

Carla Letícia dos Santos Bandeira

**EXPRESSÃO DO FATOR CRIPTO-1 NA INTERFACE
MATERNO-PLACENTÁRIA EM CAMUNDONGOS**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Estela Bevilacqua

São Paulo

2009

RESUMO

BANDEIRA, C.L.S. **Expressão do fator Cripto-1 na interface materno-placentária em camundongos**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área: Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A interface materno-embriônica, formada por componentes maternos e fetais, permite a complexa interação entre inúmeros tipos celulares e fatores regulatórios que fundamentam o sucesso da gestação. Células trofoblásticas e decíduais desempenham papéis importantes, embora não sejam as únicas populações celulares relevantes. Neste contexto, este estudo teve como proposta analisar na interface materno-placentária, ao longo da gestação, a expressão gênica e o conteúdo proteico do fator Cripto 1 (Cr1), também denominado de crescimento derivado de teratocarcinoma (Tdgf1), através da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e *Western blotting*. Nossos resultados mostraram que a proteína Cr1 está presente ao longo do desenvolvimento placentário em ambos os compartimentos da interface materno-placentária. Este conteúdo aumentou progressivamente no compartimento fetal com a evolução da gestação, decresceu na decídua após o 13º dia de gestação, mas ainda assim manteve valores altos em relação ao observado na porção fetal da placenta. As avaliações semi-quantitativas de *Cr1* por PCR indicam uma baixa expressão nas fases de pós-implantação e finais da gestação tanto no compartimento materno, quanto no fetal com um aumento significativo nos dias 10,5 ($p < 0,04$ vs. 7,5 dia de gestação) e principalmente no dia 13,5 ($p < 0,00$ vs 7,5 dia de gestação) de gestação. A presença de Cr1 na interface materno-placentária sugere um papel relevante para este fator, possivelmente no desenvolvimento placentário ou ainda nos muitos processos que se desenvolvem neste sítio e que são essenciais para sua manutenção e sucesso gestacional.

Palavras-chave: Cripto-1; Tdgf-1; Trofoblasto; Decídua; Interface materno-placentária; implantação embrionária; Placentação.

ABSTRACT

BANDEIRA, C. L. S. **Expression of Cripto-1 at mice maternal-placental interface.** Thesis (Master in Sciences in Tissue and Cell Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The maternal-placental interface, including maternal and fetal components, allows the complex interaction among different cell populations and regulatory factors being responsible for the success of gestation. Trophoblast and decidual cells play important roles, but they are not the unique relevant cell population. In this context, the current study aimed to analyze the gene expression and protein content of Cripto 1 (Cr1), also called Teratocarcinoma-derived growth factor 1 (Tdgf1), at the maternal-placental interface during gestation, by means of polimerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blotting. Our results showed that the protein Cr1 was present during placental development in both compartments of the maternal-placental interface. The Cr1 content increased gradually in the fetal compartment as the gestation progress and decreased in the decidua after the day 13.5 of gestation, although still in high levels in comparison with the fetal compartment. The semi-quantitative evaluations of *Cr1* by PCR were indicative of low expression at the post-implantation and final gestational periods in both maternal and fetal compartments. On the other hand, it was observed a significant increase at day 10.5 ($p < 0.04$ vs. 7.5 day of gestation) and mainly at 13.5 of gestation ($p < 0.00$ vs 7.5 day of gestation). The presence of Cr1 at the maternal-placental interface suggests a relevant role played by this factor, possibly during placental development or, yet, in the processes developed in this particular site and that are essential for gestational maintenance and success.

Key words: Cripto-1; Tdgf-1; Trophoblast; Decidua; Maternal-placental interface; Embryo implantation; Placentation.

1 INTRODUÇÃO

A implantação embrionária é o processo por meio do qual o embrião sob a forma de blastocisto adquire uma posição estável no endométrio de modo a tornar possível a manutenção de um eficiente sistema de trocas metabólicas e de informações entre os organismos materno e embrionário (AMOROSO, 1955; RED-HORSE, 2004). O blastocisto forma-se poucas horas após o embrião alcançar o útero e é constituído por um aglomerado celular denominado de embrioblasto, uma cavidade, a blastocele, e um epitélio de células achatadas que reveste ambos, o trofoblasto.

Em roedores a implantação do embrião é excêntrica, partindo da cripta uterina antimesometrial e progredindo rapidamente para uma posição intersticial na parede do útero, dada a ação invasiva do trofoblasto e facilitadora do endométrio. A implantação inicia-se ao redor do quinto dia de gestação em camundongos e determina em estágios posteriores uma placentação do tipo hemocorial, em que o trofoblasto após vencer as barreiras representadas pelo epitélio e estroma uterino, se interpõe entre as células endoteliais das vênulas subepiteliais, fazendo contato direto com o sangue materno (MOSSMAN, 1937; SHARKEY e SMITH, 2003; AIN, 2003). Este processo ocorre em toda a superfície de contato do embrião com os tecidos maternos, iniciando-se na região abembrionária em contato com o endométrio antimesometrial e continuando, posteriormente, na região polar do embrião em contato com a região mesometrial uterina.

