ROSEMARY VIOLA BOSCH

Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo

São Paulo

2006

ROSEMARY VIOLA BOSCH

Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1675
FMVZ

Bosch, Rosemary Viola

Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo / Rosemary Viola Bosch. – São Paulo: R. V. Bosch, 2006.
125 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Placenta. 2. Trofoblasto. 3. Bovinos. 4. Citometria de fluxo.
5. Ultra-estrutura. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo", protocolo nº879/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos provenientes de abatedouros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Populational dynamics of fresh and cultured bovine placental cells", protocol number 879/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 12 de abril de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOSCH, Rosemary Viola

Título: Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Professor Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Professor Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Professor Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, **Valter Bosch**, pelo incentivo, companheirismo, lealdade e respeito que têm pautado nossas vidas.

Aos meus filhos, **Gabriel Viola Bosch e Marcela Viola Bosch**, pela compreensão e por serem a essência do meu viver. Eu amo vocês!

Ao meu pai, **José Viola** (*in memoriam*), por ter-me ensinado que a honra é o nosso maior tesouro.

À minha mãe, **Marianna Nassar Viola**, por ser o meu "porto seguro" e a fortaleza em que sempre me espelhei.

Aos meus irmãos, **Cezar Augusto Viola e Julio Cezar Viola**, pelo incentivo e apoio sempre que busquei novos caminhos. Eu me orgulho de vocês!

À minha tia, **Marlene Nassar Berringer**, pela minha criação e pela ajuda recebida em todos os momentos da minha vida.

À minha prima, **Rosalind Mobaid**, pelo empenho, conhecimento e perseverança. Eu me orgulho de você!

Ao meu padrinho, **Olympio Geraldo Gomes**, por ser exemplo de retidão, ética e profissionalismo, especialmente por ter despertado em mim o desejo contínuo de atualização e aprendizado. Conviver com você é um privilégio pra mim!!!

AGRADECIMENTOS

À minha casa Universidade de São Paulo, berço de minha formação, que me acolheu e proporcionou as melhores oportunidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, pela oportunidade de realizar um sonho, pelos ensinamentos, respeito, disposição e principalmente a confiança e o carinho a mim dedicado;

Ao Prof. Dr. Pedro Pimo Bombonato, pela acolhida em um momento turbulento da minha vida e por oferecer sua amizade incondicionalmente!

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blaquez, que honra esta casa com seus ensinamentos e que não poupou esforços para que eu concluísse este trabalho.

À Prof^a. Dra. Maria Angélica Miglino, coordenadora deste programa, que faz dele um dos melhores do país!

Ao Prof. Dr. Ricardo Coutinho do Amaral, que foi o responsável pelo meu retorno a esta casa, minha eterna lealdade e amizade!

Ao Prof. Dr. Ricardo A. Dias, pela orientação nos caminhos da estatística.

A todos os professores do Departamento de Cirurgia e Anatomia esta faculdade.

A minha amiga Janaína Munuera Monteiro pela dedicação, companheirismo e amizade. Eu nunca vou te esquecer!

Ao meu companheiro de "cultivo" **Arlei José Birck**, pela presteza e empenho, sem o qual eu não concluiria este trabalho. Que Deus te abençoe e a toda sua fan

A minha aluna de iniciação científica preferida, **Renata Stecca Iunes**, pelo entusiasmo, carinho e dedicação, que coroam o Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfo-Fisiologia (LTIAM) de êxito.

Aos meus amigos LÍlian de Jesus Oliveira, Hildebrando Gomes Benedicto, Fernanda Rodrigues Agreste, Juliana Placido Guimarães, Renata de Britto Mari, Karina Martinez Gagliardo, Naianne Kelly Clebis, Ana Rita de Lima, Emerson Ticoná Fioretto, Priscilla Teixeira de Barros Moraes, Robson Fortes Giglio, Eduardo Maurício Mendes de Lima, Guilherme José B. C. Ferreira, Erica Branco, Rosa Maria Cabral e Vivian Samoto, pelo incentivo e estímulo para a execução deste projeto.

