

Caracterização das proteínas caveolinas -1 e -2 na placenta de conceptos bovinos clonados transgênicos¹

Kenya C. Peres², Vitor Trinca², Fernanda P. Oliveira², Lilian J. Oliveira³, Fabiana F. Bressan⁴, José R.V. Pimentel⁵, Flávio V. Meirelles⁴ e Flávia T.V. Pereira^{2*}

ABSTRACT.- Peres K.C., Trinca V., Oliveira F.P., Oliveira L.J., Bressan F.F., Pimentel J.R.V., Meirelles F.V. & Pereira F.T.V. 2015. [Characterization of caveolin -1 and -2 proteins in cloned and transgenic placenta of cattle.] Caracterização das proteínas caveolinas -1 e -2 na placenta de conceptos bovinos clonados transgênicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(5):477-485. Curso de Zootecnia, Faculdade Estadual Paulista, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brazil. E-mail: verechia@gmail.com

The transgenic application of green fluorescent protein (GFP) as fetal cell marker on cattle cloned placenta could provide an exclusive model for studying the morphologic and immunologic maternal-fetal interactions, providing information about its mapping, distinguishing the fetal from maternal cells. This model will have direct application, mainly because these animals present problems during its development. With this model's support, we intend to verify the substances transport between mother and fetus during endocytosis, through the immunolocalization of protein named caveolae. For these, we used 06 cloned bovine and 30 cattle samples of artificial insemination (AI) with 90 days of pregnancy, which had been their development interrupted by humanitarian slaughter of the recipient and recovery of the pregnant uterus. We collected the placentome and the chorion. A part of the samples was cut and fixed, by immersion, on a solution containing 4% of paraformaldehyde or 10% of formaldehyde on a sodium phosphate buffer (PBS), at 0,1M pH 7.4, Zamboni solution (4% of paraformaldehyde, 15% of picric acid, on sodium phosphate buffer 0,1M pH 7.4), metacarn (60% of metanol, 30% of chloroform, and 10% glacial acetic acid), for morphologic and immunohistochemistry verification for caveolins proteins -1 and -2 (CAV-1 and CAV- 2). The caveolins -1 were found in fetal and maternal villi, but its strongest staining was observed in the endometrial stroma. The caveolins -2 had positive staining in trophoblast and chorioallantoic membrane, and specifically in giant trophoblastic binucleated cell. Therefore the results were compared between cloned cattle and from AI or natural mating, for assisting on detection of the reason of many placental alterations, embryonic losses, spontaneous abortion, post-natal mortality and large offspring syndrome on laboratory-manipulated animals. The result suggests that the proteins caveolins -1 and -2 (CAV-1 and CAV-2) are part of the caveolae composition and important structures related to the molecule transfer to the fetus, nourish it through endocytosis and pinocytosis.

INDEX TERMS: Caveolin-1 and -2 proteins, caveolae, placentation, immunolocalization, cattle.

RESUMO.- A utilização da transgenia com a proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de células de origem fetal nas placentas de clones bovinos servirá de modelo

inédito para estudo morfofisiológico e imunológico da interação materno-fetal, visto que possibilitará o seu mapeamento, diferenciando as células fetais das maternas. Tal

¹ Recebido em 23 de junho de 2014.

Aceito para publicação em 20 de março de 2015.

² L@mpe-Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (Unesp), Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros Km 651, Dracena, SP 17900-000, Brasil.

*Autor para correspondência: verechia@gmail.com

³ Department of Animal Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

⁴ LMMD-Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, Pirassununga, SP 13635-900, Brasil.

modelo terá aplicação direta, principalmente porque estes são animais que apresentam problemas em relação ao seu desenvolvimento. Com o auxílio deste modelo, pretende-se verificar o transporte de substâncias entre a mãe e o feto via endocitose, pela imunolocalização das proteínas chamadas de caveolinas. Para tanto foram utilizados 06 bovinos clonados e 30 bovinos de inseminação artificial (IA) com idade até 90 dias de gestação, os quais tiveram seu desenvolvimento interrompido mediante abate humanitário das receptoras e ovariosalpingohisterectomia, com posterior recuperação do útero gestante. Foram coletados os placentônios e o cório. Uma parte das amostras foi recortada e fixada, por imersão, em solução de paraformaldeído a 4% ou formaldeído a 10% em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M pH 7.4, solução de Zamboni (4% de paraformaldeído, 15% de ácido pícrico, em tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7.4), metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio, e 10% de ácido acético glacial), para verificação da morfologia e realização de imuno-histoquímica para as proteínas caveolinas -1 e -2 (CAV -1 e CAV-2). As caveolinas -1 foram localizadas nos vilos fetais e maternos, mas sua marcação mais forte foi observada no estroma endometrial. As caveolinas -2 tiveram marcação positiva no trofoblasto e membrana córioalantoide, e, especificamente em célula trofoblástica gigante binucleada. Sendo assim, os resultados mostram que a proteína CAV-1 teve uma maior expressão em relação à proteína CAV-2 e que as proteínas CAV-1 e -2 são parte da composição das cavéolas, sendo estruturas importantes e relacionadas com a transferência de moléculas para o feto, realizando a nutrição do mesmo mediante endocitose e pinocitose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Proteínas caveolinas -1 e -2, placenta de conceptos bovinos clonados, transgênicos, cavéola, caveolina, placentação, imunolocalização

INTRODUÇÃO

Segundo Anderson (1998) a original intenção da palavra cavéola foi descrever invaginações da membrana na superfície da célula. Dávalos et al. (2010) completou dizendo que as cavéolas são micro estruturas encontradas de forma abundante na membrana plasmática de muitas células especializadas, incluindo células endoteliais, células epiteliais, e adipócitos. Com a microscopia atual, pode-se notar que há variedade morfológica destas estruturas de membranas, podendo assim estar dispostas em grupos denominados “rosetas” e/ou “cachos de uvas. Estes grupos podem estar tanto próximos à membrana quanto dispersos no citoplasma em forma de vesículas. Ainda em função dessa variedade morfológica, são encontradas cavéolas também no formato de estruturas tubulares alongadas ou canais transcelulares que estão frequentemente presentes em adipócitos e células endoteliais (Razani et al. 2002).