Durante o processo de implantação embrionária também se inicia a diferenciação do trofoblasto que culmina com a formação de diferentes tipos celulares, com diferentes potenciais funcionais e que juntos, mais tardiamente, vão compor a placenta fetal (MÜNTENER e HSU, 1977; CROSS, 2004; VERCRUYSSSE e PIJNENBORG, 2006).

O trofoblasto é denominado de mural quando presente nas paredes laterais e abembrionárias do embrião e polar quando se justapõe ao conglomerado celular que forma o embrioblasto. Em comum, ambos dão origem a populações de células periféricas gigantes e poliplóides em contato com o organismo materno, envolvidas no processo de implantação embrionária e que, em diferentes fases gestacionais, podem apresentar atividades invasiva e fagocitária (ZYBINA, 1961; TACHI *et al.*, 1970, BEVILACQUA e ABRAHAMSOHN, 1989; ZYBINA e ZYBINA, 1996). Além das células gigantes o trofoblasto polar, também é capaz de originar outras populações celulares que formam a placenta (MÜNTENER e HSU, 1977; CROSS, 2002).

As células trofoblásticas murais exibem um papel iniciador no processo de implantação embrionária, sendo a primeira população celular, por volta do 5º dia de gestação, a tornarem-se gigantes e poliplóides (células trofoblásticas gigantes primárias) e expressar atividades invasiva e fagocítica. Estas atividades atingem um nível máximo entre os dias 7 e 9 da gestação.

Entre o 6º e 7º dias de gestação, as células do trofoblasto polar proliferam intensamente e formam uma excrescência denominada de cone ectoplacentário, a estrutura precursora da placenta. Na periferia deste aglomerado celular, diferenciam-se células trofoblásticas gigantes secundárias com potencial funcional semelhante ao das células gigantes do trofoblasto mural, que por sua vez, contribuem para a implantação embrionária na região mesometrial (MÜNTENER e HSU, 1977). As células mais internas desta estrutura mantêm atividade proliferativa e diferenciam-se em células do espongiotrofoblasto onde se reconhecem células que acumulam glicogênio e células endócrinas produtoras de hormônio placentário lactogênico entre outros. Na base desta estrutura organiza-se o ectoderma extra-embrionário que associado ao mesoderma alantoideano formará a região do labirinto placentário responsável pelas trocas moleculares entre os organismos materno e fetal. A vascularização deste mesoderma estabelece a circulação materno-placentária no camundongo ao redor do 10º dia de gestação caracterizando a formação da placenta que se torna completamente amadurecida cerca de 3 a 4 dias após (14º dia de gestação) (MÜNTENER e HSU, 1977; CROSS, 2000).

O endométrio subluminal em contato com o trofoblasto transforma-se em um tecido de características próprias denominado de decídua, mantendo um micro-ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e fetal no interstício uterino.

A implantação embrionária, desta forma, está associada ao desenvolvimento e diferenciação de células trofoblásticas gigantes com potencial invasivo, capazes de penetrar o epitélio uterino, o estroma endometrial e finalmente os capilares sanguíneos uterinos. Como conseqüência, o sangue materno extravasado passa a banhar a superfície destas células, estabelecendo uma relação de trocas altamente eficiente, cuja complexidade aumenta com a maturação da placenta (BILLINGTON, 1971; PIJNENBORG, 2006).

Além da invasão para o alojamento do embrião no estroma endometrial associado ao processo de implantação embrionária, observa-se ainda uma segunda onda de invasão

trofoblástica a partir do 10º dia de gestação, na decídua mesometrial. Trabalhos recentes na literatura (CROSS *et al.*, 2002; DUNK *et al.*, 2003; GEUSENS *et al.*, 2008) mostram que estas células trofoblásticas poliplóides migram pelo interstício decidual ou pelo leito vascular alcançando os grandes vasos arteriais e alterando sua estrutura. Aparentemente, há uma gradativa substituição das células musculares e endoteliais por trofoblásticas nestas estruturas.

Esta remodelação vascular também é observada em humanos, o que parece garantir o fluxo sanguíneo placentário independente de fatores maternos vasoativos. Dados da literatura, por outro lado, também mostram que o painel de eventos biológicos associados a este processo é em muitos aspectos semelhante à invasividade de células tumorais (TACHI *et al.*, 1970; BISCHOF e CAMPANA, 2000). A relevante diferença, entretanto, é que o processo de invasão trofoblástica é controlado temporal e espacialmente ao longo da gestação, de forma fisiológica. Ainda, em humanos, defeitos neste processo e que levam à exacerbação da invasão destas células no útero ou que o minimizem, estão frequentemente associados a índices significativos de perdas fetais e maternas em patologias como tumores trofoblásticos ou pré-eclâmpsia, respectivamente (APLIN, 1997).