Aos alunos de iniciação científica, **Priscilla Pedra Mendonça, Nívea Alves Biaggio e Douglas**, vocês trouxeram vida nova ao LTIAM!

A todos os **colegas do programa de pós-graduação** da Anatomia dos Animais Domésticos e Slivestres pela alegria da convivência durante este período.

Aos funcionários e amigos do setor **Diogo Palermo, Edinaldo Ribas Farias (Índio), Ronaldo Agostinho da Silva, Raimundo Leal de Sousa, João do Carmo Freitas e Paolo Valerio Caporuscio**, pela ajuda, amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos da secretaria do setor de Anatomia, **Jaqueline Martins de Santana e Maicon Barbosa da Silva**.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação, biblioteca e comissão de bioética, pela colaboração para a confecção desta dissertação.

À minha irmã de coração, Teresa de Fátima Junqueira, pelo incentivo para que eu concluísse esse trabalho.

Ao senhor André Luiz Nogueira proprietário do **Frigorífico Mantiqueira LTDA,** que viabilizou a coleta dos materiais.

A todos os funcionários do Frigorífico Mantiqueira LTDA, que auxiliaram na realização deste trabalho.

A todos que participaram de alguma forma para a conclusão deste projeto.

HOMENAGEM

À Prof^a Doutora Irvênia Luiza S. Prada, pelo exemplo de pessoa, pela alma generosa e pela alegria de compartilhar com ela, momentos ímpares de minha vida!!! Ser sua aluna, ainda que para isso, eu tenha esperado quase trinta anos, é um privilégio!!!!!!

RESUMO

BOSCH, R. V. **Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo.** [Populational dynamics of fresh and culture bovine placental cells]. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2006.

Os bovinos são considerados a maior fonte de proteína animal para o homem, razão pela qual se fazem imprescindíveis pesquisas em diversas áreas de produção desses animais com o intuito de minimizar problemas que possam interferir no desenvolvimento e produtividade dos rebanhos. Nesse cenário, o estudo da placenta e placentação tem por objetivo conhecer o desenvolvimento embrionário e suas interações fisiológicas entre o feto e o organismo materno, caracterizado pela íntima união entre eles. O estudo da placenta e placentação tem por objetivo conhecer o desenvolvimento embrionário e suas interações fisiológicas entre o feto e o organismo materno, caracterizado pela íntima união entre eles. Além disso, a falta de marcadores específicos para células placentárias bovinas e as alterações que essas células sofrem durante o progresso da gestação são as principais barreiras para a determinação do perfil morfológico celular presente na interface materno-fetal, razão pela qual seu monitoramento torna-se importante. Buscando melhor compreender essas mudanças, o presente trabalho estudou a dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo. Foram utilizadas 30 amostras de placentônios, divididos em três grupos, de acordo com o desenvolvimento da gestação, quais sejam: primeiro, segundo e terceiro trimestres (n:10 para cada terço). Células oriundas de placentônios foram examinadas a fresco e pós-cultivo durante dez dias, pela microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo. Os resultados deste trabalho demonstraram a presença de tipos morfológicos celulares distintos na dependência do progresso da gestação: células gigantes trofoblásticas binucleadas, células gigantes trofoblásticas trinucleadas, células gigantes trofoblásticas mononucleadas, células mononucleadas maiores, células mononucleadas

menores e células que apresentam citoplasma amplo, contendo inúmeras vesículas em seu interior. Com a utilização da citometria de fluxo, foi possível identificar nas amostras a fresco três populações distintas em tamanho (*FSC*) e complexidade (*SSC*) no primeiro terço, cinco populações no segundo terço e duas populações no terceiro terço gestacional. As células placentárias bovinas apresentaram frequências variáveis de acordo com o trimestre gestacional e seu tempo de cultivo.

