, catalisada pela piruvato quinase que é substituída por duas reações, catalisadas pela piruvato carboxilase e pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase; a conversão da frutose 1,6-bifosfato à frutose 6-fosfato, catalisada pela fosfofrutoquinase que é substituída pela frutose 1,6-bifosfatase; e finalmente, a conversão da

glicose 6-fosfato à D-glicose, pela substituição da enzima glicoquinase pela glicose 6-fosfatase.

A maior parte dos nutrientes transferidos através da placenta são metabolizados e/ou produzidos por este órgão (FERRELL et al., 1983; FERRELL, 1989). A placenta é praticamente o único órgão responsável pelas trocas entre os sistemas materno e fetal, onde todos os substratos necessários para o crescimento e desenvolvimento feto-placentário provêm direta ou indiretamente do sistema materno, e a quantidade absoluta e relativa de tais substratos que atingem o feto, em última instância, são transportados, metabolizados ou modificados pela placenta. Aproximadamente 90% do peso fetal a termo é adquirido durante o último trimestre de gestação (FERRELL, 1989), e o crescimento absoluto fetal e placentário continua a aumentar até o parto, mas acredita-se que o declínio no crescimento relativo fetal nas últimas semanas de gestação ocorre em consequência da restrição, que o tecido placentário impõe ao feto, exatamente quando a demanda fetal por nutrientes é maior (PRIOR e LASTER, 1979; REYNOLDS et al., 1990). Disfunções no metabolismo e função placentária podem causar alterações (ou perda) no efeito constritor placentário sobre o crescimento fetal no final da gestação.

Desta forma, considerando a atividade metabólica intensa do tecido placentário, especulamos que a gliconeogênese possa ter papel significativo no crescimento e desenvolvimento do conceito bovino, em especial do feto, com possíveis variações importantes ao longo da gestação. Embora tenha sido descrita a presença de enzimas gliconeogênicas na placenta de ratas (BAGEWADIKAR et al., 1977) e de mulheres (PAPAMARCAKI e TSOLAS, 1991), ainda não foi demonstrada a participação da gliconeogênese como uma via para produção de glicose na placenta de bovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- (a) Colaborar no entendimento do metabolismo placentário em bovinos e sua associação à fisiopatologia da gestação.
- (b) Compreender o papel da gliconeogênese, se presente na placenta bovina, no metabolismo feto-placentário durante os distintos períodos gestacionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Estudar a ocorrência de expressão gênica das três enzimas gliconeogênicas, a frutose 1,6 bifosfatase, a glicose 6-fosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase nos três terços gestacionais da placenta bovina através da extração do mRNA, síntese do cDNA, amplificação com *primers* específicos, e clonagem e sequenciamento dos produtos obtidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLACENTA BOVINA

Realdus Columbus (1516-1559) introduziu o termo “PLACENTA” ao descrever as estruturas liberadas após o parto, em mulheres, como uma “affusion of residual material in the form of circular cake”, ou seja, uma afusão de material residual em forma de um bolo circular. Atualmente, o termo placenta possui um significado mais amplo, não se referindo apenas às estruturas discoidais encontradas em mulheres, coelhos, ratos, camundongos e cobaias, mas a todas as estruturas – não importando a forma – que permitam uma aposição, ou fusão, entre as membranas fetais e a mucosa uterina, de maneira que ocorram trocas fisiológicas (ATKINSON et al., 1984).

A morfogenia da placenta durante o início da gestação está intimamente relacionada às membranas fetais, que são diferenciadas em cório, alantóide, saco vitelínico e âmnio. Estas membranas participam da formação da placenta, separadamente ou em combinações, dando origem a três tipos de placentação, a coriônica, a corioalantóide e o saco vitelínico (NETO, 2005).

Após a fecundação, o embrião passa por vários estágios de divisão (clivagem), modelagem e compactação de células (blastômeros), correspondendo ao estágio de mórula. Em seguida passa para o estágio de blastocisto, quando desenvolve-se uma cavidade preenchida de fluidos, a blastocele, que está circundada por uma camada celular simples, o trofoectoderma. Estas células formam a parede externa do concepto, assumindo funções especializadas, sendo conhecidas como células trofoblásticas, as quais, combinadas com o mesoderma subjacente, formam o cório. O cório é intrinsecamente um tecido avascular, de forma que, para fazer parte da troca materno-fetal, o mesmo deve desenvolver uma circulação funcional (NETO, 2005).

Com o passar do tempo, mais fluidos são produzidos dentro da blastocele, resultando em uma expansão do embrião. Durante o estágio de blastocisto, outras células especializadas se agrupam, resultando em uma maior massa celular, a qual dará origem ao embrião propriamente dito. Uma segunda camada de células de origem endodérmica cresce logo abaixo da massa celular interna, contornando uma cavidade denominada de saco vitelino. Este vai formar a placenta coriovitelínica, que consiste em uma estrutura temporária que serve para

nutrir a placenta permanente, até que a mesma esteja formada. A partir da terceira semana de gestação, o saco vitelino involui e se degenera (KAUFMANN e BURTON, 1994).

O âmnio é formado a partir das células do trofoectoderma e do mesoderma somático. Ele envolve o embrião em crescimento e começa a formar um saco repleto de fluidos onde o feto irá flutuar até o final da gestação (Figura 1). Antes da parede abdominal ventral do embrião fechar, o intestino posterior se estende para formar uma estrutura saculiforme, o alantóide, que armazena resíduos metabólicos nitrogenados do feto. O alantóide e o cório fusionam-se para formar o córioalantóide, que é característica de todos os animais domésticos (LATSHAW, 1987). Uma característica do corioalantóide é o aumento da área na junção materno fetal pela formação de vilosidades coriônicas, que consistem em cones vasculares circundados por células trofoblásticas. A função das vilosidades coriônicas é colocar os vasos fetais (alantóide) em proximidade com os vasos sanguíneos maternos (GURTLER et al., 1987).

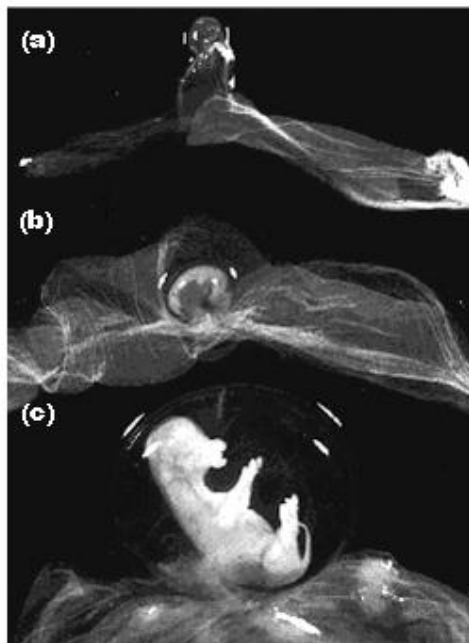


Figura 1. Fetos bovinos em início de placentação, com aproximadamente 30 (a), 40 (b) e 50 (c) dias de gestação. Os fetos estão envolvidos pela membrana amniótica repleta de líquido transparente. A membrana corioalantóide foi aberta para demonstrar melhor o saco amniótico. Os vasos placentários estão evidentes estendendo-se a partir do feto, ao longo do cordão umbilical, em sentido do corioalantóide, o qual inicia adesão no endométrio ao redor dos 33 dias de gestação. Os cotilédones ainda não estão aparentes. Fonte: Schlafer et al. (2000).

A implantação embrionária é resultante de uma série de interações altamente coordenadas que começam com o contato íntimo entre a superfície das membranas do concepto e o epitélio luminal uterino (NODEN e LAHUNTA, 1972). Cronologicamente o período completo da implantação é de 40-45 dias. Os bovinos apresentam um processo de implantação superficial, não invasivo que envolve três fases: aposição, adesão e fixação (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

À medida que o embrião vai se segmentando e formando o blastocisto como citado anteriormente, o útero também vai sofrendo modificações preparatórias para a implantação. Durante este período gestacional, a atividade muscular e a tonicidade do útero diminuem, o que pode auxiliar a retenção do blastocisto na luz uterina. Ao mesmo tempo, desenvolve-se um suprimento sanguíneo aumentado para o epitélio uterino. O conteúdo de aminoácidos e proteínas do fluído uterino se modifica na época da implantação. Associadas com o suprimento sanguíneo aumentado do útero ocorrem modificações na atividade secretora do epitélio glandular e superficial do endométrio. Compostos de alto peso molecular (proteínas, carboidratos, mucopolissacarídeos) são degradados, acumulando-se derivados de baixo peso molecular juntamente com glicogênio e gorduras. Este material, juntamente com restos celulares e leucócitos extravasados na luz uterina, forma o histiotrofo que nutre o embrião nos primórdios da vida uterina. A partir do 12º dia após a fecundação, a vesícula embrionária dos ruminantes cresce rapidamente e o trofoblasto alonga, ocupando fisicamente o interior do lúmen uterino, que, por volta do 18º dia, atinge um comprimento de mais de 16 cm. Até este momento, a nutrição do embrião ainda se processa por meio do histiotrofo (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

A placenta bovina é classificada como cotiledonária e sinepiteliocorial, referindo-se o primeiro termo ao arranjo tridimensional da placenta e o segundo, ao número de camadas celulares que separam a circulação materna da circulação fetal (WOODING, 1992). O córion inicia sua fixação em áreas especiais da superfície uterina, denominadas de carúnculas. Quando as membranas fetais extra-embrionárias crescem e se expandem junto com o lúmen do útero, a superfície plana do córion começa a ficar irregular e se remodela sobre a superfície das carúnculas, formando o cotilédone (Figura 2). O arranjo do cotilédone em vilos projetados e interdigitados em direção às criptas carunculares proporciona uma grande superfície de contato. A combinação de tecido cotiledonário e caruncular forma a unidade de interação feto-maternal, chamada de placentônio, com forma ovalada e significativas variações de

tamanho na fase madura, podendo chegar à dimensão de 10 a 12 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura (SCHLAFER et al., 2000).



Figura 2. Feto bovino com aproximadamente 70 dias de gestação e placenta com cotilédones evidentes. A expansão sofrida pelo âmnio permite a visualização de discretos cotilédones que, histologicamente, iniciaram sua formação aos 30 dias de gestação na superfície da membrana corioalantóide. Fonte: Schlafer et al. (2000).

O processo de fixação se estabelece nas carúnculas. Elas constituem áreas especializadas do endométrio de ruminantes, formadas pelo espessamento do tecido conjuntivo denso subepitelial, sem presença de glândulas, moderadamente vascularizadas por vasos finos que tendem, em seu desenvolvimento, a rumar para a superfície em ângulo reto. Entre as proeminências carunculares, encontramos as áreas intercarunculares que contêm uma grande quantidade de glândulas uterinas distribuídas pelo endotélio e um fino tecido conjuntivo subepitelial.

A formação dos vilos resulta de modificações nas áreas cotiledonárias do trofoblasto. Eles iniciam seu desenvolvimento como ramos da ectoderme fetal, apresentando, depois, em seu centro, tecido mesodérmico e veias alantóicas. Nas áreas de intervalos, o trofoblasto assume a conformação de uma arcada, como se formasse a fundação da árvore vilosa. O vilo insinua-se para dentro da carúncula materna, através de depressões ou criptas formadas em

sua superfície, aumentando em tamanho e ramificando-se em diferentes direções, conforme a prenhez avança. Não se sabe ao certo se os vilos crescem para dentro do tecido materno por ação mecânica ou por fagocitose. As criptas carunculares, por sua vez, são alinhadas com a ectoderma fetal e não são secretoras na essência da palavra. (ATKINSON et al., 1984; SCHLAFER et al., 2000).