Tradicionalmente, as cavéolas são consideradas microdomínios de membrana especializados se destacam primordialmente por sua forma invaginante e/ou vesicular e pela presença da proteína caveolina. Sowa (2012), afirma que a caveolina, influencia em diversos processos celulares interagindo com as sinalizações das moléculas e regulando

o índice de colesterol dessas estruturas, e ainda que os colesteróis e glicosíngolípidos são os principais componentes das cavéolas. Se o colesterol for removido da membrana plasmática, a cavéola desaparece (Rothberg et al. 1992, Chang et al. 1994, Pelkmans & Helenius 2002).

Segundo Deurs (2003), Thomas & Smart (2008) e Hansen & Nichols (2010) a caveolina-1 é expressa dentro da maioria das células que possuem adipócitos, músculo liso, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos sendo necessária para a estruturação da cavéola. A caveolina-1 e 3 pode dar forma a cavéolas invaginantes, já a caveolina-2 só apresenta forma invaginando quando em presença com a caveolina-1, caso contrário, o Complexo de Golgi irá degradá-lo. A caveolina-3 é específica do tecido muscular, encontrada nos músculos esquelético, cardíaco e liso.

Este trabalho teve como objetivo observar a função e marcação das proteínas caveolina-1, -2 na placenta de bovinos clonados e transgênicos, que estão envolvidas no transporte de substâncias transplacentárias e internalização celular destas, mediante a técnica de imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização das caveolinas -1 e -2 na placenta de conceptos bovinos clonados transgênicos, que expressam a proteína fluorescente verde, foram utilizados o cório e placentônios, listados no Quadro 1 e também os anticorpos primários e secundários listados no Quadro 2.

As amostras de cório e placentônio são provenientes do Projeto Jovem Pesquisador FAPESP, Processo 2005/52676-1, sob responsabilidade da Profa. Adjunta Flávia Thomaz Verechia Pereira, do Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião - L@

Quadro 1. Relação de tamanhos dos embriões bovinos clonados transgênicos expressando a proteína fluorescente verde - GFP (cm) e idade fetal (dias). Dracena/SP, 2007

Animal Clonado Transgênico	Medida - CR (cm)	até 45 dias gestação
GFP3.*1	1,1 cm	34
GFP3.*2	0,65cm	34
GFP4	1,0cm	28
Animal Clonado Transgênico	Medida - CR (cm)	61-75 dias gestação
GFP5	5,5cm	60
GFP6	5,5cm	60
GFP7	5,66	60
Animal Clonado Transgênico	Medida CR (cm)	76 - 90 dias gestação
GFP8	16,0cm	90

* GFP 3 são fetos de gestação gemelar.

Quadro 2. Anticorpos primários e secundários utilizados para testes imuno-histoquímicos na interação materno-fetal de conceptos de gestação natural e clonados transgênicos em diferentes estágios de gestação. Dracena/SP, 2012

Anticorpo primário	Clone (isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
Caveolina 1	Policlonal	Coelho	1:400	SCBT (sc-894)
Caveolina 2	Policlonal	Coelho	1:200	SCBT (sc-7942)
Anticorpo Secundário anti-camundongo anti-coelho/anti-ovino (biotinilado)				Kit LSAB, Dako® (K0690)

(Adaptado de Artoni et al. 2007).

mpe, Unesp Dracena, SP (Protocolo CEUA 002/2006 Unesp Dracena).

As células utilizadas para a marcação GFP, foram os fibroblastos fetais bovinos oriundos de feto da raça Nelore, macho, com 55 dias de gestação e portador de marcador mitocondrial de origem *indicus* (marcador citoplasmático).

Os fibroblastos foram utilizados para desenvolvimento de embriões recombinantes, mediante transferência nuclear, e a metodologia empregada para a enucleação dos oócitos foi a descrita por Pereira et al. (2013).

Os embriões produzidos foram transferidos em progenitoras e as 06 gestações produzidas de clones transgênicos foram acompanhadas por ultra-som e divididas em grupos, conforme Quadros 1 e 2. Aos 28 e 34 dias, as gestações foram interrompidas por abate humanitário, e aos 60 e 90 dias, por ovariosalpingohisterectomia.

Os úteros gestantes foram transportados em gelo para o laboratório, o cório e os placentônios, foram recortados e fixados.

As secções de cório e placentônio 4-5µm foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de etanol. O desmascaramento antigênico foi realizado pelo aquecimento dos cortes em tampão citrato (0,384g de ácido cítrico mono-hidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico di-hidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) por 15 minutos em forno de microondas. A atividade de peroxidase tecidual endógena foi bloqueada pela incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5 (TBS, 60,57g de Tris para 500mL de água ultrapura) por 30 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com soro de cabra a 10% em TBS por 30 minutos. O anticorpo primário foi diluído em tampão TBS contendo 1% de soro de cabra e incubado "overnight" a 4°C em câmara

úmida. Paralelamente, outras secções foram incubadas na mesma concentração com anticorpo para o controle de isotipo (IgG).

Após incubação com o anticorpo primário e todas as lavagens dos cortes foram realizadas com TBS contendo 1% de soro de cabra. A reação foi visualizada por meio do kit polivalente Dako-advance HRP Link (cat. # K4069, Dako, EUA) ou Kit LSAB-Dako® (K0690) de acordo com a recomendação do fabricante. A reação foi revelada por precipitação de 3,3'-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine, cat. # SK-4100). Para finalizar, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e as lâminas permanentes foram montadas com Entellan® (Merck) para análise dos placentônios sob microscopia de luz.

RESULTADOS

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas para a verificação da expressão das proteínas caveolina-1 e caveolina-2 em conceitos bovinos transgênicos clonados GFP positivos aos 60 e 90 dias de gestação. E para animais de gestação de monta natural aos 30 dias e 53 dias de gestação.

Quando realizada a reação para o anticorpo anti-caveolina 1, houve marcação positiva da proteína tanto nos vilos fetais como nos vilos maternos, sendo mais pronunciada no estroma endometrial (Fig.1-4).

Não foi possível observar alterações da expressão da proteína caveolina 1 entre os conceitos provenientes de IA (Fig.1) e os conceitos GFP positivos (GFP+) (Fig.2-4).

