

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARCELO DE LUNA FREIRE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E VASCULARES DO
ÚTERO DURANTE A PRENHEZ PRECOCE DE EMBRIÕES DE CLONES BOVINOS
PRODUZIDOS POR SCNT EM TRÊS DIFERENTES APRESENTAÇÕES GESTACIONAIS**

Pirassununga

2017

MARCELO DE LUNA FREIRE OLIVEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E VASCULARES DO
ÚTERO DURANTE A PRENHEZ PRECOCE DE EMBRIÕES DE CLONES BOVINOS
PRODUZIDOS POR SCNT EM TRÊS DIFERENTES APRESENTAÇÕES GESTACIONAIS**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Medicina Veterinária

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Marcelo de Luna Freire

0048e Estudo comparativo das alterações morfológicas e vasculares do útero durante a prenhez precoce de embriões de clones bovinos produzidos por SCNT em tr / Marcelo de Luna Freire Oliveira ; orientador Luciano Andrade Silva. -- Pirassununga, 2017.

81 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Clone por SCNT. 2. Gestações alteradas. 3. Prenhez bovinos. 4. Ultrassonografia Doppler. 5. Vascularização endometrial. I. Silva, Luciano Andrade, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Marcelo de Luna Freire Oliveira

Título: Estudo comparativo das alterações morfológicas e vasculares do útero durante a prenhez precoce de embriões de clones bovinos produzidos por SCNT em três diferentes apresentações gestacionais.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Título:

Estudo comparativo das alterações morfológicas e vasculares do útero durante a prenhez precoce de embriões de clones bovinos produzidos por SCNT em três diferentes apresentações gestacionais

Colaboradores:

Mestrandos: Bárbara Monteiro e Izabelle Balbi Jardim.

Doutorandos: Estela Rose Araújo, Fábio Luís Valério Pinaffi e Tiago De Bem.

Professores: Felipe Perecin e Flávio Meirelles

DEDICATÓRIA

À toda a minha família,
em especial aos meus pais e ao meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, alegria e determinação pela busca de novos conhecimentos e por conviver sempre ao lado da minha querida família, que esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, dando suporte emocional e financeiro. Dedico imensamente esses esforços durante a pós-graduação, principalmente aos meus pais, José Victor de Oliveira e Glauce de Luna Freire Oliveira, ao meu irmão, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira. Não tenho palavras para descrever o sentimento e a ligação afetiva que possuo por todos vocês.

À minha namorada, Izabelle Balbi Jardim, por tê-la conhecido em uma fase muito proveitosa de nossas vidas, em que pudemos sempre unidos compartilhar e suportar vários momentos de decisões difíceis em nossas carreiras, o que nos fez firmarmos cada vez mais os nossos laços de união. A Iza foi essencial durante toda essa jornada, e espero sempre poder contar com o seu carinho e alegria. Amo você!

Ao meu orientador, Professor Dr. Luciano Andrade Silva, pela orientação, ensinamentos, convivência e discussões muito proveitosas sobre trabalhos científicos desde a minha primeira iniciação científica. Obrigado pelas oportunidades oferecidas e alcançadas graças aos seus esforços e confiança em meu trabalho. Pelo exemplo de pessoa, em saber lidar com adversidades na sua forma calma e tranquila sempre as superando facilmente com maestria.

A todos os integrantes do Laboratório de Teriogenologia O. J. Ginther, em especial à Izabelle (mais uma vez), Barbara, Fabio e Estelinha por conviver grandes momentos de frustrações e alegria. Vocês foram essências em cada etapa dessa caminhada e obrigado pela oportunidade de ter trabalhado com pessoas tão competentes. Sucesso é palavra certa no futuro de vocês.

Aos professores responsáveis pelos Laboratórios de Fisiologia e Endocrinologia Molecular – (LFEM) e Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD). Aos professores Dr. Felipe Perecin, Dr. Mario Binelli e ao Dr. Guilherme Pugliesi por sempre serem solícitos em debater e discutir ou tirar algumas dúvidas sobre questões intrigantes do meio científico.

Aos meus amigos de República, pelo convívio sempre muito alegre e prazeroso. Em especial ao grande amigo, Thiago Kan Nishimura, que além de dividir quarto comigo, compartilhou muitos momentos de confiança e amizade.

Aos pós-graduados Tiago Camara de Bem e Juliano Sangalli pela intensa produção de embriões clonados para a realização desse estudo. E ao Everton Lopes, que além de ter sido um grande companheiro foi essencial na ajuda para a realização das análises de western-blotting.

Por fim, obrigado a todos que de alguma forma contribuiu para a realização desse sonho.

RESUMO

OLIVEIRA, M. L. F. **Estudo comparativo das alterações morfológicas e vasculares do útero durante a prenhez precoce de embriões de clones bovinos produzidos por SCNT em três diferentes apresentações gestacionais** [Comparative study of morphological and vascular changes of the uterus during the early pregnancy of bovine embryos clones produced by SCNT in three different gestational phenotypes]. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A clonagem por transferência de núcleo de células somáticas (SCNT) em bovinos é uma biotécnica ineficiente, porém é uma ferramenta muito importante para pesquisas em biologia do desenvolvimento. Estudos prévios em nosso laboratório identificaram três fenótipos gestacionais de clones bovinos produzidos por SCNT: (1) gestação normal (CNG) - presença do embrião (EP), vesícula embrionária (VE) e corpo lúteo ativo (CL); (2) gestação anembrionada (CAG) - presença da VE e CL ativo e ausência de EP; (3) receptoras com CL ativo persistente sem a presença de EP e VE (CPCL). Vacas doadoras de embriões foram sincronizadas pelo protocolo de super-ovulação (SOV) e inseminadas artificialmente, os embriões obtidos após sete dias da ovulação foram transferidos para receptoras que ao ficarem gestantes formaram o grupo controle (GC). O objetivo do estudo foi investigar as características morfovasculares do útero nestes quatro fenótipos gestacionais. A hipótese central foi que as características morfovasculares do útero são moduladas diferentemente nos três fenótipos gestacionais de embriões clonados por SCNT e gestação controle. Vacas Nelores foram sincronizadas e utilizadas como receptoras de embriões. Coletas de sangue para análise de progesterona e exames ultrassonográficos nos modos B e Doppler para análise da morfologia e vascularização uterina foram realizados a cada dois dias a partir do dia 6 até o dia 30 pós-ovulação. Entre os dias 31 e 36, as receptoras foram abatidas e o útero coletado para análises *in situ*. A simetria entre cornos, o grau de desenvolvimento de carúnculas e da VE foram mensurados e amostras endometriais coletadas para quantificação relativa do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor do tipo 2 (VEGF-R2) por western-blotting. No total foram realizadas 212 sincronizações do ciclo estral, das quais 79 receptoras receberam embriões de clones por SCNT e 49 receberam embriões produzidos *in vivo*. Aos 25 dias pós-ovulação as taxas de concepção por grupo foram: CNG = 15,1% (12/79), CAG = 2,5% (2/79), CPCL = 8,8% (7/79) e CG = 24,4% (10/49). Duas receptoras da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) do fenótipo do grupo CAG provindas de outro experimento foram

incluídas nas análises. Algumas receptoras foram excluídas do experimento devido a perdas gestacionais ocorridas antes do momento do abate, restando para as análises sete receptoras no grupo CNG, três no CAG, quatro no CPCL e nove no CG. Somente o grupo CG apresentou diferença de perfusão vascular entre os cornos uterinos ipso e contralateral ($P < 0,05$). Em relação ao corno ipsolateral, os grupos CG e CNG apresentaram maior perfusão vascular em relação ao grupo CPCL do dia 24 ao 30 ($P < 0,05$). Porém, com a média dos escores da perfusão vascular endometrial de ambos os cornos, o grupo CNG apresentou maiores valores em relação aos grupos CAG e CPCL nos dias 24 e 30. Os índices de resistência vascular (RI) nas artérias uterinas confirmaram os dados subjetivos de diferença de perfusão vascular entre cornos, o corno ipsolateral do grupo CG apresentou menor RI em relação ao contralateral nos dias 22, 24, 28 e 30 ($P < 0,05$) e os grupos CNG e CPCL não apresentaram diferença entre cornos ($P > 0,05$). Entre os grupos, o RI no CG e CAG foi menor que no CPCL no dia 30 ($P < 0,05$). A concentração de progesterona (P4) sanguínea foi menor no grupo CPCL em relação aos grupos CG e CNG nos dias 18 e 26 ($P < 0,05$). A P4 atingiu valores próximos de 8 ng/ml a partir do dia 22 nos grupos CG e CNG, sendo que no grupo CPCL os valores foram inferiores à 6 ng/ml a partir do dia 14. As análises *in situ* revelaram maior frequência de assimetria de cornos uterinos no grupo CG em relação aos grupos CNG, CAG e CPCL; o grupo CNG obteve maior frequência de ocorrência de carúnculas e VE desenvolvidas nos dois cornos uterinos em relação aos grupos CAG e CPCL ($P < 0,05$), não diferindo do grupo CG ($P > 0,05$). O comprimento dos embriões do grupo CNG foi maior que dos embriões do grupo CG ($P < 0,05$), entre os dias 28 e 34. Não foi detectada diferença de abundância relativa das proteínas VEGF e VEGF-R2 entre os quatro grupos estudados, porém quando os grupos de gestações normais (CG e CNG) foram comparados com os grupos de gestações alteradas (CAG e CPCL) foi detectada maior abundância relativa para o fragmento de 75 kDa da proteína do VEGF-R2 no grupo de gestações alteradas. A hipótese central do estudo, que afirma que as alterações morfovasculares do útero gestante durante o primeiro mês são moduladas em diferentes graus de forma dependente à qualidade de desenvolvimento do conceito foi confirmada. Por fim, este estudo proporcionou um melhor entendimento da fisiologia endócrina, morfológica e vascular das gestações normais e alteradas de embriões clonados por SCNT durante o primeiro mês gestacional, fornecendo base para novos estudos sobre o desenvolvimento e manutenção da gestação inicial em bovinos.

Palavras-chave: clone por SCNT, gestações alteradas, prenhez, ultrassonografia Doppler, vascularização endometrial.

ABSTRACT

Cloning by nuclear transfer of somatic cells (SCNT) in cattle is an inefficient biotechnique. However, it is a very important tool for research in developmental biology. Previous studies from our lab have identified three gestational phenotypes of bovine clones: (1) Clone normal gestation (CNG) – presence of embryo (EP = embryo proper), embryonic vesicle (EV) and corpus luteum (CL); (2) Clone anembryonic gestation (CAG) - presence of EV and CL and no EP; (3) Recipient presenting only a persistent CL (CPCL). Embryo donor cows were synchronized by superovulation protocol (SOV) and artificially inseminated, embryos obtained after seven days of ovulation were transferred to the control group (CG). This study aimed to investigate whether modulation of the morphological and vascular abnormalities of the uterus by the presence of the cloned conceptus is different between the three gestational clone phenotypes and control. The central hypothesis was that the morphovascular characteristics of the uterus are modulated differently in the three gestational phenotypes of embryos cloned by SCNT and control gestation. Nellore cows were synchronized and used as embryo recipients. Blood collections for progesterone analysis and ultrasound examinations in B and Doppler modes for analysis of uterine morphology and vascularization were performed every two days from day 6 to day 30. Between 31-36 days, the recipients were slaughtered and the uteri were collected for *in situ* analyzes. The symmetry between horns, the degree of caruncle and EV development were measured and endometrial samples were collected for relative quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type 2 (VEGF-R2) by western blotting. A total of 212 estrous cycle synchronizations were performed, 79 recipients cows received clone embryos by SCNT and 49 embryos produced *in vivo*. At 25 days after ovulation the conception rates by group were: CNG = 15.1% (12/79), CAG = 2.5% (2/79), CPCL = 8.8% (7/79), and CG = 24.4% (10/49). Two pregnant cows Tabapuã (*Bos taurus indicus*) of CAG phenotype from another experiment were included in the analyzes. Some recipients were excluded from the experiment due to gestational losses occurring before the time of slaughter, remaining seven recipients in CNG group, three in CAG, four in CPCL and nine in CG. Only the CG group had a difference in vascular perfusion between the ipso and contralateral uterine horns ($P < 0.05$). In relation to the ipsilateral horn, the CG and CNG groups

presented higher vascular perfusion compared to the CPCL group from day 24 to 30 ($P<0.05$). However, with the average of endometrial vascular perfusion scores of both uterine horns, the CNG group presented higher values in compared to the CAG and CPCL groups on days 24 and 30. The vascular resistance index (RI) of the uterine arteries confirmed the subjective data of vascular perfusion between horns. The ipsilateral horn of the CG group presented lower RI in compared to the contralateral on days 22, 24, 28 and 30 ($P<0, 05$) and the CNG and CPCL groups did not show this difference between horns ($P>0.05$). Among groups, the RI in CG and CAG was lower than in the CPCL on day 30 ($P<0.05$). The blood progesterone (P4) concentration was lower in the CPCL group than in the CG and CNG groups on days 18 and 26 ($P<0.05$). P4 reached values close to 8 ng/ml after day 22 in the CG and CNG groups, and in the CPCL group the values were lower than 6 ng/ml after day 14. In situ analyzes revealed a higher frequency of uterine horn asymmetry in the CG group compared to the CNG, CAG and CPCL groups; the CNG group had a higher frequency of caruncles and EV development in the two uterine horns compared to the CAG and CPCL groups ($P<0.05$), not differing from the CG group ($P>0.05$). The length of the embryos of the CNG group was higher than that of the embryos of the CG group ($P<0.05$) between days 28 to 34. No difference was detected in the relative abundance of VEGF and VEGF-R2 proteins among the four groups, but when the normal gestation groups (CG and CNG) were compared with the altered pregnancies groups (CAG and CPCL) a greater relative abundance was detected for the 75 kDa fragment of the VEGF-R2 protein in the group of altered pregnancies. The central hypothesis of the study, which states that the morphovascular changes of the pregnant uterus during the first month are modulated in different degrees depending on the quality of development of the concept was confirmed. Finally, this study provided a better understanding of the endocrine, morphological and vascular physiology of normal and altered embryos of cloning by SCNT during the first gestational month, providing a basis for new studies on the development and maintenance of initial gestation in cattle.

Key words: altered pregnancies, bovine pregnancy, cloning by SCNT, Doppler ultrasonography, endometrium vascularization.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BE – Benzoato de estradiol
- CAG – Gestação de clone anembrionada
- CG – Grupo controle
- CL – Corpo lúteo
- CNG – Gestação de clone normal
- CPCL – Receptora de clone com persistência de CL
- CTG – Células trofoblásticas gigantes
- DAB - Tetrahydrocloro de diaminobenzidina
- DDS - Dodecil sulfato de sódio
- eCG – Gonadotrofina coriônica equina
- EP – *Embryo proper*
- FGF – Fator de crescimento fibroblástico
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GnRH –Hormônio liberador de gonadotrofinas
- HIF-1 - Fator induzido por hipóxia
- IA – Inseminação artificial
- IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
- IFN- τ – Interferon tau
- IM – Intramuscular
- IV – Intravenoso
- NO – Óxido nítrico
- OCT - Optimal cutting temperature compound
- P4 – Progesterona
- PBS – Solução tampão fosfato salino
- PGF_{2 α} – Prostaglandina F2-alfa
- SCNT – Transferência de núcleo de células somáticas
- SFB – Soro fetal bovino
- TE – Transferência de embriões
- TETF - Transferência de embriões em tempo fixo
- VE – Vesícula embrionária
- VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
- VEGF-R2 – Receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial

Lista de Figuras

- Figura 1 –Modelo hipotético gráfico que representa a hipótese central do estudo. 19
- Figura 2 - Protocolo de sincronização de receptoras para transferência de embriões e esquema para coleta de dados (ultrassom, sangue e abate). 21
- Figura 3 - Protocolo hormonal de superovulação das doadoras de embriões. 22
- Figura 4 - Médias \pm EPM da vascularização endometrial e mesometrial avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos nos grupos experimentais deste estudo.. 36
- Figura 5 - Médias \pm EPM da vascularização do corno ipsolateral ao embrião, ou ao CL (grupo CPCL) das regiões endometrial (A) e mesometrial (B) avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos em três grupos experimentais do estudo (CNG, CPCL e CG) 39
- Figura 6 - Médias \pm EPM do valor médio da vascularização endometrial dos cornos ipso e contralateral ao embrião (grupo CG), VE (grupo CAG) ou CL (grupo CPCL) avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos em três grupos experimentais do estudo (CNG, CAG e CPCL). 42
- Figura 7 - Médias \pm EPM da vascularização endometrial avaliada por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 até o dia 20 pós-ovulação, em escores subjetivos no grupo de vacas cíclicas não gestantes (CGNG). 44
- Figura 8 - Médias \pm EPM do índice de resistência vascular (RI) das artérias uterinas avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler-spectral, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, em escores objetivos (0-1), em três grupos experimentais (CG, CNG e CPCL). 46
- Figura 9 - Médias \pm EPM do índice de resistência vascular (RI) das artérias uterinas ipsolateral, ao embrião, ou ao CL (grupo CPCL), avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler-spectral, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, em escores objetivos (0-1) 48
- Figura 10 - Médias \pm EPM da concentração sanguínea de progesterona, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, dos três grupos CNG, CPCL e CG. 50
- Figura 11 - Amostras de útero das receptoras após o abate em análise macroscópica... 54
- Figura 12 - Médias \pm EPM do comprimento, em milímetros, dos embriões dos grupos CNG = Gestações normais de embriões clonados e CG = Gestações normais de embriões produzidos in vivo, avaliados por ultrassonografia durante o intervalo entre os dias 24 e 34 de gestação. 59

Figura 13 - Médias \pm EPM e valores individuais da quantidade relativa de proteína, de 46 kDa, VEGF (A) e, 75 kDa, VEGF-R2 (B) em relação aos níveis de β -actina de amostras do endométrio dos grupos CG = gestações normais de embriões produzidos in vivo, CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT, CAG = gestações anembrionada de embriões clonados por SCNT e CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente..... 61

Figura 14 - Médias \pm EPM da quantidade relativa de proteína VEGF e VEGF-R2 – 75 kDa em relação aos níveis de β -actina de amostras do endométrio. 65

Lista de tabelas

Tabela 1. Resultados de eficiência dos protocolos de TETF e taxas de prenhez por grupo de estudo após a TE de embriões clonados por SCNT ou de embriões produzidos in vivo. 32

Tabela 2. Características macroscópicas do trato reprodutivo dos animais abatidos nos quatro grupos em estudo para os seguintes parâmetros: simetria dos cornos uterinos, desenvolvimento das carúnculas endometriais, características da placenta, momento da primeira detecção da vesícula embrionária e do batimento cardíaco do embrião. 55

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 DESENVOLVIMENTO DA GESTAÇÃO INICIAL EM BOVINOS	4
2.2 VASCULARIZAÇÃO ENDOMETRIAL NO INÍCIO DA GESTAÇÃO.....	8
2.3 PROBLEMAS DE DESENVOLVIMENTO DURANTE A GESTAÇÃO INICIAL DE CLONES BOVINOS POR SCNT	12
3. OBJETIVOS.....	16
4. HIPÓTESES.....	17
5. MODELO HIPOTÉTICO GRÁFICO.....	18
6. MATERIAL E MÉTODOS	20
6.1 PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	20
6.2 ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL E COLETAS DE SANGUE	22
6.3 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS GESTACIONAIS DE EMBRIÕES BOVINOS CLONADOS POR SCNT	23
6.4 COLETA DOS TECIDOS	24
6.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE PROGESTERONA. 25	
6.6 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	26
6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
7. RESULTADOS e DISCUSSÃO	29
7.1 TAXA DA TETF E FREQUÊNCIA DA OCORRÊNCIA DOS FENÓTIPOS GESTACIONAIS	29
7.2 PERFUSÃO VASCULAR UTERINA	35
7.3 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE PROGESTERONA	49
7.4 DESCRIÇÃO DOS ACHADOS <i>IN SITU</i> E DAS ESTRUTURAS DETECTADAS POR ULTRASSONOGRAFIA	53
7.5 ABUNDÂNCIA PROTEICA	60

8.	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	68
9.	CONCLUSÕES.....	71
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

A clonagem em bovinos por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) é uma biotécnica da reprodução com considerável relevância, sendo utilizada comercialmente e em pesquisas. Apesar de todos os benefícios intrínsecos à clonagem na produção de bovinos, como a multiplicação do material genético de interesse zootécnico no rebanho e a possibilidade de replicação genética de indivíduos selecionados em um menor tempo, a técnica demonstra baixos resultados de eficiência, gerando taxas de nascimento de fetos viáveis variando de 6 a 15% (Wells et al., 1999; Merighe, 2007; Chavatte-Palmer et al., 2012). As perdas gestacionais se iniciam logo após a transferência de embriões clonados por SCNT e continuam ao longo de toda a gestação, sendo este um dos fatores que aumentam os custos desta técnica. Esses custos estão também associados à preparação e manutenção das receptoras de embriões antes e após a transferência de embriões (TE), os quais devem ser considerados.

As perdas gestacionais observadas em embriões clones entre o dia da TE e o dia 30 de gestação podem variar de 45% (Heyman et al., 2002), 70% (Merighe, 2007) até 85% (Jardim, 2016). Tem sido demonstrado que o fator que mais influencia a eficiência da clonagem por SCNT em bovinos está relacionado à ineficiente reprogramação gênica da célula doadora de núcleo (Niemann et al., 2008; Chavatte-Palmer et al., 2012; Ferreira & Franco, 2012). Após a fusão nuclear, um novo padrão de metilação gênica embrionária é estabelecido no núcleo somático para a formação de novas células indiferenciadas. Durante a embriogênese, essas células passarão por uma nova onda de metilação iniciando o processo de diferenciação celular do novo indivíduo clonado. Esses processos de alterações epigenéticas são denominados reprogramação nuclear gênica (Bourc'his et al., 2001; Santos et al., 2003; Hiendleder et al., 2004, Niemann et

al., 2008). Dessa maneira, as perdas gestacionais iniciais podem ter sua causa primária nas alterações epigenéticas, que podem imprimir um padrão alterado de expressão gênica, culminando com uma insuficiente sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação. Tem sido também relatado que essa sinalização ineficiente estimula alterações vasculares e da matriz extracelular endometrial de forma diferente quando são comparadas gestações de clones com gestações normais produzidas *in vivo* (Bauersachs et al., 2009).

Vários estudos mostram que os principais problemas encontrados após o diagnóstico gestacional em gestações de embriões clonados por SCNT estão relacionados ao desenvolvimento vascular rudimentar, gerando uma placenta incompetente na função de trocas materno-fetais (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Chavatte-Palmer et al., 2012). As alterações de remodelamento vascular uterino são provocadas pelas necessidades de desenvolvimento do concepto, estando presente desde o estabelecimento e desenvolvimento inicial da prenhez. Portanto, este estudo sugere, levando em consideração o grau das alterações de desenvolvimento do concepto, que as gestações alteradas de embriões clonados por SCNT devem modular em menor intensidade o remodelamento morfovascular uterino quando comparado às gestações de embriões produzidos *in vivo*.