O período entre o 28° dia e o 34° dia de gestação apresenta placentônios em vários estágios de desenvolvimento. Os placentônios menos desenvolvidos têm epitélios carunculares um pouco irregulares, sem evidências de vilos coriônicos ou criptas, e a frágil adesão dos tecidos permite um fácil descolamento entre o trofoblasto e o epitélio caruncular. Os placentônios mais desenvolvidos, nesse período, formam vilos coriônicos interdigitados e criptas carunculares. Entre o 46° e o 60° dia, aumentam consideravelmente tanto os vilos coriônicos principais como os vilos secundários. Os vilos terciários surgem nesse período, a partir dos vilos secundários, como projeções regulares, em forma de dedos, interdigitadas com a estrutura correspondente à das criptas carunculares (LEE et al., 1986).

A função de ambos, corioalantóide cotiledonário e intercotiledonário, é suprir o freqüente incremento de demanda metabólica fetal e suportar o rápido crescimento tecidual. Adicionalmente, existe uma extensiva síntese de proteínas dentro do tecido placentário e a produção de uma grande variedade de hormônios e fatores de crescimento (SCHLAFER et al., 2000). As Figuras 3 e 4 ilustram a estrutura dos placentônios, demonstrando claramente como as camadas cotiledonária e caruncular se sobrepõem e se mesclam.

A duração da gestação em bovinos situa-se entre 275 e 305 dias (9 meses). O útero, que no estado não prenhe pesa cerca de 0,5 a 1,0 Kg, aumenta consideravelmente de volume e alcança um valor final de massa de mais de 10 Kg. O feto desenvolve-se em um dos dois cornos uterinos e por volta do quarto mês de gestação o útero altera sua posição devido ao aumento de volume fetal, dirigindo-se cranial e ventralmente na cavidade abdominal, ocorrendo um deslocamento das vísceras abdominais com a evolução do crescimento (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

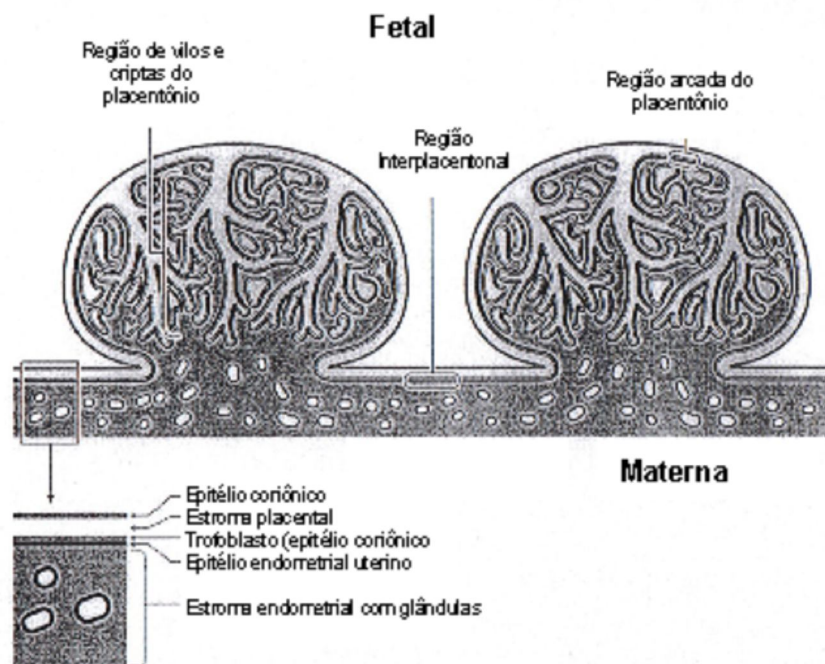


Figura 3 Desenho esquemático representando membranas fetais e placentônios bovinos. A relação entre o vilos cotiledonários, formado pelo corioalantóide, e o endométrio pode ser visualizada claramente. Observar as ramificações dos vilos cotiledonários penetrando nas criptas do endométrio, nas regiões carunculares, para formarem depois, em conjunto, o placentônio. Fonte: Schlafer et al. (2000).

O suprimento sanguíneo materno da placenta é derivado das artérias e veias uterinas, porém devido à dificuldade de separação do suprimento placentário daquele da parede uterina, geralmente é referida como circulação útero-placentária. Do lado fetal, a circulação é representada pelas artérias e veias umbilicais. Os sangues do feto e da mãe nunca entram em contato direto, não obstante as duas circulações são suficientemente íntimas na junção com o endométrio para a passagem de oxigênio e nutrientes do sangue materno para o fetal e de resíduos na direção oposta (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

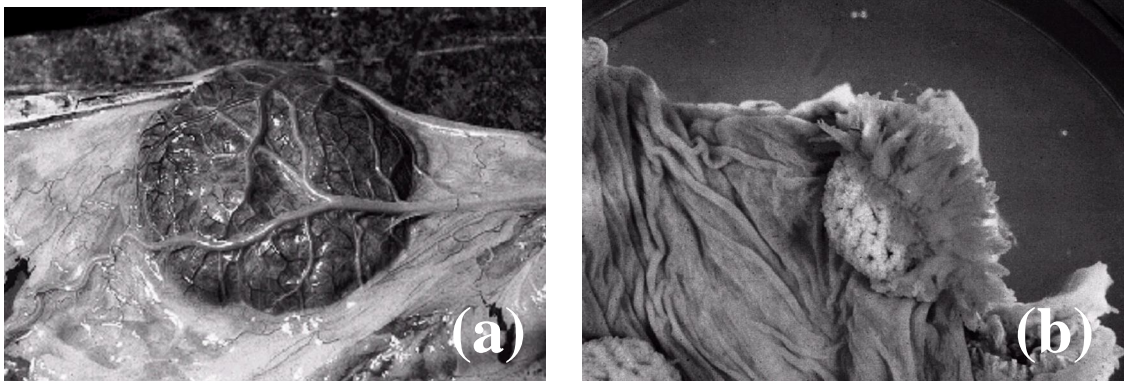


Figura 4. Placentônio bovino em fase final de gestação (a), com vasos umbilicais injetados com látex. Notar o padrão vascular dos ramos de artérias e veias umbilicais e a forma como os vasos penetram e saem do placentônio. Placentônio bovino com vilo cotiledonário separado das criptas carunculares (b), demonstrando a relação entre o vilo fetal e as criptas maternas. Fonte: Schlafer et al. (2000).

3.2 GLICONEOGÊNESE

A maioria dos tecidos animais é capaz de suprir suas necessidades energéticas a partir da oxidação de vários tipos de compostos: carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos. Alguns tecidos e células de animais superiores como cérebro e hemácias, utilizam exclusivamente glicose como fonte de energia. Para que esse suprimento seja ininterrupto, o organismo dispõe de mecanismos destinados a manter a oferta de glicose circulante, possibilitando sua captação contínua por esses tipos de células, mesmo durante o período pós-absortivo e no jejum. À medida que vai diminuindo a concentração de glicose circulante derivada diretamente da absorção dos alimentos, a degradação crescente do glicogênio hepático incumbe-se da manutenção da concentração adequada de glicose sanguínea. No entanto a reserva hepática de glicogênio é limitada e insuficiente para manter níveis glicêmicos normais além de 8 horas de jejum. Após esse período, a contribuição da reserva de glicogênio decresce, ao mesmo tempo em que é acionada outra via metabólica de produção de D-glicose. Essa outra via, que se processa no fígado e, minoritariamente nos rins, é a gliconeogênese. Como seu nome indica, a gliconeogênese consiste na síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos: aminoácidos, lactato, glicerol e ácido propiônico (MARZZOCO e BAYARDO, 1999).

Com exceção da lisina e leucina, todos os aminoácidos podem originar D-glicose. Os aminoácidos são provenientes da degradação de proteínas endógenas, principalmente as musculares, durante o jejum, que ainda no músculo são convertidos a alanina, a forma de

transporte de aminoácidos até o fígado. O lactato origina-se dos músculos submetidos à contração intensa e de outras células que degradam glicose anaerobicamente – medula renal, retina e, principalmente, hemácias. O glicerol é derivado da hidrólise de triacilgliceróis do tecido adiposo durante o jejum (BACILA, 2003).

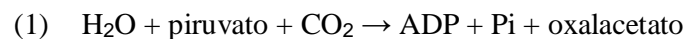
Nos ruminantes, assume fundamental importância os ácidos orgânicos voláteis originados das fermentações de carboidratos no rúmen, entre os quais o ácido acético, o propiônico e o butírico, que compreendem 85% do total. Dentre esses compostos, o ácido propiônico é utilizado para produzir D-glicose pela via gliconeogênica. Portanto, o organismo dispõe de várias maneiras para produzir D-glicose sempre que houver necessidade. (MARZZOCO e BAYARDO, 1999).

A transformação de alanina e lactato em D-glicose inicia-se por sua conversão a piruvato. A alanina origina piruvato por ação da alanina aminotransferase; o lactato é convertido a piruvato por ação da lactato desidrogenase. O glicerol para ser usado como composto gliconeogênico, é fosforilado a glicerol 3-fosfato, que é oxidado a diidroxiacetona fosfato. Este é um composto da via glicolítica e pode, portanto, prosseguir em direção à glicose pelas reações da glicólise e as substitutivas (MARZZOCO e BAYARDO, 1999). A produção de D-glicose por gliconeogênese processa-se no sentido oposto ao da glicólise, utilizando quase todas as suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis – piruvato quinase, fosfofrutoquinase e glicoquinase. Estas reações são contornadas através de outras reações, catalisadas, naturalmente por outras enzimas (Figura 5).

3.2.1 Etapas da gliconeogênese

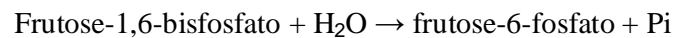
As três etapas que a gliconeogênese difere da glicólise são (BACILA, 2003):

• **Etapa 1.** Conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato: catalisada pela piruvato quinase que é substituída por duas reações, catalisadas pela piruvato carboxilase (1) e pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP-CK) (2):



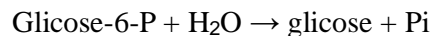
Para ser utilizado como substrato da piruvato carboxilase, uma enzima mitocondrial, o piruvato produzido no citosol entra na mitocôndria por ação da piruvato translocase. A piruvato carboxilase contém biotina como grupo prostético. A biotina combina-se com o CO_2 a custa de ATP e promove a carboxilação do piruvato, produzindo oxaloacetato. O oxaloacetato passa para o citosol novamente e, por ação da PEPCK, é convertido a fosfoenolpiruvato, através da descarboxilação e fosforilação a custa de GTP. O fosfoenolpiruvato produzido nesta etapa é transformado em frutose 1,6-bisfosfato pelas enzimas que também compõem a glicólise, que, como catalisam reações reversíveis, podem operar a via no sentido inverso.

- **Etapa 2.** Conversão da frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato: catalisada pela fosfofrutoquinase que é substituída pela frutose 1,6-bisfosfatase (F1,6-B);



A frutose 6-fosfato pode ser isomerizada a glicose 6-fosfato pela fosfoglicoisomerase

- **Etapa 3.** Conversão da glicose 6-fosfato a D-glicose, pela substituição da enzima glicocinase pela glicose 6-fosfatase (G6-P).