Palavras-chave: Placenta. Trofoblasto. Bovinos. Citometria de fluxo. Ultra-estrutura.

ABSTRACT

BOSCH, R. V. **Populational dynamics of fresh and culture bovine placental cells.** [Dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo]. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

There is a great diversity of cell types in the bovine placenta like mononucleate trophoblast giant cells, binucleate trophoblast giant cells, specialized leucocytes (uterine natural killer, uterine macrophages, etc.) and part of their characterization and function remains unknown or controversial. Besides that, some of these cells change as pregnancy progresses; thus their monitoring is very important. The lack of specific markers to bovine placental cells is a main barrier for the development of an efficient cell tracing. Alternative techniques are being used to study these cells, as well as morphologic observation by optical and electron microscopy methods. The study was carried out to establish a populational kinetics of fresh and cultured bovine placental cells by optical microscopy, by electron microscopy and flow cytometry. Bovine placentomas were sampled at the slaughterhouse from cows with different trimesters of pregnancy (n:10 each). Fragments from the cotyledonary/caruncular interface were collected and cells were mechanically dissociated and their viability was estimated by Trypan Blue exclusion. After that they were incubated ($2,5 \times 10^7$ cells per 2 mL) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* with 10% FBS. First of all, fresh bovine placental cells analyzed by flow cytometry in order to identity the profiles of populational cells. At the same time, smear of fresh cells was made, fixed by methanol, stained with Giemsa for optical microscopy morphologic analisys and differential counting. After this, cells were analised by flow cytometry and optical microscopy .This process was repeated on the first, fifth and tenth days of the culture. We found seven types of cell: mononucleate trophoblast giant cells, binucleate trophoblast giant cells, trinucleate trophoblast giant cells, large mononucleate cells and small

mononucleate cells. The placental cells displayed different frequencies according to the gestation period and culture time length.

Key words: Placenta. Trophoblast. Bovine. Flow cytometry. Ultra- structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da incidência dos feixes de laser e dos filtros de captação.....	35
Figura 2 –	Esquema de placentônio bovino. A região tracejada é o local de interdigitação materno-fetal onde foram colhidas as amostras.....	39
Figura 3 –	Placentônio bovino (setas).....	40
Figura 4 –	Fotomicrografias de uma célula gigante trofoblástica binucleada (A e B) corada por Giemsa - setas (barra: 40 μ m).....	44
Figura 5 –	Frequência da célula gigante trofoblástica binucleada (CGTB) nos terços gestacionais: 1T/2T(p>0,05); 2T/3T(p>0,05); 1T/3T(p<0,05).....	44
Figura 6 –	Fotomicrografias de uma célula gigante trofoblástica trinucleada apresentando dois núcleos simétricos e um menor e arredondado (A e B) corada por Giemsa C – Fotomicrografia de célula gigante trofoblástica trinucleada com três núcleos simétricos - setas (barra: 40 μ m).....	45
Figura 7 –	Fotomicrografias de uma célula gigante trofoblástica trinucleada apresentando dois núcleos simétricos e um menor e arredondado (A e B) corada por Giemsa C – Fotomicrografia de célula gigante trofoblástica trinucleada com três núcleos simétricos - setas (barra: 40 μ m).....	46
Figura 8 –	Fotomicrografia de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (A e B) corada por Giemsa – setas (barra: 40 μ m).....	46
Figura 9 –	Frequência de uma célula gigante trofoblástica mononucleada nos terços gestacionais: 1T/2T (p>0,05), 2T/3T e 1T/3T (p<0,05). Houve diferença estatística entre o 2T/3T e entre o 1T/3T.....	47
Figura 10 –	Fotomicrografia de uma célula mononucleada maior (A e B) corada por Giemsa - setas (barra: 40 μ m).....	47
Figura 11 –	Frequência da célula mononucleada maior nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os três terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T (p<0,05).....	48
Figura 12 –	Fotomicrografia de uma célula mononucleada menor (A e B) corada por Giemsa – setas. Linfócito (L) célula com núcleo redondo, cromatina densa e reduzido volume citoplasmático basófilo (barra: 40 μ m).....	48

