

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR) EM PLACENTAS BOVINAS DE ANIMAIS CLONADOS, PRODUZIDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*, PELO MÉTODO DE RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

(ANALYSIS OF VEGF GENE EXPRESSION IN PLACENTAS OF CLONED BOVINES, PRODUCED *IN VITRO* AND *IN VIVO*, BY SEMIQUANTITATIVE RT-PCR)

(ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR) EN PLACENTAS BOVINAS DE ANIMALES CLONADOS, PRODUCIDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*, POR EL MÉTODO DE RT-PCR SEMICUANTITATIVO)

L. P. LANDIM JR¹, C. R. FERREIRA¹, F. PERECIN¹, S. C. MÉO NICIURA¹,
W. YAMAZAKI¹, M. A. MIGLINO², J. M. GARCIA³

RESUMO

O sucesso da produção de embriões por fecundação *in vitro* ou transferência nuclear depende de uma variedade de fatores, dos quais a formação de uma incompleta vascularização placentária representa uma das principais causas de perda gestacional precoce. Neste trabalho, avaliou-se a expressão relativa de Fator de Crescimento Endotélio-vascular (VEGF), um potente agente vasculogênico, em placentas de bovinos clonados por transferência nuclear (NT), produzidos por fecundação *in vitro* (FIV), ou por monta natural (MN). Verificou-se um decréscimo altamente significativo de expressão de VEGF nas placentas dos animais produzidos *in vitro*, quando comparados aos animais MN (1,32^a; 0,21^b; 0,31^b, respectivamente para MN, FIV e NT, $p < 0,05$; teste de Duncan), sugerindo haver falha na reprogramação gênica, gerada tanto no sistema de cultivo, quanto na manipulação física de gametas e embriões, alterando o padrão de vascularização placentária e, portanto, ocasionando perdas gestacionais.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino. VEGF. Clone. RT-PCR. Placenta.

SUMMARY

The successful production of embryos by *in vitro* fertilization or nuclear transfer depends on many factors, with incomplete placental vascularization formation representing the main problem in early pregnancy losses. In this study, the relative VEGF gene expression, a high vasculogenic agent, was evaluated in bovine placentas from *in vitro* fertilization (IVF), nuclear transfer (NT), and natural breeding (MN) animals. There was a considerable decreasing of gene expression in placentas from *in vitro* produced animals compared to MN animals (1,32^a; 0,21^b; 0,31^b, respectively to MN, FIV e NT, $p < 0.05$, Duncan's test), suggesting that genetic reprogramming failures are due to culture system, as well as to the manipulation of gamete and embryo manipulation, changing the placental vascularization pattern, and therefore, leading to pregnancy losses.

¹ Doutorando – Medicina Veterinária, Reprodução Animal – FCAV/UNESP - Jaboticabal. Depto. Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Dr. Paulo D. Castellane s/n. Cep. 14884-900 – Jaboticabal - SP. Endereço eletrônico: plandimjr@yahoo.com.br

² Prof. Titular – FMVZ/USP - São Paulo.

³ Prof. Assist. Doutor – FCAV/UNESP – Jaboticabal.

KEY WORDS: Bovine. VEGF. Clone. RT-PCR. Placenta.

RESÚMEN

El éxito en la producción de embriones por fecundación *in vitro* o transferencia nuclear depende de una variedad de factores, siendo la incompleta vascularización placentaria una de las principales causas de falla en el mantenimiento de la preñez. En este trabajo fue evaluada la expresión relativa del Factor de Crecimiento Endotelio-vascular (VEGF), un potente agente vasculogénico, en placentas de bovinos clonados por transferencia nuclear (NT), producidos por fecundación *in vitro* (FIV) o por monta natural (MN). Se verificó una disminución altamente significativa de la expresión de VEGF en las placentas de los animales producidos *in vitro*, al ser comparados con los animales MN (1,32^a; 0,21^b; 0,31^b, respectivamente para MN, FIV y NT, $p < 0,05$; teste de Duncan). Esto que sugiere falla en la reprogramación génica generada tanto en el sistema de cultivo, como en la manipulación física de gametos y embriones, alterando el patrón de vascularización placentaria y, por ende, ocasionando pérdidas gestacionales.

PALABRAS-CLAVE: Bovino. VEGF. Clon. RT-PCR. Placenta.