Assim, na busca da compreensão dos mecanismos de regulação da invasão celular, muitos estudos têm utilizado células trofoblásticas como modelo, mostrando a participação de genes e fatores de transcrição específicos que podem estar envolvidos neste processo. São dignas de destaque as expressões gênicas de *NEUROD1*, *NEUROD2* em populações invasivas de células trofoblásticas humanas de placentas de primeiro trimestre da gestação (WESTERMAN *et al.*, 2002) e a expressão aumentada de *PAI-1* em células trofoblásticas de reduzida expressão invasiva em sistemas *in vitro* (XIA *et al.*, 2003). Alteração na expressão de proto-oncogenes tais como *c-fos* e *c-jun* ou diminuição na expressão de HB-EGF ou seus receptores HER-1 e HER-4 tirosino-quinase também têm sido associados a alterações na invasividade do trofoblasto (POPOVICI *et al.*, 2006).

Estudos preliminares realizados no Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, demonstraram por técnicas de microarranjo de cDNA (HOSHIDA *et al.*, 2007) a expressão gênica de *Cripto-1* nas células trofoblásticas de camundongo obtidas aos 7,5 dias de gestação, fase onde estas células apresentam uma intensa atividade invasiva. Por outro lado, a expressão protéica

deste fator de crescimento em tumores de diferentes origens tem sido correlacionada ao grau de invasividade das células cancerosas (SALOMON *et al.*, 1999; 2000; BIANCO *et al.*, 2005; MALLIKARJUNA *et al.*, 2007). Neste contexto, a caracterização da expressão de *Cripto-1* na interface materno-placentária tornou-se uma promissora proposta para a compreensão dos processos invasivos do trofoblasto.

CRIPTO 1 também denominado TDGF 1 (fator de crescimento derivado de teratocarcinoma) foi inicialmente isolado de uma linhagem celular de teratocarcinoma embrionário humano indiferenciado, de características invasivas (DONO *et al.*, 1993) e que tem como produto gênico uma glicoproteína denominada CRIPTO 1 (CR1 ou TDGF).

A proteína Cripto 1 pertence à família do fator de crescimento epidermal (EGF-CFC) que inclui a Criptina (*Human Genome Sciences Inc.*, patente número S 5981215), o Cripto 1 humano (CR1 ou TDGF1) e de camundongo (*Cr1/Tdgfl*), o gene Críptico humano (CFC1) e de camundongo (*Cfc1*), o gene relacionado a formina em leucócitos (*FRL1*) em *Xenopus* e o *one-eyed pinhead (Oep)* do Paulistinha (CICCODICOLA *et al.*, 1989; DONO *et al.*, 1993; KINOSHITA *et al.*, 1995; SHEN *et al.*, 1997 e ZHANG *et al.*, 1998).

Assim como as demais proteínas da família EGF-CFC, o Cripto1 contém vários domínios que incluem um peptídeo N-terminal, um domínio semelhante ao EGF e um domínio rico em cisteína (KENNEY *et al.*, 2004). Além disto, a Cripto1 é uma glicoproteína ancorada a membrana através da ancora GPI (glicosil fosfatidil inositol) ligada à região C-terminal (**FIG. 1**).

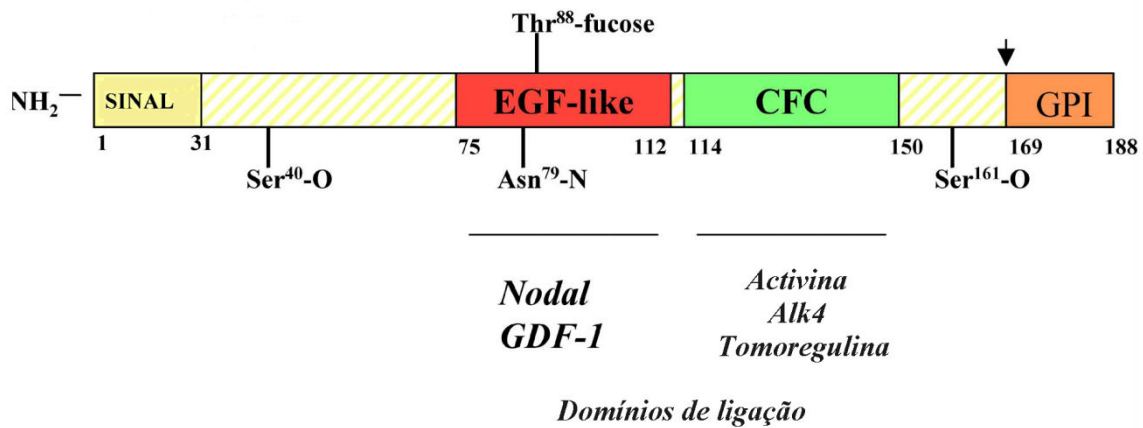


FIGURA 1: Esquema representativo da proteína Cripto-1 com seus domínios de ligação e de glicosilação (Modificada de KENNEY *et al.*, 2004).