O produto da reação, a glicose, ao contrário da glicose fosforilada, pode atravessar livremente a membrana plasmática. A glicose 6-fosfatase ocorre exclusivamente em fígado e rins, e é graças à sua presença que estes órgãos, principalmente o fígado, podem exportar glicose para corrigir a glicemia.

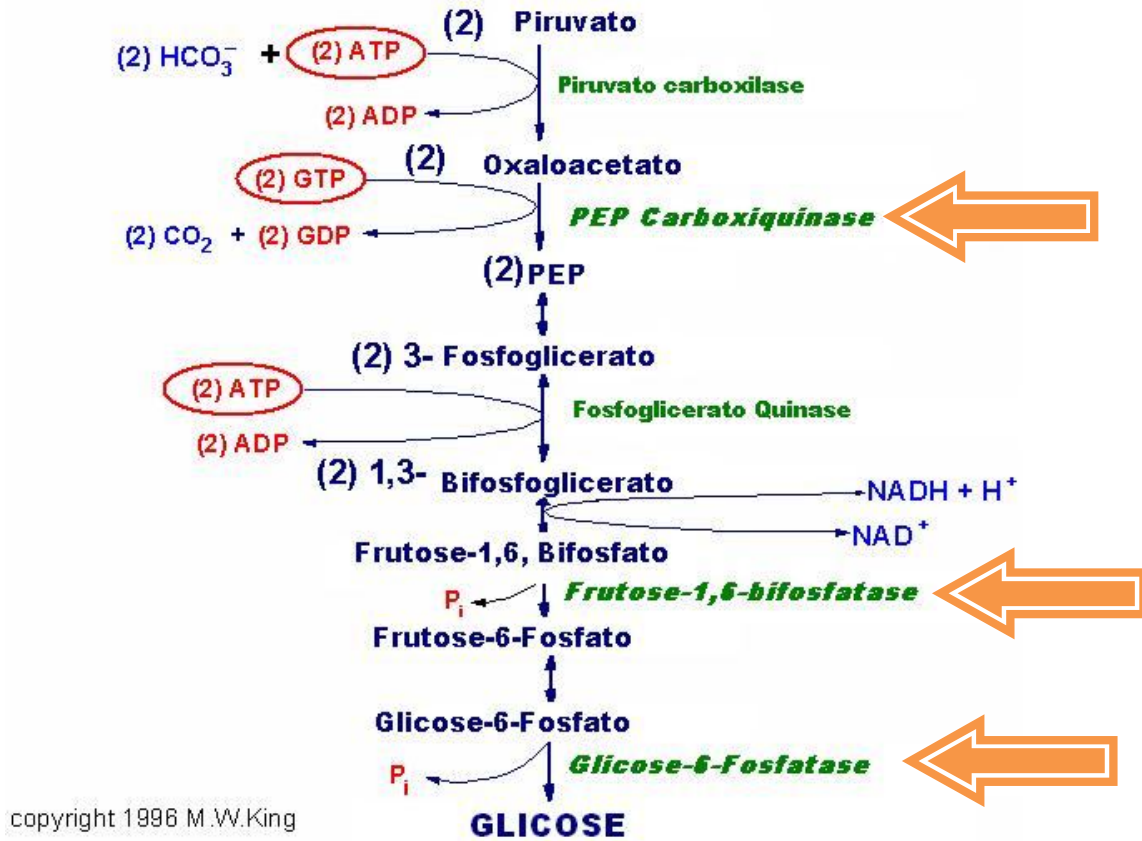


Figura 5. Esquema da reação de gliconeogênese. As setas apontam para as três enzimas gliconeogênicas com atividades irreversíveis. Fonte: <http://www.bioq.unb.br/images/esquemas/gliconeogenese>.

Pelo processo descrito, a D-glicose é produzida no fígado e pode ser exportada do hepatócito, destinando-se às células que dela necessitam. A gliconeogênese é uma síntese, pois utiliza um precursor de três carbonos e tem como produto final um composto de seis carbonos, a D-glicose. Como todas as sínteses, é um processo que consome energia, sob a forma de ATP. De fato, para cada molécula de glicose formada a partir de duas moléculas de piruvato são necessários 6 ATP.

Visto que a placenta é um órgão importante para a nutrição e desenvolvimento fetal em todos os mamíferos, haveria a possibilidade deste órgão possuir a via gliconeogênica como forma de produzir D-glicose, importante substrato para o feto. Entretanto, ainda não foi demonstrada a participação da gliconeogênese na placenta de bovinos, embora tenha sido

descrita a presença de enzimas gliconeogênicas na placenta de ratas (BAGEWADIKAR et al., 1977) e de mulheres (PAPAMARCAKI e TSOLAS, 1991).

3.3 METABOLISMO MATERNO E PLACENTÁRIO DURANTE A GESTAÇÃO

Uma característica singular do desenvolvimento precoce dos mamíferos é a provisão de nutrientes do organismo materno por intermédio da placenta. O tamanho e função da placenta se alteram continuamente durante o curso da gestação. Para o feto, a placenta consiste na combinação, em apenas um órgão, de muitas atividades funcionais, que no adulto são separadas tais como respiração, proteção, nutrição e produção de hormônios, substituindo o trato gastrointestinal, os pulmões, os rins, o fígado e as glândulas endócrinas do feto durante a gestação (GURTLER et al., 1987). A membrana placentária controla a transferência de uma grande variedade de substâncias por vários processos, como a difusão simples e facilitada, transporte ativo, fagocitose e pinocitose. Para dirigir estes processos, a energia é derivada de reações metabólicas produtoras de energia, como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a via das pentose-fosfato. O consumo de oxigênio pela placenta é comparável ao de outros órgãos, tais como o fígado ou os rins (NETO, 2005).

Do ponto de vista metabólico, existem dois estágios claramente diferenciados durante a gestação. Durante o primeiro estágio, correspondente aos dois terços iniciais, quando o crescimento fetal é bastante limitado, a mãe armazena uma grande quantidade de nutrientes para sua própria nutrição, os quais juntamente com sua hiperfagia causam um aumento nos estoques de lipídeos. Durante o terço final de gestação o crescimento fetal torna-se muito acelerado, sendo necessário um aumento na transferência de nutrientes através da placenta, ocasionando à mãe uma condição catabólica. Isto é especialmente observado pela diminuição dos depósitos de lipídeos devido principalmente a lipólise. Esse aumento catabólico durante o final da gestação está intimamente relacionado com a redução da ingestão de alimentos pela mãe, na qual os índices de cetogênese e gliconeogênese tornam-se altamente acelerados, permitindo um contínuo aporte de nutrientes para o feto (HERRERA, 2000).

3.3.1 Metabolismo lipídico

O fluxo de lipídios através da placenta ocorre por diferentes mecanismos: transferência direta de ácidos graxos por proteínas transportadoras; síntese de lipídeos complexos a partir de ácidos graxos e subsequente transporte para a circulação umbilical; e hidrólise de triglicerídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos maternos (COLEMAN e HAYNES, 1987).

A atividade lipogênica no tecido adiposo materno torna-se aumentada durante a gestação, com isso os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e glicerol que atingem o fígado também aumentam; conseqüentemente há um aumento na produção de triglicerídeos que retornam para a circulação na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Um aumento na produção hepática de triglicerídeos VLDL, juntamente com o decréscimo da lipoproteína lípase (LPL) no tecido adiposo promove um aumento intenso dessas lipoproteínas e triglicerídeos. Triglicerídeos maternos não atravessam a placenta, mas a presença de LPL e outras lípases permitem sua hidrólise, liberando ácidos graxos para o feto. Em condições de jejum, ácidos graxos são convertidos em corpos cetônicos através da via de B-oxidação, e esses compostos atravessam facilmente a barreira placentária para serem metabolizados pelo feto (HERRERA, 2000). Estes ácidos graxos podem ser utilizados pelo feto para a síntese de triglicerídeos, colesterol, esterificação, biossíntese de membranas ou produção de energia através de oxidação (ROUX e GREEN, 1967).

3.3.2 Metabolismo protéico

Em ruminantes, o metabolismo protéico é derivado inicialmente da absorção de aminoácidos através da placenta, que são utilizados pelo feto para a produção de proteínas endógenas (GURTLER et al., 1987). O plasma materno é a única fonte de aminoácidos para o feto e sua concentração no plasma fetal é semelhante a da mãe. Isso ocorre porque os aminoácidos são carregados da mãe para o feto por processo ativo, garantindo a apropriada viabilidade desses metabólitos essenciais para o conceito e justificando as tendências maternas para o desenvolvimento, em alguns casos, de hipoaminoacidemia (SILVER et al., 1994).

A placenta contém várias enzimas que sugerem sua capacidade para metabolizar aminoácidos através de diferentes vias metabólicas, incluindo gliconeogênese, glicogênese, síntese de proteínas, oxidação e amoniogênese (LEMONS, 1979). A amônia produzida pela placenta é liberada para a circulação uterina e umbilical, conservando os níveis de glicogênio para a síntese de proteína fetal (HOLZMAN et al., 1979).

3.3.3 Metabolismo glicídico

A D-glicose é quantitativamente o mais importante substrato capaz de atravessar a placenta (HERRERA, 2000). É essencial para o desenvolvimento do conceito e sua transferência ocorre por difusão facilitada. No feto, parte da D-glicose é reduzida a sorbitol, que é transformado em frutose. Esta é utilizada lentamente, de modo que sua concentração encontra-se elevada durante a gestação. Após o nascimento, o teor de frutose dos recém-nascidos decresce, enquanto que o teor de D-glicose aumenta (LEONCE et al., 2006).

O consumo de glicose pela placenta varia durante a gestação. Se este consumo for elevado a mãe torna-se hipoglicêmica e isto tende a um bloqueio total no transporte de glicose para a circulação umbilical. Com isso, ocorre uma diminuição na demanda de glicose para o conceito e um desvio de parte da glicose placentária para o metabolismo fetal (HAY, 1991).

Durante o final da gestação, a mãe possui uma tendência ao desenvolvimento de hipoglicemia, a qual é especialmente manifestada durante o jejum. Nessas condições são utilizados os estoques de glicogênio hepático, levando o organismo materno a um estado de hipoglicemia, o qual pode ocorrer em consequência da diminuição da gliconeogênese ou aumento da utilização de glicose, ou ambos os fatores juntos (HERRERA, 2000).

Estudos indiretos em mulheres e experimentos diretos em ratas mostraram que o índice de gliconeogênese materno está aumentado em condições de jejum e esse aumento também depende do tipo de substrato usado. Durante a gestação, a conversão de glicerol para glicose está aumentada, se comparado a outros substratos, tais como piruvato e alanina, mais comumente utilizados como gliconeogênicos. Esses resultados indicam que a capacidade enzimática para sintetizar D-glicose quando o substrato é viável, está aumentada no final da gestação. Isto pode estar ocorrendo porque os substratos gliconeogênicos endógenos encontram-se diminuídos devido a sua transferência para o feto. Embora os níveis plasmáticos de aminoácidos estejam diminuídos durante a gestação, os níveis de lactato e piruvato não

sofrem mudanças, enquanto que o glicerol encontra-se significativamente aumentado (ASSEL et al., 1993).

3.4 CRESCIMENTO FETAL

O crescimento fetal é regulado pelo balanço entre a demanda de nutrientes para o feto, determinado pelo seu potencial genético de crescimento, e o suprimento placentário materno. Fatores que determinam o suprimento placentário materno de nutrientes incluem nutrição materna e metabolismo, gradiente de concentração transplacentária, fluxo sanguíneo útero-placentário, tamanho placentário e sua capacidade de transferência (JANSSON et al., 1993).