Em relação às possíveis alterações de desenvolvimento inicial observadas no concepto bovino clonado por SCNT, tem sido observado por nosso grupo de pesquisa, a existência de três diferentes fenótipos de gestações precoces classificadas por ultrassonografia em modos B e Doppler, durante o período de 25 a 30 dias pós-ovulação, sendo eles: 1) Gestação normal de clone (CNG): receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT que apresentam em média 25 dias pós-ovulação o lúmen uterino preenchido pela vesícula embrionária (VE), presença do embrião propriamente

dito (*embrião próprio* = EP) com batimento cardíaco e o corpo lúteo ativo (CL) detectado pela ultrassonografia Doppler, 2) Gestação anembrionada de clone (CAG): receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT que apresentam VE e CL ativo, mas não apresentam o EP, e 3) Receptora de clone com corpo lúteo persistente (CPCL): receptoras de embriões clonados por SCNT que apresentam CL ativo e persistente até o dia do abate, mas sem a presença de EP e VE.

Vale ser ressaltado que no mesmo laboratório foram detectadas alterações em gestações de embriões produzidos *in vivo*, com características de gestações anembrionadas, porém em uma menor frequência quando comparada às gestações de embriões clones por SCNT. Este fato evidencia que a utilização da clonagem animal como modelo para estudos de fisiopatologia da gestação é pertinente, pois permite delinear experimentos oferecendo uma maior frequência dessas alterações, não dependendo da variação natural para que ocorram. Além disso, a clonagem por SCNT permite a seleção de linhagens celulares doadoras de núcleos que sabidamente possam favorecer o aparecimento de distúrbios gestacionais previamente caracterizados (Powell et al., 2004).

A partir dessas observações, o presente estudo visou descrever e comparar o remodelamento morfovascular endometrial precoce nos três diferentes fenótipos gestacionais de embriões de clones bovinos por SCNT, comparando-os com gestações de embriões produzidos *in vivo* (controle). O objetivo principal foi determinar, com base na descrição dos fenótipos gestacionais e da evolução das alterações gestacionais, os diferentes graus de modulação das alterações morfovasculares uterinas causadas pelos conceptos estudados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO DA GESTAÇÃO INICIAL EM BOVINOS

O oviduto é o local onde ocorre a fertilização e importantes eventos do desenvolvimento embrionário se iniciam, como o estágio de clivagens, a transição materno-zigótica e a fase das divisões mitóticas dos blastômeros que originam a mórula. Neste estágio, por volta do terceiro ao quarto dia após a fertilização, o embrião bovino migra para o útero (Morris et al., 2001; Bazer et al., 2012). No útero, os blastômeros da mórula continuam sua constante divisão mitótica, atingindo a etapa de compactação. Dentre os muitos eventos que já ocorreram, a compactação é uma etapa delicada durante o processo de desenvolvimento embrionário, pois as células dão início ao processo de diferenciação celular, desempenhando um papel fundamental na formação de blastocistos viáveis (Morris et al., 2001).

O estágio de blastocisto é caracterizado pelo aparecimento da blastocèle, uma cavidade preenchida por líquido no centro do embrião, que é cercada por uma camada celular simples, o trofoectoderma. Essas células futuramente se diferenciarão e serão responsáveis pela formação das membranas placentárias (Shea, 1981; Schlafer et al., 2000). Nessa fase de blastulação, por volta do dia 7 de desenvolvimento, algumas células se agrupam em um dos polos do embrião, dando origem à massa celular interna. Esse agrupamento celular formará todos os tecidos do futuro feto (Shea, 1981). O blastocisto em constante desenvolvimento e expansão rompe sua zona pelúcida. Essa nova estrutura rompida é denominada de blastocisto eclodido e é observada normalmente por volta do oitavo ao nono dia de desenvolvimento (Bazer et al., 2012). Ao final da fase de blastulação, a massa celular interna dá origem a duas camadas celulares, o hipoblasto e o epiblasto, formando o disco embrionário bilaminar, por volta

do 12º dia de desenvolvimento (Schlafer et al., 2000). A próxima etapa do desenvolvimento embrionário compreende a formação dos folhetos germinativos, que é denominada de gastrulação, nessa fase ocorre a diferenciação das células e de toda a estruturação e formação dos sistemas (Schlafer et al., 2000).

Todas essas fases do desenvolvimento embrionário inicial são acompanhadas de uma adequada adaptação do ambiente uterino. Os hormônios esteroides, estrogênios e progestágenos, são moléculas responsáveis por proporcionar esse ambiente uterino propício para a manutenção do embrião, acompanhando as suas necessidades de desenvolvimento (Xiao e Goff, 1998; Marques et al., 2013). Durante o estro, os folículos dominantes produzem estradiol em grande quantidade, favorecendo a proliferação de glândulas endometriais e vasos sanguíneos no útero, aumentando a permeabilidade vascular e gerando o extravasamento de fluido extracelular (edema uterino). Após esse período de estro, de intensa proliferação celular e glandular, o corpo lúteo gerado após a ovulação começa a produzir progesterona no metaestro que aumenta e estabiliza sua concentração durante o diestro. Nesta fase, as glândulas endometriais atingem a sua máxima atividade secretória. Essa secreção denominada histotrofo é responsável por nutrir e manter o desenvolvimento do embrião antes da placentação (Forde & Lonergan, 2012; Mesquita et al., 2014).

O processo de adaptação do ambiente uterino favorecendo o desenvolvimento embrionário é dinâmico e ocorre em uma sintonia fina de comunicação entre ambos, o embrião e o útero. O embrião durante essa fase sofre grandes modificações em sua estrutura (Schlafer et al., 2000; Bazer et al., 2012). Após a eclosão do blastocisto o embrião bovino se torna ovoide (Schlafer et al., 2000). Então, o embrião se alonga por todo o lúmen uterino, tornando-se tubular e depois filamentosos (Bazer et al., 2012). Nessa fase, o embrião apresenta um crescimento exponencial até o 16º dia pós-

fertilização (Morris et al., 2001). Estudos indicam que por volta dos dias 17 ao 20 o embrião preenche todo o corno ipsilateral ao corpo lúteo, e entre os dias 20 e 24 se estende por todo o comprimento do corno contralateral (King et al., 1981, Bazer et al., 2012).

Durante todo esse período de rápido crescimento e preenchimento do lúmen uterino, células trofoblásticas do embrião liberam o fator antiluteolítico interferon-Tau (IFN- τ). Essa citocina pode ser detectada entre os dias 12 e 38 atingindo os níveis mais elevados de secreção entre dias 16 a 19 (Thatcher et al., 1995; Spencer et al., 1996; Bazer et al., 1998). A ação antiluteolítica do IFN- τ ocorre de forma parácrina nas células do epitélio endometrial, atenuando a transcrição de receptores de estrógeno e ocitocina no epitélio luminal e glandular do endométrio. Conseqüentemente, os picos de liberação da prostaglandina (PGF 2α) pelo endométrio são inibidos, evento este determinante no processo de bloqueio da luteólise (Bazer et al., 1998; Spencer et al., 2004; Bazer et al., 2010).

Esse bloqueio da luteólise é importante para a manutenção da produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo. Vários estudos associam a produção de P4 com um adequado fornecimento de histotrofo para um bom desenvolvimento embrionário (Garrett et al., 1988; Mann & Lamming, 2001; Lonergan et al., 2007; Clemente et al., 2009). O fornecimento adequado de histotrofo, como consequência, fornecerá maior quantidade de nutrientes para permitir um maior alongamento embrionário. Tal fato é importante durante a fase crítica de reconhecimento materno, pois um concepto melhor desenvolvido produzirá mais IFN- τ e de forma mais difusa pelo lúmen uterino do corno ipsilateral ao CL, efetivamente bloqueando a luteólise e garantindo a manutenção da produção de P4 (Kerbler et al., 2006; Morris e Diskin, 2008; Lonergan et al., 2013). Todo esse mecanismo de comunicação concepto-materna é orquestrado adequadamente

no tempo, ou seja, o sucesso de cada etapa sempre depende de uma perfeita passagem pela etapa anterior. Após o reconhecimento materno da gestação, de modo a equilibrar o aumento das necessidades nutricionais do conceito, o processo de desenvolvimento placentário se inicia, para que trocas gasosas mais eficientes ocorram entre o conceito e a mãe (Lee & DeMayo, 2004; Assis Neto et al., 2009).

O período de implantação embrionária nos bovinos começa por volta do dia 18 e 19, e é esse acontecimento que marca o início da placentação (King et al., 1981; Bauersachs & Wolf, 2012). Em ruminantes, esse momento pode ser destacado em três fases: 1) pré-contato e orientação do blastocisto, 2) aposição, e 3) adesão (Guillomot, 1995; Bazer et al., 2012). Durante a primeira fase, o embrião se alonga por todo o lúmen uterino e as células do trofoblasto iniciam sua orientação para um contato mais íntimo com as carúnculas do endométrio (Bazer et al., 2012). Segundo King et al. (1981), até o dia 17 nenhuma mudança no epitélio colunar pseudoestratificado foi verificado em amostras de tecido endometrial ipsolateral ao corpo lúteo de vacas gestantes. Logo após a orientação das células extraembrionárias, uma tênue aposição e instável adesão é verificada entre essas células do trofoectoderma e o epitélio do lúmen uterino, diminuindo a espessura do epitélio materno (Bazer et al., 2012) e favorecendo um contato mais íntimo entre as interfaces materno-fetal por volta dos dias 18 ao 20 (King et al., 1981). Durante a fase de adesão ocorre uma firme aderência entre as células do trofoectoderma e o epitélio luminal, através da formação de uma rede complexa de microvilos, que se expande conforme o desenvolvimento do trofoblasto (King et al., 1981). Células específicas binucleadas do trofoectoderma, conhecidas como células trofoblásticas gigantes (CTGs) migram do trofoectoderma para o epitélio luminal e se fundem com células epiteliais endometriais, formando células multinucleadas. Esse evento é muito importante na formação de um contato íntimo entre o trofoblasto e o

endométrio para o desenvolvimento de uma placenta funcional (King et al., 1980; Wooding, 1992; Bazer et al., 2012).

A placentação em ruminantes é considerada sinepteliocorial, com implantação central difusa e cotiledonária com aposição e adesão do córion com células do epitélio uterino e sem erosão permanente do tecido uterino (Leiser & Kaufmann, 1994; Bazer et al., 2012). Um dos processos mais importantes durante a placentação é a expansão do alantoide, que externamente é revestido pelo mesoderma esplâncnico, que se junta ao córion, originando o alantocóron que será vascularizado mais tardiamente (Schlafer et al., 2000; Bazer et al., 2012). Durante a quarta semana de gestação o corioalantoide se adere ao útero em áreas especializadas do endométrio, denominadas carúnculas, formando os placentônios, sendo maiores e mais vascularizados próximo ao embrião (Schlafer et al., 2000). Deste modo, durante todo o processo de desenvolvimento e estabelecimento da gestação existem importantes etapas de desenvolvimento extremamente sincronizadas. Tanto o concepto quanto o útero devem estar morfológicamente preparados em cada uma delas, conforme descritos nos parágrafos anteriores, e esse preparo é dependente de uma perfeita comunicação entre ambos, o concepto e o útero.

2.2 VASCULARIZAÇÃO ENDOMETRIAL NO INÍCIO DA GESTAÇÃO

Para um desenvolvimento embrionário e fetal saudável é necessário que ocorra uma adaptação da vascularização uterina ao longo da gestação (Reynolds et al., 2006; Torry et al., 2007). Essa vascularização tende a aumentar acompanhando o crescimento das exigências do concepto através de dois processos: vasculogênese e angiogênese

(Zygmunt et al., 2003). A vasculogênese é o processo de formação vascular, ou seja, que origina os vasos, e ocorre principalmente durante o início da placentação. Após o estabelecimento dos primeiros vasos sanguíneos, ocorre a proliferação de novas ramificações a partir desses vasos primários, processo esse denominado de angiogênese.

O processo de desenvolvimento vascular no embrião e em seus anexos pode ser dividido em três períodos: 1) antes da implantação, 2) implantação e 3) placentação (Reynolds et al., 2006; Torry et al., 2007). Antes da implantação, o processo de vasculogênese é iniciado pelas células progenitoras endoteliais (angioblastos), as quais são originadas do mesoderma, e se diferenciam logo após a gastrulação, formando uma rede vascular primitiva (Breier, 1999). Enquanto um sistema vascular embrionário é desenvolvido, antecipadamente ao aumento da demanda de oxigênio e nutrientes (Breier, 1999), a angiogênese uterina também é estimulada, por fatores de crescimento angiogênicos, e estabelecida para se adequar às maiores necessidades de uma rica vascularização no momento da implantação (Torry et al., 2007). Após a implantação, durante a placentação ocorre o desenvolvimento e expansão da vascularização dos vilos placentários e um remodelamento vascular uterino, facilitando o transporte de nutrientes e oxigênio para acompanhar e acomodar o rápido crescimento das demandas do desenvolvimento do concepto (Reynolds et al., 2006; Torry et al., 2007).

O mecanismo de vasculogênese e angiogênese é regulado por fatores estimulatórios ou inibitórios. Inúmeras moléculas que atuam na regulação do crescimento vascular durante a gestação, formação de tumores, ou qualquer outro processo que envolva a formação de novos vasos sanguíneos têm sido detalhadamente descritas (Yancopoulos et al., 2000; Charnock-Jones et al., 2004; Reynolds et al., 2010). Os principais fatores de crescimento que modulam o processo de angiogênese são: 1) membros da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), 2) alguns dos

fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), 3) angiopoietinas (ANG), dentre outros (Zygmunt et al., 2003; Charnock-Jones et al., 2004; Reynolds et al., 2005; Johnson et al., 2006). Esses fatores de crescimento alteram a permeabilidade vascular e modificam a matriz extracelular através da ação de proteases específicas, causando proliferação das células endoteliais (Zygmunt et al., 2003). Em Yancopoulos et al. (2000) pode ser encontrado a complexa e detalhada descrição sobre a atuação dos fatores de crescimento durante as fases de remodelamento, estabilização e maturação do endotélio vascular, fases estas que compõem os processos de vasculogênese e de angiogênese.

A produção de VEGF, que é considerado o principal agente indutor dos processos de vasculogênese e angiogênese, é regulada por vários fatores, dentre eles podemos destacar o fator induzido por hipóxia (HIF-1) (Zygmunt et al., 2003; Charnock-Jones et al., 2004). Em condições de alto metabolismo pelo crescimento celular, o elevado consumo leva à condições teciduais de baixa tensão de oxigênio, sendo o HIF-1 então produzido e estabilizado, estimulando assim a transcrição e produção de VEGF e de seus receptores (Charnock-Jones et al., 2003). O VEGF possui dois receptores principais, o VEGF-R1 e VEGF-R2, sendo ambos expressos nas células endoteliais. Enquanto o VEGF-R2 é responsável pelo estímulo do crescimento e permeabilidade vascular, o VEGF-R1 atua como um modulador negativo da ação do VEGF, capturando-o da circulação sanguínea e não permitindo a sua atuação efetiva nos receptores de membrana. O domínio intracelular não está presente na estrutura deste receptor (Zygmunt et al., 2003).

Os representantes da família do FGF atuam semelhantemente ao VEGF, possuindo ação mitogênica e modulando funções das células endoteliais que favorecem a estruturação endotelial durante a angiogênese (Klagsbrun e Amore, 1991). Em um estudo com gestação de ovelhas, Borowicz et al. (2007) constataram que a expressão de

FGF2 apresentou aumento mais expressivo em tecido cotiledonário comparado à amostras de tecido caruncular, indicando o FGF como um dos principais agentes angiogênicos de origem fetal.

As angiopoietinas, quando ligadas aos seus receptores de tirosina quinase do tipo 1 (ANG-1) presentes no endotélio vascular, possuem a ação principal de estabilização e maturação dos novos vasos sanguíneos (Yancopoulos et al., 2000). Estudos em embriões de camundongos knockout para o receptor ANG-1 apresentaram desenvolvimento vascular primitivo aparentemente normal, porém a maturação vascular foi incompleta levando à mortalidade embrionária, essa observação demonstra que esse fator de crescimento possui um papel importante na interação entre o endotélio e a matriz de remodelamento (Suri et al., 1996).

No processo de desenvolvimento vascular, além dos fatores angiogênicos existem também fatores vasoativos e, dentre eles, podemos destacar o óxido nítrico (NO). O NO desempenha um papel de mensageiro intercelular em vários tecidos do organismo, modulando principalmente o tônus da musculatura lisa em vasos sanguíneos, que por sua vez regula o fluxo sanguíneo local (Condorelli & George, 2001). A produção basal de NO está associada com a diminuição da resistência vascular fetoplacentária durante a gestação (Sladek et al., 1997; Reynolds et al., 2010). Além do mais, o NO e o VEGF podem interagir entre si, ou seja, um fator pode aumentar a expressão do outro, gerando situações em que ocorrem vasculogênese acompanhado de vasodilatação (Ahmed & Perkins, 2000; Reynolds & Redmer, 2001; Reynolds et al., 2010).

Os hormônios estrogênicos também possuem um papel chave no processo de angiogênese. Vários estudos têm demonstrado a importância do estradiol e seus

receptores na formação de vasos sanguíneos (Muller et al., 2000; Losordo & Isner, 2001; Johnson et al., 2006). A angiogênese regulada por hormônios é evidente no trato reprodutivo. Em condições normais, no organismo adulto o evento da angiogênese é um processo raro, no entanto, no trato reprodutivo feminino, a atuação direta e constante de variações hormonais ao longo do ciclo estral modulam ciclicamente a reorganização vascular (Losordo e Isner, 2001). Muller et al. (2000) demonstraram que a ação do estrógeno pode induzir diretamente a transcrição do gene VEGF em células endoteliais. Em outro estudo, ovelhas ovariectomizadas apresentaram aumento da expressão de sete fatores angiogênicos, e seus respectivos receptores em poucas horas após o tratamento com 17 β -estradiol, indicando relação direta do estrógeno no estímulo da expressão de fatores angiogênicos (Johnson et al., 2006).

Por fim, sugere-se que a evolução da vascularização do complexo uteroplacentário é dependente e acompanha o desenvolvimento do concepto de modo a atender suas exigências nutricionais e metabólicas. A reorganização vascular pelo processo angiogênicos é um evento dinâmico modulado por vários fatores que atuam como mensageiros intercelulares, a fim de adaptar temporalmente o ambiente uteroplacentário para um adequado desenvolvimento do embrião/feto.

2.3 PROBLEMAS DE DESENVOLVIMENTO DURANTE A GESTAÇÃO INICIAL DE CLONES BOVINOS POR SCNT

Os embriões clonados pela técnica de SCNT, desde o momento da fusão nuclear até a completa formação da placenta, enfrentam vários desafios de desenvolvimento. Alguns autores dividem a gestação inicial em três períodos críticos de desenvolvimento,

sendo: 1) antes da transferência de embrião, 2) peri-implantação, e 3) placentação (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Wells et al., 2004; Merighe, 2007; Chavatte-Palmer et al., 2012).

A produção *in vitro* de embriões bovinos clonados por SCNT apresenta grande ineficiência já no processo da clonagem, no laboratório (Wells et al., 2004). Dos oócitos que são enucleados, somente em 55% ocorrerá a fusão nuclear e apenas 8% desses se desenvolverão até o estágio de blastocisto (Merighe, 2007). O fator que mais influencia o sucesso da clonagem por SCNT é o momento em que a expressão gênica das células adultas é bloqueada, e um novo padrão de metilação gênica embrionária é estabelecido para a formação de novas células indiferenciadas durante a embriogênese, momento onde ocorrem as alterações epigenéticas da reprogramação gênica (Bourc'his et al., 2001; Santos et al., 2003; Hiendleder et al., 2004). Bourc'his et al. (2001) afirmaram que distúrbios na dinâmica de metilação, durante o estágio em que o genoma embrionário é gradualmente preparado para a ativação, pode ser um dos fatores que contribuem para o elevado aparecimento de anormalidades que comprometem o desenvolvimento da gestação e do indivíduo após o nascimento.

Como esses erros de reprogramação gênica ocorrem no desenvolvimento inicial do blastocisto, as maiores perdas acontecem neste período e, além disso, o sucesso das próximas etapas da gestação também fica comprometido. Deste modo, falhas subsequentes, após a transferência destes embriões clonados por SCNT para receptoras, são esperadas durante o desenvolvimento gestacional. Mudanças nos padrões de transcrição uterina provocada pela comunicação concepto-materna durante o período de pré-implantação foi verificado através de vários estudos em gestações de embriões não clonados (Bauersachs et al., 2006; Klein, 2006; Spencer et al., 2008). Em relação às gestações de clone, Bauersachs et al. (2009) identificaram diferença entre o perfil de

transcrição endometrial de gestações desses embriões comparada às gestações de embriões produzidos por fertilização *in vitro* (FIV). Essa resposta endometrial alterada reflete uma comunicação concepto-materna anormal, sugerindo ser uma das consequências para as falhas de desenvolvimento observadas durante o processo de placentação nestas gestações de clones.

Em relação ao processo de migração das CTGs, amostras de tecido cotiledonário de gestações de clones podem apresentar menor quantidade de CTGs quando comparado a gestações de embriões naturalmente produzidos. Este fato explica, pelo menos em parte, as elevadas perdas gestacionais iniciais ou pobre implantação observadas em gestações de clone (Arnold et al., 2008). Além das alterações na comunicação concepto-materna e de implantação, também existem associações de abortamento precoce provocada por resposta imune alterada. Sugere-se que a resposta imune alterada é desencadeada por uma desregulação temporal da expressão de antígenos pelas células trofoblásticas de gestações de clones (Davies et al., 2004).

Todos esses mecanismos alterados durante a fase inicial da gestação, agindo separadamente ou em conjunto, podem gerar falhas diretas ou indiretas no desenvolvimento placentário e/ou fetal. Tem sido demonstrado que até o dia 30, a taxa de gestação cai para 30% de todos os blastocistos clones transferidos para receptoras de embriões (Merighe, 2007).

Após o período de implantação, a placenta malformada, apresentando número reduzido de placentônios, poucos vilos coriônicos, carúnculas subdesenvolvidas e pobre vascularização do saco alantoideano são observações comuns em gestações de clones bovinos por SCNT (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Chavatte-Palmer et al., 2012). Essas alterações resultam em insuficiência de trocas materno-fetal, sendo a

provável causa da maioria dos abortamentos no primeiro trimestre da gestação (Chavatte-Palmer et al., 2012), com taxas de perdas gestacionais de 40% entre os dias 30 e 60 de gestação (Merighe, 2007).

De acordo com a literatura é possível verificar que existem muitas falhas placentárias e de vascularização apresentadas já no primeiro trimestre da gestação de embriões clonados bovinos clonados por SCNT. Portanto, o uso desta técnica de clonagem oferece um excelente modelo experimental para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das anormalidades morfovasculares durante gestações precoces. Somado a isso, existe a possibilidade do uso dessas gestações como modelo de estudo para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos que poderão reverter determinadas condições desfavoráveis às trocas materno-fetais durante a gestação.

3. OBJETIVOS

Estudar as alterações morfológicas e vasculares endometriais e a concentração de P4 sanguínea antes da TE até os 30 - 35 dias de gestação nos três fenótipos gestacionais encontrados após transferência de embriões clonados por SCNT e em gestações de embriões produzidos *in vivo*.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- I. Descrever as alterações morfológicas do grau de desenvolvimento dos conceptos (nos grupos que apresentam embrião) e vasculares do endométrio durante a fase inicial da gestação de clones bovinos, avaliadas por ultrassonografia em modo-B e color-Doppler, respectivamente;
- II. Descrever as variações de desenvolvimento gestacional, assimetria de cornos, grau de desenvolvimento das carúnculas e vesícula embrionária, avaliadas *in situ* macroscopicamente após o abate.
- III. Avaliar as variações das concentrações de progesterona sanguínea entre os quatro grupos experimentais;
- IV. Quantificar relativamente o fator angiogênico, VEGF e seu receptor do tipo 2 (VEGF-R2) no endométrio no dia 35 de gestação utilizando a técnicas de western blotting;

4. HIPÓTESES

A hipótese central é que as alterações morfovasculares do útero gestante durante o primeiro mês são moduladas em diferentes graus de forma dependente à qualidade de desenvolvimento do concepto presente.