O *Cripto 1* murino, que codifica a proteína Cripto 1, da mesma forma que o humano é dividido em seis éxons, com o éxon 4 codificando o domínio EGF-like. Uma comparação entre as seqüências genômicas humanas e de camundongos mostra que os éxons 1 e 3 de camundongos são mais curtos do que os éxons correspondentes humanos (LIGUORI *et al.*, 1996). Em murinos, dois tipos distintos de transcritos de *Cripto 1* foram encontrados, um durante o desenvolvimento embrionário e em células de teratocarcinomas, e outro em fetos e em órgãos do animal adulto (JOHNSON *et al.*, 1994). Dono *et al.* (1991) caracterizaram estes transcritos como pertencentes aos genes *Cripto-1* e *Cripto-3*, enquanto Liguori *et al.* (1996) caracterizaram-nos como pseudo-genes 2 e -3.

No estágio embrionário em murinos, a proteína Cripto 1 foi detectada no dia 6,5 de gestação no epiblasto, na linha primitiva e no cone ectoplacentário (DONO *et al.*, 1993).

No animal adulto, o gene *Cripto 1* foi encontrado em baixos níveis no baço, coração, pulmão, cérebro e em níveis mais significativos nas mamas. Nestas, parece

desempenhar funções específicas na ramificação dos ductos mamários após o nascimento (DONO *et al.*, 1993; ADAMSON *et al.*, 2002).

Apesar da funcionalidade da proteína Cripto 1 não ter sido ainda completamente elucidada, estudos recentes apontam para uma função reguladora do crescimento celular. Sob condições experimentais, células epiteliais mamárias humanas com expressão induzida de CRIPTO 1 formam ramificações similares às observadas *in vivo* e apresentam hiperplasia ductal quando transplantadas para camundongos (SALOMON *et al.*, 1999; WECHSELBERGER *et al.*, 2001).

CRIPTO 1 é expressa em células murinas e humanas derivadas de teratocarcinomas (CICCODICOLA *et al.*, 1989) assim como em células de carcinoma cervical (ERTOY *et al.*, 2000; STRIZZI *et al.*, 2005) e carcinomas colo-retais e suas metástases, mas não em tecidos normais de cólon (CIARDIELLO *et al.*, 1991). Salomon *et al.* (2000) sugere uma possível correlação entre níveis aumentados de expressão desta proteína e o grau de malignidade e predisposição à metástase em cânceres gástricos. A síntese aumentada de CRIPTO 1 também tem sido associada ao crescimento de tumores pancreáticos, ovarianos, endometriais, hepáticos, intestinais, de mama e melanoma uveal (SALOMON *et al.*, 1999, 2000; BIANCO *et al.*, 2005; MALLIKARJUNA *et al.*, 2007).

Segundo Strizzi *et al.* (2004, 2005) proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular podem ser reguladas por CRIPTO 1 atuando como um co-receptor para WNT ou como fator de inibição do complexo de degradação da β -catenina. Atualmente, entretanto, acredita-se que o Cripto 1 aja através de pelo menos 3 vias de ativação: como co-receptor da proteína Nodal e fatores de diferenciação, como ligante de glipican ativando a via de sinalização mediada por MAPK-Akt (**FIG. 2**) e como inibidor da sinalização de TGF- β e activina (BIANCO *et al.*, 2002; GRAY *et al.*, 2006).

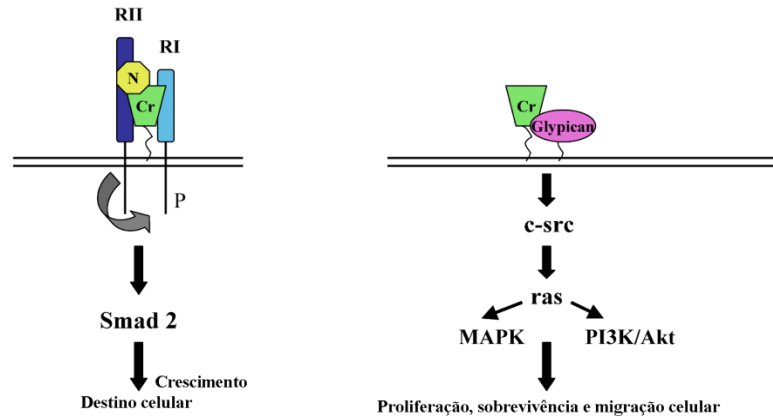


FIGURA 2: Cripto-1 e suas possíveis vias de ativação celular (Modificado de Kenney *et al.*, 2004). Dentre as possíveis vias de ativação mediadas por CRIPTO-1 destaca-se o recrutamento e ativação dos receptores I e II da activina que fosforila o fator de transcrição Smad2 que ativa expressão gênica associada com crescimento celular. Cripto também pode se ligar ao proteoglicano associado a membrana, Glipican para induzir c-Src, através do qual as vias MAPK e AKT são ativadas.