O crescimento fetal ocorre lentamente durante o início da gestação e exponencialmente durante o estágio final (ELEY et al., 1978; PRIOR e LASTER, 1979; FERRELL, 1989; REYNOLDS et al., 1990). No entanto, a placenta cresce mais rápido do que o feto no início da gestação, sendo o peso placentário maior que o fetal durante o primeiro trimestre gestacional. Posteriormente, o peso fetal supera o peso placentário (ELEY et al., 1978; PRIOR e LASTER, 1979; FERRELL, 1989; REYNOLDS et al., 1990). Acredita-se que este período inicial de crescimento mais acelerado da placenta é importante para o desenvolvimento da placenta como um órgão ativo que funciona como uma interface entre os sistemas materno e fetal, permitindo com que o feto cresça exponencialmente durante o segundo e terceiro trimestres da gestação (ELEY et al., 1978; PRIOR e LASTER, 1979; FERRELL, 1989; REYNOLDS et al., 1990). O crescimento fetal é geralmente condicionado por fatores maternos e placentários, um mecanismo homeostático fisiológico que garante a sobrevivência materna (FERRELL, 1991a,b; GLUCKMAN et al., 1992). O efeito constritor materno está relacionado com o controle do fornecimento de nutrientes para o conceito no final da gestação (GLUCKMAN et al., 1992), e o grau de constrição no crescimento fetal no final da gestação pode estar associado com o padrão de crescimento placentário ocorridos durante o primeiro e segundo trimestres (BELL et al., 1999).

Alterações no suprimento de substratos ao conceito resulta em modificações moleculares e celulares permanentes com implicações na sobrevivência pós-natal. A condição corporal materna e a dieta são fatores que podem afetar o desenvolvimento e programação fetal devido a efeitos diretos na viabilidade de substratos para o conceito, e indiretamente através de mudanças na função e estrutura placentária (GODFREY, 2002). Fatores causadores de alterações no ambiente uterino podem resultar em adaptações fisiológicas no feto em

desenvolvimento, os quais por sua vez podem predispor a problemas cardiovasculares, metabólicos e endócrinos na vida adulta, o que parece confirmar o conceito da origem fetal de doenças na fase adulta (BARKER, 1998).

3.4.1 Alterações epigenéticas

Alterações epigenéticas parecem estar relacionadas com alterações no crescimento fetal intra-uterino. Genes de caráter de *imprinting* mostram ter um importante papel no crescimento placentário e fetal. A maior função dos genes de *imprinting* na placenta é a regulação da eficiência do transporte de nutrientes, pois promovem a ligação entre a nutrição materna e o crescimento feto-placentário. Estes genes são expressos por somente um alelo ativo (expressão monoalélica), ou o alelo materno ou o paterno, onde os genes paternos expressos são promotores do crescimento e genes maternos expressos são supressores do crescimento. O alelo inativo está epigeneticamente marcado por modificações nas histonas e/ou metilação das citosinas (ANGIOLINI et al., 2005).

Os hormônios do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1 e IGF-2) são importantes na regulação do crescimento fetal, pois regulam a capacidade placentária de captação, biotransformação e liberação de substratos para o feto e inibem a restrição materna de crescimento fetal. O crescimento fetal é normalmente restringido por fatores placentários e maternos, um mecanismo fisiológico homeostático para assegurar a sobrevivência materna. Esse mecanismo reduz a incidência de super crescimento fetal, pois poderia levar a distocia e danos à saúde da mãe devido a utilização excessiva dos substratos maternos pelo feto (YOUNG et al., 2001).

3.5 PROBLEMAS FETAIS EM CONCEPTOS ORIUNDOS DE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO IN VITRO (PIV) DE EMBRIÕES

Freqüentemente bezerros provenientes da produção in vitro de embriões como a fecundação in vitro (FIV) e a clonagem por transferência nuclear (TN), que muitas vezes envolvem o cultivo in vitro, apresentam alto peso ao nascer, ao que denominamos de “Síndrome dos Bezerros Absolutamente Grandes” (SBAG). Esse crescimento acelerado é especificamente pré-natal. Os mecanismos responsáveis pela síndrome são desconhecidos,

mas o fato de que nem todos os descendentes de embriões derivados de transferência nuclear são afetados, sugere que o problema não é plenamente controlado por genes (BERTOLINI e ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2007).

Na busca de uma explicação fisiológica para um problema que é primariamente pré-natal, alterações na função placentária fornecem um papel lógico. Além disso, a aceleração do crescimento pré-natal não é observada após o nascimento, pois as taxas de crescimento parecem normalizar na maioria dos casos. Distúrbios no desenvolvimento placentário podem levar a mudanças no modelo de crescimento fetal. Alguns autores têm descrito defeitos placentários em conceptos de embriões bovinos derivados da FIV e em produtos de TN, que estão associados ao crescimento fetal anormal. Em adição, alguns destes bezerros sofrem problemas de saúde que podem ou não estar associados com o alto peso ao nascer (BERTOLINI e ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2007).

Hill et al (2000) sugeriram a existência de pelo menos três fenótipos placentários em gestações derivadas de transferência nuclear que determinam a viabilidade do concepto: placentas rudimentárias subdesenvolvidas que causam morte embrionária antes ou próximo a completa placentação; placentas com reduzida área de trocas materno-fetal, que podem eventualmente levar a morte fetal antes dos 60 dias de gestação; e placentas normais com uma esporádica redução no número de placentônios.

Placentônios gigantes foram relatados em placentas de animais clonados, provavelmente devido ao aumento da vascularização (HEYMAN et al., 2002). As altas taxas de mortalidade fetal e pós-natal dos bovinos clonados estão principalmente associadas a diversas anormalidades cardiopulmonares, estas por sua vez associadas a alterações placentárias (HILL et al., 1999, 2000). As anormalidades placentárias ocorrem com altas incidências tanto no início como no final da gestação e incluem alterações morfológicas do epitélio trofoblástico (HILL et al., 2000), deficiências no estabelecimento da vascularização placentária e diminuição no número de cotilédones (HILL et al., 2000; ALLEN et al., 2003), edema placentário (HILL et al., 1999) e desenvolvimento de hidroalantóide (HEYMAN et al., 2002, HILL et al., 1999).

O manejo dos animais parece contribuir para o sucesso ou insucesso da gestação de animais clonados, mas não explica todos os problemas subsequentes. O sucesso da clonagem depende da reprogramação dentro do núcleo, que induz a expressão de genes nos programas típicos do genoma do zigoto. As principais anormalidades que provocam perdas iniciais e

tardias dos animais clonados estão relacionadas a alterações no processo de reprogramação nuclear (KONO, 1998), com consequente alteração nos padrões de expressão de determinados genes (NIEMANN et al., 2002).

A ligação fisiológica entre a expressão individual destes genes e o fenótipo bezerros grandes não está totalmente claro. Além disso, fenótipos e expressão de bezerros grandes são variáveis. Em adição ao alto peso ao nascer, alguns bezerros PIV sofrem problemas de saúde perinatal que podem ou não estar associados com peso ao nascer. O excessivo crescimento parece ser um problema pré-natal, pois após o nascimento, o crescimento parece normalizar (WILSON et al, 1995). Esta última observação é particularmente intrigante, pois sugere que condições para a expressão do fenótipo bezerro-grande existem durante o período pré-natal, mas não no período pós-natal.

Hasler et al. (1995) também observaram um aumento na incidência de hidroalantóide em bezerros PIV, um problema tipicamente associado com anormalidades placentárias. Farin e Farin (1995) descreveram que embriões PIV desenvolveram menos placentônios do que em conceptos in vivo. Stice et al (1996) descreveram falhas no desenvolvimento cotiledonário em conceptos de transferência nuclear, e Hill et al (2000) propuseram que a causa primária de perdas em gestações bovinas por transferência nuclear é o defeituoso desenvolvimento placentário.

O excessivo padrão de crescimento fetal observado no final da gestação de embriões PIV parece estar associado a um aumento no aporte de substratos aos tecidos útero-placentário-fetais, em especial a glicose (BERTOLINI et al., 2004; 2007). Em estudos anteriores, o crescimento fetal de conceptos oriundos de FIV e TNCS foi caracterizado por um padrão bifásico de crescimento, com um período de retardo na fase que coincide com o início da placentação (Figura 6). Este fenômeno foi seguido por um desvio de desenvolvimento do tecido placentário em prenhez de FIV (BERTOLINI et al., 2002a; 2004) e TNCS (BATCHELDER et al., 2005, 2007a,b), restaurando o tamanho do feto no final do primeiro trimestre da prenhez (BERTOLINI et al., 2002, 2004). Tal manifestação culmina com a ocorrência de um maior tamanho e pesos uterinos, placentários e fetais no terceiro trimestre da gestação, com alterações morfológicas significativas em placentas de FIV e TNCS (Figura 7) e o nascimento de bezerros absolutamente grandes com menor sobrevivência pós-natal (BERTOLINI & ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2001, 2002a, 2004, BATCHELDER et al., 2005, 2007a,b).

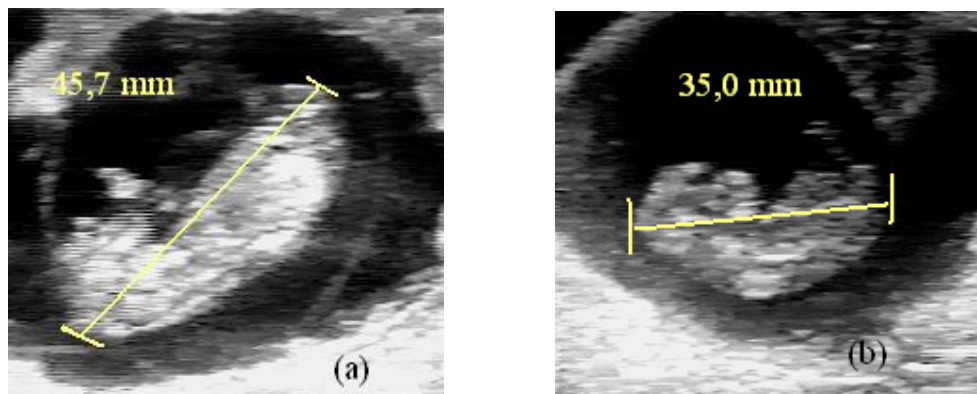


Figura 6 Vista sagital de fetos bovinos aos 51 dias de gestação. (a) feto controle, (b) feto derivado de fecundação in vitro. Fonte: Bertolini et al. (2002).

As alterações morfológicas descritas acima para prenhez PIV também foram correlacionadas a um maior acúmulo total de glicose e frutose no plasma e fluidos fetais em prenhez de FIV. Em adição, bezerros de FIV são maiores e apresentam concentrações elevadas de frutose imediatamente após o parto (BERTOLINI et al., 2004). Uma maior utilização, aporte ou síntese de glicose pela gliconeogênese, por exemplo, parece ocorrer, reduzindo a restrição placentária e favorecendo o crescimento fetal. Considerando-se a importância das trocas metabólicas entre mãe e feto, que ocorrem por intermédio dos placentônios, torna-se fundamental o entendimento do funcionamento destas unidades funcionais, principalmente com relação ao metabolismo energético. Para que futuramente possam ser compreendidas alterações na estrutura e função dos placentônios, as quais são responsáveis em alterar o crescimento fetal, antes precisamos aprofundar o conhecimento do metabolismo normal destas estruturas. Através deste trabalho estudou-se a expressão gênica das enzimas gliconeogênicas através de seu mRNA em placentônios de gestações bovinas normais.