A expressão da proteína caveolina-1 não alterou com a

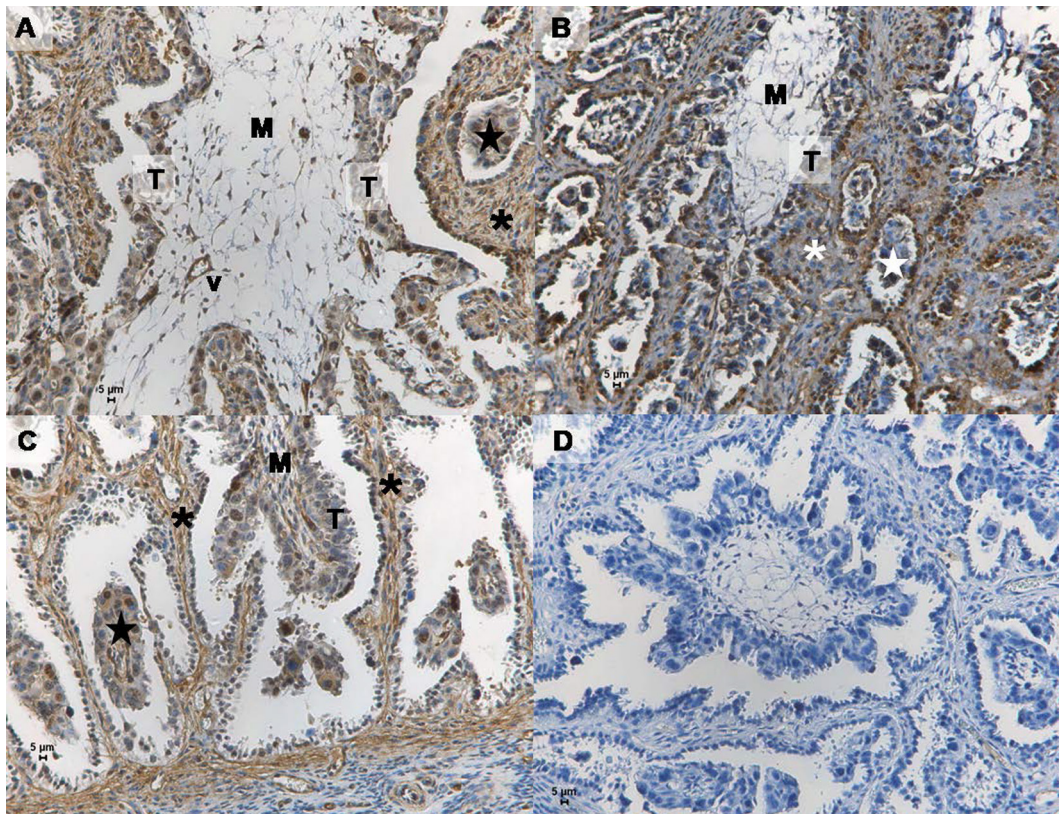


Fig.1. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. (A-D) 53 dias de gestação, animal de gestação natural; interdigitações materno-fetais. (A-C) Imunomarcagem positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). (D) Controle negativo sem marcação. Barra= 5µm.

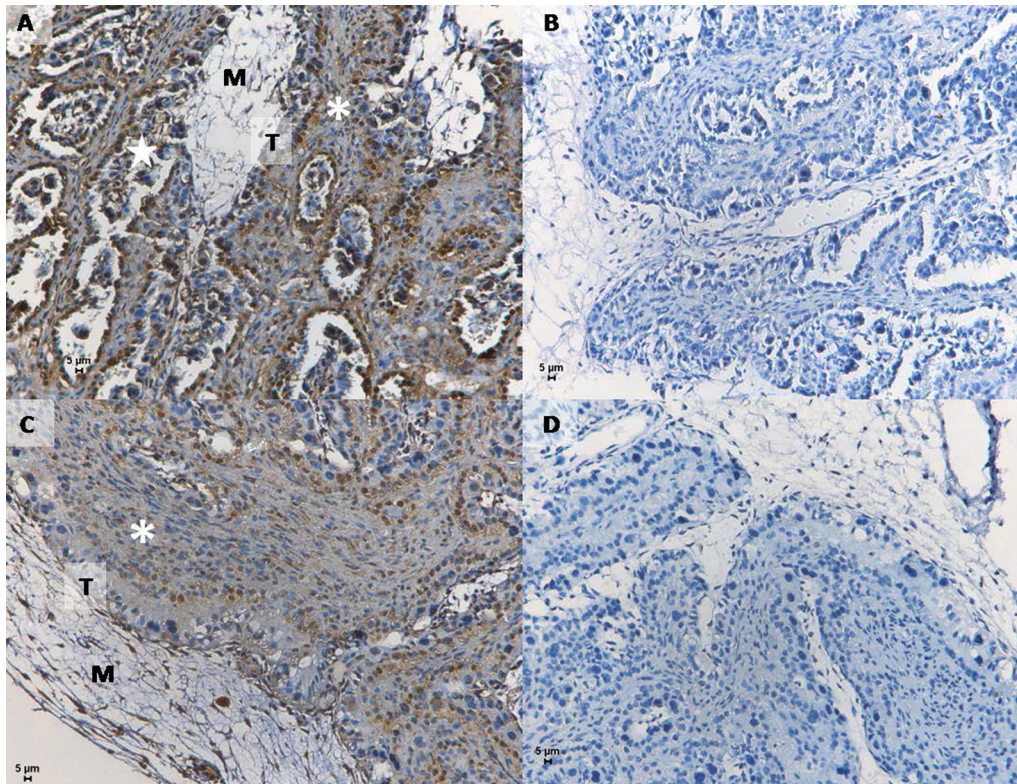


Fig.2. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. (A-D) 60 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A,C) Imuno-marcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*). (B,D) Controles negativos sem marcação. Barra= 5 μ m.