Hipóteses específicas:

- I. O desenvolvimento do concepto inicial é semelhante nos grupos CG e CNG e mais adiantado que nos grupos CAG e CPCL.
- II. Os grupos CG e CNG apresentam maior grau de vascularização endometrial e mesometrial, comparados com os grupos CAG e CPCL.
- III. Os grupos CG e CNG apresentam maior concentração de progesterona no sangue, resultando em um maior desenvolvimento das carúnculas e vesícula embrionária, quando comparados aos grupos CAG e CPCL.
- IV. As expressões do fator angiogênico (VEGF) e de seu receptor (VEGF-R2) estão presentes em maior quantidade nos grupos CG e CNG quando comparados aos grupos CAG e CPCL.

CNG = Gestação normal de clone. Receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT que apresentam o embrião propriamente dito (EP), a vesícula embrionária (VE) e o corpo lúteo ativo (CL);

CAG = Gestação anembrionada de clone. Receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT que apresentam VE e CL, mas não apresentam o EP;

CPCL = Corpo Lúteo persistente. Receptoras de embriões bovinos clonados por SCNT que apresentam CL persistente até os 35 dias, mas sem sinal de EP e VE;

CG = Gestações controle (CG). Receptoras gestantes após transferência de de embriões produzidos in vivo apresentando o embrião propriamente dito (EP), a vesícula embrionária (VE) e o corpo lúteo ativo (CL).

5. MODELO HIPOTÉTICO GRÁFICO

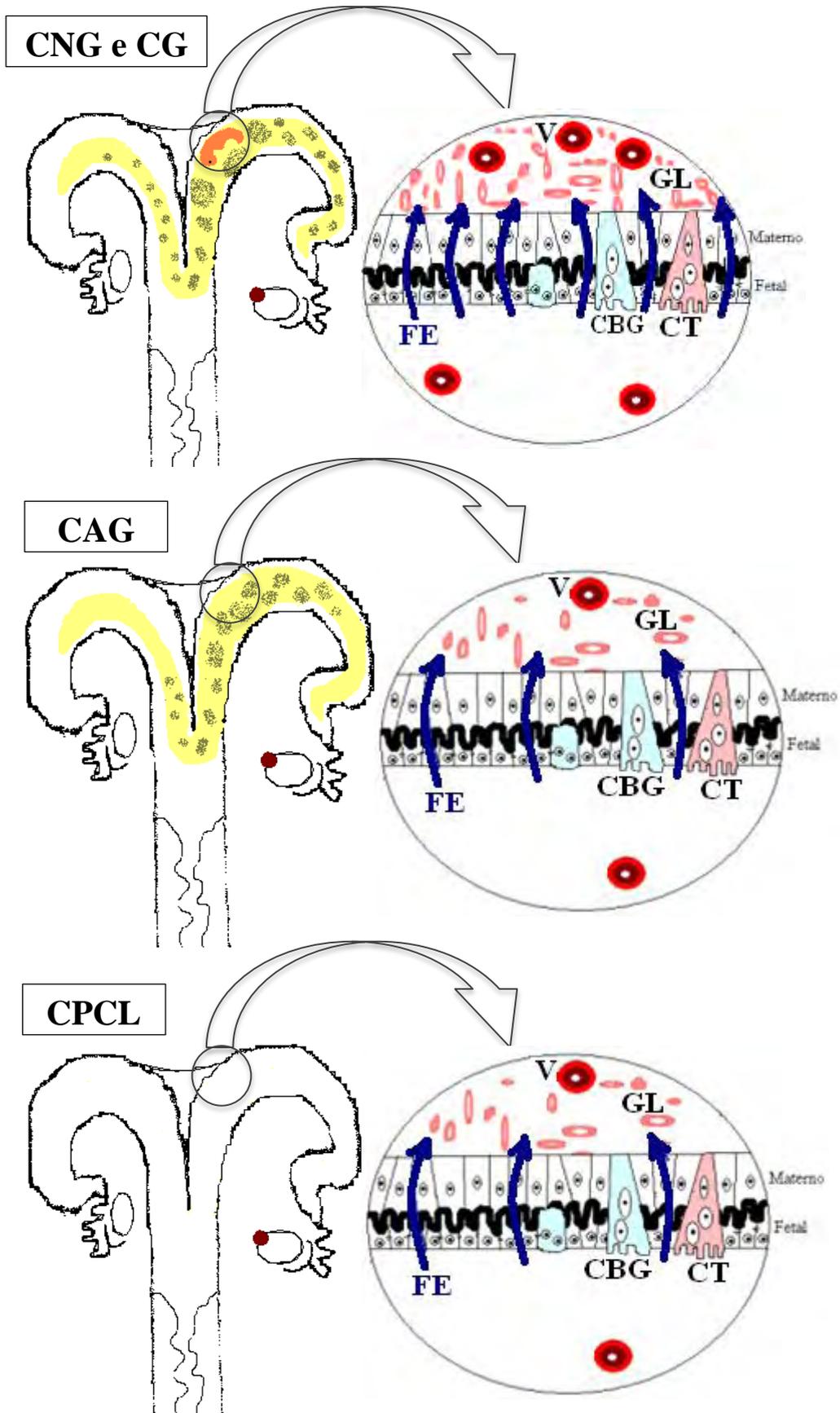


Figura 1 – (Adaptado de Horst & Hans (2011) e Paulesu et al. (2012)) modelo hipotético gráfico que representa a hipótese central do estudo, em que os grupos controle (GC) e CNG, que possuem o conceito normalmente desenvolvido consegue modular, através de maior quantidade de fatores embrionários (FE), as mudanças uterinas de uma maneira mais eficaz e adequada, em relação aos grupos CAG e CPCL, para suprir as necessidades do seu desenvolvimento. Em relação a isso, as receptoras dos grupos CG e CNG apresentarão maior vascularização endometrial e quantidade do fator angiogênico (VEGF) e seu receptor (VEGF-R2); e maior concentração sanguínea de progesterona produzida pelo CL, através de uma adequada sinalização do embrião, quando comparada às receptoras dos grupos CAG e CPCL.

CG e CNG contam com formação de placenta no corno ipsolateral ao corpo lúteo, presença de embrião propriamente dito e corpo lúteo ativo.

CAG conta com a presença dos anexos placentários e do corpo lúteo ativo, mas sem a presença do embrião propriamente dito.

CPCL é representado no modelo sem a presença de membranas placentárias e do embrião propriamente dito, mas apresentando corpo lúteo ativo por mais de 25 dias.

No lado materno visualiza-se a população de glândulas endometriais (GL) e vasos sanguíneos (V), células binucleadas gigantes (CBG) células trinucleadas (CT). No lado do conceito, os fatores embrionários (FE) que são liberados pelo conceito modulam as alterações morfovasculares endometriais (setas azuis).

6. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado e segue as normativas da Comissão de ética no uso de animais - CEUA-FZEA-USP (protocolo no. 2210140815-5).

6.1 PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Para a produção das gestações de embriões clonados e daqueles produzidos *in vivo* foram utilizadas como receptoras 60 vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) múltíparas e não lactantes sincronizadas para permitir a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) (Figura 2). No protocolo de sincronização das receptoras, o dia 0 (D0) correspondeu ao dia da ovulação. Um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 (Sincrogest™), de primeiro ou segundo uso, foi inserido no D-11 juntamente com a aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE-Sincrodiol™) e 0,5 mg de análogo de PGF2 α (Cloprostenol-Sincrocio™). No D-3, o dispositivo de P4 era retirado e 0,5 mg de PGF2 α e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG-SincroeCG™) aplicados por injeção via IM. A indução de ovulação foi realizada com o uso de 2 mg de BE no D-2, sendo programada a ovulação no D0. No D7 (sete dias após a ovulação) foi realizada a transferência de embriões (TE).

Foram utilizados dois tipos de embriões para o estudo dos grupos gestacionais, (1) embriões produzidos *in vivo*, para compor o grupo controle, e (2) embriões clones produzidos *in vitro* pela técnica de clonagem por SCNT pelo Laboratório de Morfologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD), como descrito por Sangalli et al. (2012) utilizando fibroblastos fetais do sexo masculino como doador de núcleo, para compor os três fenótipos gestacionais de clone.

O grupo controle foi composto por gestações de embriões produzidos *in vivo*. Para isso, vacas doadoras de embriões foram sincronizadas através do protocolo de superovulação mostrado na figura 3. No D-9 o protocolo foi iniciado da mesma forma ao protocolo das receptoras com a colocação do dispositivo intravaginal de P4 juntamente com as aplicações de BE e PF2 α . A partir do D-5 uma série de aplicações IM de FSH purificado (Folltropin-V™, Tecnopec) foi realizada duas vezes ao dia até o D-2 em doses regressivas totalizando 133 mg em todas as aplicações. A indução da ovulação foi realizada através da aplicação IM de 0,05 mg de análogo de GnRH (Buserrelina- Sincroforte™) no D-1 no período da manhã e neste mesmo dia foi realizada a inseminação artificial (IA) no período da tarde utilizando sêmen convencional de touro da raça Nelore com fertilidade comprovada. Após sete dias da ovulação, o útero dessas doadoras foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) e os embriões encontrados com o auxílio de um microscópio estereoscópico foram transferidos para as receptoras previamente sincronizadas (Figura 2) para estarem no mesmo dia do ciclo estral das doadoras.

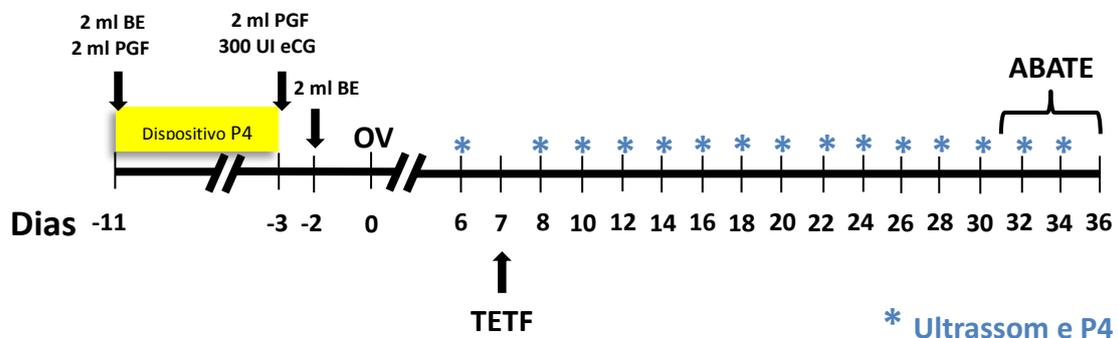


Figura 2 - Protocolo de sincronização de receptoras para transferência de embriões e esquema para coleta de dados (ultrassom, sangue e abate).

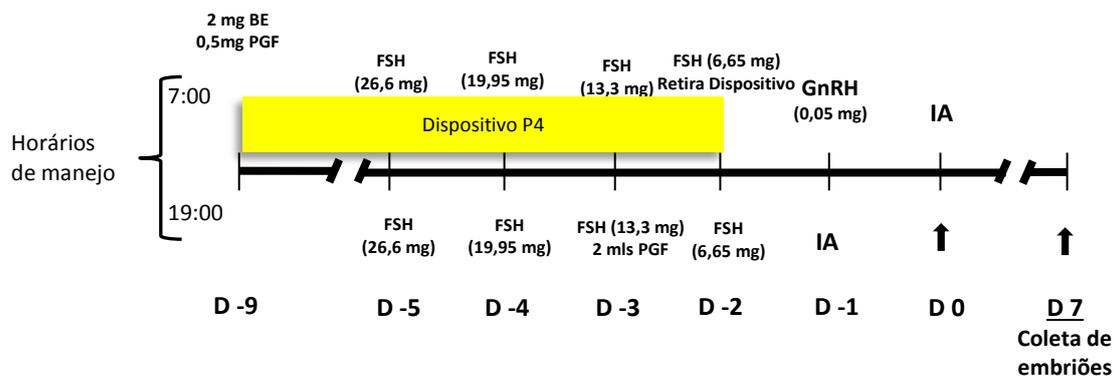


Figura 3 - Protocolo hormonal de superovulação das doadoras de embriões.

6.2 ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL E COLETAS DE SANGUE

Dados de ultrassonografia transretal do endométrio, mesométrio e artérias uterinas das receptoras foram coletados de dois em dois dias a partir do D6 (um dia antes da TE) até o abate (aproximadamente até o D34) utilizando um aparelho de ultrassonografia contendo os modos B (escala de cinza) e Doppler (Esaote MyLab 70, Florence, Itália) com a probe linear multi-frequência ajustada para 7,5-MHz (mod. SV3513 VET, Esaote, Florence, Itália). Vídeos de todos os exames ultrassonográficos foram gravados para posterior análise. No modo-B foram coletadas as mensurações de morfologia (diâmetros e comprimentos). A perfusão vascular do útero (endométrio e mesométrio), placenta e embrião foram avaliados com o uso de ultrassonografia no modo color-Doppler e nas artérias uterinas pelo modo spectral-Doppler. As mensurações subjetivas de escore vascular do terço médio do endométrio e mesométrio foram classificadas em uma escala de 1 a 4 (variando do menos vascularizado para o maior grau de vascularização) e as medidas objetivas foram realizadas através dos índices de resistência (RI) das artérias uterinas, segundo Silva & Ginther (2010). Juntamente aos escaneamentos ultrassonográficos, foram coletadas amostras de sangue da veia jugular em tubos de soro para posterior análise hormonal de P4.

6.3 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS GESTACIONAIS DE EMBRIÕES BOVINOS CLONADOS POR SCNT

Após as transferências de embriões clonados por SCNT, como detalhado anteriormente, as vacas receptoras foram acompanhadas através do escaneamento ultrassonográfico (seguindo o protocolo na Figura 2) e classificados em três diferentes fenótipos gestacionais de acordo com as características do conteúdo uterino e a confirmação da presença de um corpo lúteo ativo visualizados por exame ultrassonográfico.

As receptoras de gestações de embriões clones consideradas como normais (CNG) apresentaram por volta do dia 25 pós-ovulação o lúmen uterino preenchido por vesícula embrionária (VE), embrião (EP, embrião propriamente dito) com batimentos cardíacos, sendo evidenciado por sinais coloridos pulsantes na região cardíaca do embrião por ultrassonografia Doppler colorido, e a presença do corpo lúteo (CL) ativo, também detectado por Doppler.

Nos grupos de fenótipos gestacionais alterados, em nenhum escaneamento a presença do EP foi detectado. Nas gestações anembrionadas (CAG), as vacas apresentavam, por volta do dia 25, presença significativa de líquido e de membranas flutuantes no lúmen uterino, indicando a presença da VE, sem qualquer vestígio do EP e possuíam um CL ativo. Esse fenótipo era mantido até o dia do abate para coleta de dados in situ. O grupo de CL persistente (CPCL) foi formado por vacas que não apresentaram, em qualquer período de escaneamento até o dia do abate, líquido ou membranas placentárias no lúmen uterino, ou seja, sem o desenvolvimento da VE e do EP, mas sempre mantiveram o CL ativo.

Inicialmente foi proposto no mínimo um número de quatro animais por grupo, porém ao longo dos ciclos de TETFs para a obtenção de todos os fenótipos gestacionais, as taxas de ocorrência das gestações normais foram maiores que das alteradas. No total foram obtidas para abate e análises posteriores sete gestações do grupo CNG, uma CAG, quatro CPCL e nove CG; sendo que o grupo CAG foi completado com duas receptoras da raça Tabapuã providas de outro experimento de embriões clones realizado paralelamente a este, e que apresentaram as mesmas características desse fenótipo gestacional, portanto totalizando três gestações para esse fenótipo.

6.4 COLETA DOS TECIDOS

As receptoras gestantes foram abatidas após completarem 30 dias pós-ovulação, sendo agendadas para abate, com variação de 5 dias (31 aos 36 dias), conforme a disponibilidade do abatedouro na semana. Após o abate, o trato reprodutivo foi coletado e transportado para o laboratório em caixa de isopor refrigerada com gelo. Assim que o trato reprodutivo foi recebido no laboratório, a assimetria entre cornos foi avaliada, o útero foi dissecado e os cornos uterinos ipso e contralateral ao ovário com CL foram incisados longitudinalmente na porção antimesometrial. Após essa incisão, macroscopicamente o lúmen uterino foi analisado quanto ao grau de desenvolvimento das carúnculas, e da vesícula embrionária e essas observações foram anotadas em fichas individuais.

Após serem realizadas todas as observações macroscópicas do lúmen uterino, os cornos uterinos foram individualizados e analisados. Nos grupos CNG, CAG e CG o corno uterino que o embrião ou a vesícula embrionária foi localizado e/ou apresentou

um maior grau de desenvolvimento (tamanho, volume, vasos sanguíneos e carúnculas) foi denominado de ipsilateral, e o corno oposto ao embrião e/ou presença da vesícula embrionária menos desenvolvida foi classificado como corno contralateral. As receptoras do grupo CPCL, por não apresentarem o embrião ou a vesícula embrionária, a denominação dos cornos ipso e contralateral foram baseados no lado em que os CLs estavam presentes. Após essas identificações, amostras de útero foram coletadas do terço médio de cada corno uterino no sentido transversal. Partes das amostras foram fixadas em soluções de paraformaldeído 4% tamponado e em solução Carnoy para posterior inclusão em parafina. A outra parte foi separada e depositada em meio de inclusão para congelamento (optimal cutting temperature compound - OCT), congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C para futuras análises histológicas. Por fim, amostras de endométrio da região caruncular e intercaruncular foram coletadas e armazenadas em criotubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, para futura extração de RNA e proteínas.

6.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE PROGESTERONA

As amostras congeladas de soro sanguíneo, que foram coletadas durante os escaneamentos, foram enviadas para o Laboratório de Endocrinologia Animal, coordenado pelo Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, para serem analisadas através do “Kit” de radioimunoensaio (coat-a-count; DPC), validado previamente por (Garbarino et al., 2004) para esse tipo de amostra.

6.6 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

As amostras criopreservadas da região caruncular e intercaruncular do endométrio foram submetidas à maceração em aparato de inox, devidamente congelado após a imersão em nitrogênio líquido. O tecido macerado foi então homogeneizado e incubado em tampão de extração de proteínas (50 mM Tris-base, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Ditioneitol (DTT), 0,5 mM fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF), 10% glicerol, inibidor de proteases (GE 80-6501-23, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000G por 10 minutos e o sobrenadante recolhido em tubos de 1,6 mL. Os extratos ficaram armazenados em freezer -80°C. A concentração das amostras foi determinada pelo método de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). O equivalente a 25µg de proteína foi fervido em tampão Laemmli, com β-mercaptoetanol (5%).

As amostras foram fracionadas eletroforicamente em gel descontínuo de poliacrilamida a 10%. O fracionamento foi realizado em cuba de eletroforese Bio-Rad durante 120 minutos, em tampão de corrida (Glicina 192mM; Tris Base 25mM; SDS 0.1%), em tensão de 120 volts. Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (Glicina 192mM; Tris Base 25mM; SDS 0.1% 20% de Metanol), e submetido à transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Amershan Protan GE). Utilizou-se membrana de nitrocelulose GE para a transferência úmida, realizada em cuba de transferência Bio-Rad, durante 12 horas, em corrente de 80 mA. Após a transferência, a membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas sendo utilizado solução de TBS contendo 0,1% de tween e 3% de BSA por 90 minutos.

As membranas foram então lavadas em TBS-tween (0,1% v/v) – TBS-T quatro vezes por 10 minutos cada lavagem. Os anticorpos primários foram incubados

overnight, em temperatura 4° C, usando-se os anticorpos anti VEGF (anticorpo para VEGF policlonal, antiovelho 1:500, sc-152, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA) e anti VEGF-R2 (anticorpo para Fetal Liver Kinase-1/FLK-1, policlonal, anti-coelho, 1:500, sc-315, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA) em TBST e 1% de BSA e β -actina (anticorpo para β -actina policlonal-HRP, 1:250.000, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST, por quatro vezes por 10 minutos. Após as lavagens as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (anticorpo policlonal conjugado com substrato para HRP, anti-coelho 1:5000, sc-2030, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA), por uma hora. Novas lavagens foram realizadas em TBST, por quatro vezes por 10 minutos.

As membranas foram incubadas em solução quimioluminescente GE (ECL BioRadLaboratories, Hercules, CA, EUA) na diluição 1:1, por 5 minutos. A membrana então foi exposta à captação de quimioluminescência no equipamento ChemiDoc BioRad MP (BioRadLaboratories, Hercules, CA, EUA). A quantificação proteica foi realizada com auxílio do software ImageLab Versão 5.2 (ImageLab Software, BioRadLaboratories, Hercules, CA, EUA). Análise de volume dessa banda foi utilizada para as estimativas da quantidade das proteínas (VEGF e VEGF-R2) e normalizadas pelo volume encontrado para a banda da β -actina, e essa proporção foi analisada e comparada entre os grupos experimentais do estudo.

6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram examinados para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov test. Dados que não apresentaram uma distribuição normal foram

transformados em escala logarítmica natural. Variáveis individuais foram analisadas para efeito de dia e comparações envolvendo os grupos de tratamento foram analisados para os efeitos principais (grupo e dia) e interação. ANOVA em modelo com efeitos mistos foi realizada no programa SAS (versão 9.2; SAS Institute Inc.). O procedimento PROC MIXED foi utilizado considerando a autocorrelação entre as medidas repetidas no tempo. Teste t de Student pareado e não pareado foram utilizados para a localização de diferenças entre variáveis entre dias dentro do mesmo grupo e entre grupos no mesmo dia, respectivamente quando o efeito de dia ou o efeito de interação foi obtido. Comparações entre os grupos de dados de frequência foram realizadas com o teste qui-quadrado. Probabilidade de $P \leq 0,05$ indicou que a diferença foi significativa e a probabilidade entre $P > 0,05$ e $P \leq 0,1$ indicou que a diferença apresentou tendência à significância. Os dados foram apresentados como média \pm EPM.

7. RESULTADOS e DISCUSSÃO

7.1 TAXA DA TETF E FREQUÊNCIA DA OCORRÊNCIA DOS FENÓTIPOS GESTACIONAIS

Para a realização das TETFs, tanto de embriões clonados quanto dos naturalmente produzidos, ao longo de todo o experimento, foram realizados 13 lotes de sincronização do estro e ovulação, totalizando 212 sincronizações, das quais, 189 ovularam, gerando uma taxa de 89,2% (189/212) de resposta aos protocolos (Tabela 1). Essa taxa de ovulação é considerada elevada, quando comparado às taxas de 70 – 75% encontrados na literatura, utilizando vacas em várias condições, ciclando ou em anestro, da raça Nelore frente à diferentes protocolos de sincronização da ovulação (Marques et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2004). Desse total de ovulações foram utilizadas 120 vacas como receptoras para as transferências dos embriões disponíveis. Na maioria dos protocolos foi obtido um número igual ou superior de receptoras aptas à receberem um embrião, ou seja, com a presença de CL ativo no dia da TE em relação à quantidade de embriões disponíveis para transferência, gerando uma taxa de 1,6 vacas disponíveis por embrião. Essa quantidade excedente de vacas sempre foi almejada, pois deste modo as melhores vacas eram selecionadas, evitando aquelas que apresentavam no dia da TE acúmulo de líquido no útero, área e perfusão sanguínea de CL reduzidos, cérvix com morfologia alterada, ou também aquelas com temperamento agitado e de difícil manejo.