INTRODUÇÃO

Os estudos na área reprodutiva avançam para a era da clonagem e transgênese. O sucesso dessa evolução na fase de pré-implantação do desenvolvimento é essencial para estabelecimento da gestação (WATSON et al., 2000). A biologia comparativa revela muitas similaridades entre diferentes grupos de mamíferos. Com relação a essas diferenças, o propósito comum da função placentária é facilitar um aumento na quantidade de trocas entre as circulações materna e fetal. Em todos os tipos de placenta existe um aumento do aporte sanguíneo de forma considerável, garantindo uma arquitetura de vasos capazes de promover uma potencialização nas trocas entre os organismos materno e fetal. De acordo com Charnock-Jones et al. (2001), um dos mais potentes estimuladores da angiogênese é o Fator de Crecimento Endotélio Vascular (VEGF).

A troca transplacentária supre a demanda metabólica do crescimento e desenvolvimento fetal, dependendo a taxa de troca primariamente do fluxo sanguíneo uterino (placenta materna) e umbilical (placenta fetal). As taxas de fluxo sanguíneo placentário, por sua vez, são dependentes da taxa de vascularização placentária, e a angiogênese é, portanto, crítica para o desenvolvimento de fetos saudáveis e viáveis (REYNOLDS e REDMER, 2001). De fato, uma reduzida vascularização placentária tem sido associada à mortalidade embrionária precoce (HILL et al., 2000, CHARNOCK-JONES e BURTON, 2000).

Em animais clonados, uma das principais causas de perda gestacional é a deficiência placentária, na qual 82% dos bovinos clonados por transferência nuclear (NT) não sobrevivem entre o trigésimo e nonagésimo dia da gestação. Essa viabilidade ineficiente é atribuída ao desenvolvimento rudimentar da membrana corioalantóide, bem como a problemas associados aos fatores que

promovem o crescimento placentário e vascular, e suas interações materno-fetais, tais como conexões placentárias e formação dos vilos coriônicos. O deficiente desenvolvimento vascular placentário pode ser evidenciado em bovinos por estruturas cotiledonares reduzidas ou ausentes (MIGLINO, 2004). Daniels et al. (2000) atribuem essa baixa eficiência de clonagem animal por transferência nuclear como resultado de uma incompleta reprogramação da célula doadora de núcleo, levando a uma expressão anormal ou reduzida de genes importantes para o desenvolvimento ou ainda, segundo Young e Fairburn (2000) e Jaenisch e Wilmut (2001), devido a expressão irregular de genes marcados (“imprinting”). Adicionalmente, análises por meio de “differential display”, comparando blastocistos PIV, NT ou produzidos *in vivo*, revelaram que a maioria, mas não todos os RNAm dos embriões NT, foi reprogramada (DE SOUZA, 1999).

Miles et al. (2004), avaliando a quantificação de RNAm, a proteína VEGF e do Receptor-gama do Proliferador Ativado de Peroxissoma (PPAR γ) em placentas bovinas de animais produzidos *in vivo* ou *in vitro*, verificaram similaridade na expressão nos cotilédones para essas duas proteínas, porém as carúnculas dos animais PIV tiveram aumento da expressão de PPAR γ . Também foi identificada uma menor área da superfície endometrial, diminuição das vilosidades fetais e células binucleadas com menor volume, somados a um aumento na razão entre o volume de vasos sanguíneos e a área da superfície dos placentônios dos animais PIV, inferindo haver uma série de mecanismos compensatórios no leito vascular desses embriões.

Diante da importância de um desenvolvimento placentário adequado durante a gestação, expressado pelo estabelecimento de uma completa organização vascular, este trabalho tem por objetivo analisar comparativamente a expressão gênica do VEGF em placentas de animais

clonados, dos produzidos por fecundação *in vitro* ou por monta natural, correlacionando-a aos problemas descritos nas placentas de animais clonados.

MATERIAL E MÉTODOS

Placentas de cinco animais, divididas em triplicata, compondo 15 amostras por grupo, oriundos de monta natural (MN), produzidos por fecundação *in vitro* (FIV) ou clonados por transferência nuclear (NT) foram utilizadas para o desenvolvimento da pesquisa. Os placentônios, localizados próximos à linha dorsal do feto, foram retirados com auxílio de pinça e tesoura esterilizados, acondicionados em criotubos, mergulhados diretamente em nitrogênio líquido e armazenados em congelador a -80°C para posterior extração do RNA total.