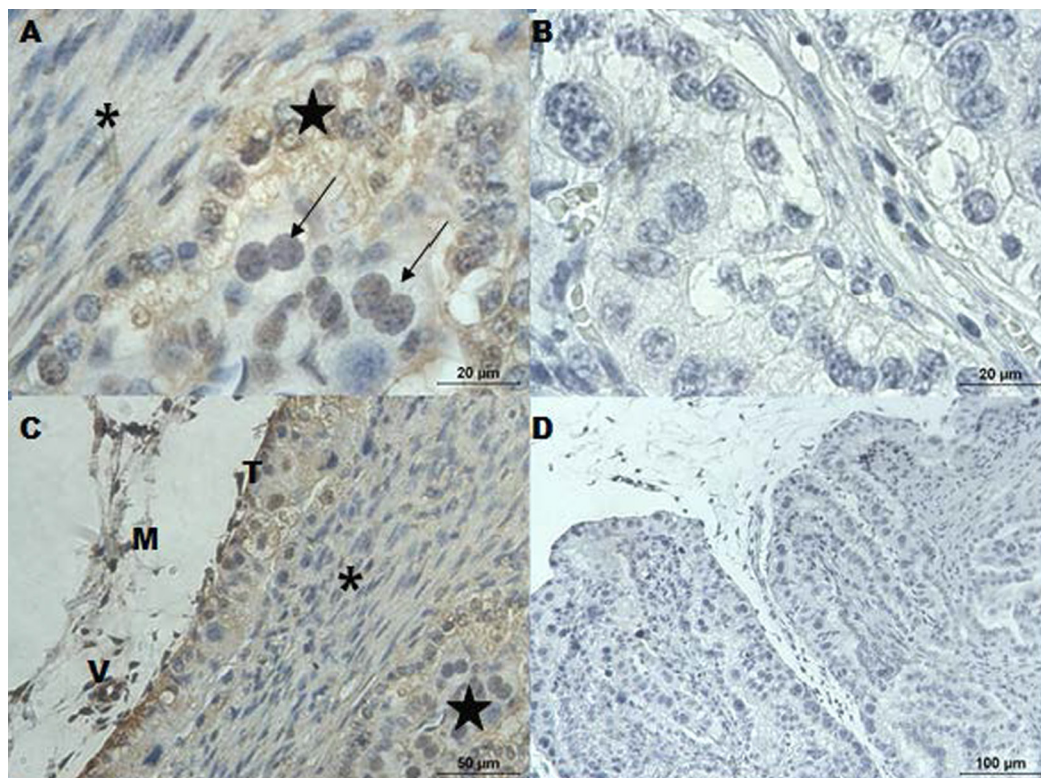


Fig.3. Fotomicrografia Imuno-histoquímica para a caveolina 1. (A-D) 60 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A,C) Imunomarcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*), células trofoblasticas gigantes binucleadas (seta), vasos sanguíneos (v). B e D: controles negativos sem marcação. (A) Barra = 20 μ m. (B) Barra = 20 μ m. (C) Barra = 50 μ m. (D) Barra = 100 μ m.

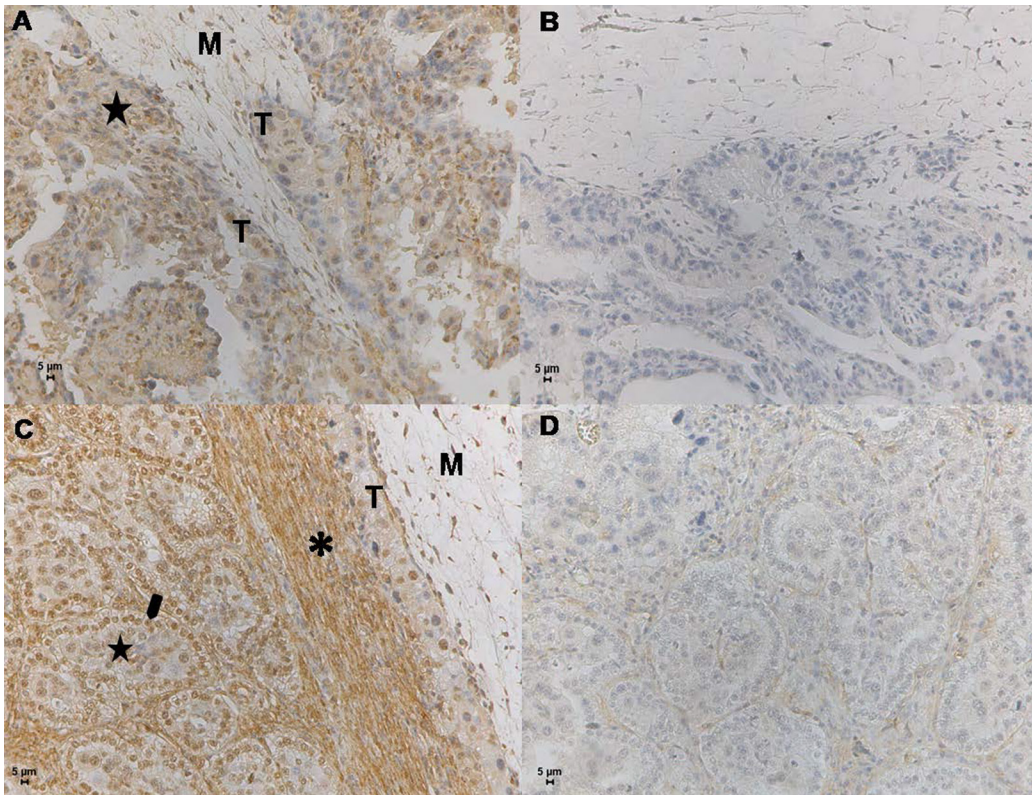


Fig.4. Imuno-histoquímica para a caveolina 1. (A-D) 90 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A,C) Imuno-marcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino (cabeça de seta). (B,D) Controles negativos sem marcação. Barra = 5 μ m.