Do total das 120 transferências, 79 foram realizadas com embriões clonados por SCNT e 41 com embriões produzidos *in vivo* (grupo controle). Os embriões clonados geraram 12 gestações do fenótipo CNG (15,2%; 12/79), duas gestações CAG (2,5%; 2/79) e sete gestações CPCL (8,9%; 7/79), enquanto que no CG foram obtidas 10

gestações (24,4%; 10/41). As taxas de gestação entre os grupos CG e CNG não diferiram entre si ($P>0,05$). Além do mais, a taxa de gestação de embriões produzidos *in vivo* foi considerada baixa, quando comparadas às médias de 35 a 70% em bovinos *Bos indicus* relatadas na literatura (Wright, 1981; Peixoto et al., 2007). Já as taxas descritas na literatura em relação às prenhez de gestações de embriões clones são bem variadas, pois são dependentes de vários fatores. Entre eles podemos destacar a qualidade oocitária e a linhagem da célula doadora de núcleo utilizados para a produção de embriões clonados por SCNT (Heyman et al., 2002). Essas taxas diagnosticadas aos 30 a 35 dias de gestação podem variar de 14% (Jardim, 2016), 30% (Merighe, 2007) até 55% (Heyman et al., 2002). Além desses fatores contribuírem para o sucesso da gestação de clones durante a manipulação *in vitro*, outros importantes componentes, como fatores ambientais e nutricionais (Spell et al., 2001; Santos et al., 2004; Jones & Lamb, 2008) também podem ter interferido tanto nas taxas de gestação dos embriões clonados quanto dos embriões naturalmente produzidos, visto a elevada variação de resultados obtidos nos protocolos de TETF deste estudo, sendo: de 0 a 54% e de 0 a 100% para os grupos de embriões clonados e controle, respectivamente. Os piores resultados de protocolos obtidos ao longo de todo o estudo (protocolos de nº. 5 a 8 e nº. 12), coincidiram com a estação fria do ano, o inverno, época de escassez de forragem de boa qualidade, fato que provavelmente influenciou negativamente a reprodução dessas receptoras (Souza et al., 2016). Os fenótipos de gestações alteradas encontradas no presente estudo, também foram descritos em outro estudo por Jardim (2016). A autora obteve uma taxa de 6,1% para o grupo CAG, no qual foi maior que a deste estudo (2,5%), e de 7,4% para CPCL, semelhante à deste estudo (8,8%). Assim como a linhagem celular utilizada como doadora de núcleo no processo da clonagem sabidamente pode determinar a aparência de distúrbios da gestação (Powell et al.,

2004), a frequência de obtenção desses fenótipos gestacionais também poderia ser influenciada por determinadas linhagens das células doadoras de núcleo. Reforçando essa sugestão, enquanto Jardim (2016) fez uso de várias linhagens celulares para a produção de embriões clones, o presente projeto utilizou apenas uma linhagem celular como doadora de núcleos, sendo que este fato pode ser a explicação para a diferença da frequência dos fenótipos obtidos entre os dois estudos.

A Tabela 1 resume os dados dos 13 ciclos de sincronização, número de vacas sincronizadas e ovuladas por protocolo, assim como a frequência de ocorrência dos grupos gestacionais em cada ciclo de transferência de embriões realizado.

Tabela 1. Resultados de eficiência dos protocolos de TETF e taxas de prenhez por grupo de estudo após a TE de embriões clonados por SCNT ou de embriões produzidos *in vivo*. CNG – clone gestação normal; CAG – clone gestação anembrionada; CPCL – clone persistência de corpo lúteo; Controle – grupo de embriões produzidos *in vivo*. Abate - número de abates por protocolo. SCNT – embriões produzidos pela técnica de transferência nuclear de células somáticas, *In vivo* – embriões produzidos por IA.

Nº Protocolo	Vacas Sincronizadas	Vacas Ovuladas	Nº de TEs	Tipo de Embrião Transferido	Taxa dos fenótipos gestacionais (%)				Abate para análises
					CNG	CAG	CPCL	CG	
1 (N1)	9	8	5	SCNT	0	0	0	-	0
2 (N2)	16	16	6	SCNT	16,7 (1/6)	0	0	-	1
3 (N3)	15	11	11	SCNT	54,5 (6/11)†	0	18,1 (2/11)**	-	4
4 (N4)	15	13	13	SCNT	7,7 (1/13)†	0	23,1 (3/13)	-	3
5 (N5)	26	20	10	SCNT	0	10 (1/10)	0	-	1
6 (N6)	31	31	12	SCNT	16,7 (2/12)	8,3 (1/12)*	0	-	2
7 (N7) + (C2)	23	23	22 / 1	SCNT / <i>in vivo</i>	9,1 (2/22)†	0	9,1 (2/22)*	0 (0/1)	1
8 (C1)	10	6	1	<i>in vivo</i>	-	-	-	100 (1/1)	1
9 (C3)	31	26	13	<i>in vivo</i>	-	-	-	7,7 (1/13)	1
10 (C4)	11	11	8	<i>in vivo</i>	-	-	-	12,5 (1/8)	1
11 (C5)	8	7	2	<i>in vivo</i>	-	-	-	50 (1/2)*	0
12 (C6)	7	7	6	<i>in vivo</i>	-	-	-	0	0
13 (C7)	10	10	10	<i>in vivo</i>	-	-	-	60 (6/10)	6
Total	212	189	120		15,1 (12/79)	2,5 (2/79)	8,8 (7/79)	24,4 (10/41)	21

*Uma, ou ** duas receptoras retirados de todas as análises por não se enquadrarem em todos os requisitos de caracterização do grupo até o momento do abate.

†Total de cinco Gestações do grupo CNG que foram utilizadas para outro experimento e não foram abatidas (duas, uma e duas gestações dos protocolos 3, 4 e 7, respetivamente).

Algumas receptoras de embriões clonados não foram abatidas ou foram abatidas e retiradas de todas as análises por não apresentarem todas as características gestacionais do grupo no qual estavam inseridas. Ademais, das 12 gestações do grupo CNG, cinco receptoras não foram abatidas por terem sido destinadas a outro experimento que objetivava o acompanhamento da evolução da gestação até o termo.

No grupo CAG foram obtidas duas gestações, sendo que uma delas não foi abatida. Essa receptora, apesar de ter tido a detecção da vesícula embrionária em desenvolvimento ao longo dos escaneamentos ultrassonográficos, um desses exames gerou dúvida quanto à uma possível visualização do embrião, sendo que essa estrutura tinha aparência degenerada sem batimentos cardíacos. Devido ao fato de somente uma gestação do grupo CAG ter sido produzida neste estudo e de não mais haver tempo hábil para a produção de mais gestações neste grupo foi decidido o aproveitamento de duas gestações provenientes de outro estudo que utilizou receptoras da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) também inovuladas com embriões clonados por SCNT e que apresentaram de maneira clara todas as características de fenótipo do grupo CAG. Por fazerem parte de outro experimento, as coletas de dados ultrassonográficos foram realizadas de três em três dias a partir do dia 14, sendo necessário, para o aproveitamento dos dados, um rearranjo dos mesmos em relação aos momentos das coletas de dados deste estudo. Cada dia ímpar da coleta de dados do outro estudo (D15, D21, D31 e D33) foi utilizado como dado do dia par antecedente para análise com os dados neste estudo. Com este artifício, no total três receptoras foram utilizadas em todas as análises de dados no grupo CAG.

Das sete gestações obtidas no grupo CPCL foram utilizadas apenas quatro para as análises de dados. Duas receptoras foram excluídas após terem o CL regredido alguns dias antes do abate (D32 e D28). A terceira receptora foi excluída das análises após a

visualização de um provável embrião sem batimentos cardíacos em um dos escaneamentos ultrassonográficos. Mesmo assim, essa receptora foi abatida para verificação das características do desenvolvimento gestacional, confirmando a presença de um embrião subdesenvolvido, a presença de uma fina membrana amarelada e de carúnculas desenvolvidas apenas no corno ipsolateral ao embrião.

O grupo controle também teve um animal retirado das avaliações. Após a identificação de ausência de batimentos cardíacos no embrião durante o escaneamento ultrassonográfico do dia 30, foi constatada morte embrionária. Essa receptora foi abatida para avaliação do desenvolvimento gestacional, no qual foi observado um embrião mal desenvolvido, sem presença de desenvolvimento vascular ao seu redor, além de carúnculas e membranas subdesenvolvidas. É importante salientar que essas perdas embrionárias e ocorrência de problemas de desenvolvimento vascular são muito mais comuns em gestações de embriões clonados (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Chavatte-Palmer et al., 2012). Curiosamente, em um dos protocolos de sincronização para obtenção das gestações de embriões *in vivo* do grupo CG, acompanhamos o desenvolvimento de uma gestação anembrionada, com vesícula embrionária desenvolvida e o CL mantido vascularizado por mais de 60 dias pós-ovulação. Esse achado da gestação anembrionada provinda de embrião produzido *in vivo*, demonstra que, podemos encontrar, ao acaso, gestações com alterações semelhantes às encontradas em gestações de clones, porém em uma menor frequência quando comparado às gestações de embriões provindos de manipulação *in vitro*. Isso reforça a importância da utilização de gestações de embriões clonados em delineamentos experimentais com o objetivo de estudar gestações alteradas.

7.2 PERFUSÃO VASCULAR UTERINA

O comportamento temporal da evolução da perfusão vascular uterina nos grupos experimentais avaliados por ultrassonografia Doppler está apresentado na figura 4.

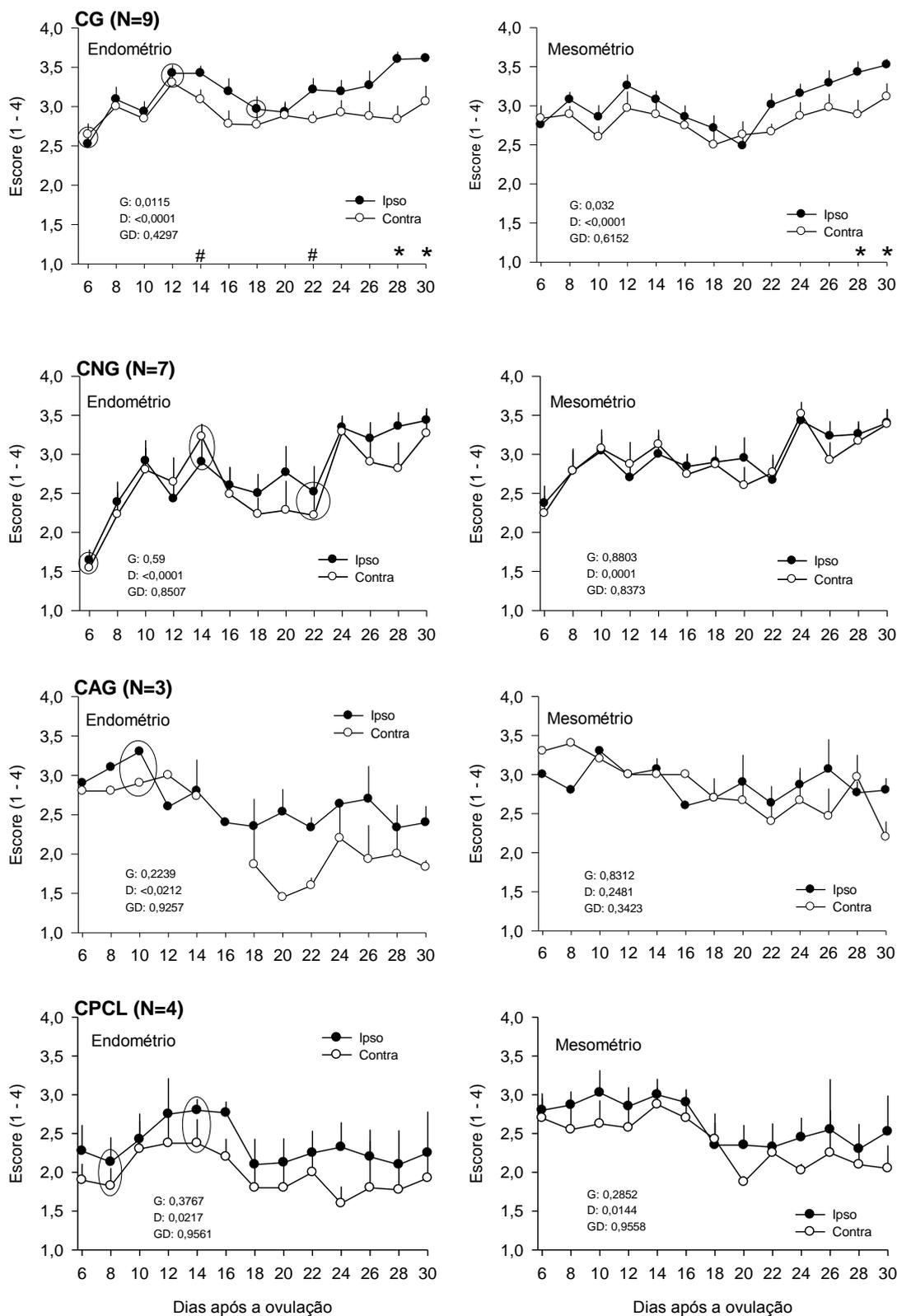


Figura 4 - Médias \pm EPM da vascularização endometrial (gráficos à esquerda) e mesometrial (gráficos à direita) avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 (um dia antes da TE) até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos (1-4; mínimo-máximo sinais de Doppler colorido) nos grupos experimentais deste estudo. Os cornos uterinos ipso e contralateral ao embrião são representados pelas linhas com bolas negras e brancas, respectivamente. CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT, CAG = gestações anembrionadas de embriões clonados por SCNT,

CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT apresentando somente CL persistente, e CG = gestações normais de embriões produzidos *in vivo*. Anéis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). Asteriscos (*) indicam o dia quando a perfusão vascular dos cornos foi diferente estatisticamente ($P \leq 0,05$) e o símbolo jogo da velha (#) indica o dia quando a perfusão vascular dos cornos obteve tendência à significância ($0,05 < P \leq 0,1$).

Em todas as análises de perfusão vascular uterina (Figura 4), efeito de dia foi detectado em todos os grupos experimentais nas duas regiões, endometrial e mesometrial ($P < 0,05$), com exceção no mesométrio do grupo CAG ($P = 0,2481$). Somente no grupo CG foi detectado efeito de grupo nas regiões endometrial e mesometrial ($P < 0,0115$ e $P < 0,0320$, respectivamente). Interação entre grupo e dia não foi detectada em nenhuma das análises ($P > 0,1$). A perfusão vascularização endometrial apresentou tendência à significância nos dias 14 e 22 ($P = 0,0603$ e $P = 0,057$, respectivamente) e, tanto na análise endometrial quanto na mesometrial, os dias 28 e 30 apresentaram diferença de perfusão vascular entre os cornos ipso e contralateral ($P < 0,05$) no grupo GC.

Esses resultados de perfusão vascular do grupo CG estão de acordo com estudos prévios que acompanharam o desenvolvimento do embrião e seus anexos durante o período de placentação (Melton et al., 1951; Curran et al., 1986). Silva & Ginther (2010) avaliaram por ultrassonografia Doppler a vascularização endometrial e mesometrial de novilhas prenhes, e detectaram uma vascularização maior do corno ipsolateral desde o dia 20 pós-ovulação até o dia 42. Em outro estudo sobre a vascularização uterina durante a gestação inicial em vacas, Ford et al. (1979) relataram um aumento progressivo do fluxo sanguíneo da artéria uterina do corno gestante em relação ao corno não gestante a partir do dia 25 até o dia 30 pós-ovulação. Apenas com diferença de alguns dias em relação aos estudos citados, dia 20 (Silva & Ginther, 2010) e dia 25 (Ford et al., 1979), o grupo CG deste estudo seguiu o mesmo padrão de

vascularização nos cornos uterinos. Apesar da diferença estatística na vascularização entre cornos ter sido detectada apenas nos dias 28 e 30, o corno gestante apresentou um patamar de vascularização mais elevado a partir do dia 22, revelando uma modulação vascular provocada pela formação do alantocócion entre os dias 22-23, conforme previamente sugerido por Silva & Ginther (2010).

Essa modulação vascular ocorrendo de forma antecipada no corno ipsolateral não ocorreu nos grupos com os fenótipos gestacionais de clones (CNG, CAG e CPCL). Esse comportamento vascular diferente pode ser o resultado de alguns dos problemas de desenvolvimento placentário, demonstrado em outros estudos (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Chavatte-Palmer et al., 2012), que são inerentes aos embriões produzidos pela técnica de SCNT. Em relação ao grupo CNG, o desenvolvimento dos anexos fetais do conceito clonado pode ser diferente em relação ao CG, que por sua vez, se alonga mais rapidamente modulando ao mesmo tempo, de maneira semelhante, a vascularização uterina inicial nos dois cornos uterinos. Em relação aos grupos alterados, CAG e CPCL, por não apresentarem o embrião próprio, não modulam a vascularização endometrial de forma diferente entre os dois cornos uterinos.

Devido à fragilidade do grupo CAG, por possuir apenas três receptoras e sendo que em duas delas muitos dados foram perdidos, para uma melhor comparação entre grupos, os próximos gráficos apresentarão dados comparativos sem este grupo. A Figura 5 apresenta dados médios de vascularização endometrial e mesometrial dos grupos CNG, CPCL e CG, considerando apenas o corno gestante (dos grupos CNG e CG) e o corno ipsolateral ao CL (do grupo CPCL).

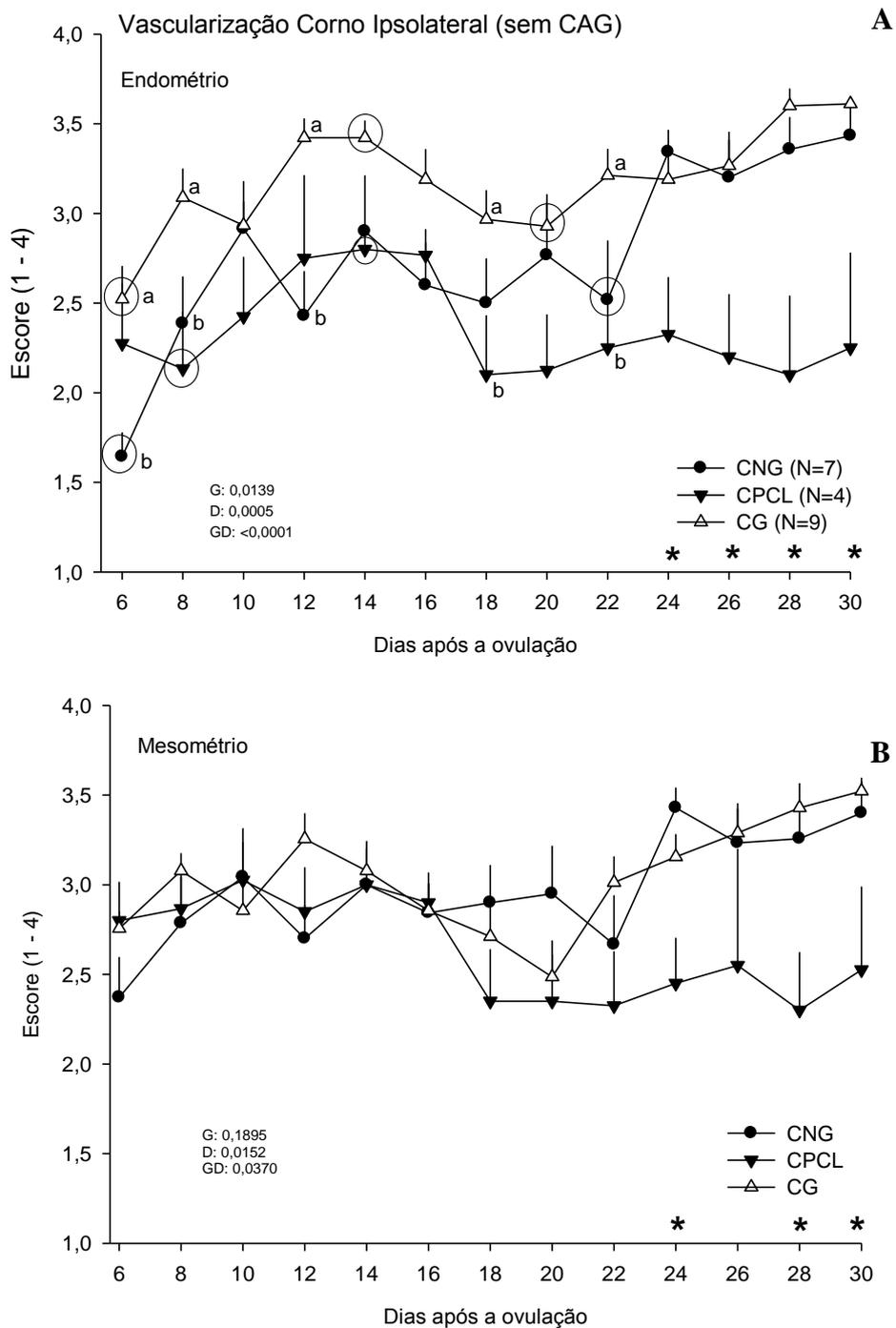


Figura 5 - Médias \pm EPM da vascularização do corno ipsolateral ao embrião, ou ao CL (grupo CPCL) das regiões endometrial (A) e mesometrial (B) avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 (um dia antes da TE) até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos (1-4; mínimo-máximo sinais de Doppler colorido) em três grupos experimentais do estudo (CNG, CPCL e CG). CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT, CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente, e CG = gestações normais de embriões produzidos *in vivo*. Aneis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas (a e b) indicam no dia a diferença de perfusão vascular entre dois grupos ($P \leq 0,05$). * indicam o dia quando a perfusão vascular dos grupos CNG e CG foi diferente em relação ao grupo CPCL ($P \leq 0,05$).

A perfusão vascular endometrial e mesometrial nos grupos CNG e CG apresentaram valores superiores quando comparado ao grupo CPCL ($P < 0,05$; figura 5) após o dia 24, exceto no dia 26 para a perfusão mesometrial. Foi verificado que o grupo CG também apresenta uma perfusão vascular maior, em comparação ao CNG, antes do dia 20 (nos dias 6, 8 e 12). Apesar desse padrão vascular inicial ser maior no grupo CG em relação ao CNG, essa diferença pode estar mais relacionada com o nível vascular uterino mais elevado pré-implantação, do dia 6 até o dia 12, do que a uma modulação provocada pela presença do embrião. Durante esse intervalo específico, nenhum estudo sobre vascularização uterina durante a gestação inicial encontrou diferenças entre a vascularização uterina de vacas gestantes comparados com as cíclicas (Ford et al., 1979; Honnens et al., 2008; Silva & Ginther, 2010), ou seja, essa diferença entre grupos provavelmente não está associada com o tipo de embrião produzido em cada grupo.