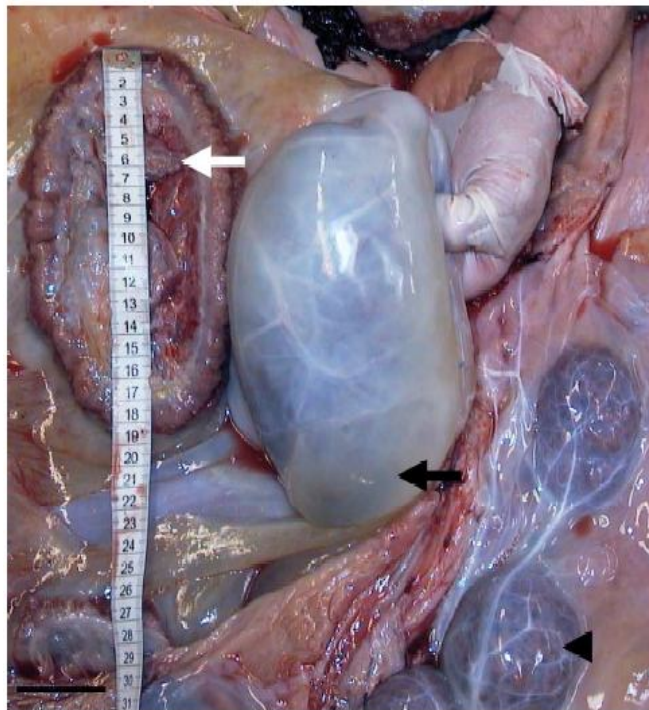


Figura 7. Placentônio gigante bovino oriundo de transferência nuclear aos 259 dias de gestação. Fonte: Pedersen et al. (2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE TECIDO

O material em estudo foi obtido de fêmeas bovinas prenhes saudáveis, sem classificação de raça, fornecidas pelo frigorífico Frigofox Ltda. localizado na cidade de Lages- SC.

A coleta do material placentário foi iniciada instantes após o abate das fêmeas, com a exposição dos fetos e dos placentônios através da abertura do útero e das membranas fetais. Fragmentos de placentônios compreendendo uma coluna de tecido desde a interface fetal até a materna foram coletados nas regiões mais próximas ao feto. Foram coletados também fragmentos de fígado bovino, que foram utilizados como controle positivo. Estes fragmentos de placentônios e fígado foram acondicionados em criotubos e transportados em nitrogênio líquido até o Laboratório de Biologia Molecular do CAV-UDESC. As amostras foram mantidas congeladas em freezer à -80 °C para posterior extração de seu RNA.

Para avaliação da idade gestacional, utilizou-se a medida atlanto-coccígea do feto (*Crown Rump*), de acordo com Williams e Wilkins (1951) correlacionando-a a uma tabela que determina a idade gestacional correspondente.

As amostras foram divididas em três fases gestacionais: primeiro terço, compreendido entre o primeiro e o terceiro mês de gestação; segundo terço, compreendido entre o quarto e o sexto mês de gestação; terceiro terço, compreendido entre o sétimo e o nono mês de gestação, conforme demonstrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Distribuição das amostras de placenta bovina, segundo seus períodos gestacionais, estabelecidos através da comparação das medidas fetais

Amostra	Medida do Feto	Período Gestacional
01	14 cm	Primeiro terço
02	9 cm	
03	8 cm	
04	12 cm	
05	11cm	
06	28 cm	Segundo Terço
07	34 cm	
08	33 cm	
09	27 cm	
10	30cm	
11	69 cm	Terceiro terço
12	59 cm	
13	75 cm	
14	62cm	
15	66 cm	

4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O isolamento do RNA do tecido placentario foi realizado seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Aproximadamente 100 mg de tecido congelado foi triturado com auxílio de um pistão em microtubo de 1,5 ml RNase free, contendo 1 ml do reagente Trizol, para lisar as células evitando a degradação do RNA. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, antes de serem submetidas à centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após este período, 100 µl de clorofórmio foram adicionados, os tubos foram fechados e agitados vigorosamente por aproximadamente 15 segundos e incubados novamente à temperatura ambiente por 2-3 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000 g a 4°C. Enquanto isso, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500 µl de isopropanol. Após a centrifugação, o sobrenadante foi

transferido para os tubos contendo isopropanol, homogeneizados suave e manualmente e incubados á temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos, 14.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA-Total) solubilizado com 1 ml de álcool 75% diluído em água DEPC. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 8.000 g a 4 °C, o excesso de álcool retirado e o precipitado (RNA Total) solubilizado em 200 µl de água tratada com DEPC. Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em gel de agarose a 1% e para quantificação, e o restante da solução foi armazenado imediatamente em freezer -80°C até sua utilização. A análise qualitativa foi realizada em gel de agarose a 1% diluída em TBE 1X . Para tanto, 10 µl do RNA total foi acrescido de 3,0 µl do corante Loading Dye (azul de bromofenol, glicerol e água) 5X, e a eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 80W.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção 1:5, ou seja, 40 µl de H₂O DEPC foi adicionada de 10 µl do RNA total e homogeneizada suavemente. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf 6131/ Alemanha) a 260/280nm. Utilizou-se água DEPC para calibração do equipamento.

4.4 SINTESE DOS cDNAs

Para se assegurar que os resultados foram oriundos do mRNA e não do DNA genômico, as amostras foram previamente tratadas com 1 µl de DNase (Invitrogen Carlsbad, CA – USA) por 15 minutos á temperatura ambiente. Aos tubos contendo RNA total (1 µg, previamente tratados com DNase I) foram adicionados 1µl do Oligo DT; 1 µl de dNTPs (mix 10 mM – 2,5 mM de cada dNTP) e incubados a 65°C por 5 minutos, retirados do termociclador e colocados em a 0°C em gelo. A seguir, foram acrescentados aos tubos: 4 µl do buffer 5X Superscript III; 2 µl de DTT 1 M; 1 µl de RNase OUT; esta mistura foi incubada por 2 minutos a 42°C. A incubação continuou a 42°C por 50 minutos e em seguida a 70°C por 15 minutos. Ao término desta incubação foram acrescentados aos tubos 1 µl de enzima RNase H (para retirar os resíduos de RNA remanescente na amostra de cDNA) e incubados a 37°C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA por PCR.

4.5 PCR

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar fragmentos de cDNA de cada uma das enzimas gliconeogênicas.

4.5.1 Projeção dos *primers*

Com o intuito de verificar a expressão gênica de cada uma das enzimas gliconeogênicas através da amplificação de suas seqüências de DNA de tamanho conhecido, foram projetados três pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie bovina (*Bos taurus*) a partir da seqüência de mRNA descrita no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). Os desenhos dos *primers* foram realizados utilizando-se o programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html), os quais estão descritos na Tabela 2.

O GAPDH (gliceraldeído-fosfato desidrogenase) é um gene constitutivo, pertencente a uma classe de genes também chamados de “housekeeping genes”, que são expressos em níveis semelhantes em praticamente todas as células do organismo. Por esse motivo, o GAPDH foi utilizado como um controle da reação de PCR.

Tabela 2. *Primers* senso e antisenso utilizados nas reações de PCR

Enzima	Seqüência 5'- 3'
	Senso
F-1,6-B	EX2 TCCTCTCCAATGACCTGGTT
G-6-P	EX2 CTTTTGGTGGGTCCATGAGT
PEPCK	EX1 GGAGGAGGGTGTGATCAAGA
GAPDH	EX7 TGCMTCCCTGCACCACCAACT

	Anti-senso
F-1,6-B	EX6 CTTTCCACTGGGGCTTTTCT
G-6-P	EX6 GCCGCTCACACCACTTAGAG
PEPCK	EX3 GTGGAGGCACTTGACGAACT
GAPDH	EX10 YGCCTGCTTCACCACCTTC

A otimização da técnica de PCR foi realizada com o cDNA sintetizado a partir de fígado bovino adulto, que também foi utilizado como controle positivo, pois possui as enzimas gliconeogênicas. Inicialmente, testamos amplificações sob diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1 mM, 1,5 mM, 2 mM e 2,5 mM), diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* (60, 58 e 55°C), e diferentes temperaturas de extensão do DNA (72 e 68°C). Estas condições, quando determinadas como sendo ideais, foram aplicadas na amplificação das amostras de placentônios, conforme abaixo. Todos os *primers* foram submetidos às mesmas condições de otimização anteriormente citadas. A amplificação do cDNA com os *primers* específicos para cada enzima foi executada em 25 µl de volume da reação contendo Tampão 1X (20 mM Tris-HCl [pH 8,4]; 50 mM KCl), cloreto de magnésio na concentração de 2,5 mM, deoxinucleotídeos trifosfato (Amersham®) na concentração final de 2,5 mM cada, 25 pmoles de cada *primer*, 1,5 unidade da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen®), e 2 µl de cDNA. Os ciclos para PCR consistiram de desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos termais, com cada ciclo compreendendo 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 58°C (anelamento dos *primers*), e 30 segundos a 72°C (extensão do DNA) e extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto da reação foi mantido a 4°C até sua utilização. Cada conjunto de reação foi acompanhado de um controle negativo, que consiste em todos os reagentes necessários para a amplificação à exceção do cDNA molde.

4.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (1 µg/ml). Para isto, 5 µl de cada amostra foram diluídos em volume igual de tampão de amostra 2X (azul de bromofenol a 0,25%; xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%) e aplicados no gel que foi submetido a 90 V por aproximadamente 1 hora em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A visualização das amostras foi realizada com o auxílio de um transiluminador, onde os resultados foram fotografados.

4.5.3 Extração de DNA do gel de agarose

Devido à presença de produtos de PCR com bandas de tamanho inespecífico, houve a necessidade de extração do DNA do gel de agarose, para posterior clonagem destes produtos. O Kit de extração de DNA em gel de agarose *Hiyield (Real Biotech Corporation, USA)* foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. Primeiramente foi recortado o fragmento de gel que continha a banda de interesse e transferida para um tubo de microcentrífuga ao qual se adicionou 500 µl de *DF Buffer* e em seguida submetido ao vortex para homogeneização. A seguir, o gel com *DF Buffer* foi incubado durante 15 minutos a 55°C para a dissolver totalmente o fragmento de gel, e durante a incubação inverteu-se o tubo a cada 2 minutos. Aplicamos esse conteúdo em uma coluna, que foi previamente encaixada a outro tubo de microcentrífuga e centrifugados a 8.000 r.p.m. por 30 segundos. O cDNA ficou retido na coluna e foi em seguida lavado com 500 µl de Wash Buffer e centrifugado a 14.000 r.p.m. por 2 minutos para secar a coluna. Para eluir o cDNA, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, foi adicionado 15 µl de água mili-Q, e após 2 minutos, foi realizada uma nova centrifugação a 14.000 r.p.m. durante 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C para então serem posteriormente utilizadas para o sequenciamento.

4.6 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR

Após a purificação do DNA pelo método descrito acima, foi realizada a clonagem deste produto de PCR. Utilizou-se o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, número de catálogo K457501), conforme descrito a seguir.

4.6.1 Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio

Antes de iniciar a reação de clonagem no vetor PCR4 TOPO procedeu-se a preparação de células competentes com cloreto de cálcio. Esta preparação foi feita segundo o método de Hanahan (1983).