O RNA total do tecido placentário foi obtido pelo método fenol-clorofórmio, utilizando Trizol⁰ (Invitrogen, USA). Ao final, o RNA total obtido foi ressuscitado em 50mL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), incubado a 55-56°C durante cinco minutos e estocado a -80°C, anterior à síntese de DNA complementar (cDNA) pela técnica de transcrição reversa (RT-PCR).

O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa ImProm II⁰ (Promega, USA) partindo-se de 3g de RNA total e 0,5mg/mL de oligonucleotídeo poli-T (oligo dT primer⁰, Invitrogen, USA). As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C, anterior às reações em cadeia da polimerase (PCR), específicas para cada um dos genes. Os *primers* de cada gene, bem como as temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons) estão representados na Tabela 01.

As reações de PCR para o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram promovidas utilizando-se uma solução de 1mM de tampão Tris-HCl, 0,6mM de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 0,04 U/mL de enzima Taq DNA polymerase⁰ (Invitrogen, USA), 1mL de cDNA template (correspondente a 300 mg/mL) e água

Tabela 1 - Apresentação dos primers senso (F) e anti-senso (R) correspondentes aos genes VEGF e GAPDH, utilizados na reação de PCR, bem como suas temperaturas de anelamento e o tamanho dos produtos de amplificação (amplicons), expressos em número de pares de base (bp).

Gene	Temp. Anel. (°C)	Amplico n (bp)	Primers
GAPDH	56	120	F- 5' - GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA - 3' R- 5' - CCC TCC ACG ATG CCA AAG T - 3' F- 5' - CAA GCC GTC CTG TGT GCC CC - 3'
VEGF	55	610	R- 5' - AAA CTC TCT AAA CTT CGG GG - 3'

q.s.p. 25mL em 33 ciclos de 94°/30seg; 56°/45s; 72°C/45s e um ciclo final de extensão de 72°C. Para o gene VEGF, preconizou-se o uso de uma solução contendo 1mM de tampão Tris-HCl, 0,2mM de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 0,04 U/mL de enzima Taq DNA polymerase⁰ (Invitrogen, USA), 1mL de cDNA template (correspondente a 300 mg/mL) e água q.s.p. 25mL, também executados em 33 ciclos de 94°/30s; 55°/45s; 72°C/45s. e um ciclo final de extensão de 72°C. Ao final das reações, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, tendo a imagem digitalizada pelo programa Stratagene Eagle eye II⁰ (EagleSight v3.21, USA), e, as bandas, quantificadas pelo programa IMAGE GAUGE⁰ (FUJIFILM versão 3.12).

A análise relativa da expressão gênica foi baseada na técnica descrita por HORIKOSHI & SAKAKIBARA (2000), utilizando-se o gene GAPDH como normalizador, ou controle endógeno, uma vez que se apresenta expresso de maneira constitutiva nos diferentes tipos celulares em mamíferos. A partir da densidade óptica (pixel) obtida, estabeleceu-se a relação $R = (\text{densidade} / \text{volume cDNA VEGF}) / (\text{densidade} / \text{volume cDNA gene GAPDH})$, na qual os valores normalizados de cada grupo foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos, testados pelo teste de Duncan ($p < 0,05$; SAS System, v.8).

RESULTADOS

Após a realização da eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, as bandas correspondentes ao produto de amplificação de cada gene foram quantificadas pelo programa analisador de imagem e os valores, correspondentes para cada indivíduo, normalizados pela relação R (VEGF/GAPDH), expressos na Tabela 02.

Os valores de R estabelecidos, referentes à expressão relativa de RNAm, avaliados por análise de variância (ANOVA), bem como as diferenças entre os grupos, testados pelo teste de Duncan ($p < 0,05$), permitiram demonstrar uma diminuição da expressão relativa de VEGF nos grupos FIV e NT, expressados na Tabela 03 e Figura 01.