Estudos recentes, em sistemas *in vitro*, também mostram a participação de CRIPTO 1 na morfogênese cardíaca (DONO *et al.*, 1993; XU *et al.*, 1998; DING *et al.*, 1998; ADAMSON *et al.*, 2002) através da via de sinalização Smad-2 (PARISI *et al.*, 2003) e em processos de orientação do eixo antero-posterior do embrião (DING *et al.*, 1998) fundamentando sua importância como uma molécula sinalizadora na gastrulação e na formação de padrões corporais. Embriões homocigotos *Cr I^{-/-}* apresentam alterações na formação e migração do mesoderma, gerando um fenótipo embrionário do tipo “cabeça sem tronco” (DING *et al.*, 1998), o que ocasiona letalidade embrionária.

Cripto 1 pode funcionar tanto como um co-receptor ligado a membrana quanto como um ligante solúvel. Interessantemente, Watanabe *et al.* (2007) demonstraram recentemente que ambas formas – solúvel e ancorada– têm a capacidade de promover a migração endotelial *in vitro*, utilizando um modelo angiogênico a partir de células tumorais (FIG. 3).

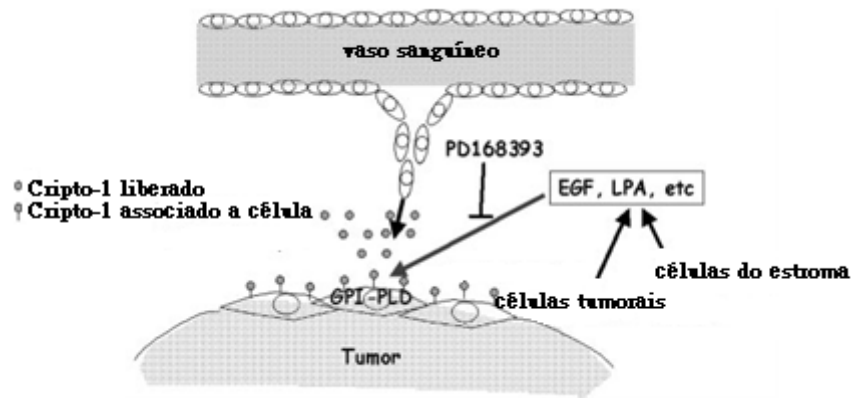


FIGURA 3: Mecanismo da angiogênese tumoral mediada por Cripto-1. A proteína Cripto-1 age sobre as células endoteliais fazendo com que estas percam sua capacidade de adesão. Esquema retirado e modificado de Watanabe *et al.*, 2007.

Apesar destes estudos mostrando que a forma solúvel é secretada no meio condicionado de tumores cultivados (Watanabe *et al.*, 2007), os fatores que regulam a transição da forma ancorada para a solúvel ainda não foram totalmente elucidados, assim como possíveis diferenças funcionais entre estas formas do Cripto 1.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram concluir que:

1. Cripto 1 está presente ao longo do desenvolvimento placentário em ambos os compartimentos da interface materno-placentária.
2. O conteúdo protéico de Cripto 1 aumenta progressivamente no compartimento fetal da placenta com a evolução da gestação.
3. O conteúdo protéico de Cripto 1 decresce na decídua após o 13º dia de gestação, mas ainda assim mantém valores altos em relação ao observado na porção fetal da placenta.
4. Observou-se um aumento na expressão gênica de *Cripto 1* nos dias 10,5 e principalmente no dia 13,5 de gestação tanto no compartimento fetal como no materno da interface materno-placentária.
5. Os valores obtidos nas avaliações semi-quantitativas de *Cripto 1* por RT-PCR indicam uma baixa expressão nas fases iniciais pós-implantação e finais da gestação tanto no compartimento materno, quanto no fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, E.D.; MINCHIOTTI, G.; SALOMON, D.S. Cripto: a tumor growth factor and more. **J. Cell. Physiol.**, v. 190, p. 267-278, 2002a. Review.¹

ADAMSON, S.L.; LU, Y.; WHITELEY, K.J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M.; PFARRER, C.; CROSS J.C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev. Biol.**, v. 250, p. 358-373, 2002b.

AIN, R.; CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Dev. Biol.**, v. 260, p. 179-190, 2003.

AMOROSO, E.C. Endocrinology of pregnancy. **Br. Med. Bull.**, v. 11, p.117-125, 1955.

APLIN, J.D. Adhesion molecules in implantation. **Rev. Reprod.**, v. 2, p. 84-93, 1997.

ASHKAR, A.A.; CROY, B.A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.**, v.61, n. 1, p. 493-502, Aug. 1999.

BIANCO, C.; ADKINS, H.B.; WECHSELBERGER, C.; SENO, M.; NORMANNO, N.; DE LUCA, A.; SUN, Y.; KHAN, N.; KENNEY, N.; EBERT, A.; WILLIAMS, K.P.; SANICOLA, M.; SALOMON, D.S. Cripto-1 activates nodal- and ALK4-dependent and -independent signaling pathways in mammary epithelial. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, n. 8, p. 2586-97, 2002.