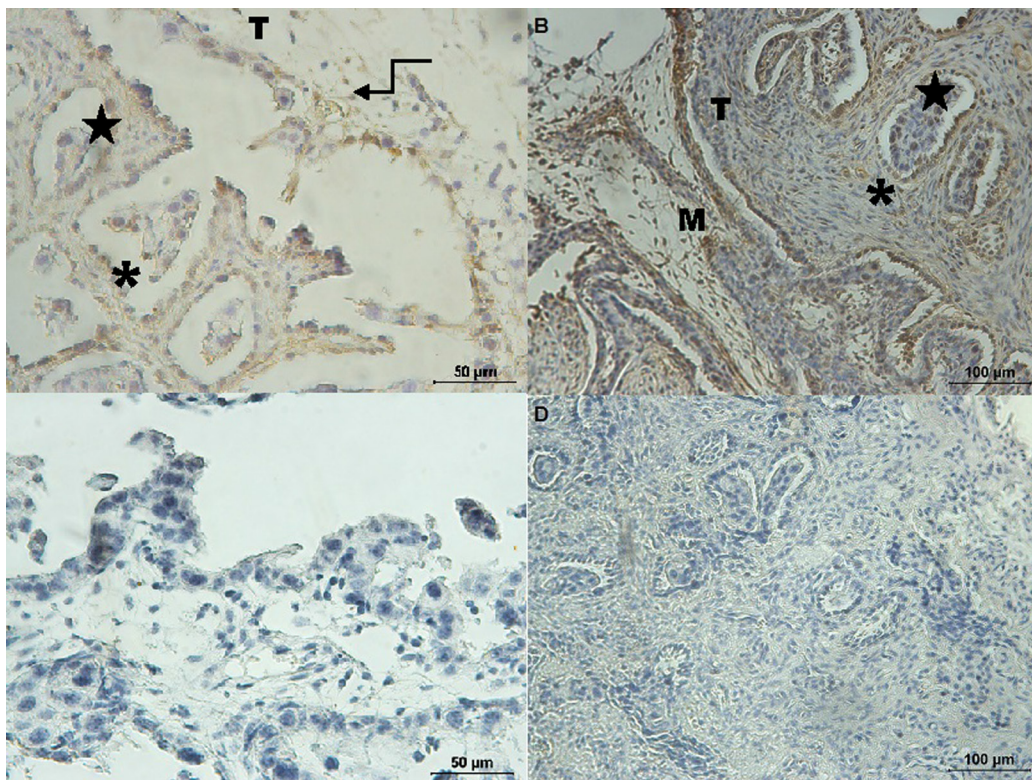


Fig.5 Imuno-histoquímica para a caveolina 1. (A,B) 90 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A-C) Imuno-marcação positiva para a caveolina 1 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela), vilos maternos (*), células trofoblásticas gigantes binucleadas (seta). (D) Controle negativo sem marcação. (A) Barra = 200 μ m. (B) Barra = 100 μ m. (C) Barra = 50 μ m. (D) Barra = 100 μ m.

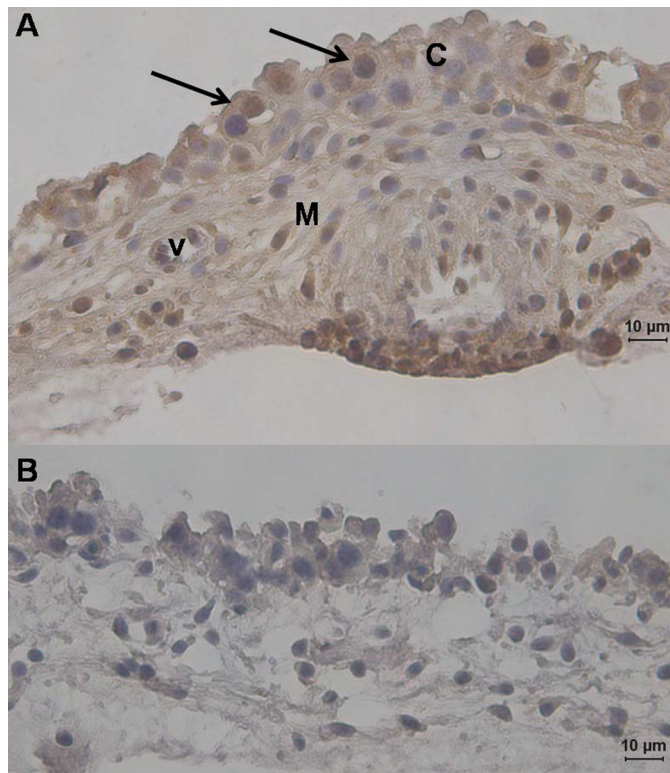


Fig.6. Imuno-histoquímica para a caveolina 2 em cório (C). (A,B) 30 dias de gestação, FIV. A imunomarcção foi positiva para a caveolina 2 na célula trofoblástica gigante binucleada (setas) e mesênquima (M). Vaso sanguíneo fetal (v). (B) Mesmo animal; controle negativo sem marcação. Barra = 10µm.

evolução da gestação, ressaltando que os o conceito GFP positivo de conceitos GFP positivos (Fig.2 e 3) são animais de 60 dias de gestação e os GFP positivos (Fig 4-9), são animais de 90 dias de gestação.

Para o anticorpo anti-caveolina-1, houve marcação específica de células trofoblásticas gigantes binucleadas (Fig.6A).

Já para o anticorpo anti-caveolina-2, obteve-se marcação positiva no trofoblasto da membrana córioalantoide (Fig.9 e 12).

É possível observar a marcação específica em células trofoblásticas gigantes binucleadas (Fig.9A, 10C e 12C).

Além disso, houve marcação positiva no placentônio de conceito GFP positivos de 90 dias de gestação, sendo que, a marcação foi mais pronunciada nas Fig.11A, 12A-C em relação à Fig.11C, o que pode ser explicado pela padronização da diluição do anticorpo, que nas primeiras figuras a concentração era maior 1:200 e na Fig.11C a concentração era menor 1:300.

Foi possível notar a presença de vasos sanguíneos, considerando o cório um tecido ricamente vascularizado (Fig.6C e 9B).

Assim como nas figuras com marcação positiva para caveolina-1, as marcações para caveolina -2 também não tiveram diferenças entre as idades dos conceitos bovinos, sendo a Figura 9, de conceito bovino de 30 dias de gestação, a Figura 10 conceito bovino de 60 dias de gestação e as Figuras 11 e 12 conceitos bovinos de 90 dias de gestação.

Foi possível notar que as amostras com reação para anticorpo anti-caveolina 1, apresentaram maior marcação em relação às de caveolina 2.