Um tubo contendo bactérias *E. coli*, cepa DH10B, foi descongelado, mantendo-o por 15 minutos no gelo. As bactérias foram espalhadas em uma placa de LB ágar e incubada a 37°C durante a noite. Uma colônia isolada foi colocada em 3 ml de meio SOC pré-aquecido a

37°C e mantido a 37°C e 200 r.p.m. de agitação durante 16 horas. Após, 1 ml dessa cultura foi diluído em 100 ml de meio SOC e mantido a 37°C e 200 r.p.m. por 4 horas até atingir A600 = 0,6. A seguir a cultura de bactérias foi centrifugada a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos e, mantendo-se em gelo, ressuspendeu-se o precipitado em 50 ml de MgCl₂ a 0,1 M durante 30. Centrifugou-se novamente a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspensão em 10 ml de CaCl₂ 0,1 M e mantido em gelo durante 30 segundos. As bactérias foram segregadas em alíquotas de 100 µl com glicerol 10% de glicerol, congeladas e armazenadas em freezer -80 C.

4.6.2 Reação de ligação

O vetor *pCR-TOPO* utilizado para a clonagem é um vetor linearizado que apresenta uma seqüência de 3 timinas (T) na extremidade 3' e uma topoisomerase covalentemente ligada a uma timina. Cada reação continha 4 µl de produto de PCR purificado, 1 µl de solução de sais e 1 µl de vetor *pCR4-TOPO*. A ligação ocorreu durante 5 minutos à temperatura ambiente e os produtos foram utilizados para transformação.

4.6.3 Transformação

Bactérias *E. coli DH10B* competentes foram descongeladas em gelo. Um total de 2 µl da reação de ligação foram adicionados a 100 µl de células competentes e incubadas em gelo por 15 minutos. O processo de choque térmico consistiu em incubar os tubos contendo as células competentes e os produtos da ligação em banho maria, a 42°C por 30 segundos, e imediatamente levadas ao gelo por 2 minutos. A seguir, adicionou-se 500 µl de meio SOC em cada tubo. Estes foram incubados a 37°C com agitação de 200 rpm por 1 hora e posteriormente plaqueada em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. As colônias que poderiam conter o DNA recombinante foram semeadas, isoladamente, em 3 ml de meio LB (triptona bacteriológica a 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl a 1%), contendo 100 µg/ml de ampicilina. Esta cultura foi mantida a 37°C, 200 r.p.m., por 16 horas, em tubo cônico de 15 ml.

4.6.7 Extração de DNA plasmidial

Para o procedimento de extração e purificação do DNA plasmidial a partir de bactérias *Escherichia coli* DH10B transformadas foi utilizado o protocolo de lise alcalina. 1,5 ml da cultura bacteriana foi centrifugado a 7.000 r.p.m. durante 3 minutos. Ao precipitado adicionou-se 100 µl de solução GTE (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH8,0 e 10 mM de EDTA), incubando-se 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 200 µl de uma solução de NaOH 0,2 N e SDS 1% preparado na hora do uso. Em seguida, adicionou-se 150 µl de uma solução de acetato de potássio, pH 4,8, gelado, misturando-se e incubando-se 5 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 6.000 r.p.m. durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foram adicionados 800 µl de etanol 95%, incubando-se 2 minutos à temperatura ambiente e em seguida incubou-se 30 minutos no freezer -20°C. Após, procedeu-se a centrifugação a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos, resuspendendo-se o precipitado em 1 ml de etanol a 70%; centrifugou-se novamente a 10.000 rpm durante 5 minutos. O *pellet* foi secado durante 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida ressuspenso em 30 µl de TE (Tris-EDTA). Adicionou-se 1 µl da enzima RNase e incubou-se por 1 hora a 37°C.

4.6.8 Digestão dos clones selecionados

Para a confirmação de que os clones obtidos eram os esperados, procedeu-se a reação de digestão com a enzima de restrição *Eco* RI a qual clivou o inserto nas suas duas extremidades, liberando o fragmento de DNA clonado. Para a digestão foram utilizados 5 µl do DNA purificado pela técnica de lise alcalina anteriormente citada, juntamente com 1 µl da endonuclease *Eco* RI e 4 µl de tampão, mantidos a 37°C por 1 hora. A eficiência da digestão foi verificada em gel de agarose. Após a confirmação dos clones desejados pela digestão, o próximo passo foi a realização de seqüenciamento dos clones.

4.7 – SEQÜENCIAMENTO DE DNA

O seqüenciamento dos clones selecionados foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000*[®] *DNA Analysis System* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire). A

reação de seqüenciamento foi preparada a partir do DNA plasmidial e o Kit *DYEnamic*[®] *ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire) conforme especificações do fabricante. A reação foi realizada na presença de 5,0 pmol dos *primers* iniciadores e aproximadamente 800 ng do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados, utilizando-se isopropanol a 70% e etanol absoluto, para a retirada dos nucleotídeos e *primers* não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2 KV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7 KV.

4.7.1 Análises das seqüências obtidas

Após a eletroforese, as seqüências geradas foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org) sendo consideradas somente as seqüências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Todas as etapas de sequenciamento e análise das seqüências obtidas foram realizadas no Laboratório de Bioinformática da UFSC (www.bioinformatica.ufsc.br).

5 RESULTADOS

Com este estudo foi possível detectar a expressão gênica de três enzimas gliconeogênicas na placenta de fêmeas bovinas por meio da identificação dos respectivos mRNAs. A expressão das enzimas gliconeogênicas foi encontrada nos três períodos gestacionais, pois em todos os períodos houve a amplificação de produtos de tamanho esperado. Como controle positivo foi utilizado fragmentos de fígado bovino adulto, já que este órgão expressa as três enzimas gliconeogênicas. Para facilitar a descrição dos resultados, cada enzima será abordada separadamente, tanto no fígado, como na placenta.

5.1 FRUTOSE 1,6 BIFOSFATASE (F1,6-B)

Para a enzima F1,6-B houve a amplificação por PCR do produto de tamanho esperado de 599 pb. No controle positivo hepático o produto de PCR para esta enzima pôde ser detectado facilmente, se comparado com as outras enzimas (Figura 8). Esta enzima foi a única que não apresentou produtos de tamanho inespecífico e a intensidade da amplificação no fígado foi mais forte que na placenta (Figura 9). O produto de PCR foi recortado do gel de agarose, purificado, clonado e seqüenciado. A comparação do produto seqüenciado com a seqüência de *Bos taurus* foi realizada pelo programa BLAST, no qual obteve-se similaridade de 100% entre as seqüências.

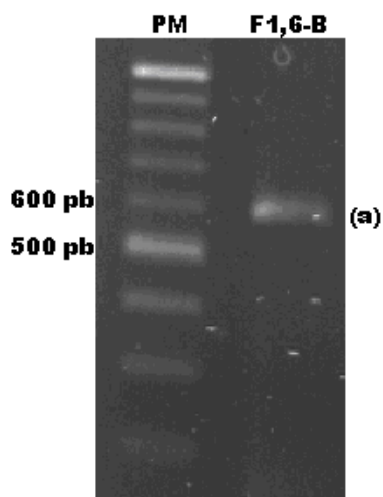


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose com produto de PCR para a enzima F1,6-B. (a) Produto de tamanho esperado para a enzima frutose 1,6 bifosfatase (599 pb) com mRNA oriundo de fígado bovino. **PM**: Marcador de peso molecular de 100 pb; pb: pares de bases.

A F1,6-B placentária foi detectada nos três períodos gestacionais, e assim como no fígado, não houve formação de produtos de tamanho inespecífico. O produto de PCR do terceiro período de gestação foi recortado do gel de agarose, purificado, clonado e sequenciado. Escolheu-se este produto devido à maior intensidade de banda observada no gel de agarose (Figura 10). A comparação deste produto sequenciado com a sequência de *Bos taurus* também obteve 100% de similaridade.

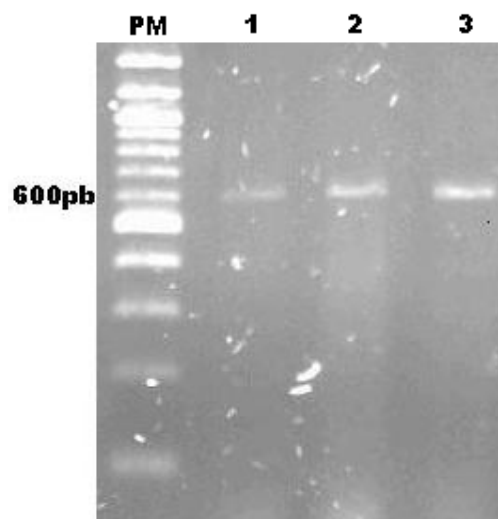


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose com produto de PCR para a enzima F1,6-B de mRNAs oriundos de placentônios bovinos. Os números 1, 2 e 3 equivalem respectivamente ao primeiro, segundo e terceiro terço gestacionais. Nos três períodos foram observados produtos de tamanho esperado (599 pb). **PM**: Marcador de peso molecular de 100 pb; pb: pares de bases.

5.2 GLICOSE 6-FOSFATASE (G6-P)

Para a enzima G6-P o tamanho esperado do produto de PCR é de 473 pares de bases. Tanto no fígado quanto na placenta houve o aparecimento de produto de tamanho esperado. Os produtos esperados foram detectados em todos os períodos gestacionais. Entretanto, para esta enzima, produtos de tamanho inespecífico foram encontrados. Observou-se o aparecimento regular de uma amplificação inespecífica de 600 pb com intensidade maior do que o produto esperado. Estas amplificações inespecíficas foram observadas tanto no fígado (Figura 10) quanto no tecido placentário (Figura 11). O produto de tamanho esperado foi recortado do gel de agarose, purificado, clonado e sequenciado, tanto para o fígado, representando o controle positivo, quanto para a placenta. No caso da placenta optou-se por

um produto do segundo terço de gestação, pois a intensidade da banda pareceu ser a mais satisfatória. Os produtos seqüenciados apresentaram similaridade de 100% com a seqüência de *Bos taurus*.

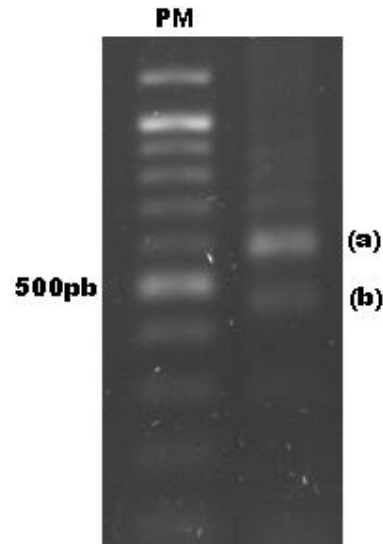


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose de produtos de para a enzima G6-P. (a) Produto inespecífico. (b) produto de tamanho esperado para a enzima glicose 6-fosfatase (473 pb) com mRNA oriundo de fígado. **PM**: Marcador de peso molecular de 100 pb; pb: pares de bases.