DISCUSSÃO

O Fator de Crescimento Endotélio Vascular (VEGF) é um regulador fundamental na angiogênese normal e anormal. Recentes evidências indicam que essa proteína é essencial na angiogênese e vasculogênese embrionária, bem como na proliferação cíclica dos vasos sanguíneos do trato reprodutivo de fêmeas (FERRARA, 1999). A

Tabela 2 - Apresentação dos valores individuais das densidades ópticas, captados por programa analisador de imagens, a partir das bandas correspondentes ao produto de amplificação, aplicadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (MN – monta natural, FIV – fecundação *in vitro*, NT – clone por transferência nuclear), bem como os valores de R (VEGF/GAPDH).

Indivíduos	MN			FIV			NT		
	GAPDH	VEGF	R	GAPDH	VEGF	R	GAPDH	VEGF	R
1	2113	4766	2,25	2800	747,6	0,26	4798	2392	0,49
1	1963	3028	1,54	2546	667,6	0,26	4816	2512	0,52
1	2013	5143	2,55	2100	517,3	0,24	4445	2460	0,55
2	2961	3200	1,08	552,5	-	-	1141	136,7	0,11
2	2935	2070	0,70	444,3	-	-	1168	237	0,20
2	3066	2011	0,65	455,3	-	-	1204	215,7	0,17
3	3500	3272	0,93	264,4	-	-	2403	667,5	0,27
3	3391	3918	1,15	439,8	-	-	-	540,3	0,00
3	3885	2691	0,69	506	-	-	-	603,7	0,00
4	2404	1000	0,41	1643	368,6	0,22	1537	709	0,46
4	1926	1095	0,56	1717	396,6	0,23	1695	872	0,51
4	2326	1245	0,53	1690	427,3	0,25	1867	611,3	0,32
5	786	1743	2,21	3310	1635	0,49	1723	757	0,43
5	922	2397	2,59	4451	2154	0,48	2398	524,3	0,21
5	1170	2125	1,81	4700	2986	0,63	1723	568	0,32

Tabela 3 - Expressão gênica relativa do gene VEGF em placentas de animais oriundos de MN, FIV ou NT, analisados por ANOVA e teste de Duncan ($p < 0,05$)

Grupos	N	VEGF	
		média	Desv. Padrão
MN	15	1.3154 ^a	0.78
FIV	15	0.2064 ^b	0.20
NT	15	0.3096 ^b	0.18

(letras iguais em uma mesma coluna não representam diferença significativa, $p < 0,05$)

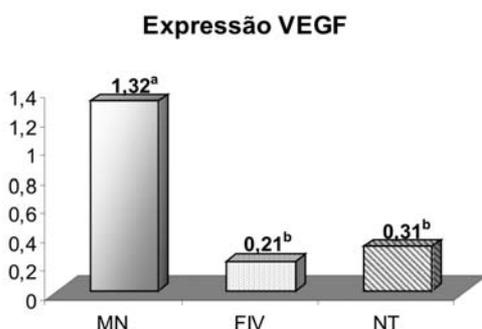


Figura 1 - Representação esquemática dos valores médios de R (relação VEGF/GAPDH) de acordo com a expressão de VEGF (Fator de crescimento endotélio vascular) nos diferentes grupos de placenta em animais MN, FIV e NT ($p < 0,05$).

vasculogênese consiste no processo de diferenciação *in situ* de células mesenquimais em hemangioblastos, precursores das células endoteliais. Por outro lado, angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio preexistente (ONG et al., 2000).

Neste experimento, ao contrário dos dados observados por Miles et al. (2004), a expressão gênica relativa do VEGF apresentou-se significativamente reduzida (até seis vezes menos) nas placentas de animais provenientes de técnicas de produção *in vitro* (FIV e NT), quando comparada aos animais produzidos *in vivo* (MN), sugerindo como uma das prováveis causas ligadas à elevada mortalidade, conseqüente de uma vascularização placentária deficiente.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam maiores taxas de perda embrionária precoce e abortamentos, quando comparados aos produzidos por inseminação artificial ou transferência de embriões, representando os fatores envolvidos no sistema de cultivo, qualidade embrionária e função placentária os principais motivos dessas perdas (FARIN, 2004).

Em animais clonados, essas perdas são atribuídas ao elevado decréscimo na vascularização placentária, à ocorrência de uma incompleta vascularização da membrana córionialantóide, ao decréscimo no número de placentônios e ao aumento no tamanho dos mesmos (LEE et al., 2004), o que de fato, reduz o fluxo sanguíneo placentário, crítico para o desenvolvimento de fetos saudáveis e viáveis (REYNOLDS e REDMER, 2001).