BIANCO, C.; STRIZZI, L.; REHMAN, A.; NORMANNO, N.; WECHSELBERGER, C.; SUN, Y.; KHAN, N.; HIROTA, M.; ADKINS, H.; WILLIAMN, K.; MARGOLIS, R.U.; SANICOLA, M.; SALOMON D.S. A Nodal- and ALK4-independent signaling pathway activated by Cripto-1 through Glypican-1 and c-Src. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1192-1107, 2003.

BIANCO, C.; STRIZZI, M.M.; EBERT, A.; CHANG, C.; REHMAN, A.; NORMANNO, N.; GUEDEZ, L.; SALLOUM, R.; GINSBURG, E.; SUN, Y.; KHAN, N.; HIROTA, M.; WALLACE-JONES, B.; WECHSELBERGER, C.; VONDERHAAR, B.K.; TOSATO, G.; STETLER-STEVENSON, W.G.; SANICOLA, M.; SALOMON, D.S. Role of human Cripto-1 in tumor angiogenesis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, p. 132-141, 2005.

BEVILACQUA, E.M.A.F; ABRAHAMSOHN, P.A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Arch. Biol. Med. Exp.**, v. 22, p. 107-18, 1989.

BISCHOF, P.; CAMPANA, A. A putative role for oncogenes in trophoblast invasion? **Hum. Reprod.**, v. 6, p. 51-8, 2000. Review.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CIARDIELLO, F.; KIM, N.; SAEKI, T.; DONO, R.; PERSICO, M.G.; PLOWMAN, G.D.; GARRIGUES, J.; RADKE, S.; TODARO, G.J.; SALOMON, D.S. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 17, p. 7792-6, 1991.

CHAOUAT, G.; MELIANI, A.A.; MARTAL, J.; RAGHUPATHY, R.; ELLIOT, J.; MOSMANN, T.; WEGMANN, T.G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 matting corrected by in vivo injection of IFN-tau. **J. Immunol.**, v. 154, p.4261-4268, 1995.

CHAOUAT, G.; DUBANCHET, S.; LEDEE, N. Cytokinas: important for implantation? **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 24, p. 491-505, 2007.

CHEN H.L.; KAMATH R.; PACE J.L.; RUSSELL S.W.; HUNT JS. Expression of the interferon-gamma receptor gene in mouse placentas is related to stage of gestation and is restricted to specific subpopulations of trophoblast cells. **Placenta**, v.15, n. 2, p. 109-121, 1994.

CICCODICOLA, A.; DONO, R.; OBICI, S.; SIMEONE, A.; ZOLLO, M.; PERSICO, M.G. Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. **EMBO J.**, v. 8, p. 1987-1991, 1989.

CLEGG, K.B.; PIKÓ, L. Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)+ RNA in early mouse embryos. **Dev. Biol.**, v. 95, p. 331-341, 1983.

CROSS, J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 11, p. 105-113, 2000.

CROSS, J.C.; HEMBERGER, M.; LU, Y.; NOZAKI, T.; WHITELEY, K.; MASUTANI, M.; ADAMSON, S.L. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 187, n. 1-2, p. 207-12, 2002.

CROSS, J.C. How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice – A Review. **Placenta**, v. 26, 2005. Suppl. A.

CROY, B.A. Where now for the Th1/Th2 paradigm of the gestational uterus? **J. Reprod. Immunol.**, v. 51, n. 1, p. 1-2, 2001.

DING, J.; YANG, L.; YAN, Y.T.; CHEN, A.; DESAI, N.; WYNshaw-BORIS, A.; SHEN, M.M. Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. **Nature**, v. 395, p. 641-643, 1998.

DONO, R.; MONTUORI, N.; ROCCHI, M.; DE PONTI-ZILLI, L.; CICCODICOLA, A.; PERSICO, M.G. Isolation and characterization of the CRIPTO autosomal gene and its X-linked related sequence. **Am. J. Hum. Gen.**, v. 49, p. 555-565, 1991.

DONO, R.; SCALERA, L.; PACIFICO, F.; ACAMPORA, D.; PERSICO, M.G.; SIMEONE, A. The murine Cripto gene: expression during mesoderm induction and early heart morphogenesis. **Development**, v. 118, p. 1157-1168, 1993.

DUNK, C.; PETKOVIC, L.; BACZYK, D.; ROSSANT, J.; WINTERHAGER, E.; LYE, S. A Novel In Vitro Model of Trophoblast-Mediated Decidual Blood Vessels Remodeling. **Lab. Invest.**, v. 83, p. 1821-1828, 2003.

ERTOY, D.; AYHAN, A.; SARAÇ, E.; KARAAĞAOĞLU, E.; YASUI, W.; TAHARA, E.; AYHAN, A. Clinicopathological implication of cripto expression in early stage invasive cervical carcinomas. **Eur. J. Cancer**, v. 36, n. 8, p. 1002-1007, 2000.