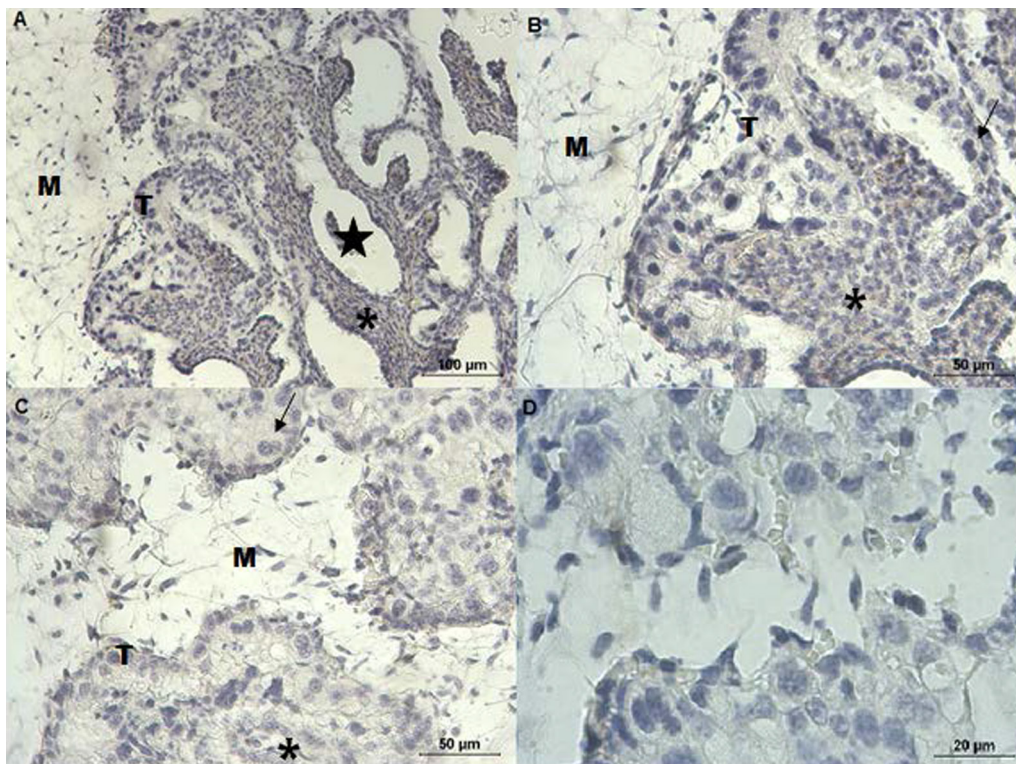


Fig.7. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. (A-D) 90 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A-C) Imuno-marcação positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) (D) Controle negativo sem marcação. (A) Barra = 100µm. (B) Barra = 50µm. (C) Barra = 50µm. (D) Barra = 20µm.

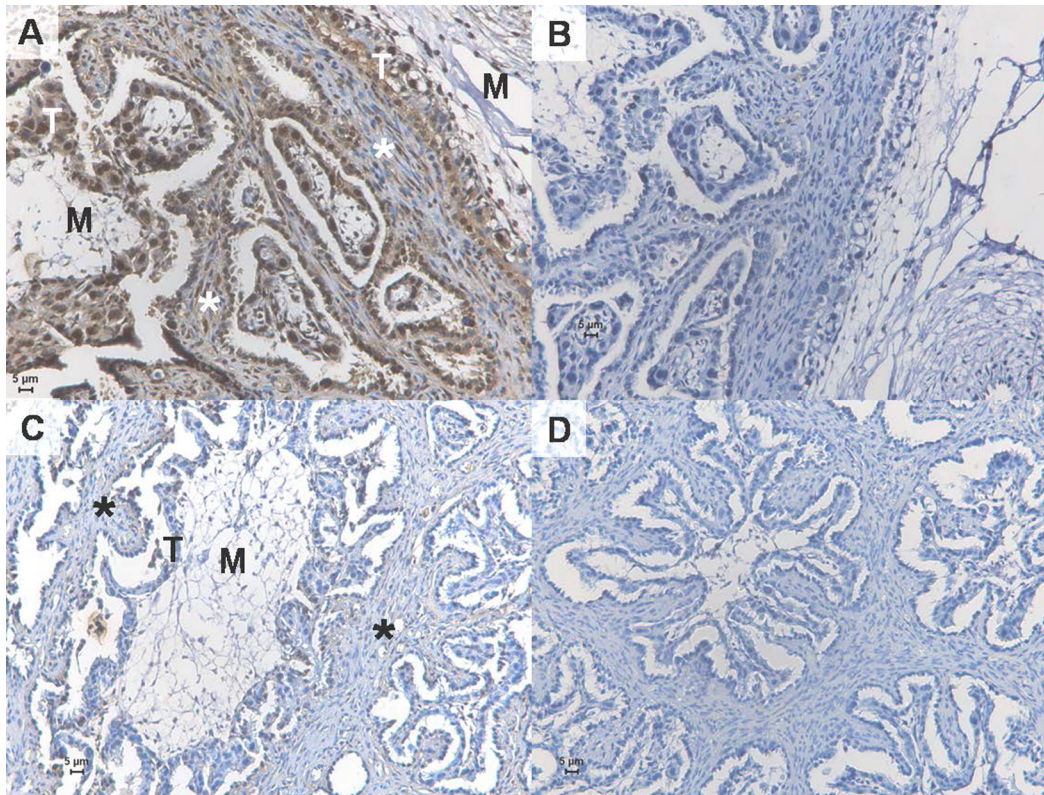


Fig.8. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. (A-D) 90 dias de gestação, conceito GFP; interdigitações materno-fetais. (A,C) Imunomarcacão positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela) e vilos maternos (*) e epitélio uterino. (B,D) Controles negativos sem marcação. Barra = 5 μ m.