As prováveis causas ligadas às perdas

embrionárias em animais clonados não remetem apenas às condições de cultivo, mas também à exposição a traumas físicos durante a enucleação, reconstrução nuclear e eletrofusão (Mc EVOY, 2003), propiciando um padrão anormal de reprogramação epigenética, verificado pelo aumento dos níveis de metilação (FAIRBURN et al., 2002), observados também em células trofoblásticas, condizentes com os defeitos placentários manifestados durante o desenvolvimento fetal (KANG et al., 2002).

Diante da literatura, podemos inferir pelos dados deste experimento que a expressão reduzida de VEGF nos animais produzidos *in vitro* e conseqüente falhas gestacionais geradas por um padrão anormal de vascularização podem ser atribuídas a alterações da reprogramação gênica, promovida não somente pelas condições físicoquímicas no sistema de cultivo, diferentes do sistema *in vivo*, mas também pela manipulação física de gametas e embriões. Dessa forma, novos estudos em reprogramação gênica e genes *imprinting* tornam-se necessários, envolvendo não somente o VEGF, quanto à vascularização, mas também outros genes ligados ao desenvolvimento placentário.

ARTIGO RECEBIDO: Agosto/2005

APROVADO: Março/2007

REFERÊNCIAS

- CHARNOCK-JONES, D. S., BURTON, G. J. Placental vascular morphogenesis. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.14, n.6, p.953-68, 2000.
- CHARNOCK-JONES, D. S., CLARK, D. E., LICENCE, D., DAY, K., WOODING, F. B. P., SMITH, K. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. **Reproduction**, v.122, p.753-60, 2001.
- DANIELS, R., HALL, V., TROUNSON, A. O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1034-40, 2000.
- De SOUSA, P. A., WINGER, Q., HILL, J. R., JONES, K., WATSON, A. J., WESTHUSIN, M. E. Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. **Cloning**, v.1, p.63-9, 1999.
- FAIRBURN, H. R., YOUNG, L. E., HENDRICH, B. D. Epigenetic reprogramming: how know, cloned cow? **Current Biology**, v.12, p.R68-R70, 2002.
- FARIN, P. W., MILES, J., FARIN, C. E. Pregnancy loss associated with embryo technologies in cattle. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Farinsimple.pdf>> . Acesso em: 21 mar. 2005.
- FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, v.77, n.7, p.527-43, 1999.
- HILL, J. R., BURGHARDT, R. C., JONES, K., LONG, C. R., LOONEY, C. R., SHIN, T., SPENCER, T. E., THOMPSON, J. A., WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1787-1794, 2000.
- HORIKOSHI, T., SAKAKIBARA, M. Quantification of relative mRNA expression in the rat brain using simple RT-PCR and ethidium bromide staining. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 99, p.45-51, 2000.
- JAENISCH, R., WILMUT, I. Developmental biology. Don't clone humans! **Science**, v.291, p.2552, 2001.
- KANG, Y. K., PARK, J. S., KOO, D. B., CHOI, Y. H., KIM, S. U., LEE, K. K., HAN, T. M. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. **EMBO Journal**, v.21, p.1092-1100, 2002.
- LEE, R. S., PETERSON, A. J., DONNISON, M. J., RAVELICH, S., LEDGARD, A.M., L. I. N., OLIVER, J. E., MILLER, A. L., TUCKER, F. C., BREIER, B., WELLS, D. N. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1-11, 2004.
- McEVOY, T. G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.268-75, 2003.
- MIGLINO, M. A. Clonagem animal e placentação. **Ciência e Cultura**, v.56, n.3, p.31-3, 2004.
- MILES, J. R., FARIN, C. E., RODRIGUEZ, K. F., ALEXANDER, J. E., FARIN, P. W. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1919-26, 2004.
- ONG, S., LASH, G., BAKER, P. N. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.14, n.6, p.969-80, 2000.

REYNOLDS, L. P., REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1033-40, 2001.

WATSON, A. J., DE SOUSA, P., CAVENEY, A., BARCROFT, L. C., NATALE, D., URQUHART, J., WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-64, 2000.

YOUNG, L. E., FAIRBURN, H. R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v.53, p.627-48, 2000.