GEUSENS, N.; VERLOHREN, S.; LUYTEN, C.; TAUBE, M.; HERING, L.; VERCRUYSSSE, L.; HANSSSENS, M.; DUDENHAUSEN, J.W.; DECHEND, R.; PIJNENBORG, R. Endovascular Trophoblast Invasion, Spiral Artery Remodelling and Uteroplacental Haemodynamics in a Transgenic Rat Model of Pre-eclampsia. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 614-623, 2008.

GUIMOND, M.; WANG, B.; and CROY, B.A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg α 26 mice. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 217-223, 1998.

GILES, R.H.; van ES, J.H.; CLEVERS, H.; Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1653, p. 1-24, 2003.

GRAY, P.C.; SHANI, G.; AUNG, K.; KELBER, J.; VALE, W. Cripto Binds Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Inhibits TGF- β Signaling. **Mol. Cell Biol.**, v. 26, n. 24, p. 9268-9278, 2006.

HEMBERGER, M.; NOZAKI, T.; MASUTANI, M.; CROSS, J.C. Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. **Dev. Dyn.**, v. 227, p. 185-191, 2003.

HOSHIDA, M.S.; GORJÃO, R.; LIMA, C.; DAHER, S.; CURI, R.; BEVILACQUA, E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. **Placenta**, 2007. In press.

JOHNSON, S.E.; ROTHSTEIN, J.L.; KNOWLES, B.B. Expression of epidermal growth factor family gene members in early mouse development. **Dev. Dyn.**, v. 201, n. 3, p. 216-26, 1994.

KENNEY, N. J.; ADKINS, H. B.; SANICOLA, M. Nodal and Cripto-1: Embryonic Pattern Formation Genes Involved in Mammary Gland Development and Tumorigenesis. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 9, p. 133-144, 2004.

KINOSHITA, N.; MINSHULL, J.; KIRSCHNER, M.W. The identification of two novel ligands of the FGF receptor by a yeast screening method and their activity in Xenopus development. **Cell**, v. 83, n. 4, p. 621-30, 1995.

LIGUORI, G.; TUCCI, M.; MONTUORI, N.; DONO, R.; LAGO, C.T.; PACIFICO, F.; ARMENANTE, F.; PERSICO, M.G. Characterization of the mouse *TdGF1* gene and *TdGF* pseudogenes. **Mamm. Genome**, v. 7, n. 5, p. 344-8, 1996.

MALLIKARJUNA, K.; VAIJAYANTHI, P.; KRISHNAKUMAR, S. Cripto-1 expression in uveal melanoma: an immunohistochemical study. **Exp. Eye Res.**, v. 84, n. 6, p. 1060-1066, 2007.

MORKEL M.; HUELSKEN, J.; WAKAMIYA M.; DING J.; WETERING M. VAN DE; CLEVERS, H.; TAKETO, M.M.; BEHRINGER, R.R.; SHEN, M.M.; WALTER BIRCHMEIER, W. b-Catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. **Developmental**, v. 130, p. 6283-6294, 2003.

MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contr. Embryol.**, v. 26, p. 133-246, 1937.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anat.**, v. 98, p. 241-52, 1977.

PARISI, S.; D'ANDREA, D.; LAGO, C.T.; ADAMSON, E.D.; PERSICO, M.G.; MINCHIOTTI, G. Nodal-dependent Cripto signaling promotes cardiomyogenesis and redirects the neural fate of embryonic stem cells. **J. Cell Biol.**, v. 163, p. 303-314, 2003.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L. Mathias Duval on Placental Development in Mice and Rats. **Placenta**, v. 27, p. 109-118, 2006.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; HANSSSENS, M. Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen. **Hypertens. Pregnancy**, v. 27, n. 2, p. 183-196, 2008. Review.

POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev.**, v. 1, n. 15, p. 1837-1851, 2000.

POLLHEIMER, J.; LOREGGER, T.; SONDEREGGER, S.; SALEH, L.; BAUER, S.;

BILBAN, M.; CZERWENKA, K.; HUSSLEIN, P.; KNÖFLER, M. Activation of the Canonical Wntless/T-Cell Factor Signaling Pathway Promotes Invasive Differentiation of Human Trophoblast. **Am. J. Pathol.**, v. 168, n. 4, p. 1134-1147, 2006.

POPOVICI, R.M.; BETZLER, N.K.; KRAUSE, M.S.; LUO, M.; JAUCKUS, J.; GERMAYER, A.; BLOETHNER, S.; SCHLOTTERER, A.; KUMAR, R.; STROWITZKI, T.; VON WOLFF, M. Gene expression profiling of human endometrial-trophoblast interaction in a coculture model. **Endocrinology**, v. 147, p. 5662-75, 2006.

RAPPOLEE, D.; STURM, K.S.; SCHULTZ, G.A.; PEDERSEN, R.A.; WERB, Z. The expression of growth factor ligands and receptors in the preimplantation mouse embryo. In: HEYNER, S.; WILEY, L. (Ed.). **Early Embryo Development and Paracrine Relationships**. New York: A.R. Liss, 1990. p 11-25.