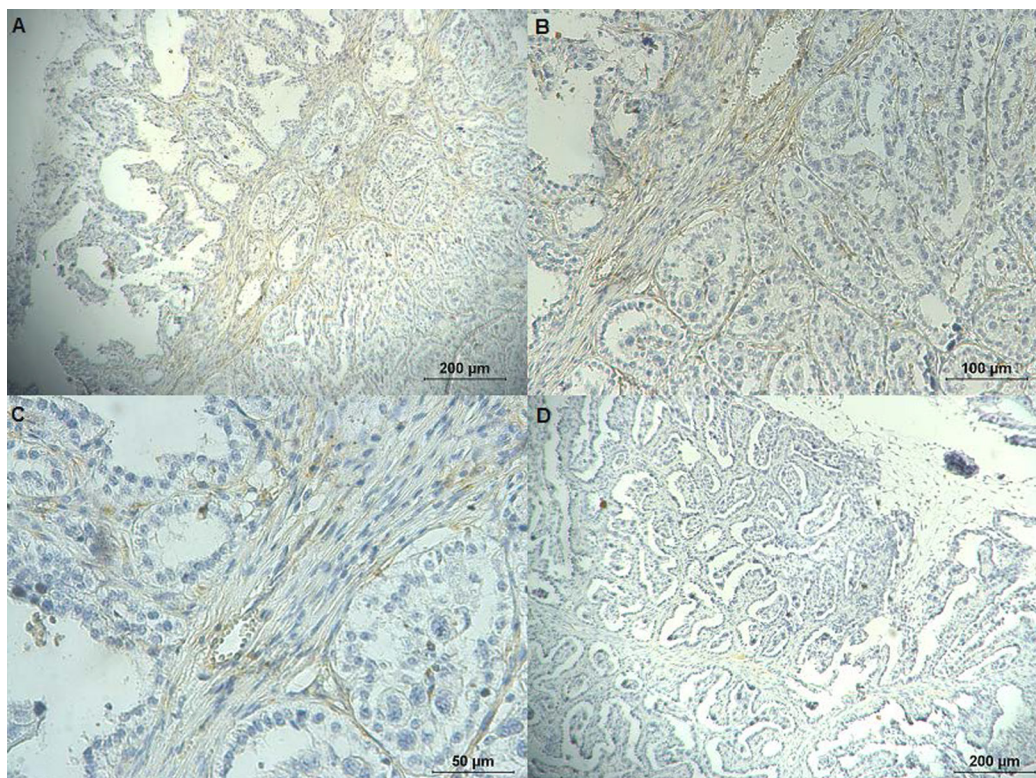


Fig.9. Imuno-histoquímica para a caveolina 2. (A-D) 90 dias de gestação, conceito GFP +; interdigitações materno-fetais. (A-C) Imunomarcacão positiva para a caveolina 2 no mesênquima (M), trofoblasto (T), vilos fetais (estrela), vilos maternos (*) células trofoblásticas gigantes binucleadas (seta) D: controles negativos sem marcação. (A) Barra = 200 μ m. (B) Barra = 100 μ m. (C) Barra = 50 μ m. (D) Barra = 200 μ m.

Foi possível observar as células cuboidais do trofoblasto nas placentas dos bovinos em toda a evolução das gestações, nas idades 30, 60 e 90 dias.

Ainda no trofoblasto da membrana córioalantoide foram observadas poucas cavéolas, e no placentônio nas fases iniciais da gestação estudadas, mas em grande quantidade no endotélio dos capilares sanguíneos da membrana córioalantoide.

DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve pela primeira vez a localização e demonstra a expressão das proteínas caveolinas-1 e -2, na placenta de conceptos bovinos clonados transgênicos com idade de 60 e 90 dias de gestação, e conceptos de IA nos períodos de 30 e 53 dias de gestação, mediante imuno-histoquímica.

Foi observado que as mesmas células presentes na placenta de conceptos bovinos de gestação natural aos 30 e 53 dias de gestação se encontram também nas placentas de conceptos clonados transgênicos de 60 e 90 dias de gestação, concordando com Oliveira et al. (2010), que observou que as estruturas como células gigantes binucleadas, vasos sanguíneos presentes no cório e células epiteliais, que formam a placenta de conceptos bovinos providos de gestação natural no início da gestação, estão presentes em todas as fases até o final desta e que de fato, as características histológicas das placentas nas diferentes fases da gestação são muito semelhantes, fato também relatado por Miglino et al. (2007) comparando a placenta de bovinos providos de gestações normais com a de bovinos clonados.

Para uma especificidade maior, a região da placenta de bovinos estudada nesse trabalho foram as regiões dos placentônios, caracterizada pela presença de áreas especializadas de trocas metabólicas, os quase estão separados por áreas intercotiledonárias de cório liso, assim como as estudadas por Pereira (2000), em búfalas.

Assis Neto et al. (2009), demonstraram o desenvolvimento inicial da placentação bovina (*Bos indicus*) do ponto de vista do alantoide e âmnio, que compõe as membranas fetais. Essas células são sustentadas por uma fina membrana basal e o mesênquima extraembrionário, mesma região que obteve marcação positiva para as proteínas caveolinas -1 e -2, em nas amostras.

O trofoblasto é um tecido que em seu desenvolvimento apresenta-se extremamente vascularizado, corroborando com nossos resultados em relação à presença de grande quantidade de vasos sanguíneos, visualmente observados no presente trabalho. Hard & Anderson (1982) e Ford et al. (1984) afirmam que o fluxo uterino sanguíneo aumenta acentuadamente a partir dos 20 dias de gestação até o nascimento, assim os vasos sanguíneos presentes são importantes para a vascularização do sincício trofoblástico, por possuírem paredes finas não apresentam nenhuma resistência ao fluxo sanguíneo.

A constituição do trofoblasto é caracterizada por uma única camada de células cuboidais a colunares altas, em concordância com trabalhos descritos anteriormente que relataram tal semelhança entre placentas bovinas (Greens-

tein et al. 1958, King et al. 1979, King et al. 1980) e placentas bubalinas. (Sharma et al. 1983, Pereira 2000).

Neste trabalho foram observadas células trofoblásticas gigantes binucleadas, o mesmo também foi descrito por Bosch (2006), como células trofoblásticas arredondadas ou esféricas, de diferentes tamanhos que evoluem para células trofoblásticas gigantes binucleadas, também observado por Pinto et al. (2008), que afirma que a fusão de algumas células epiteliais uterinas é um evento característico da placenta de bovinos, que a classifica como sinepiteliocorial. Foram encontradas células trofoblásticas gigantes com dois ou mais núcleos, e o número de núcleos está relacionado com o número de células envolvidas nesse processo de fusão. De acordo com Carvalho (2004), a formação e a migração das células trofoblásticas binucleadas ocorrem de maneira progressiva na placenta de búfalas. A princípio aparece de forma dispersa no epitélio coriônico sendo raras ou inexistentes no epitélio uterino. A partir de 21º dia ocorre o aumento gradual das células trofoblásticas binucleadas, chegando a representar 20% das células coriônicas, concordando com Bosch (2006), que afirma um maior aumento das células trofoblásticas gigantes binucleadas e trinucleadas no último terço de gestação dos bovinos.

Foi possível confirmar a presença das proteínas caveolinas -1 e -2 nos placentônios de conceptos bovinos, mediante a técnica de imuno-histoquímica demonstrando a importância das mesmas no processo de nutrição fetal por endocitose, inclusive nos epitélios, endotélio e musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Esses dados corroboram com Trinca & Pereira (2013), que também realizaram imuno-histoquímica para caveolinas -1, mas em placenta de búfalas, evidenciando a afirmação de Thomas & Smarth (2008).