A partir do dia 18 até o dia 30, exceto no dia 20, o grupo CG apresentou valores maiores de fluxo sanguíneo endometrial do corno gestante em relação ao corno ipsolateral ao CL do grupo CPCL ($P < 0,05$). Já o grupo CNG tem a vascularização aumentada do dia 22 para o 24 ($P < 0,05$), sendo que a partir deste último dia o fluxo sanguíneo se iguala ao grupo controle em níveis maiores em relação ao CPCL ($P < 0,05$). Esses dados de perfusão vascular evidenciam que os embriões clonados transferidos nas receptoras que formaram o grupo CPCL não conseguiram estimular a vascularização uterina, ou seja, o desenvolvimento do conceito (ou placentação inicial) não modulou de maneira eficaz a vascularização do ambiente uterino como visualizados nos grupos CG e CNG. Além do mais, foi possível verificar que o grupo CNG modulou a perfusão vascular uterina, porém mais tardiamente em comparação ao grupo controle. Esse atraso da modulação vascular ocorreu provavelmente devido às gestações de clones

apresentarem falhas de placentação (aposição e adesão) já nesta fase da gestação (Arnold et al., 2008).

A perfusão sanguínea endometrial e mesometrial (gráfico não apresentado) do corno contralateral também seguiu o mesmo padrão de perfusão do corno gestante e/ou ipsilateral ao CL. Os grupos CG e CNG apresentaram patamares vasculares maiores ($P < 0,05$) em relação ao CPCL a partir do dia 22 e 24, respectivamente. Isso demonstra que, em ambos cornos uterinos, os padrões de vascularização uterina nos grupos CG e CNG se diferenciam em relação ao CPCL por conta do desenvolvimento das membranas placentárias começarem a apresentar um contato íntimo ao epitélio endometrial, que ocorre por volta do dia 20 (King et al., 1981).

Para uma comparação do desenvolvimento vascular uterino geral (cornos ipso e contralateral) foi realizada a média dos escores de vascularização endometrial dos dois cornos uterinos (Figura 6). Nesta avaliação foram analisados os três grupos clones (CNG, CAG e CPCL), sendo retirado o grupo controle (CG) da análise, pois foi o único grupo que apresentou diferença de vascularização endometrial e mesometrial entre cornos uterinos (Figura 4), não permitindo deste modo a realização da média entre os cornos.

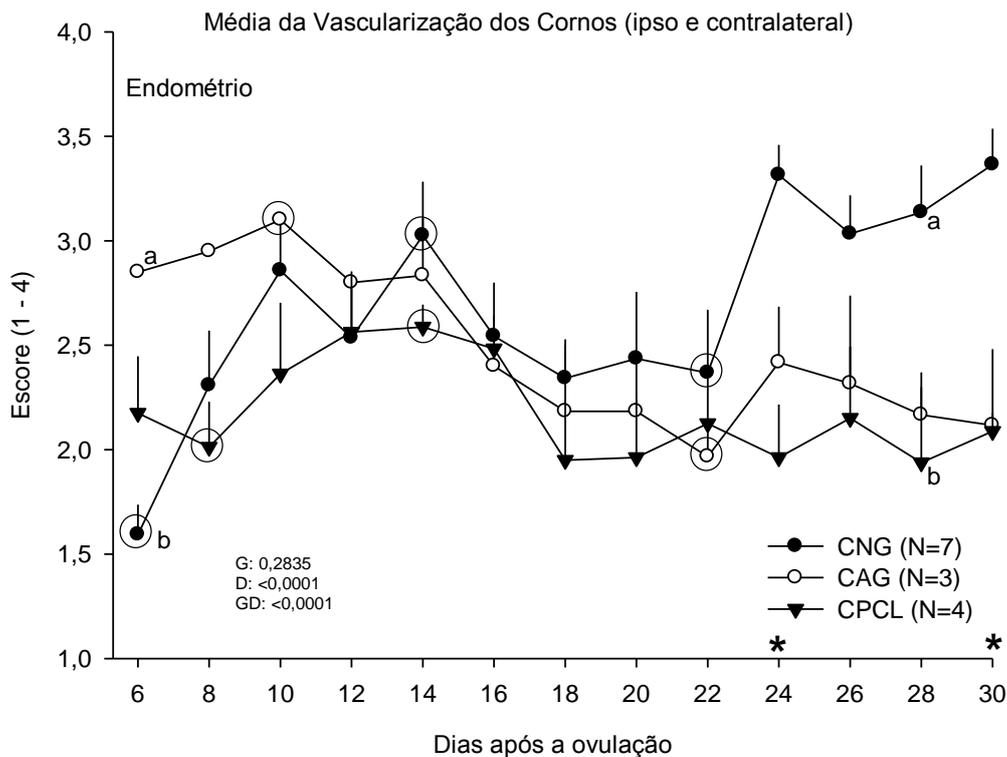


Figura 6 - Médias \pm EPM do valor médio da vascularização endometrial dos cornos ipso e contralateral ao embrião (grupo CG), VE (grupo CAG) ou CL (grupo CPCL) avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 (um dia antes da TE) até o dia 30 pós-ovulação, em escores subjetivos (1-4; mínimo-máximo sinais de Doppler colorido) em três grupos experimentais do estudo (CNG, CAG e CPCL). CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT, CAG = gestações anembrionadas de embriões clonados por SCNT, CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente. Anéis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). As letras minúsculas (a e b) indicam no dia a diferença de perfusão vascular entre dois grupos ($P \leq 0,05$). * indicam o dia quando a perfusão vascular do grupo CNG foi diferente em relação aos grupos CAG e CPCL ($P \leq 0,05$).

No dia 6, um dia antes da TE, o grupo CNG apresentou vascularização menor do que o grupo CAG ($P < 0,05$). Porém, após o dia 22 o grupo gestação normal de clones aumentou a vascularização estabilizando em patamares maiores em comparação aos grupos de gestação alterada de clones (CAG e CPCL), apresentando diferença nos dias 24 e 30 pós-ovulação ($P < 0,05$), e no dia 28 o CNG foi apenas maior que o grupo CPCL. Esse resultado reflete o mesmo comportamento dos resultados apresentados no gráfico da figura 5, demonstrando que as gestações de embriões com desenvolvimento normal apresentam uma maior modulação da vascularização uterina provocada pela fase

inicial da placentação do concepto, enquanto que os grupos de gestações alteradas de clones não demonstraram esse comportamento, por conta das várias falhas de desenvolvimento descritas na gestação de embriões bovinos clonados (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Wells et al., 2004; Merighe, 2007; Chavatte-Palmer et al., 2012)

Pela observação dos gráficos de perfusão vascular endometrial durante o período do dia anterior à TE (D6) até o dia 14, pode ser notado que na maioria dos grupos estudados houve um aumento de perfusão do dia 6 até o dia 14 (figura 4), principalmente quando a vascularização antes da TE estava com valores baixos como é o caso do grupo CNG. Esse fato foi associado a um possível efeito da técnica de TE em bovinos, pois as inovulações sempre foram realizadas na extremidade cornual, ou seja, no terço final do corno ipsolateral ao CL, e acreditamos que em alguns casos essa manipulação pode gerar uma reação inflamatória elevando temporalmente o fluxo vascular endometrial durante esse período. Para efeito de investigação dessa hipótese, um grupo de vacas cíclicas não gestantes (n = 5; GCNG) foi acompanhada seguindo o mesmo protocolo de ultrassonografia dos grupos anteriores, e também foram submetidas à técnica de TE no D7 do ciclo estral, depositando no lúmen uterino apenas o meio de manutenção sem a presença do embrião. Os dados de vascularização endometrial estão apresentados na figura 7 comparando os cornos ipso e contralateral.

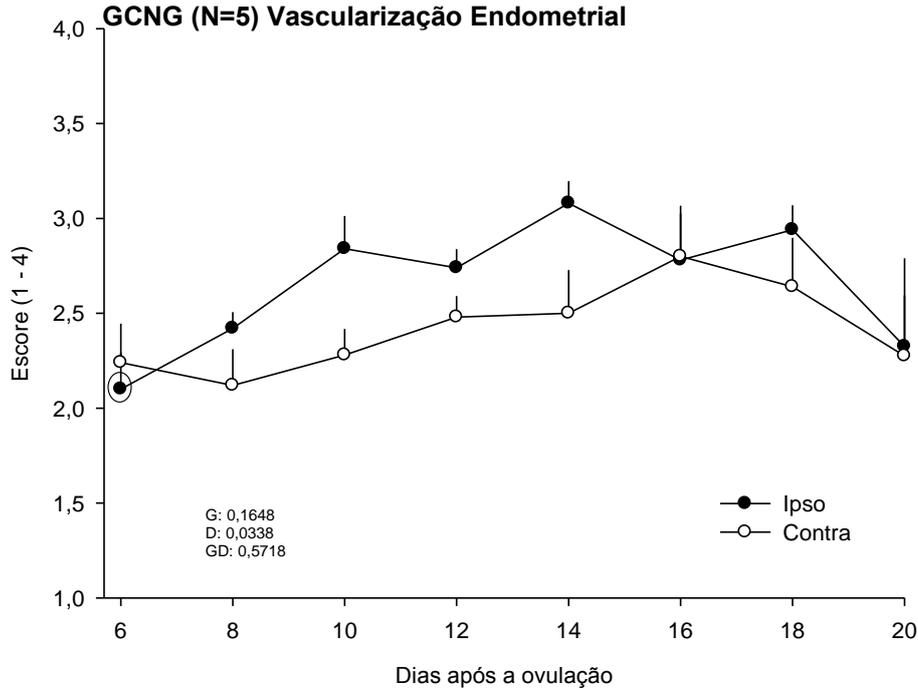


Figura 7 - Médias \pm EPM da vascularização endometrial avaliada por ultrassonografia no modo Doppler, do dia 6 (antes da simulação da TE) até o dia 20 pós-ovulação, em escores subjetivos (1-4; mínimo-máximo sinais de Doppler colorido) no grupo de vacas cíclicas não gestantes (CGNG). Os cornos uterinos ipso e contralateral ao embrião são representados pelas linhas com bolas negras e brancas, respectivamente. Anéis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição, dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$).

De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que não houve diferença de vascularização entre cornos ou interação ($P=0,1648$ e $P=0,5718$, respectivamente). Porém, existe um aumento de vascularização neste período (do dia 6 ao 14, $P < 0,0338$) em ambos os cornos uterinos, e visualmente mais acentuada no corno ipsilateral ao CL, corno que sofreu uma maior manipulação durante a execução da técnica de TE. Portanto, a técnica de inováção pode ser uma das causas responsáveis por aumentar temporalmente a vascularização endometrial especialmente no corno que sofreu uma maior manipulação.

Por último, como método de análise objetiva do fluxo de vascularização uterina, foi mensurado o índice de resistência vascular (RI) na artéria uterina ipso e contralateral

ao corno gestante nos grupos CG e CNG, e ao CL no grupo CPCL. O índice de resistência vascular (RI) é um indicador inversamente proporcional à capacidade do órgão imediatamente abaixo do local de mensuração receber suprimento sanguíneo, ou seja, quanto menor for o RI maior será o fluxo sanguíneo pela artéria avaliada (Ginther, 2007). Esses dados são mostrados na figura 8, comparando os cornos ipso e contralateral dos grupos CG, CNG e CPCL.

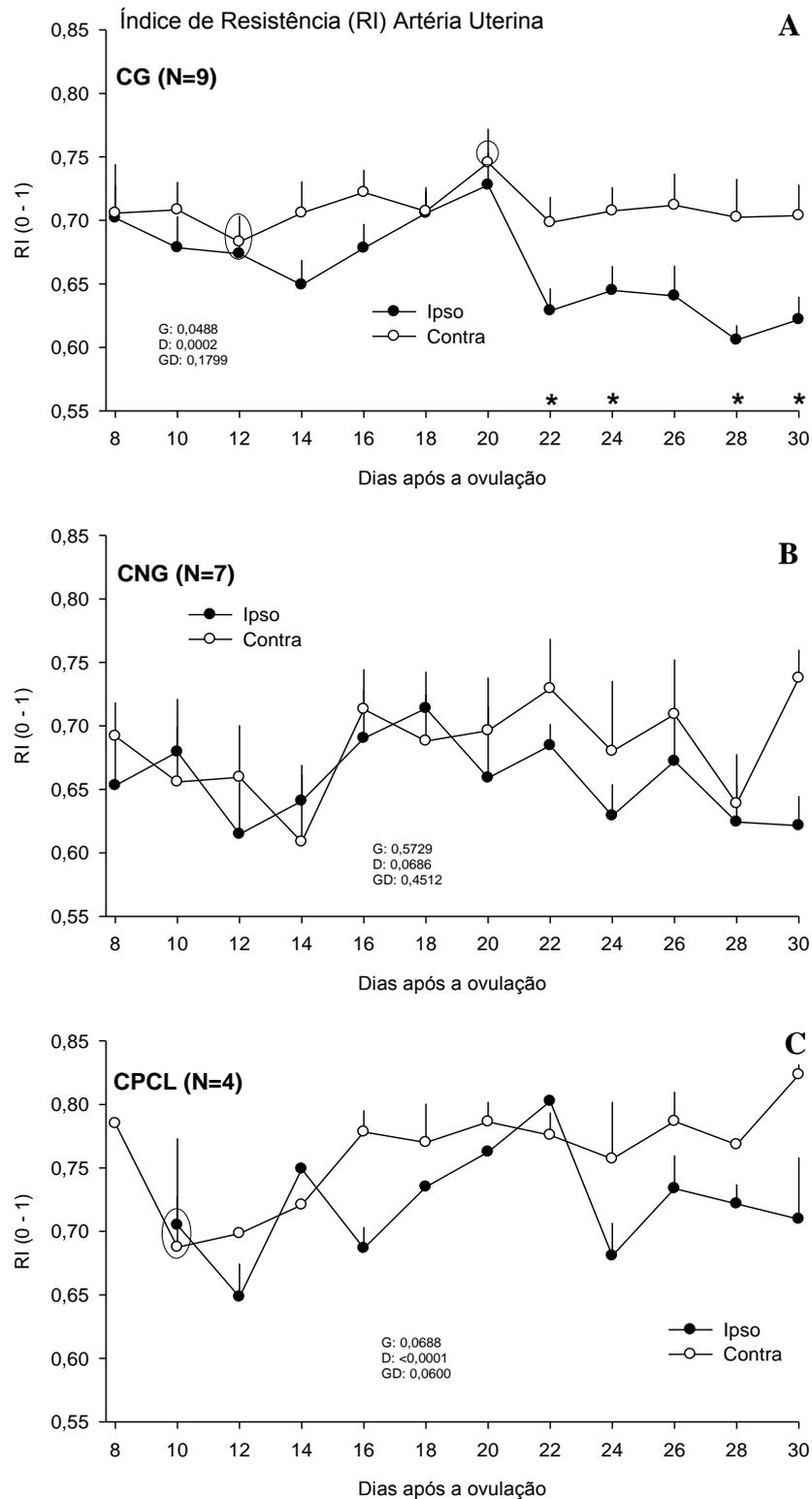


Figura 8 - Médias \pm EPM do índice de resistência vascular (RI) das artérias uterinas avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler-espectral, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, em escores objetivos (0-1), em três grupos experimentais (CG, CNG e CPCL). As artérias uterinas ipso e contralateral ao embrião ou ao CL (grupo CPCL) são representadas pelas linhas com bolas negras e brancas, respectivamente. Gráfico A: CG = gestações normais de embriões produzidos (*in vivo*), Gráfico B: CNG = gestações

normais de embriões clonados por SCNT e Gráfico C: CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente. Anéis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). Asteriscos (*) indicam o dia quando a perfusão vascular dos cornos foi diferente estatisticamente ($P \leq 0,05$).

Efeito de dia para as variações do RI foi detectado nos grupos CG e CPCL ($P < 0,05$). Apenas o grupo controle apresentou efeito principal para cornos uterinos ($P < 0,0488$), sendo que o RI entre os cornos uterinos foi diferente a partir do dia 22, exceto no dia 26. Ford et al. (1979), em um estudo sobre as mudanças do fluxo sanguíneo do útero durante o primeiro mês da gestação, avaliaram o fluxo vascular uterino através de sondas eletromagnéticas localizadas nas artérias uterinas ipso e contralateral ao CL e ao embrião, e observaram dois aumentos de fluxo vascular da artéria uterina do corno gestante em relação ao corno contralateral durante os primeiros 30 dias da gestação. O primeiro aumento ocorreu entre os dias 14 e 18 após o cio, portanto dias 13 a 17 da gestação, e o segundo após 25 dias da manifestação de cio, ou seja 24º dia da gestação. Apesar do presente estudo, assim como Silva & Ginther (2010), não terem encontrado diferença significativa entre cornos (entre 14 e 18 dias) como descrito por Ford et al. (1979), é possível observar um padrão de índice de resistência menor no corno gestante em relação ao contralateral no grupo CG. Esse primeiro aumento relatado por Ford et al. (1979) foi associado a uma ação local do conceito reduzindo o efeito vasoconstritor da artéria uterina do corno grávidico provocado pelo efeito da alta concentração de progesterona durante essa fase (Lindner et al., 1964; Morris & Sass, 1966). Provavelmente a discrepância entre os resultados desses estudos esteja no método de detecção do fluxo sanguíneo, no qual o uso da sonda eletromagnética pode ter sido mais sensível em detectar alterações menores do fluxo arterial em relação ao modo Doppler espectral utilizado neste experimento e por Silva &

Ginther et al. (2010). Em relação à diferença do índice de resistência entre as artérias uterinas encontrado a partir do dia 22 em nosso estudo, este achado está compatível com o segundo aumento descrito por Ford et al. (1979) após 25 dias da manifestação do cio, 24º dia da gestação, e por Silva & Ginther (2010) durante os dias 23 e 24 da gestação. Essa diferença do RI entre cornos durante essa fase confirmam os resultados encontrados na avaliação subjetiva do fluxo vascular endometrial pelo modo color Doppler (Figura 4).

Na Figura 9, o RI da artéria uterina ipsilateral ao embrião e/ou ao CL foi comparado entre os grupos CNG, CPCL e CG. Efeitos de grupo e dia foram significativos ($P=0,0223$ e $P<0,0016$, respectivamente).

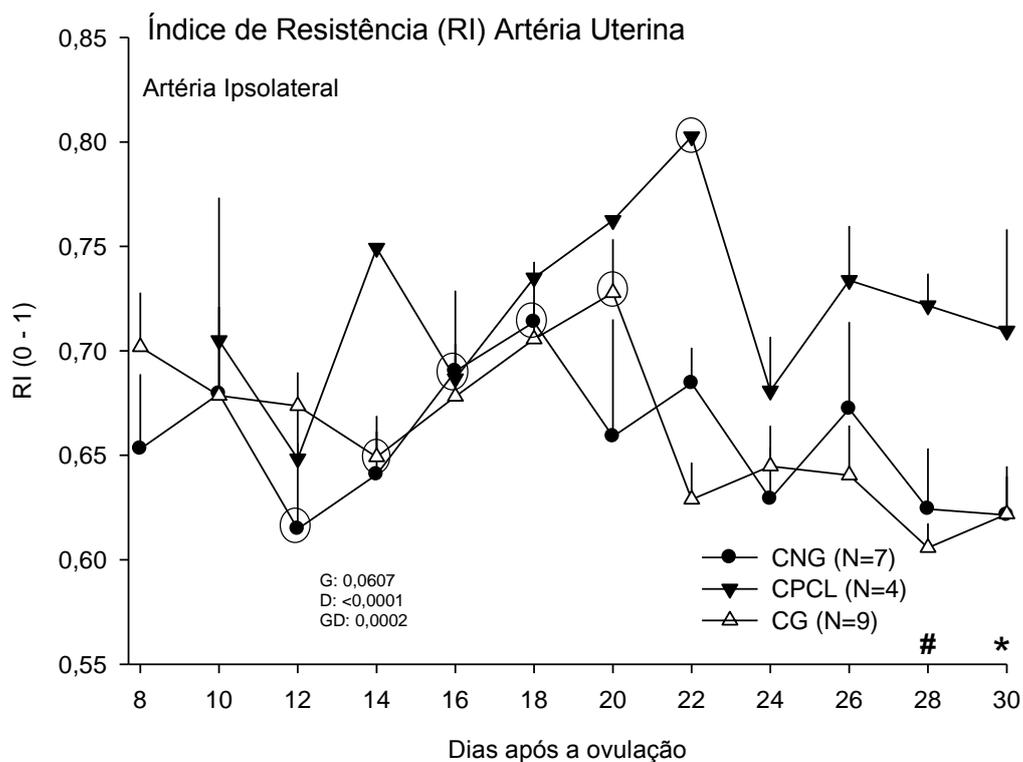


Figura 9 - Médias \pm EPM do índice de resistência vascular (RI) das artérias uterinas ipsilateral, ao embrião, ou ao CL (grupo CPCL), avaliadas por ultrassonografia no modo Doppler-spectral, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, em escores objetivos (0-1). Em três grupos experimentais do estudo (CNG, CPCL

e CG). CG = gestações normais de embriões produzidos (*in vivo*), CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT e CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente. Anéis indicam o dia de detecção de mudança de direção do padrão de perfusão, aumento ou diminuição dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). Asteriscos (*) indicam o dia quando o RI dos grupos CNG e CG foi diferente em relação ao grupo CPCL ($P \leq 0,05$). Jogo da velha (#) indicam o dia quando o RI dos grupos CNG e CG obteve tendência à significância ($0,05 < P \leq 0,1$).

O RI foi maior no grupo CPCL do que nos grupos de gestações normais (CG e CNG) apenas no dia 30 ($P=0,0223$) e no dia 28 apresentou tendência. Porém é possível observar no gráfico uma maior média de índice de resistência vascular para o grupo CPCL em relação aos outros dois grupos desde o dia 22 da gestação em diante, ou seja, indicando fluxo sanguíneo uterino reduzido em comparação aos outros dois grupos. Nesse mesmo período, a análise subjetiva do fluxo endometrial do corno ipsolateral apresentou maior vascularização, a partir do dia 22 e 24, para o grupo CG e CNG, respectivamente, em comparação ao CPCL. De uma maneira geral, através da análise de todos esses dados de ultrassonografia Doppler, podemos evidenciar que os conceitos dos grupos CAG e CPCL falharam em alguma fase da gestação inicial em estimular uma resposta vascular uterina para suprir suas necessidades de desenvolvimento durante o período de peri-implantação.

7.3 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE PROGESTERONA

O grupo CAG foi retirado da análise estatística por apresentar dados de amostras de sangue colhidas de apenas um animal até o dia 30. As coletas seguiram o mesmo cronograma dos exames ultrassonográficos (Figura 2), de dois em dois dias a partir do dia 6 até o dia do abate. Essas amostras foram analisadas para a dosagem de progesterona e as médias dessas concentrações estão apresentadas na Figura 10.