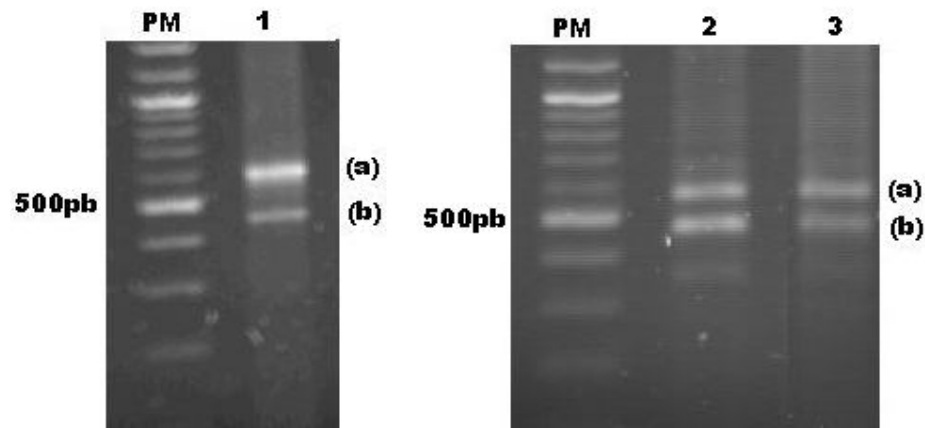


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose com produtos de PCR para a enzima F1,6-B de mRNAs oriundos de placentônios bovinos. Os números 1, 2 e 3 equivalem respectivamente ao primeiro, segundo e terceiro terço gestacionais. (a) produtos inespecíficas. (b) produto de tamanho esperado (473 pb). **PM**: Marcador de peso molecular de 100; pb: pares de bases.

5.3 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASE (PEP-CK)

Para a enzima PEP-CK o tamanho esperado do produto de PCR é de 400 pares de bases. O produto de tamanho esperado foi detectado no fígado (Figura 12) e na placenta nos três períodos gestacionais. Tanto no fígado quanto na placenta foi observado um “rastros” durante toda a extensão de corrida no gel.

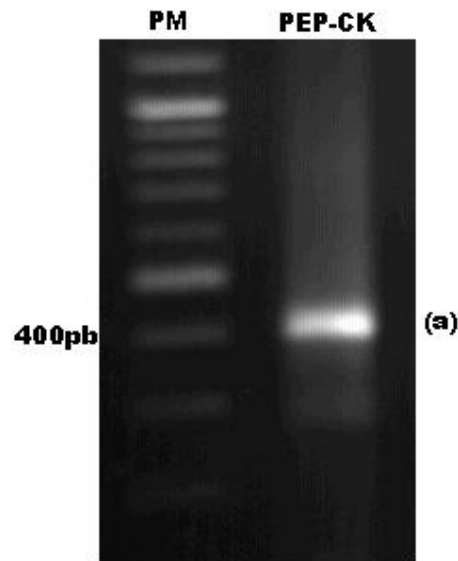


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose com produto de PCR para a enzima PEP-CK. (a) produto de tamanho esperado para a enzima fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (400 pb) com mRNA oriundo de fígado. **PM**: Marcador de peso molecular de 100 pb; pb: pares de bases.

No fígado o produto de PCR foi recortado, purificado, clonado e seqüenciado. No caso da placenta os produtos apresentaram baixa intensidade (Figura 13), por esse motivo, esses produtos foram recortados, purificados e reamplificados novamente através de PCR.

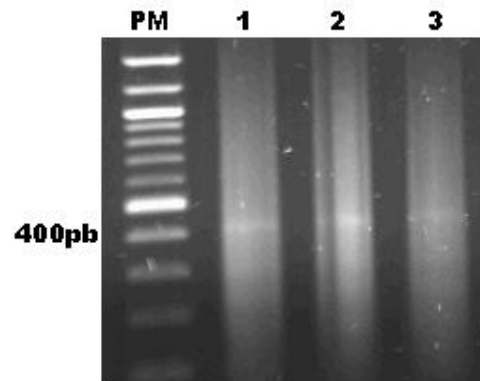


Figura 13. Foto de gel de agarose com produtos de PCR para a enzima PEP-CK de mRNAs oriundos de placentônios bovinos. Os números 1, 2 e 3 equivalem respectivamente ao primeiro, segundo e terceiro terço gestacionais. Amplificações fracas de tamanho esperado (400 pb) podem ser observadas nos três períodos gestacionais. **PM**: Marcador de peso molecular de 100 pb; pb: pares de bases.

Com essa segunda reamplificação melhorou-se significativamente a qualidade dos produtos (Figura 14). Dessa forma, o produto correspondente ao segundo terço gestacional foi recortado, purificado, clonado e sequenciado.

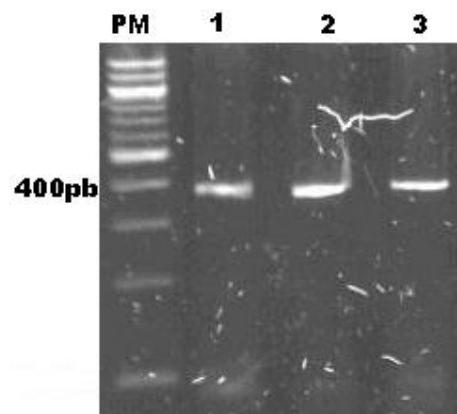


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose com produtos de PCR para a enzima PEP-CK de mRNAs oriundos de placentônios bovinos reamplificados por PCR. 1, 2 e 3 representam respectivamente o primeiro, segundo e terceiro terço gestacionais. **PM**: Marcador de peso molecular de 100; pb: pares de bases.

A similaridade do sequenciamento da PEP-CK comparado à seqüência de *Bos taurus* foi de 99% tanto para o fígado bovino quanto para a placenta bovina.

6 DISCUSSÃO

A possibilidade de que a placenta de humanos poderia produzir glicose foi sugerida por Claude Bernard em 1859 (LEONCE et al., 2006). Outros autores também estudaram a presença da via gliconeogênica em placentas. Matsubara e Sato (1999) descreveram que o fígado é o órgão central no metabolismo de carboidratos em adultos e que a placenta possui analogias a este órgão, já que várias rotas metabólicas da glicose como glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese e glicólise também parecem estar presentes no tecido placentário. Em outro trabalho destes mesmos autores (MATSUBARA et al., 2001), estes sugerem que a placenta não somente transfere efetivamente glicose de compartimentos maternos para o feto, mas também é capaz de produzi-la. Porém, raros grupos de pesquisadores dedicaram-se ao estudo da gliconeogênese na placenta, com estes estudos sendo realizados somente em placentas de mulheres (PAPAMARCAKI e TSOLAS, 1991) e de ratas (BAGEWADIKAR et al., 1977). Desta forma, não há nada descrito na literatura com relação à existência da rota gliconeogênica ativa na placenta de bovinos. Portanto, a detecção da expressão gênica de enzimas gliconeogênicas na placenta bovina, realizada neste trabalho, apresenta-se como a primeira descrição científica da possibilidade da ocorrência desta rota metabólica durante a gestação em bovinos, com possíveis implicações ao crescimento do concepto como um todo.

Bagewadikar et al. (1977) fizeram um estudo mais completo sobre a gliconeogênese na placenta de ratas, pesquisando as três enzimas também estudadas neste trabalho, onde fêmeas prenhes foram avaliadas quanto à presença das enzimas gliconeogênicas no período denominado inicial (14 e 16 dias) e período final de gestação (19 e 21 dias). As ratas foram sacrificadas e as placentas e fígados fetal coletados para a dosagem das enzimas por meio de ensaio enzimático. Os autores observaram que o glicogênio placentário estava aumentado durante a gestação, com níveis máximos relatados no 16º dia de gestação e declinando após esse período. O tecido placentário estava apto para utilizar L-alanina-¹⁴C como um precursor da síntese de glicose, e por volta do 16º dia de gestação, a síntese de glicose estava 3,5 vezes maior comparado ao 14º dia e 8 vezes maior comparado ao final da gestação. O aumento da atividade das enzimas gliconeogênicas ocorreu paralelamente ao aumento dos níveis de glicogênio na placenta. Similarmente, a redução da atividade dessas enzimas foi correlacionada com a queda dos níveis de glicogênio placentário. Já no fígado fetal, a G6-P não foi mensurada na fase inicial da gestação e sua atividade começou a surgir somente após o 16º dia, enquanto a PEP-CK não foi detectada no fígado fetal durante a gestação. O

aparecimento das enzimas gliconeogênicas no fígado fetal coincidiu com o decréscimo dessas enzimas no tecido placentário. Em nosso estudo, constatamos a presença de transcritos placentários para as três enzimas gliconeogênicas em todos os períodos gestacionais avaliados em bovinos. Como avaliamos somente a expressão gênica, estes resultados não necessariamente significam atividade enzimática no tecido placentário, mas trazem a possibilidade de que esta rota metabólica esteja presente durante a gestação de bovinos.

Papamarcaki et al. (1991) encontraram atividade enzimática da frutose 1,6-bifosfatase (F1,6-B) na placenta de mulheres a termo, através de ensaio enzimático e de Western Blot. Estes autores fizeram a suposição que a gliconeogênese na placenta encontra-se diminuída com relação ao fígado materno. Entretanto, como a área placentária é muito maior do que a hepática, a quantidade de glicose produzida pela placenta pode ser significativa em manter os níveis glicêmicos fetais. Em bovinos, considerando-se que a massa de tecido placentário representa em torno de 11% do peso do bezerro ao nascer (Batchelder et al., 2007a,b), e considerando-se que o tecido placentário representa ao redor de 80% de todo o metabolismo oxidativo do concepto bovino do meio para o final da gestação (Ferrell, 1989), as baixas expressões observadas na placenta bovina neste estudo, se confirmadas as atividades enzimáticas *a posteriori*, também poderão representar uma fração significativa de produção placentária de glicose ao concepto.

A glicose 6-fosfatase (G6-P) é a terceira enzima chave irreversível da gliconeogênese. Há evidência de diferentes genes para G6-P expressos em diferentes tecidos. A atividade da G6-P em humanos tem sido encontrada em vários tecidos como pâncreas e em alguns astrócitos cerebrais (LEONCE et al., 2006). Nesses tecidos é improvável que a G6-P tenha alguma importância em manter a glicemia, uma vez que a atividade dessa enzima nesses tecidos é menor que no fígado. Entretanto, em algumas condições patológicas mostrou-se que o cérebro pode exportar glicose e contribuir para a manutenção dos níveis de glicose sanguínea (LEONCE et al., 2006). Em contraste, a massa de tecido placentário é relativamente grande em comparação ao fígado fetal e este possui baixos níveis de G6-P em comparação com o fígado adulto; então, a G6-P na placenta pode ter um importante papel em manter os níveis de glicose na circulação fetal (LEONCE et al., 2006).

Com o intuito de buscarmos informações ainda ausentes na literatura, foram analisadas amostras de placentônios representativas dos três períodos gestacionais em bovinos. Durante todos os períodos de gestação foi detectada a expressão gênica placentária das três enzimas gliconeogênicas. Nosso próximo passo, para um melhor entendimento deste

assunto, é buscarmos a quantificação destas enzimas por meio de PCR quantitativo em tempo real, além da análise da presença e da atividade das enzimas gliconeogênicas no tecido placentário bovino. Esta análise poderá apresentar uma conotação importante no entendimento de processos fisiológicos homeorréticos que ocorrem durante a prenhez que acomodam o metabolismo materno ao crescimento e desenvolvimento do concepto, tanto em eventos de normalidade quanto patológicos.