REDLINE, R.W.; LU, C.Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. **Lab. Invest.**, v.61, n. 1, p. 27-36, 1989.

RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.; MCMASTER, M.; FISHER, S.J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 744-754, 2004.

SALOMON, D.S.; BIANCO, C.; DE SANTIS, M. Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. **Bioessays**, v. 21, n. 1, p. 61-70, 1999. Review.

SALOMON, D.S.; BIANCO, C.; EBERT, A.D.; KHAN, N.I.; DE SANTIS, M.; NORMANNO, N.; WECHSELBERGER, C.; SENO, M.; WILLIAMS, K.; SANICOLA, M.; FOLEY, S.; GULLICK, W.J.; PERSICO, G. The EGF-CFC family: Novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 7, p. 199-226, 2000.

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

SHARKEY, A.M.; SMITH, S.K. The endometrium as a cause of implantation failure. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 17, p. 289-307, 2003.

SHEN, M.M.; WANG, H.; LEDER, P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. **Development**, v. 124, p. 429-442, 1997.

SHIBAMOTO, S.; HAYAKAWA, M.; TAKEUCHI, K.; HORI, T.; OKU, N.; MIYAZAWA, K.; KITAMURA, N.; TAKEICHI, M.; ITO, F. Tyrosine phosphorylation of

beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. **Cell Adhes. Commun.**, v. 1, p. 295-305, 1994.

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

STRIZZI, L.; BIANCO, C.; NORMANNO, N.; SENO, M.; WECHSELBERGER, C.; WALLACE-JONES, B. KHAN, N.I.; HIROTA, M.; SUN, Y.; SANICOLA, M.; SALOMON, D.S. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. **J. Cell Physiol.**, v. 201, p. 266-276, 2004.

STRIZZI, L.; BIANCO, C.; NORMANNO, N.; SALOMON, D. Cripto-1: A multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. **Oncogene**, v. 24, p. 5731-5741, 2005.

TACHI, S.; TACHI, C.; LINDNER, H.R. Ultrastructural features of blastocystic attachment and trophoblast invasion in the rat. **J. Rep. Fert.**, v. 21, p. 37-56, 1970.

TAO, Q.; YOKOTA, C.; PUCK, H.; KOFRON, M.; BIRSOY, B.; YAN, D.; ASASHIMA, M.; WYLIE C.C.; LIN X e HEASMAN J. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell**, v 120, p. 857-71, 2005.

VERCRUYSSSE, L.; CALUWAERTS, S.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Interstitial Trophoblast Invasion in the Decidua and Mesometrial Triangle During the Last Third of Pregnancy in the Rat. **Placenta**, v. 27, p. 22-23, 2006.

XIA, Y.; WEN, H.Y.; YOUNG, M.E.; GUTHRIE, P.H.; TAEGTMEYER, H.; KELLEMS R.E. Mammalian target of rapamycin and protein kinase A signaling mediate the cardiac transcriptional response to glutamine. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 13143-50, 2003.

XU, C.; LIGUORI, G.; ADAMSON, E.D.; PERSICO, M.G. Cardiac differentiation is blocked in embryonic stem cells lacking Cripto-1. **Dev. Biol.**, v. 196, p. 237-247, 1998.

ZHANG, J.; TALBOT, W.S.; SCHIER, A.F. Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. **Cell**, v. 92, p. 241-251, 1998.

WATANABE, K.; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; HAMADA, S.; MANCINO, M.; BAILLY, V.; MO, W.; WEN, D.; MIATKOWSKI, K.; GONZALES, M.; SANICOLA, M.; SENO, M.; SALOMON, D.S. Growth Factor Induction of Cripto-1 Shedding by Glycosylphosphatidylinositol-Phospholipase D and Enhancement of Endothelial Cell Migration. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 31643-31655, 2007.

ZYBINA, E.Y. Endomitosis and polyteny of the trophoblast giant cells. **Dokl. Akad. Nauk.**, v. 140, p. 1177-80, 1961.

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

ZYBINA, T.G.; ZYBINA, E.Y. Genome Multiplication In The Tertiary Giant Trophoblast Cells In The Course Of Their Endovascular And Interstitial Invasion Into The Rat Placenta Decidua Basalis. **Early Pregnancy**, v. 4, n. 2, p. 99-109, 2000.

WECHSELBERGER, C.; EBERT, A.D.; BIANCO, C.; KHAN, N.I.; SUN, Y.; WALLACE-JONES, B., MONTESANO, R.; SALOMON, D.S. Cripto-1 enhances migration and branching morphogenesis of mouse mammary epithelial cells. **Exp. Cell Res.**, v. 15, p. 95-105, 2001.

WESTERMAN, B.A.; POUTSMA, A.; MARUYAMA, K.; SCHRIJNEMAKERS, H.F.; VAN WIJK, I.J.; OUDEJANS, C.B. The proneural genes NEUROD1 and NEUROD2 are expressed during human trophoblast invasion. **Mech. Dev.**, v. 113, p. 85-90, 2002.