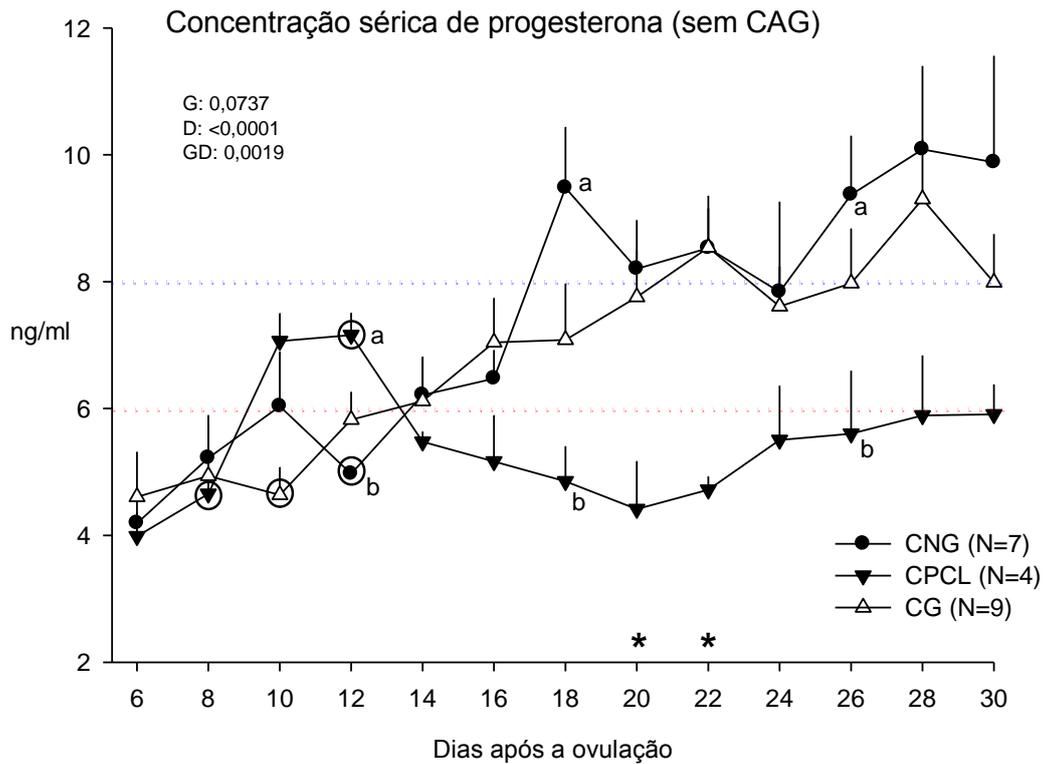


Figura 10 - Médias \pm EPM da concentração sanguínea de progesterona, do dia 8 até o dia 30 pós-ovulação, dos três grupos CNG, CPCL e CG. CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT; CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente e CG = gestações de embriões produzidos *in vivo*. Anéis indicam mudança de direção da concentração de progesterona, aumento ou diminuição, dos valores ao longo do tempo. As letras minúsculas (a e b) indicam no dia a diferença de concentração sanguínea de progesterona entre dois grupos ($P \leq 0,05$). * indicam o dia quando a perfusão vascular dos grupos CNG e CG foi diferente em relação ao grupo CPCL ($P \leq 0,05$).

Na análise dos dados de concentração de progesterona foi encontrado interação entre grupo e dia ($P=0,0019$) (Figura 10). O grupo CNG apresentou concentrações sanguíneas maiores de P4 que o grupo CPCL nos dias 18, 20, 22 e 26 ($P < 0,05$). O grupo CG apresentou valores maiores que o CPCL apenas nos dias 20 e 22 ($P < 0,05$). Porém, é possível observar, que a concentração de P4 dos grupos CG e CNG seguem patamares maiores em relação ao grupo CPCL a partir do dia 18. É nesse momento em que as concentrações de P4 entre os três grupos começam a se diferenciar. Enquanto o

grupo CPCL mantém valores baixos (abaixo de 6 ng/ml, linha tracejada vermelha), os outros dois grupos gestacionais normais, CG e CNG, começam a aumentar os seus valores, sendo que o CNG apresenta um aumento repentino de 46% do dia 16 ao dia 18 ($P < 0,05$) e o CG eleva gradualmente, cerca de 21%, do dia 16 ao dia 22 ($P < 0,05$) atingindo valores elevados junto ao grupo CNG (próximos a 8 ng/ml, linha tracejada azul) a partir do dia 20.

Diversos estudos sobre concentração de progesterona sanguínea durante a gestação apresentam resultados muito variados entre si (Short et al., 1958; Stabenfeldt et al., 1970; Donaldson et al., 1970). Isso se deve às diferenças de metodologias usadas nas análises, idade e raça dos animais utilizados, e até mesmo uma considerável variabilidade individual. Uma revisão sobre a insuficiência de progesterona durante gestações iniciais em mulheres afirma que, por conta da progesterona ser liberada de forma sustentada, amostras sanguíneas apresentam níveis variados em um curto espaço de tempo, e podem não ser confiáveis para determinar a necessidade ou o efeito do suporte lúteo (Shah & Nagarajan, 2013). Dessa forma, a comparação analítica de dados de progesterona obtidos neste estudo com os existentes na literatura pode não ser tão preciso. Por outro lado, alguns estudos retrospectivos em vacas de leite demonstram existir uma relação linear e quadrática entre o nível de progesterona durante a primeira semana de gestação e a taxa de sobrevivência embrionária, ou seja, indicando um nível ótimo de progesterona durante esse período (Stronge et al., 2005; Diskin et al., 2006; Parr et al., 2012), portanto níveis muito elevados ou muito baixos podem impactar em resultados negativos na taxa de sobrevivência embrionária (Geisert & Bazer, 2015).

Baseado nesse contexto, analisando isoladamente a concentração média menor de progesterona (6 ng/ml) apresentado pelo grupo CPCL, a partir do dia 14, pode-se sugerir que essa concentração seja baixa podendo prejudicar o desenvolvimento e,

consequentemente, a manutenção da gestação. O nível baixo de progesterona durante a gestação inicial é uma das grandes causas de aborto espontâneo em estudos em humanos (Porter & Scott, 2005; Nardo & Sallam, 2006; Daya, 2009). Porém, o fato mais importante e interessante sobre o padrão diário da concentração da progesterona do grupo CPCL, foi a queda brusca de 23% do D12 para o D14 e posterior manutenção neste patamar, em valores inferiores a 6 ng/ml até o final das coletas. Esse comportamento decrescente da progesterona durante esse período, se difere dos outros grupos gestacionais neste estudo e de vários outros relacionados ao perfil da progesterona durante a fase inicial da gestação (Short et al., 1958; Stabenfeldt et al., 1970; Donaldson et al., 1970; Stronge et al., 2005; Diskin et al., 2006; Parr et al., 2012), em que a concentração de progesterona desde a formação do corpo lúteo se mantém em crescimento até aproximadamente o terceiro mês de gestação (Senger et al., 2004). Além disso, a manutenção da progesterona em uma concentração menor após ter sofrido a queda, também é outro ponto intrigante. Provavelmente, os CLs das receptoras desse grupo podem ter sofrido luteólise funcional parcial, ocasionado por uma deficiente comunicação do concepto-útero durante o crítico período de reconhecimento materno, ou esses conceptos clones não conseguiram estimular o CL a aumentar a sua atividade secretória de progesterona, liberando fatores o suficiente apenas para manter a produção de P4 em um nível basal após o reconhecimento materno da gestação. Shirasuma et al. (2015) sugeriram que o IFN- τ pode beneficiar indiretamente a produção de progesterona pelo CL. Assim, apesar do presente estudo não ter mensurado o IFN- τ nos grupos, esse fator pode ser determinante no aparecimento desses fenótipos gestacionais de embriões clones.

Os resultados da análise de concentração sanguínea de progesterona juntamente com os dados de vascularização uterina, obtidos pela ultrassonografia Doppler, sugerem

que o grupo CPCL, que representa um fenótipo de gestação deficiente de embriões clonados por SCNT, além de não conseguir modular a vascularização endometrial semelhantemente aos grupos de gestação normal, CG e CNG, não é capaz de estimular o CL a produzir o mesmo nível de progesterona observado nos grupos de gestação normal. Dessa maneira a progesterona produzida pelo grupo CPCL em menor quantidade pode não ser suficiente em gerar um ambiente uterino ideal para o desenvolvimento do concepto, resultando dessa maneira um ciclo que não é autossustentável, ou seja, a manutenção desse fenótipo consegue se prolongar por um tempo limitado, dependendo do grau de estímulo e resposta, entre a comunicação embrião-útero-corpo lúteo.

7.4 DESCRIÇÃO DOS ACHADOS *IN SITU* E DAS ESTRUTURAS DETECTADAS POR ULTRASSONOGRAFIA

Após o abate dos animais foram realizadas anotações sobre a assimetria entre os cornos, a existência de embrião e sua localização, e do grau de desenvolvimento das carúnculas e vesículas embrionárias (VE). A figura 11 ilustra alguns dos achados de desenvolvimento de cada uma dessas observações.

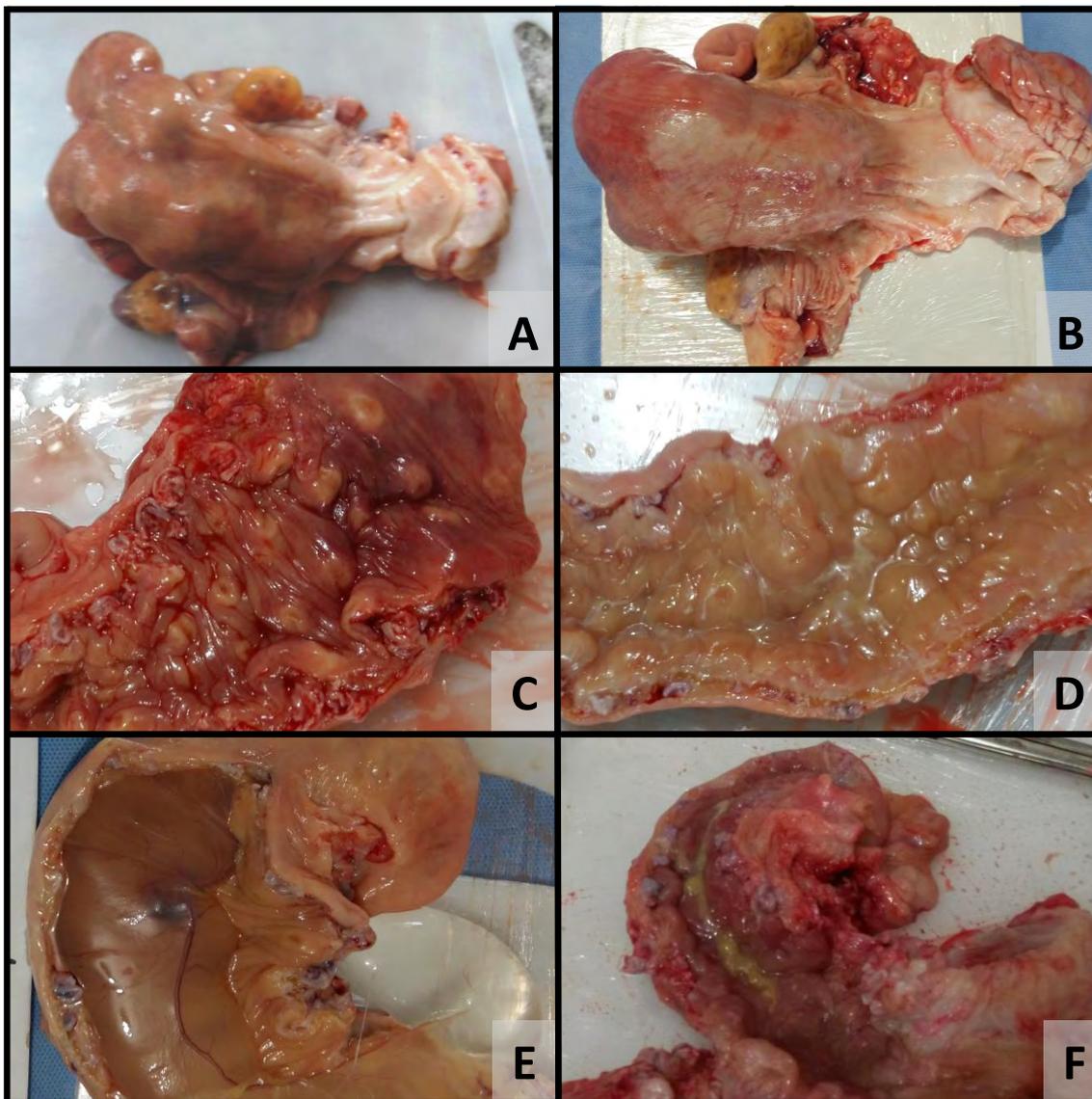


Figura 11 - Amostras de útero das receptoras após o abate em análise macroscópica. A) Útero com aspecto de simetria entre os cornos uterinos; B) Útero com aspecto de assimetria entre os cornos uterino; C) Carúnculas desenvolvidas; D) Carúnculas subdesenvolvidas; E) Vesícula embrionária desenvolvida e preenchendo completamente o corno uterino; F) Vesícula embrionária subdesenvolvida.

A Tabela 2 mostra a frequência com que foram visualizados esses achados após o abate, e as médias das primeiras visualizações da VE e batimento cardíaco por ultrassonografia ao longo da gestação em cada grupo estudado.

Tabela 2. Características macroscópicas do trato reprodutivo dos animais abatidos nos quatro grupos em estudo para os seguintes parâmetros: simetria dos cornos uterinos, desenvolvimento das carúnculas endometriais, características da placenta, momento da primeira detecção da vesícula embrionária e do batimento cardíaco do embrião.

Grupo	Dia da Gestação	Assimetria de Cornos (%)	Carúnculas desenvolvidas (ao menos em 1 corno; %)	Carúnculas desenvolvidas (2 cornos; %)	VE (ao menos em 1 corno; %)	VE (2 cornos; %)	VE (dias)	Batimentos cardíacos (dias)
CG	35,6	100 (9/9) ^a	100 (9/9) ^a	33 (3/9) ^{ab}	100 (9/9) ^a	56 (5/9) ^{ab}	24 ± 0,8	26,9 ± 0,8
CNG	35,4	57 (4/7) ^b	100 (7/7) ^a	71 (5/7) ^a	100 (7/7) ^a	86 (6/7) ^a	25,7 ± 0,7	29,1 ± 1,4
CAG	34	0 (0/3) ^b	67 (2/1) ^{ab}	0 (0/3) ^b	33 (1/3) ^b	0 (0/3) ^b	26 ± 1,2	-
CPCL	32	25 (1/4) ^b	0 (0/4) ^b	0 (0/4) ^b	0 (0/4) ^b	0 (0/4) ^b	-	-

CG: gestações de embriões produzidos *in vivo* por inseminação artificial e transferidos em receptoras no sétimo dia de seu desenvolvimento; CNG: gestações de embriões clonados com presença de vesícula placentária, embrião com batimento cardíaco e corpo lúteo; CAG: gestação anembrionada com presença de vesícula placentária e corpo lúteo e ausência de embrião com batimento cardíaco; CPCL: animais com corpo lúteo persistente; Assim: (%) Carúnculas desenvolvidas (ao menos em 1 corno): representa a porcentagem de animais que, em cada grupo, apresentaram carúnculas desenvolvidas em pelo menos um dos cornos; Carúnculas desenvolvidas 2 cornos: Representa a porcentagem de animais que, em cada grupo, apresentam carúnculas desenvolvidas nos 2 cornos uterinos; VE (ao menos em 1 corno): representa a porcentagem de animais que, em cada grupo, apresentaram vesícula embrionária desenvolvida em pelo menos um dos cornos; VE (2 cornos): representa a porcentagem de animais que, em cada grupo, apresentaram vesícula embrionária desenvolvida nos dois cornos uterinos; VE (dias): Dia da primeira detecção da vesícula embrionária durante os escaneamentos ultrassonográficos; B. Cardíaco (dias): Dia da primeira detecção do batimento cardíaco do embrião durante os escaneamentos ultrassonográficos.

Em relação à assimetria de cornos todos os animais do grupo CG apresentaram frequência de ocorrência maior (100%) em relação aos três grupos de embriões clonados ($P < 0,05$) CNG, CAG e CPCL, que obtiveram taxa de 57%, 0% e 25%, respectivamente. Em relação ao desenvolvimento de carúnculas e da VE em ao menos em um dos cornos uterinos, os grupos CG e CNG apresentaram maior frequência de ocorrência (100%) em relação ao grupo CPCL, no qual nenhum animal apresentou VE e carúnculas desenvolvidas ($P < 0,05$). Dois animais do grupo CAG apresentaram carúnculas desenvolvidas (67%), o que não diferiu da ocorrência nos grupos CG e CNG ($P > 0,05$), e desses dois, apenas um (33%) desenvolveu VE em pelo menos um dos cornos, sendo uma frequência menor que os grupos CG e CNG ($P < 0,05$).

Em relação à presença de carúnculas e VE desenvolvidas nos dois cornos uterinos, nenhum animal dos grupos CAG e CPCL se enquadrava nessa condição, o que gerou uma frequência menor dessa observação em relação ao grupo CNG ($P < 0,05$), mas não diferente de CG ($P > 0,05$). O grupo CNG apresentou taxa de 71% e 86%, respectivamente; enquanto que o CG obteve 33% e 56%, respectivamente. É importante salientar que uma receptora do grupo CAG apresentou VE e carúnculas subdesenvolvidas, e três receptoras do grupo CPCL apresentaram VE subdesenvolvidas, rudimentares e sem preenchimento de líquido com aspecto amarelado e ausência de vascularização, e uma quarta receptora não foi visualizada a VE.

Estudos sobre o desenvolvimento do embrião e seus anexos durante o período de placentação relataram o preenchimento do saco coriônico pelo alantoide, completando a formação do alantocóron, desenvolvido e preenchido por líquido, no corno ipsilateral à presença do embrião próprio por volta do dia 32, e por sua vez finalizando o seu preenchimento no corno contralateral entre os dias 35 e 37 da gestação (Melton et al., 1951; Curran et al., 1986). Esses eventos estão de acordo com as observações da

assimetria de cornos detectado nos animais deste estudo com idade gestacional por volta de 35 dias. Nesses animais foi identificado o momento da transição do preenchimento do alantocóron por líquido, ocorrendo primeiro no corno ipsolateral à presença do embrião e depois no contralateral. Em todos os animais do grupo CG foi encontrada assimetria de cornos, enquanto que quase metade dos animais do grupo CNG apresentaram cornos assimétricos. A diferença encontrada nos dois grupos, CG e CNG, pode ser explicada pelo processo de desenvolvimento do alongamento da VE, em que alguns animais do grupo CNG, que apresentaram simetria entre cornos, podem estar um pouco mais adiantados no processo de placentação em relação ao grupo CG apresentando desta maneira, os dois cornos completamente preenchidos por líquido, gerando cornos mais simétricos. Já os outros dois grupos de clones, CAG e CPCL, por apresentarem falhas de desenvolvimento durante a placentação, não conseguiram desenvolver por completo o alantocóron, acarretando em uma similaridade de tamanho entre cornos uterinos, exceto um animal do grupo CPCL que apresentou assimetria entre cornos.

As características de desenvolvimento das carúnculas e VE também refletem o maior grau de evolução das gestações normais, CG e CNG, em relação aos grupos gestacionais alterados, CAG e CPCL. O padrão de maior desenvolvimento das carúnculas do corno ipsolateral ao embrião em relação ao contralateral visualizado na maioria das gestações, também estão temporalmente de acordo com a literatura. Curran et al. (1986) detectaram a presença de placentônios por ultrassonografia em modo B próximo ao embrião a partir do dia 35. Em relação a isso, Melton et al. (1951), em observações *in situ*, não detectaram placentônios no corno contralateral até o dia 39 da gestação. Ou seja, através desses estudos podemos observar que em torno do dia 35 ainda não houve o completo processo de estímulo de desenvolvimento das carúnculas

no corno oposto para a formação de placentônios. Mesmo não apresentando diferença estatística em relação à frequência das observações entre os grupos CG e CNG, é possível destacar que a porcentagem dos animais que apresentaram carúnculas desenvolvidas nos dois cornos foi maior que o dobro da frequência encontrada nos animais do grupo CG. Essa observação nos indica que o grupo CNG apresenta um adiantamento de desenvolvimento placentário em relação ao grupo controle, modulando de maneira mais sincronizada os dois cornos uterinos. Essa ideia reforça os achados de ultrassonografia Doppler, no qual não observamos diferença de vascularização endometrial e mesometrial entre os cornos ipso e contralateral, como ocorreu nos animais do grupo controle, durante a elevação de perfusão vascular após o dia 22.

Em relação ao desenvolvimento morfológico do embrião e da placenta pela ultrassonografia, a média em dias da primeira visualização da VE dos grupos CG, CNG e CAG ocorreram em dias semelhantes, 24, 26 e 26, respectivamente ($P>0,05$). Também não foi encontrado diferença para a média da primeira visualização dos batimentos cardíacos entre os grupos CG e CNG, 27 e 29, respectivamente ($P>0,05$). A primeira detecção da VE foi próxima ao relatado por Curran et al., (1986), no qual, em média a primeira detecção ocorreu no dia 23, com variação entre os dias 22 e 25. Já em relação aos batimentos cardíacos, em média a primeira detecção ocorreu aos 21 dias com variação entre os dias 19 e 24, mais precoce em relação aos nossos achados. Esse atraso pode ser referente à diferença da metodologia e frequência dos escaneamentos ultrassonográficos utilizada neste estudo em relação ao relatado por Curran et al. (1986), que avaliou diariamente o desenvolvimento e aparecimento dos anexos embrionários, enquanto que neste estudo as receptoras eram escaneadas a cada dois dias e a varredura pelo embrião era realizada de maneira mais conservadora, a fim de, preservar as gestações evitando o excesso de manipulação transretal.

Além da análise de vascularização uterina acompanhado pela ultrassonografia Doppler, outro fator importante de comparação entre os grupos CG e CNG é o nível de desenvolvimento dos conceitos desses grupos através do acompanhamento do comprimento do maior eixo do embrião, demonstrado na Figura 12, avaliado por ultrassonografia em B-mode, a partir da sua primeira detecção até o momento do abate.

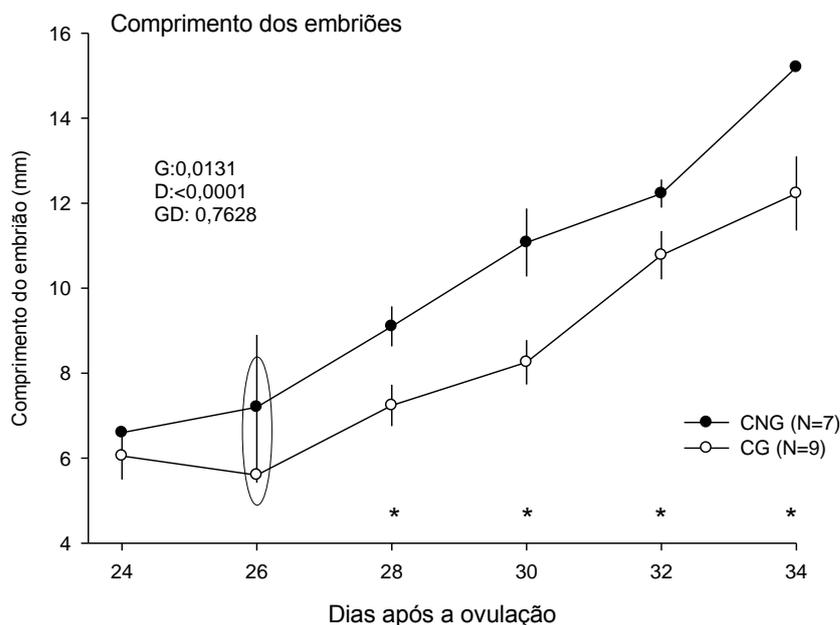


Figura 12 - Médias \pm EPM do comprimento, em milímetros, dos embriões dos grupos CNG = Gestações normais de embriões clonados e CG = Gestações normais de embriões produzidos in vivo, avaliados por ultrassonografia durante o intervalo entre os dias 24 e 34 de gestação. Anel indica o dia de detecção de mudança de direção do comprimento embrionário, aumento dos valores ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). Asteriscos (*) indicam dia quando o comprimento embrionário foi diferente ($P \leq 0,05$) (Fonte: Monteiro, 2016)

A análise de comprimento embrionário apresentou efeitos principais de grupo e de dia ($P=0,0131$ e $P<0,0001$, respectivamente), sendo que a partir do dia 26 até o dia 34 os embriões aumentaram de tamanho. A partir do dia 28 os embriões do grupo CNG apresentaram maior comprimento em relação ao grupo CG ($P<0,05$). Esse dado reforça as observações obtidas no abate, no qual as receptoras do grupo CNG apresentaram um adiantamento de desenvolvimento placentário em relação ao grupo controle. Apesar do

comprimento embrionário do grupo CNG ter sido maior em relação ao CG, seus valores condizem com estudos de desenvolvimento embrionário em gestações de vacas *Bos taurus taurus* avaliadas por ultrassonografia (Curran et al., 1986) e pós-abate (Melton et al., 1950), ou seja, provavelmente o desenvolvimento do embrião do grupo CG pode estar um pouco atrasado em relação ao grupo CNG e ao encontrado na literatura. Porém é importante ressaltar que alguns fatores, como raça e sexo do embrião e mudança de ambiente uterino, podem interferir no seu desenvolvimento. Mesmo com essa diferença de crescimento temporal, os embriões dos dois grupos apresentaram um crescimento contínuo e regular, como descrito por Bertolini et al. (2001) em gestações de clones bovinos.