A glicose é o substrato de maior relevância em meados da gestação, responsável por aproximadamente dois terços da demanda metabólica do concepto bovino. A frutose, por sua vez, é sintetizada pela placenta a partir da glicose, sendo o principal glicídeo no plasma e fluidos fetais, uma particularidade de espécies com placentas sinepitélio- ou epitélio-coriais, como os ungulados e cetáceos (GOODWIN, 1956; NIXON, 1963). Um aumento no aporte, transporte ou síntese de glicose pela placenta redireciona linearmente o uso deste substrato para rotas não-oxidativas, como a síntese de frutose (MEZMARICH et al., 1987; HAY, 1995; ALDORETTA & HAY, 1999). Conseqüentemente, a maior massa e área placentárias em prenhez a partir de embriões PIV sugere, pelo menos em parte, a existência de um aumento no aporte de nutrientes ao feto ou capacidade metabólica da placenta em prenhez de FIV e TNCS que resulta em um desvio no crescimento pré-natal com possíveis implicações na sobrevivência pós-natal (BERTOLINI et al., 2004, 2007). As evidências indicam que uma maior utilização, aporte ou síntese de glicose, possivelmente pela gliconeogênese, que parece ocorrer, reduzam a restrição placentária, favorecendo o crescimento fetal. Tendo em vista a importância que o tecido placentário possui em promover o crescimento fetal (ELEY et al., 1978; PRIOR e LASTER, 1979; FERRELL, 1989; REYNOLDS et al., 1990), bem como a restrição desse crescimento ao final da gestação (GLUCKMAN et al., 1992, BELL et al., 1999), e considerando as inúmeras alterações moleculares e fisiológicas que ocorrem em animais oriundos de técnicas de manipulação embrionária (BERTOLINI et al., 2004; 2007), parece ser imprescindível um estudo mais aprofundado destas enzimas no tecido placentário de animais normais para que aspectos patológicos, como aqueles observados em gestações de FIV e transferência nuclear, possam ser melhor compreendidos. Pelo fato de nenhum trabalho ter sido realizado, até o presente momento, para elucidar o papel da gliconeogênese no tecido placentário em bovinos, acreditamos que este trabalho contribuirá para o direcionamento de futuras pesquisas nesta importante área da biologia do desenvolvimento que é a fisiologia da gestação.

Este estudo poderá ser útil para o melhor entendimento de problemas fetais em conceptos oriundos de embriões produzidos in vitro (FIV E TN). Como descrito anteriormente, estes conceptos apresentam problemas como alto peso ao nascer, conhecida como Síndrome dos Bezerros Absolutamente Grandes (SBAG) e placentônios gigantes. Estes problemas podem estar relacionados com defeitos metabólicos placentários com relação ao metabolismo da glicose, onde este órgão pode estar produzindo glicose em maior quantidade que o normal e conseqüentemente aumentando o aporte de glicose para o concepto e com isso o peso fetal torna-se aumentado.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluirmos que:

(a) A placenta bovina apresenta a expressão dos genes para as três enzimas chave da gliconeogênese: a frutose 1,6 bifosfatase (F1,6-B), a glicose 6-fosfatase (G6-P) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP-CK).

(b) A detecção da expressão dos genes das enzimas gliconeogênicas F1,6-B, G6-P e PEP-CK ocorreu nos três períodos gestacionais estudados.

Os nossos resultados indicam que é possível que a gliconeogênese ocorra no tecido placentário de bovinos durante a gestação. Porém, são necessários mais estudos com relação à quantificação da expressão gênica e à avaliação da atividade de cada uma das enzimas gliconeogênicas em cada período gestacional para a confirmação da ocorrência desta importante rota metabólica na placenta de bovinos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDORETTA, P.W.; HAY, W.W. Jr. Effect of glucose supply on ovine uteroplacental glucose metabolism. **Am. J. Physiol.** v. 46, R947-R58, 1999.

ALLEN, W. R. et al. Placentation in the African elephant (*Loxodonta africana*): II morphological changes in the uterus and placenta throughout gestation. **Placenta.** v. 24, p. 598- 617, 2003.

ANGIOLINI, E. et al. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. **Placenta.** v. 27, p. 98-102, 2005.

ASSEL, B.; ROSSI, K.; KALHAN, S. Glucose metabolism during fasting through human pregnancy: comparison of tracer method with respiratory calorimetry. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 265, p. 351-56, 1993.

ATKINSON, B. A.; KING, G. J.; AMOROSO, E. C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biol. Reprod.** v. 30, p. 763-74, 1984.

BACILA, M. **Bioq.Veterinária.** 2.ed. Robe Editorial: São Paulo, 2003, 500p.

BAGEWADICAR, R. S.; SHARMA, C.; NADKARNI, B. Gluconeogenesis in rat placental during foetal development. **Ind. J. Exp. Biol.** v. 15, p. 27-29, 1977.

BARKER D. J. P. Mothers, babies and health in later life. **Nat. Inst. Health.** 2. ed, p. 13-41, 1998.

BATCHELDER, C. A. et al. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. **Cloning Stem Cells.** v. 7, p. 238-54, 2005.

BATCHELDER, C. A. et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning Stem Cells.** v. 9, p. 63-82, 2007a.

BATCHELDER, C. A. et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. **Cloning Stem Cells.** v. 9, p. 83-96, 2007b.

BELL, A. W.; HAY, W.W.; EHRHARDT, R. A. Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 54, p. 401-10, 1999.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology.** v. 57, p. 18-81, 2002.

BERTOLINI, M. et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro- produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology.** v. 59, p. 459, 2003.

BERTOLINI, M. et al. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine foetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**. v. 128, p. 341-54, 2004.

BERTOLINI, M. et al. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 31, p. 391-405, 2007.

BERTOLINI, M. et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**. v. 58, p. 973-94, 2002a.

COLEMAN, R. A.; HAYNES, E. B. Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture. **J. Lipid. Res.** v. 28, p. 1335-41, 1987.

ELEY, R. M. et al. Development of the conceptus in the bovine. **J. Dairy. Sci.** v. 61, p. 467-73, 1978.

FARIN P. W.; FARIN C. E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biol. Reprod.** v. 52, p. 676-82, 1995.

FERRELL C. L. et al. Placental regulation of fetal growth. **N Y: Plenum. Press.** p. 1-19, 1989.

FERRELL C. L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow. I. Growth of the tissues of the gravid uterus. **J. Anim. Sci.** v. 69, p. 1945-53, 1991a.

FERREL C. L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow. II. Blood flow and nutrient flux. **J. Anim. Sci.** v. 69, p. 1954-65, 1991b.

FERRELL, C. L. et al. Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus and fetus. **J. Anim. Sci.** p. 656-67, 1983.

GLUCKMAN P. D. et al. Elevating maternal insulin-like growth factor-I in mice and rats alters the pattern of fetal growth by removing maternal constraint. **J. Endocrinol.** v. 134, 1992.

GODFREY, K. M.; BREIER B. H; COOPER C. Constraint of the materno placental supply of nutrients: causes e consequences. **Royal Col. Obst. Gynaecol**, v. 4, p. 283-98, 2002.

GOODWIN, R.F.W. Division of the common mammals into two groups according to the concentration of fructose in the blood of the fetus. **J. Physiol.** v. 132, p. 146-56, 1956.

GURTLER, H. et al. **Fisiol. Veterinária**. 2.ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 1987, 612p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, S. E. **Reprod. Anim.** Barueri: Manole, 2003, 513p.

HASLER J. F. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**. v. 43, p. 141-52, 1995.

- HAY-J.R, W.W. The Placenta: not just a conduit for maternal fuels. **Diabetes**. v. 40, p. 44-50, 1991.
- HAY, W.W. Jr. Regulation of placental metabolism by glucose supply. **Reprod. Fert. Dev.** v. 7, p. 365-75, 1995.
- HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 1, p. 47-51, 2000.
- HEYMAN, Y. et al. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biol Reprod.** v. 66, n. 1, p. 6-13, 2002.
- HILL, J. R. et al. E.Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**. v. 51, n. 8, p. 1451-65, 1999.
- HILL, J. R. et al. Evidence of placental abnormality as a major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.** v. 63, p. 1787-94, 2000.
- HOLZMAN, I. R. et al. Glucose metabolism, lactate and ammonia production by the human placenta in vitro. **Pediat. Res.** v. 13, p. 117-20, 1979.
- JANSSON T.; WENNERGREN M.; ILLSLEY N. P. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 77, p. 1554-62, 1993.
- KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Physiol. Reprod.** v. 1, p. 441-84. 1994.
- KONO, M. et al. Molecular cloning and functional expression of a fifth type alpha 2,3 sialyltransferase (mST3Gal V: GM3 synthase). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 253, p. 170-75, 1998.
- LATSHAW, W. K. Veterinary development anatomy: a clinical oriented approach. **Toronto: Decker.** p. 49-74. 1987.
- LEE, C. S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. R. Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placentae of the deer and cow using the monoclonal antibody, SBU-3. **J. Anat.** v. 147, p. 163-79, 1986.
- LEMONS, J. A. Fetal placental nitrogen metabolism. **Semin. Perin.** v. 3, p. 177-90, 1979.
- LEONCE, J. et al. Glucose production in the human placenta. **Placenta.** v. 27, p. 103-08, 2006.
- MARZZOCO, A.; BAYARDO, B. T. **Bioq. Básica** 2.ed. Guanabara: Rio de Janeiro, p. 172-77, 1999.
- MATSUBARA, S.; SATO, I. Enzyme-histochemically detectable glucose-6-phosphatase is present in chorion laeve trophoblasts of human fetal membranes. **Histochem. Cel. Biol.** v. 113, p. 363-68, 1999.

- MATSUBARA, S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is present in normal and pré-eclamptic placental trophoblasts: ultrastructural enzyme-histochemical evidence. **Placenta** v. 22, p. 90-5, 2001.
- MEZMARICH, H. K. et al. Fructose disposal and oxidation rates in the ovine fetus. **Q. J. Exp. Physiol.** v. 72, p. 617-625, 1987.
- NETO, A. C. A. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação in vitro.** 2005. 223p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NIEMANN, H. et al. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cell.** v. 4, p. 29-38, 2002.
- NIXON, D. A. The transplacental passage of fructose, urea and meso-inositol in the direction from foetus to mother, as demonstrated by perfusion studies in the sheep. **J. Physiol.** v. 166, p. 351-62, 1963.
- NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos mecanismos de desarrollo y malformaciones.** Zaragoza: Acribia, 1972, 572p.
- PAPAMARCAKI, T.; TSOLAS, O. Demonstration of fructose 1,6-biphosphatase in human term placenta. **Experientia.** v. 47, p. 67-8, 1991.
- PEDERSEN, G. H. et al. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 234, p. 137-43, 2005.
- PRIOR, R. L.; LASTER, D. B. Development of the bovine fetus. **J. Anim. Sci.** v. 89, p. 1546-53, 1979.
- REYNOLDS, L. P. et al. Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to 250 of gestation. **J. Reprod. Fertil.** v. 48, p. 213-22, 1990.
- ROUX, J. F.; GREEN, R. Lipid metabolism by the human placenta (Abstract). **Obstet. Ginecol.** v. 29, p. 446, 1967.
- SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **J. Anim. Sci.** v. 60-61, p. 145-60, 2000.
- SILVER, M. et al. Blood amino acids in the pregnant mare and fetus: The effects of maternal fasting and intrafetal insulin. **Exp. Physiol.** v.79, p. 423-433, 1994.
- STICE, S. L. et al. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol. Reprod.** v. 54, p. 100-10, 1996.
- WILLIAMS e WILKINS. **Veterinary Obstetrics.** Baltimore, p. 29, 1951.

WILSON, J. M. et al. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.** v. 38, p. 73-83, 1995.

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliocorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta.** v. 13, p. 101-13, 1992.

YOUNG, L. E. et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics.** v .27, p. 153-54, 2001.