Justificando a maior expressão da caveolina -1 em relação à caveolina -2, Deurs et al. (2003), Dávalos et al. (2010), Hansen & Nichols (2010) afirmam que a expressão das caveolinas -1, a principal proteína de revestimento da cavéola, é necessária para a estruturação da cavéola, em células não musculares, já a caveolina -3 faz parte da biogênese da cavéola presente na musculatura cardíaca e esquelética à medida que somente a presença da caveolina -2 não induz a sua formação. Ainda é fundamental a presença da proteína caveolina -1 na cavéola para que a proteína caveolina -2 seja enviada do complexo de Golgi para a mesma, caso contrário a caveolina -2 seria degradada no próprio complexo de Golgi (Okamoto et al. 1998, Razani et al. 2001).

Neste trabalho foi caracterizada a expressão das caveolinas -1 -2 nas placentas de bovinos oriundos de IA e clonados transgênicos. Os dados revelam imunomarcação intensa para as proteínas cav -1 e -2 localizadas no placentônio, visto que essas proteínas são importantes para manter a aparência morfológica da cavéola e estão envolvidos no metabolismo lipídico, crescimento e apoptose celular (Wang et al. 2008), eventos importantíssimos para o ótimo desenvolvimento dos conceptos e saúde materna, e o entendimento desses mecanismos nos auxiliam a entender as razões de tantas perdas gestacionais e anormalidades placentárias, tanto em gestações naturais, como em manipuladas em laboratório. Sendo assim, o estudo das proteínas caveolinas -1 e -2 em conceptos bovinos clonados transgê-

nicos servirá de auxílio para futuros estudos relacionados com desenvolvimento placentário e transporte via placenta em mamíferos.

REFÊRENCIAS

- Anderson R.G. W. 1998. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225.
- Assis Neto A.C., Santos E.C.C., Pereira F.T.V. & Miglino M.A. 2009. Initial development of bovine placentation (*Bos indicus*) from the point of view of the allantois and amnion. *Anat. Histol. Embryol.* 38:341-347.
- Bosch R.V. 2006. Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo. Dissertação de Mestrado em Ciências, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 125p.
- Carvalho I. 2004. Expressão e distribuição da conexina 43 nas células trofoblásticas gigantes bovinas em três fases gestacionais. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 106p.
- Chang W.J., Ying Y.S., Rothberg K.G., Hooper N.M., Turner A.J., Gambliel H.A., De Gunzburg J., Mumby S.M., Gilman A.G. & Anderson R.G. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell Biol.* 126:127-138.
- Dávalos A, Fernández-Hernando C., Sowa G., Derakhshan B., Lin M.I., Lee J.Y., Zhao H., Luo R., Colangelo C. & Sessa W.C. 2010. Quantitative proteomics of caveolin-1-regulated proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 9:2109-2124.
- Deurs B., Roepstorff K., Hommelgaard A.M. & Sandvig K. 2003. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends in Cell Biology* 13:93-100.
- Ford S.P., Reynolds L.P. & Ferrell C.L. 1984. Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. *J. Anim. Sci.* 59:1085-1091.
- Greenstein J.S., Murray R.W. & Foley R.C. 1958. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre - attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat. Rec.* 132:321-341.
- Hansen C.G. & Nichols B.J. 2010. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Cell Press* 20:177-186.
- Hard D.L. & Anderson L.L. 1982. Interaction of maternal blood volume and uterine blood flow with porcine fetal development. *Biol. Reprod.* 27:79-90.
- King G.J., Atkinson B.A. & Robertson H.A. 1979. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *J. Reprod. Fert.* 55:173-180.
- King G.J., Atkinson B.A. & Robertson H.A. 1980. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. *J. Reprod. Fert.* 59:95-100.
- Miglino M.A., Pereira F.T., Visintin J.A., Garcia J.M., Meirelles F.V., Rumpf R., Ambrósio C.E., Papa P.C., Santos T.C., Carvalho A.F., Leiser R. & Carter A.M. 2007. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology* 68:604-617.
- Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E. & Lisanti M.P. 1998. Caveolins, a family of scaffoldin proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273:5419-5422.
- Oliveira C.M., Oliveira A.B., Ramos E.M., Cavalcante T.V. & Maruo V.M. 2010. Caracterização histológica da placenta de zebuínos criados na Amazônia Oriental. *Acta Vet. Bras.* 4:100-104.
- Pelkmans L. & Helenius A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3:311-320.
- Pereira F.T.V. 2000. Desenvolvimento do placentônio em búfalas (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). Dissertação de Mestrado, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 76p.
- Pereira F.T.V., Oliveira L.J., Barreto R.D.S.N., Mess A., Perecin F., Bressan F.F., Mesquita L.G., Miglino M.A., Pimentel J.R., Fantinato Neto P. & Meirelles F.V. 2013. Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. *PLoS One* 8:e64399. DOI:10.1371/journal.pone.0064399.
- Pinto L.M., Ambrósio C.E., Teixeira D.G., Araújo K.P.C., Kfoury Júnior J.R., Morini Junior J.C., Morini A.C., Rici R.E.G., Ferreira G.J.B.C., Martins D.S. & Miglino M.A. 2008. Comportamento das células trofoblásticas gigantes na placenta de vacas Nelore (*Bos indicus* Linnaeus, 1758). *Revta Bras. Reprod. Anim.* 32:110-121.
- Razani B., Engelman J.A., Wang X.B., Schubert W., Zhang X.L., Marks C.B., Macaluso F., Russell R.G., Li M., Pestell R.G., Di Vizio D., Hou Hou Jr, K.B., Lagaud G., Christ G.J., Edelmann W. & Lisanti M.P. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276:38121-38138.
- Razani B., Woodman S.E. & Lisanti M.P. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54:431-67.
- Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R. & Anderson R.G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-682.
- Sharma R.D., Nanda B.S., Saigal R.P., Khatra G.S. & Gupta S.K. 1983. Histo-morphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. *Ind. J. Anim. Sci.* 53:964-967.
- Sowa G. 2012. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Front. Physiol.* 2:1-13.
- Thomas C.M. & Smart E.J. 2008. Caveolae structure and function. *J. Cell Mol. Med.* 12:796-809.
- Trinca V. & Pereira F.T.V. 2013. Localization and characterization by immunohistochemistry of the protein caveolins-1 and -2 in water buffalo placenta (*Bubalus bubalis bubalis* Simpson, 1945). *Anais 50ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campinas, SP.* Disponível em <<http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/>> Acesso em 3 set. 2013.
- Wang C., Mei Y., Li L., Mo D., Li J., Zhang H., Tian X. & Chen Y. 2008. Molecular characterization and expression analysis of caveolin-1 in pig tissues. *Scient. China Ser. C-Life Sci.* 51:655-61.