7.5 ABUNDÂNCIA PROTEICA

As amostras de endométrio obtidas após o abate foram submetidas à quantificação relativa das proteínas VEGF e seu receptor do tipo 2 (VEGF-R2) pela técnica de Western Blotting. Nesse estudo foram encontradas as bandas de 32 e 46 KDa para o VEGF. Para o VEGFR-2, foi encontrada somente a banda de 75 KDa. As análises de abundância relativa de proteína para VEGF e VEGFR-2, normalizadas pela β -actina, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos avaliados. Abaixo, a Figura 13 ilustra a distribuição dos resultados por indivíduo e as médias da quantidade das proteínas VEGF e VEGFR-2 em relação à β -actina em amostras de endométrio, em cada grupo estudado.

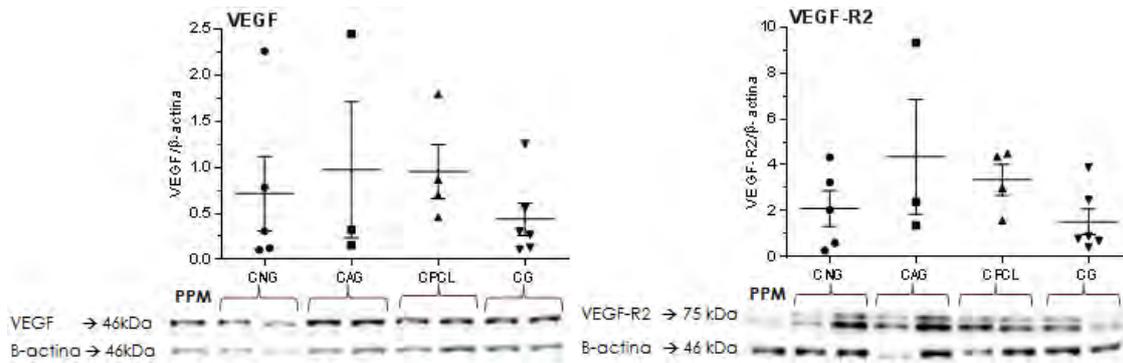


Figura 13 - Médias \pm EPM e valores individuais da quantidade relativa de proteína, de 46 kDa, VEGF (A) e, 75 kDa, VEGF-R2 (B) em relação aos níveis de β -actina de amostras do endométrio dos grupos CG = gestações normais de embriões produzidos in vivo, CNG = gestações normais de embriões clonados por SCNT, CAG = gestações anembrionada de embriões clonados por SCNT e CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente.

O VEGF é considerado um dos principais fatores responsáveis pelo desencadeamento da vasculogênese durante a formação e estabelecimento da placenta ao longo de toda a gestação (Reynolds & Redmer, 2001; Pfarrer et al., 2006). Em bovinos, um estudo de imunolocalização encontrou a presença de VEGF e seus receptores, VEGF-R1 e VEGF-R2, ao longo da gestação em células do endotélio endometrial, trofoblasto e nos epitélios glandular e luminal (Pfarrer et al., 2006). O VEGFA possui 5 principais variantes formadas por diferentes *splicings*: 121, 145, 165, 189 e 206 (Byrne et al., 2005). No presente estudo foram encontradas as bandas de 32 e 46 kDa, as quais são associadas com as variantes 121 e 165, respectivamente. Já em relação ao VEGF-R2 a única banda encontrada foi a de 75 kDa, o que difere em relação a outros estudos, que encontraram proteínas grandes, de 180 kDa (Fatima et al., 2013).

A banda de proteína de baixo peso molecular do VEGF-R2 encontrada neste estudo, pode representar apenas um segmento desse receptor, ou seja, esse receptor pode ter sofrido uma clivagem, gerando o fragmento de 75 kDa. Com base nisso,

Basagiannis & Christoforidis (2016) mostraram a ocorrência de endocitoses do VEGF-R2 como mecanismo de proteção à essas clivagens, o que permite a preservação estrutural do receptor de membrana para ser ativado posteriormente pelo fator de crescimento. Jin et al. (2013) em um estudo com ratos *knockout* para a enzima Cdc42, fator da família das GTPases importante na regulação de funções celulares, obtiveram falhas de vasculogênese e angiogênese durante a gestação inicial, acarretando em alta mortalidade embrionária e defeitos de formação vascular. Além dessas falhas de desenvolvimento vascular, foi encontrado nesses animais um aumento da quantidade de fragmento de proteína de 75 kDa para VEGF-R2 na imunoquantificação. Esse achado foi associado com o aumento da clivagem desse receptor, fração referente ao C-terminal de membrana. Dessa maneira, o VEGF é incapaz de se ligar ao receptor clivado, já que a sua ligação ocorre na fração que contém o N-terminal (fração solúvel), portanto a ação angiogênica e vasculogênica do VEGF não ocorre, ocasionando falhas de desenvolvimento vascular. Ou seja, podemos relacionar as altas quantidades de bandas de 75 kDa, fragmento da proteína de VEGF-R2, com ausência de efeito angiogênico, pois o VEGF não conseguirá se ligar ao receptor de membrana clivado e gerar estímulo para angiogênese ou vasculogênese.

No presente estudo, os níveis de proteínas VEGF e seu receptor no endométrio não apresentaram diferenças entre grupos ($P > 0,05$), apesar da menor perfusão vascular, detectada pela ultrassonografia Doppler nos grupos CAG e CPCL. Outros estudos durante o primeiro mês de gestação também não encontraram diferença na quantidade de expressão de VEGF e seus receptores entre gestações de clones e controle, em amostras de saco vitelínico (Mess et al., 2017) e entre gestações de clones e de embriões de FIV em carúnculas e membrana do corioalantoide bovino (Hoffert-Goeres et al., 2007). Porém, quando Mess et al. (2017) compararam gestações de embriões FIV com o

grupo controle, obtiveram maior abundância de VEGF e VEGF-R2, demonstrando que apesar do clone não ter apresentado diferença, outra técnica de reprodução assistida, envolvendo cultivo *in vitro*, apresentou alterações nos fatores de desenvolvimento vascular durante a gestação inicial. Essa elevada expressão pode ser reflexo do pobre desenvolvimento dos vilos do saco vitelínico presente nessas amostras, limitando a troca de gases e transporte de nutrientes.

Apesar de Mess et al. (2017) não terem encontrado diferenças de expressão de membros da família VEGF entre gestações de clones e controle, eles observaram em todas as gestações de clones, uma rede vascular deficiente e vilos pouco desenvolvidos. Além disso, Hoffert-Goeres et al. (2007) notaram uma tendência de maior expressão gênica do fator HIF-1 α (fator induzido por hipóxia) no grupo clone em relação às gestações de FIV. O HIF-1 α é produzido em situações de baixa tensão de oxigênio, estimulando a transcrição e produção de VEGF (Charnock-Jones et al., 2003). Esses dados evidenciam que apesar do sistema VEGF e seus receptores não estarem alterados em gestações de embriões clones, outros indicadores sinalizam que o desenvolvimento e a saúde dessas gestações de embriões clonados por SCNT já podem estar alterados em estágios iniciais da gestação gerando placentas malformadas, como detectado em vários estudos sobre a placentação de clones (Hill et al., 2000; Hashizume et al., 2002; Merighe, 2007; Chavatte-Palmer et al., 2012). Essas pequenas falhas durante o início da placentação podem causar alterações e limitações de desenvolvimento do concepto e membranas placentárias, que somadas, agravam ao longo da gestação até momentos próximos ao parto (Miglino et al., 2007). Dessa forma, Campos et al. (2010), diferentemente dos outros estudos em gestação inicial, confirmaram essas variações ao identificar elevada expressão de VEGF-R2, em clones machos, e tendência aumentada

do VEGF, em clones fêmeas, em placentônios durante o termo de gestações de clones bovinos.

Além do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) interferir na produção de VEGF, hormônios estrogênicos também atuam como importantes mediadores de vasculogênese, estimulando a produção de VEGF (Charnock-Jones et al., 1993; Shifren et al., 1996; Muller et al., 2000; Tasaki et al., 2010). Tasaki et al. (2010) relacionaram a atuação do estradiol induzindo o aumento da expressão de mRNA e proteína VEGF durante o estro e fase inicial do diestro, respectivamente. A localização em células não endoteliais e as mudanças da expressão do VEGF que ocorre na placenta é dependente da fase gestacional (Pfarrer et al., 2006), sugerindo a sua participação em outras funções fisiológicas além da regulação de crescimento celular, diferenciação e controle na angiogênese e neovascularização (Sousa et al., 2012). Alguns estudos *in vitro* relataram outras funções menos conhecidas do VEGF, como a modulação da esteroidogênese pela placenta (Sousa et al., 2012) e atuação na produção de PGF2 α em células endometriais (Tasaki et al., 2010). Sousa et al. (2012) detectaram alterações dos níveis de sulfato de estrona e de progesterona em células placentárias, após tratamento com VEGF em diferentes fases da gestação de controle e clone. Além disso, observaram que, os níveis desses hormônios, após esse tratamento em células placentárias, alteraram de forma diferente dependendo do tipo de gestação.

Em busca de obter mais informações a respeito da existência de diferença entre os grupos, visto que, os resultados de VEGF e VEGFR-2 não apresentaram diferença estatística entre os quatro grupos, observamos que, as médias numéricas dos grupos CNG e CG apresentam patamares de VEGF e do seu receptor tipo 2 mais próximos entre si, e ambos menores em relação aos grupos CAG e CPCL. Isso pode indicar que o ambiente uterino dos grupos gestacionais considerados normais, CNG e CG,

apresentam um estado fisiológico diferente comparado aos anormais, CAG e CPCL. De acordo com essa ponderação, reunimos na Figura 14 dois gráficos indicando a média dos dados de VEGF e seu receptor comparando esses dois grupos, gestações normais - GN (CNG e CG) e gestações alteradas - GA (CAG e CPCL).

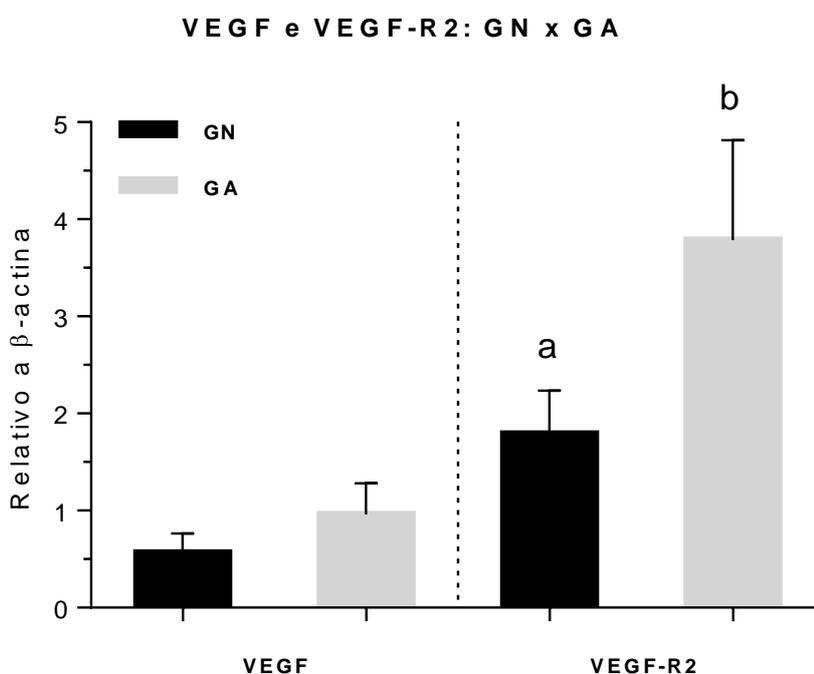


Figura 14 - Médias \pm EPM da quantidade relativa de proteína VEGF (duas barras à esquerda) e VEGF-R2 – 75 kDa (duas barras à direita) em relação aos níveis de β -actina de amostras do endométrio. Barras pretas indicam os grupos de gestação normal GN (CG e CNG) e as barras brancas indicam os grupos alterados GA (CAG e CPCL). CG = gestações normais de embriões produzidos *in vivo*, CNG = gestações normais de embriões clonados pro SCNT, CAG = gestações anembrionada de embriões clonados por SCNT e CPCL = receptoras de embriões clonados por SCNT, apresentando somente CL persistente. As letras minúsculas (a e b) indicam diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

A quantidade de VEGF não foi diferente entre os dois novos grupos gestacionais, porém o VEGF-R2 apresentou uma média maior no grupo de gestações alteradas (GA) em relação ao grupo de gestações normais (GN) ($P < 0,05$). O nível elevado do fragmento de proteína de 75 kDa do receptor de VEGF tipo 2 nos grupos

alterados pode ter resultado num bloqueio da atuação efetiva do estímulo de vascularização pelo VEGF, como descrito por Jin et al. (2013) em estudo com camundongos. Essa ideia confirma o maior desenvolvimento caruncular e da VE, dos grupos CG e CNG em relação aos grupos CAG e CPCL, durante as observações *in situ* pós-abate. Além da quantificação dos fatores angiogênicos nos grupos, a alta variabilidade individual existente em cada grupo clone é outro fator de relevante atenção, em que, também é observado em outros estudos desses fatores em gestações clone (Hoffert-Goeres et al., 2007; Campos et al., 2010; Mess et al., 2017). Essa alta variabilidade individual, apresentado anteriormente na Figura 13, é um dos grandes responsáveis por dificultar agrupar esses indivíduos (tão distintos entre eles), o que prejudica encontrar diferenças significativas em análises de comparações em relação ao grupo controle. Por conta disso, a reunião desses dados em grupos pode mascarar expressões anormais de genes presentes em cada indivíduo clone, portanto uma análise individual desses animais pode trazer informações mais importantes do que uma simples análise entre grupos (Campos et al., 2010).

Por fim, foi verificado que os quatro grupos, quando analisados separadamente, apresentaram níveis de VEGF e VEGF-R2 semelhantes entre si, mas provavelmente estímulos diferentes entre os grupos provocaram o aumento desses fatores. Sugere-se que os níveis desses fatores nos grupos considerados normais podem ser estímulos exclusivos da modulação do embrião, pelo aumento da demanda de nutrientes para o seu normal e completo desenvolvimento ao longo da gestação. Já nos grupos considerados alterados, sugere-se que os estímulos para o aumento da produção desses fatores provocados pelo concepto ocorram em menor intensidade, porém esses fatores podem sofrer estímulos de outras fontes, como a PGF2- α (Tasaki et al., 2010) e o estrogênio (Charnock-Jones et al., 1993; Shifren et al., 1996; Muller et al., 2000; Tasaki

et al., 2010). Infelizmente, nesse estudo não foram analisadas as concentrações de estradiol plasmática para a confirmação da hipótese de que o VEGF nos grupos alterados é modulado em maior quantidade pelo estrógeno. Análises de expressão gênica relativa (PCR) para o VEGF e seu receptor 2, em cada grupo, também poderiam elucidar se a expressão gênica dessas proteínas acompanha os níveis da produção das mesmas.

Ao analisar os dados de Western-Blotting juntamente com os de ultrassonografia, verificamos que apesar da abundância relativa das proteínas VEGF e VEGF-R2 serem semelhantes na comparação direta entre os quatro grupos, a perfusão vascular endometrial dos grupos alterados não atingiram o mesmo padrão vascular dos grupos normais avaliados pela ultrassonografia Doppler. Provavelmente, os patamares maiores de fragmento proteico de 75 kDa do VEGF-R2 nos grupos alterados bloquearam a atuação efetiva de vascularização do VEGF, como descrito por Jin et al. (2013). Ou então, fatores angiogênicos VEGF presentes nos grupos alterados pode sugerir que as gestações normais já alcançaram antecipadamente um nível de homeostasia vascular, conforme visualizado nos resultados de vascularização uterina por ultrassonografia Doppler, ou seja, estão em um nível satisfatório de renovação tecidual e provavelmente com baixos níveis de hipóxia tecidual. Já nas gestações dos grupos alterados, o desenvolvimento vascular está prejudicado, hipóxia está presente e, por consequência, uma maior quantidade de VEGF e seu receptor 2 estão sendo produzidos para estimular a angiogênese, porém sem efeito no aumento da vascularização endometrial, revelando um ambiente uterino em colapso. Esta possibilidade sugere outras formas de restrição do desenvolvimento vascular a níveis pós-estimulação pelos membros da família do VEGF.

8. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS ENCONTRADOS

Nossos resultados revelaram alterações morfológicas e vasculares sofridas pelo útero em gestações iniciais. Os dados de ultrassonografia Doppler e de concentração de progesterona sanguínea foram coletados desde um dia antes da TE até o dia 30 da gestação e mostraram temporalmente a variação de vascularização endometrial e de produção de progesterona em gestações de embriões bovinos clonados por SCNT e naturalmente produzidos. Esses dados foram importantes para a avaliação da evolução de cada fenótipo gestacional, os normais (CNG e CG) e os alterados (CAG e CPCL). Uma maior vascularização endometrial e de produção de progesterona sanguínea foi encontrado nos grupos gestacionais normais em relação aos alterados.

Esses achados pela ultrassonografia Doppler e de mensuração da concentração de progesterona sanguínea ao longo do tempo foram importantes para a interpretação dos resultados das análises pós-abate, por Western-Blotting e da morfologia gestacional *in situ*. A quantidade de proteínas VEGF e VEGF-R2 não diferiram entre os quatro grupos estudados, porém quando juntados os dados dos grupos normais em relação aos grupos alterados, o fragmento proteico de 75 kDa do receptor tipo 2 apresentou maior quantidade no grupo alterado em relação ao grupo normal. Segundo Jin et al. (2013), esse tipo de receptor de proteína fragmentado pode não gerar o efeito angiogênico, ou seja, isso pode indicar que o grupo de gestação alterada possui um desenvolvimento vascular menor do que o do grupo de gestação normal. Portanto, esse achado reforça o encontrado pela ultrassonografia Doppler, no qual revelou uma menor vascularização uterina nos grupos gestacionais alterados nos primeiros 30 dias de gestação. Por fim, os dados da análise morfológica *in situ* confirmaram todos os dados anteriores, revelando o

atrasado e pobre desenvolvimento placentário e caruncular dos grupos de gestação alterada.

Através da associação dos resultados encontrados foi possível descrever o comportamento das alterações vasculares uterinas frente aos diferentes fenótipos gestacionais durante a gestação inicial de bovinos. Os grupos de gestação normal, CG e CNG, de uma maneira geral, apresentaram semelhanças entre si, e também houve similaridade entre os grupos de gestação alterada, CAG e CPCL. Os grupos de gestações normais indicam uma modulação endócrina, morfológica e vascular do útero favorecendo o prosseguimento do desenvolvimento gestacional, ao contrário dos dois fenótipos gestacionais alterados cujos dados indicam o comprometimento do desenvolvimento desde a fase precoce da gestação.

De acordo com a literatura consultada, uma comunicação materno-concepto falha é normalmente encontrada em embriões clonados por SCNT, e nesse estudo encontramos diferenças no desenvolvimento inicial embrionário e placentário visualizados nos exames ultrassonográficos e macroscópicos do útero após o abate, sendo mais tardios e rudimentares nas amostras do grupo CAG e CPCL comparados aos grupos CNG e CG.

Esse estudo propiciou melhor entendimento da fisiologia endócrina, morfológica e vascular das gestações normais e alteradas de embriões clonados por SCNT. De maneira geral, os principais resultados de vascularização uterina modulado diferentemente nos quatro grupos gestacionais, o grau de desenvolvimento das carúnculas e VE avaliadas após o abate, a diferença de concentração de progesterona sanguínea entre o grupo de gestação normal e o grupo CPCL e a maior abundância relativa do VEGF-R2 presente nos grupos de gestações alterados em relação aos grupos

de gestações normais; podem enriquecer as discussões na área científica com novos padrões de gestações normais e/ou alteradas, que serão importantes no conhecimento dos fatores envolvidos na manutenção da gestação.

Estudos envolvendo gestações de embriões clonados são bastante utilizados por pesquisas focadas nas falhas genéticas, fenotípicas, de desenvolvimento embrionário/fetal e de vascularização placentária. Essas gestações de clones são adotadas como modelo de estudo dessas alterações, por apresentá-las em alta frequência em relação às gestações produzidas *in vivo*. A utilização da clonagem para esse fim se torna importante, pois facilita e viabiliza o delineamento de experimentos nessa área de pesquisa, não dependendo do acaso de se encontrar gestações alteradas para estudá-las.

9. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos deste estudo foi possível investigar as alterações morfovasculares existentes nos três fenótipos gestacionais e compará-los com gestações controle. Desse modo, a hipótese I a qual afirma que o desenvolvimento do concepto inicial é semelhante nos grupos CG e CNG e mais desenvolvida do que nos grupos CAG e CPCL, foi confirmada através das análises *in situ*, no qual detectou carúnculas e VE bem desenvolvidas nos grupos CG e CNG e pouco desenvolvidas ou ausentes nos grupos CAG e CPCL.

A hipótese II a qual afirma que os grupos CG e CNG apresentam maior grau de vascularização endometrial e mesometrial, comparados com os grupos CAG e CPCL foi parcialmente confirmada. Os exames de ultrassonografia Doppler, apenas detectaram maior perfusão vascular nos grupos CG e CNG em relação ao CPCL a partir do dia 24 até o dia 30, sendo que não foi possível comparar com o grupo CAG pelo número limitado de animais utilizados.

A hipótese III que afirma que os grupos CG e CNG apresentam maior concentração de progesterona no sangue, resultando em um maior desenvolvimento das carúnculas e vesícula embrionária, quando comparados aos grupos CAG e CPCL também foi parcialmente confirmada. O grupo CAG não foi analisado para a concentração sanguínea de progesterona, por haver amostras de sangue de apenas um animal desse grupo. A análise da concentração sanguínea de progesterona entre os três grupos, CNG, CAG e CPCL detectou maior concentração desse hormônio nos grupos CG e CNG em relação ao grupo CPCL nos dias 18, 20, 22 e 26; revelando dois patamares diferentes, sendo que os grupos de gestação normal, CG e CNG, atingiram e mantiveram níveis elevados, ao redor de 8 ng/ml a partir do dia 20, enquanto o CPCL a

partir do dia 14 estabeleceu níveis inferiores à 6 ng/ml até o fim das coletas (dia 30). Após o abate em análises macroscópicas *in situ* foi verificado maior grau de desenvolvimento e frequência de ocorrência de carúnculas e VE desenvolvidas nos grupos CG e CNG em relação aos grupos CAG e CPCL.

A hipótese IV a qual afirma que as proteínas VEGF e de seu receptor (VEGF-R2) estão presentes em maior quantidade nos grupos CG e CNG quando comparados aos grupos CAG e CPCL não foi confirmada. As análises de Western-blooting não detectaram diferença de abundância relativa desses dois fatores entre os quatro grupos estudados. Porém, quando os grupos de gestações normais (CG e CNG) foram comparados com os grupos de gestações alteradas (CAG e CPCL) foi detectado maior abundância relativa para o fragmento de 75 kDa da proteína de VEGF-R2 no grupo de gestações alteradas.

Por fim, a hipótese central no qual afirma que, as alterações morfovasculares do útero gestante durante o primeiro mês são moduladas em diferentes graus de forma dependente à qualidade de desenvolvimento do conceito presente foi comprovada. Dessa forma, esse estudo implicará em um melhor entendimento da fisiologia endócrina, morfológica e vascular das gestações normais e alteradas. Esses resultados enriquecerão as discussões na área científica com novos padrões de gestações normais e/ou alteradas, que serão importantes no conhecimento dos fatores envolvidos na manutenção da gestação.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A; PERKINS, J. Angiogenesis and intrauterine growth restriction. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*; 14: 981-998. 2000.
- ARNOLD, DR; FORTIER, AL; LEFEBVRE, R; MIGLINO, MA; PFARRER, C; SMITH, LC. Placental Insufficiencies in Cloned Animals - A Workshop Report. *Placenta* 29, Supplement A, Trophoblast Research; 22: S108-S110. 2008.
- ASSIS NETO, AC; SANTOS, ECC; PEREIRA, FTV; MIGLINO, MA. Initial Development of Bovine Placentation (*Bos indicus*) from the Point of View of the Allantois and Amnion. *Anatomia e Histologia Embryologia*; 38: 341-347. 2008.
- BARUSELLI, PS; REIS, EL; MARQUES, MO; NASSER, LF; BÓ, GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 479-486. 2004.
- BAUERSACHS, S; ULBRICH, SE; GROSS, K; SCHMIDT, SE; MEYER, HH; WENIGERKIND, H; VERMEHREN, M; SINOWATZ, F; BLUM, H; WOLF, E. Embryo-Induced Transcriptome Changes In Bovine Endometrium Reveal Species-Specific And Common Molecular Markers Of Uterine Receptivity. *Reproduction*; 132:319-331. 2006.
- BAUERSACHS, S; ULBRICH, SE; ZAKHARTCHENKO, V; MINTEN, M; REICHENBACH, M; REICHENBACH, HD; BLUM, H; SPENCER, TE; WOLF, E. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proc Natl AcadSci USA*; 106:5681-5686. 2009.
- BAUERSACHS, S; WOLF, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Animal Reproduction Science*; 134:84-94. 2012.
- BAZER, FW; OTT, TL; SPENCER, TE. Endocrinology of the Transition from Recurring Estrous Cycles to Establishment of Pregnancy in Subprimate Mammals. *Endocrinology of Transition*. 1998.
- BAZER, FW; WU, G; SPENCER, TE; JOHNSON, GA; BURGHARDT, RC; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol HumReprod*; 16: 135-152. 2010.
- BAZER, FW; SONG, G; THATCHER, WW. Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. *J. Anim. Sci.* January; 25, No. 1 : 1 - 16. 2012.
- BERTOLINI, M; MASON, J B; BEAM, SW; CARNEIRO, GF; SWEEN, ML; KOMINEK, DJ; MOYERA, AL; FAMULA, TR; SAINZ, RD; ANDERSON, GB. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology*; 58: 973-994. 2002.
- BOROWICZ, PP; ARNOLD, DR; JOHNSON, ML; GRAZUL-BILSKA, AT; REDMER, DA; REYNOLDS, LP. Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. *Biology of Reproduction*; 76: 259-267. 2007.

- BOURC'HIS, D; LE BOURHIS, D; PATIN, D; NIVELEAU, A; COMIZZOLI, P; RENARD, JP, VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.*; 11: 1542-1546. 2001.
- BREIER, G. Angiogenesis in Embryonic Development—A Review. *Placenta*; 21: S11-S15. 1999.
- BYRNE, AM; BOUCHIER HAYES, DJ; HARMEY, JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine*; 9(4): 777-794. 2005.
- CAMPBELL, KHS; FISHER, P; CHEN, WC; CHOI, I; KELLY, RDW; LEE, JH; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*; 68:214–231. 2007.
- CAMPOS, DB; PAPA, PC; MARQUES JR, JEB; GARBELOTTI, F; FÁTIMA, LA; ARTONI, LP; BIRGEL JR., EH; MEIRELLES, FV; BURATINI JR., J; LEISER, R; PFARRER, C. Somatic cell nuclear transfer is associated with altered expression of angiogenic factor systems in bovine placentomes at term. *Genetics and Molecular Research*; 9 (1): 309-323. 2010.
- CHARNOCK-JONES, DS; SHARKEY, AM; RAJPUT-WILLIAMS, J; BURCH, D; SCHOFIELD, JP; FOUNTAIN, SA; BOOCOCK, CA; SMITH, SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod*; 48: 1120-1128. 1993.
- CHARNOCK-JONES, DS; KAUFMANN, P; MAYHEW, TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25:103-113. 2004.
- CHAVATTE-PALMER, P; CAMOUS, S; JAMMES, H; LE CLEAC'H, N; GUILLOMOT, M; LEE, R.S.F. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta* 33; Supplement A, Trophoblast Research, 26: 99-104. 2012.
- CLEMENTE, M; DE LA FUENTE, J; FAIR, T; AL NAIB, A; GUTIERREZ-ADAN, A; ROCHE, JF; RIZOS, D; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*; 138:507–517. 2009.
- CONDORELLI, P; GEORGE, SC. In vivo control of soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide: A kinetic analysis. *Biophysical Journ.* 80:2110-2119. 2001.
- CURRAN, S; PIERSON, RA; GINTHER, OJ. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189: 1289-1294. 1986.
- DAVIES, CJ; HILL, JR; EDWARDS, JL; SCHRICK, FN; FISHER, PJ; ELDRIDGE, JA. SCHLAFER, DH. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. *Anim Reprod Sci*; 82-83:267–80. 2004.
- DAYA, S. Luteal support: Progestogens for pregnancy protection. *Maturitas*, 65:S29-S34. 2009

- DISKIN, MG; MURPHY, JJ; SREENAN, JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science*; 96: 297–311. 2006.
- DONALDSON, LE; BASSETT, JM; THORBURN, GD. Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of under- nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J Endocr*; 48: 599-614. 1970.
- EDWARDS, JL; SCHRICK, FN; MCCRACKEN, MD; VAN AMSTEL, SR; HOPKINS, FM; WELBORN, MG; DAVIES, CJ. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Amer J Reprod Immunol*; 50: 113-176. 2003.
- FATIMA, LA; EVANGELISTA, MC; SILVA, RS; CARDOSO, APM; BARUSELLI, OS; PAPA, PC. FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes. *Domestic animal endocrinology*; 45(4): 224-237. 2013.
- FERREIRA, AR; FRANCO, MM. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*; 36: 3-9. 2012.
- FORD, SP; CHENAULT, JR; ECHTERNKAMP, SE. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. *J Reprod Fertil*; 56: 53-62. 1979.
- FORDE, N; LONERGAN, PAT. Transcriptomic Analysis of the Bovine Endometrium: What is Required to Establish Uterine Receptivity to Implantation in Cattle? *Journ. of Reprod. and Develop*; 58:189-195. 2012.
- GARBARINO, EJ; HERNANDEZ, JA; SHEARER, JK; RISCO, CA; THATCHER, WW. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *J. Dairy Sci*; 87:4123–4131. 2004.
- GARRETT, JE; GEISERT, RD; ZAVY, MT; MORGAN, GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*; 84:437–446. 1988.
- GEISERT, RD; BAZER, FW. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals. Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy", *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 2015.
- GINTHER OJ. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 4, Color-Doppler Ultrasonography. *Equiservices Publishing*; Cross Palms, WI. 2007.
- GUILLOMOT, M. Cellular Interactions During Implantation in Domestic Ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 49:39-51. 1995.
- HASHIZUME, K; ISHIWATA, H; KIZAKI, K; YAMADA, O; TAKAHASHI, T; IMAI, K; PATEL, OV; AKAGI, S; SHIMIZU, M; TAKAHASHI, S; KATSUMA, S; SHIOJIMA, S; HIRASAWA, A; TSUJIMOTO, G; TODOROKI, J; IZAIKE, Y. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning and Stem Cells* 4: 197–209. 2002.
- HEYMAN, Y; CHVATTE-PALMER, P; LEBOURTHIS, D; CAMOUS, S; VIGNON, X; RENARD, JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*; 66: 6–13. 2002.

- HIENDLEDER, S; MUND, C; REICHENBACH, HD; WENIGERKIND, H; BREM, G; ZAKHARTCHENKO, V; LYKO, F; WOLF, E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod*; 71: 217 - 223. 2004.
- HILL, JR; BURGHARDT, RC; JONES, K; LONG, CR; LOONEY, CR; SHIN, T; SPENCER, TE; THOMPSON, JA; WINGER, QA; WESTHUSIN, ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *BiolReprod*; 63: 1787–1794. 2000.
- HOFFERT-GOERES, KA; BATCHELDER, CA; BERTOLINI, M; MOYER, AL; FAMULA, TR; ANDERSON, GB. Angiogenesis in Day-30 Bovine Pregnancies Derived from Nuclear Transfer. *Cloning and stem cells*; 9:595-607. 2007.
- HONNENS, A; VOSS, C; HERZOG, K; NIEMANN, H; RATH, D; BOLLWEIN, H. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. *Theriogenology*; 70:1048-1056. 2008.
- HORST, EK; HANS, GL. Anatomia dos animais domésticos. Texto e atlas colorido - 4ª edição, *Editores Artmed*, 2011.
- JARDIM, IB. Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais. 72 f. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Pirassununga, 2016.
- JIN, Y; LIU, Y; LIN, Q; LI, J; DRUSO, J E; ANTONYAK, MA; MEININGER, CJ; ZHANG, SL; DOSTAL, DE; GUAN, JL; CERIONE, R A; PENG, X. Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival and vasculogenesis. *Molecular and cellular biology*; 33(21): 4181-4197. 2013.
- JOHNSON, ML; GRAZUL-BILSKA, AT; REDMER, DA; REYNOLDS, LP. Effects of Estradiol-17 β on Expression of mRNA for Seven Angiogenic Factors and Their Receptors in the Endometrium of Ovariectomized (OVX) Ewes. *Endocrine*; 30:333-342. 2006.
- JONES, AL; LAMB, GC. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 2008.
- KERBLER, TL; BUHR, MM; JORDAN, LT; LESLIE, KE; WALTON, JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*; 47: 703–714. 1997.
- KING, GJ; ATKINSON, BA; ROBERTSON, HA. Development of the bovine placentome from Days 20 to 29 of gestation. *J Reprod Fertil*; 59:95-100. 1980.
- KING, GJ; ATKINSON, BA; ROBERTSON, HA. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *J Reprod Fertil*; 61:469-474. 1981.
- KLAGSBRUN, M; AMORE, PA. Regulators of Angiogenesis. *Annu Rev Physiol*; 53:217–239. 1991.
- KLEIN, C; BAUERSACHS, S; ULBRICH, SE; EINSPANIER, R; MEYER, HH; SCHMIDT, SE; REICHENBACH, HD; VERMEHREN, M; SINOWATZ, F; BLUM, H; WOLF, E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *BiolReprod*; 74:253–264. 2006.

- Lee, KY; DeMayo, FJ. Animal models of implantation. *Reproduction*; 128: 679–695. 2004.
- LEISER, R; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. *ExpClinEndocrinol.* , 102(3):122-34. 1994
- LINDNER, HR; SASS, MB; MORRIS, B. Steroids in the ovarian lymph and blood of conscious ewes. *J. Endocr*; 30: 361-376. 1964.
- LONERGAN, P; O'HARA, L; FORDE, N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Animal Reproduction*; 10:223-227. 2013.
- LONERGAN, P; WOODS, A; FAIR, T; CARTER, F; RIZOS, D; WARD, F; QUINN, K; EVANS, A. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 19:861-869, 2007.
- LOSORDO, DW; ISNER, JM. Vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis: Crouching tiger or hidden dragon? *Journal of the American College of Cardiology*. 37:2131-2135. 2001.
- MANN, GE; LAMMING, GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*; 121: 175-180. 2001.
- MARQUES, MO; REIS, EL; CAMPOS FILHO, EP; BARUSELLI, PS. Efeitos da administração de ecg e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. *Simposio internacional de reproducción animal*. Córdoba: Universidad de Buenos Aires; p. 392. 2003.
- MARQUES, TC; SILVA, NC; SILVA, RP; LEÃO KM. Progesterona no estabelecimento e manutenção da gestação em ruminantes. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. 9: 2175-2188. 2013.
- MELTON, AA; BERRY, RO; BUTLER, OD. The interval between the time of ovulation and attachment of the bovine embryo. *J Anim Sci*; 10: 993–1005. 1951.
- MERIGHE, GKF. Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil. 2007.
- MESQUITA, FS; PUGLIESI, G; SCOLARI, SC; FRANÇA, MR; RAMOS, RS; OLIVEIRA, M; PAPA, PC; BRESSAN, FF; MEIRELLES, FV; SILVA, LA; NOGUEIRA, GP; MEMBRIVE, CMB; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroid milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*. 81:861-869. 2014
- MESS, AM; CARREIRA, ACO; OLIVEIRA, CM; FRATINI, P; FAVARON, PO; BARRETO, RSN; PFARRER, C; MEIRELLES, FV; MIGLINO, MA. Vascularization and VEGF expression altered in bovine yolk sacs from IVF and NT technologies. *Theriogenology*; 87: 290–297. 2017.
- MIGLINO M A, PEREIRA F T V, VISINTI J A, GARCIA J M, MEIRELLES F V, RUMPF R . AMBRÓSIO C E, PAPA P C, SANTOS T.C, CARVALHO F A F, LEISER R, CARTER A M. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*; 68:604-617, 2007.

- MONTEIRO-ALVES, B. S. M. Alterações morfológicas e vasculares no corpo lúteo durante a gestação inicial de conceptos bovinos clonados por SCNT com diferentes fenótipos gestacionais. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- MORRIS, B; SASS, MB. The formation of lymph in the ovary. *Proc. R. Soc.* 164:577-591.1966.
- MORRIS, DG; GREALY, M; LEESE, HJ; DISKIN, MG; SREENAN, JM. Cattle embryo growth, development and viability. *Teagasc.* 2001.
- MORRIS, D; DISKIN, M. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal.* 2: 1112-1119. 2008.
- MORRIS, DG; GREALY, M; LEESE, HJ; DISKIN MG; SREENAN, JM. Cattle embryo growth, development and viability. *Beef Production Series* No. 36, 32 pag, Teagasc. 2001. Potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology.* 13: 1116–1121. 2003.
- MUELLER, MD; VIGNE, J; MINCHENKO, A; LBOVIC, DI; LEITMAN, DC; TAYLOR, RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *PNAS*; 97: 10972-10977. 2000.
- NARDO, LG; SALLAM, HN. Progesterone supplementation to prevent recurrent miscarriage and to reduce implantation failure in assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*; 13(1):47-57. 2006
- NIEMANN, H; TIAN, XC; KING, WA; LEE, RSF. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction.* 2008.
- PARR, MH; MULLEN, MP; CROWE, MA; ROCHE, JF; LONERGAN, P; EVANS, ACO; DISKIN, MG. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein–Friesian heifers. *J. Dairy Sci.*; 95: 2390–2396. 2012.
- PAULESU, L; PFARRER, C; ROMAGNOLI, R; IETTA, F; CALLESEN, H; HAMBRUCH, N; DANTZER, V. Variation in Macrophage Migration Inhibitory Factor [MIF] immunoreactivity during bovine gestation. *Placenta*: 33(3):157-163. 2012.
- PEIXOTO, MGCD; BERGMANN, JAG; SUYAMA, E; CARVALHO, MRS; PENNA, VM. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*; 67:287–292. 2007.
- PFARRER, CD; RUZIWA, SD; WINTHER, H; CALLESEN, H; LEISER, R; SCHAMS, D; DANTZER, V. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta*; 27:889-898. 2006.
- PORTER, TF; SCOTT, JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 19:85–101. 2005.

- POWELL, AM; TALBOT, NC; WELLS, KD; KERR, DE; PURSEL, VG; WALL, RJ. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 71 210–216. 2004.
- REYNOLDS, LP; REDMER, DA. Angiogenesis in the Placenta. *Biol Reprod* 64:1033-1040. 2001.
- REYNOLDS, LP; BOROWICZ, PP; CATON, JS; VONNAHME, AV; LUTHER, JS; BUCHANAN, DS; HAFEZ, AS; GRAZUL-BILSKA, AT; REDMER, DA. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.* 54:355-365. 2010.
- REYNOLDS, LP; BOROWICZ, PP; VONNAHME, KA; JOHNSON, ML; GRAZUL-BILSKA, AT; WALLACE, JM; CATON, JS; REDMER, DA. Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta*. 26:689-708. 2005.
- REYNOLDS, LP; CATON, JS; REDMER, DA; GRAZUL-BILSKA, AT; VONNAHME, KA; BOROWICZ, PP; LUTHER, JC; WALLACE, JM; WU, G; SPENCER, TE. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol*; 572:51 –58. 2006.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*; 386:671-674. 1997.
- SÁ FILHO, MF; REIS, EL; VIEL JR., JO; NICHI, M; MADUREIRA, EH; BARUSELLI, PS. Dinâmica folicular de vacas nelore lactentes em anestro tratadas com progestágenos, ecg, e gnRH. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32:235. 2004.
- SANGALLI, JR; DE BEM, THC; PERECIN, F; CHIARATTI, MR; OLIVEIRA, LJ; ARAÚJO, RR; PIMENTEL, JR; SMITH, LC; MEIRELLES, FV. Treatment of nuclear-donor cell or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell Reprogram*, 14(3):235-247. 2012.
- SANTOS, F; ZAKHARTCHENKO, V; STOJKOVIC, M; PETERS, A; JENUWEIN, T; WOLF, E; REIK, W; DEAN, W. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos. *Current Biology*; 13:1116-1121. 2003.
- SANTOS, JE; THATCHER, WW; CHEBEL, RC; CERRI, RL; GALVÃO, KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci*, 82-83:513-535. 2004.
- SCHLAFER, DH; FISHER, PJ; DAVIES, CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science*; 2:145–160. 2000.
- SENGER, PL. Pathways to pregnancy and Parturition. 2004
- SHAH, D; NAGARAJAN, N. Luteal insufficiency in first trimester. *Indian J Endocr Metab*, 17(1):44-49. 2013.
- SHEA, BF. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*. 15:31-42. 1981.
- SHIFREN, JL; TSENG, JF; ZALOUDEK, CJ; RYAN, IP; MENG, YG; FERRARA, N; JAFFE, RB; TAYLOR, RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:3112-3118. 1996.

- SHIRASUNA, K; MATSUMOTO, H; MATSUYAMA, S; KIMURA, K; BOLLWEIN, H; MIYAMOTO, A. Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction*, 150(3):217-225, 2015.
- SHORT, RV. Progesterone in blood. II. Progesterone in the peripheral blood of pregnant cows. *J. Endocr*; 16:426-428. 1958.
- SILVA, LA; GINTHER, OJ. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*, 139:453-463. 2010.
- SLADEK, SM; MAGNESS, IRR; CONRAD, KP. Nitric oxide and pregnancy. *The American Physiological Society*, 272:441-463. 1997.
- SOUSA, LMMC; CAMPOS, DB; FONSECA, VU; VIAU, P; KFOURY JR., JR; OLIVEIRA, CA; BINELLI, M; BURATINI JR., J; PAPA, PC. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) modulates bovine placenta steroidogenesis in vitro. *Placenta*; 33:788-794. 2012.
- SOUZA, FR; CAMPOS, CC; SILVA, NAM; SANTOS, RM. Influência da estação do ano, do momento da inseminação e da temperatura retal na taxa de concepção de vacas leiteiras mestiças. *Semina: Ciências Agrárias*; 37: 155-162. 2016.
- SPELL, AR; BEAL, WE; CORAH, LR; LAMB, GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56(2):287-297. 2001.
- SPENCER, TE; OTT, TL; BAZER, FW. Interferon tau: Pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc. Exp. Biol. Med.* 213:215-229. 1996.
- SPENCER, TE; JOHNSON, GA; BURGHARDT, RC; BAZER, FW Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*. 71:2-10. 2004.
- SPENCER, TE; SANDRA, O; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135:165-179. 2008.
- STABENFELDT, GH; OSBURN, BI; EWING, LL. Peripheral plasma progesterone levels in cow during pregnancy and parturition. *American journal of physiology*. 218(2):571-575. 1970.
- STRONGE, AJH; SREENAN, JM; DISKIN, MG; MEE, JF; KENNY, DA; MORRIS, DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*; 64:1212-1224. 2005.
- SURI, C., JONES, PF; PATAN, S; BARTUNKOVA, S; MAISONPIERRE, PC; DAVIS, S; SATO, TN; YANCOPOULOS, GD. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171-1180. 1996.
- TASAKI, Y; NISHIMURA, R; SHIBAYA, M; LEE, H; ACOSTA, TJ; OKUDA, K. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. *Jornal of reproduction and development*, 56(2):223-229. 2010.
- THATCHER, WW; MEYER, MD; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. *Reprod. Fertil*, 49:15-28. 1995.

- TORRY, DS; LEAVENWORTH, J; CHANG, M; MAHESHWARI, V; GROESCH, K; BALL ER; TORRY, RJ. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet.* 24:303-315. 2007.
- WELLS, DN; FORSYTH, JT; MCMILLAN, V; OBACK, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells*; 6:101-110. 2004.
- WELLS, DN; MISICA, PM; TERVIT, HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 60:996-1005. 1999.
- WOODING, FBP. Current topic: the syneptheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta.* 13 (2):101-113. 1992.
- WOODING, FBP. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J Reprod Fertil, (Suppl)*:31-39, 1982.
- WRIGHT, JM. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, 15(1):43-56. 1981.
- XIAO, CW; GOFF, AK. Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *Jornal of Reproduction and Fertility*, 112:315-324. 1998.
- YANCOPOULOS, GD; DAVIS, S; GALE, NW; RUDGE, JS; WIEGAND, AJ; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407:242-248. 2000.
- ZYGMUNT, M; HERR, F; MÜNSTEDT, K; LANG, U; LIANG, OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J ObstetGynecol Reprod Biol*, 110 Suppl 1 S10-18. 2003.