Figura 13 –	Frequência da célula mononucleada menor nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$).....	49
Figura 14 –	Fotomicrografias de célula gigante trofoblástica mononucleada (A e B) que sofreram uma lobulação corada por Giemsa - setas (barra: 40 μ m).....	49
Figura 15 –	Frequência da célula gigante trofoblástica mononucleada que sofreu uma lobulação (CGTM - Granada) nos terços gestacionais. Não há diferença estatística entre os terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p > 0,05$).....	50
Figura 16 –	Fotomicrografias de uma célula mononucleada ou binucleada com citoplasma apresentando inúmeras vesículas (CM com vesículas) corada por Giemsa - setas (barra: 40 μ m).....	51
Figura 17 –	Frequência da célula com citoplasma apresentando inúmeras vesículas (CM com vesículas) nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os três terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$).....	51
Figura 18 –	Fotomicrografias de célula com citoplasma basófilo e núcleo reniforme ou em forma de ferradura (figura), sugerindo tratar-se de monócitos - setas (barra: 40 μ m).....	52
Figura 19 –	Frequência das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. Não houve diferença estatística nas CGTB do 1o terço ($p > 0,05$). Houve diferença estatística das CGTB do 2o terço entre 1D/5D e 5D/10D ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre 1D/10D ($p > 0,05$). No 3o terço não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p > 0,05$). Houve diferença estatística entre 1D/10D e 5D/10D ($p < 0,05$).....	53
Figura 20 –	Frequência das células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1o terço houve diferença entre 1D/5D e 1D/10D ($p < 0,05$). No 2o e 3o terços não houve diferença durante o cultivo ($p > 0,05$).....	54
Figura 21 –	Frequência das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1o terço não houve diferença estatística durante o cultivo ($p > 0,05$). No 2o terço não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p > 0,05$), mas houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D ($p > 0,05$). No 3o terço houve diferença estatística durante o cultivo ($p > 0,05$).....	55

Figura 22 –	Frequência das células mononucleadas maiores (CMMA) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1o e 2o terços não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$). Houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D ($p>0,05$). No 3o terço houve diferença estatística entre 1D/5D e 5D/10D ($p<0,05$), mas não entre 1D/10D ($p>0,05$).....	56
Figura 23 –	Frequência das células mononucleadas menores (CMME) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. As CMME do 1o terço gestacional apresentam diferença estatística entre 1D/5D e 1D/10D ($p<0,05$), mas iguais entre 5D/10D ($p>0,05$). As CMME oriundas do 2o terço gestacional apresentam frequências iguais entre 1D/5D ($p>0,05$) e diferentes entre 5D/10D e 1D/10D ($p<0,05$). As CMME oriundas do 3o terço apresentam diferença estatística durante o cultivo ($p<0,05$).....	57
Figura 24 –	Frequência das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) com núcleo em forma de granada (CG) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1o e 3o terços não houve diferença estatística durante o cultivo ($p>0,05$). No 2o terço houve diferença estatística durante o cultivo ($p<0,05$).....	58
Figura 25 –	Frequência das células mononucleadas com citoplasma apresentando vacúolos em grande quantidade, descritas por nós como células mononucleadas com aspecto vesiculoso, oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. Houve diferença estatística nas células oriundas do 2o e 3o terços durante todo o cultivo ($p<0,05$).....	59
Figura 26 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica binucleada (CGTB) seta (escala da barra : 1 μ m).....	63
Figura 27 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) seta (escala da barra : 2 μ m).....	64
Figura 28 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica trinucleada (CGTT) seta (escala da barra : 1 μ m).....	65
Figura 29 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de células mononucleadas (CM) seta (escala da barra : 1 μ m).....	66
Figura 30 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula mononucleada apresentando extrusão de conteúdo do núcleo, seta (escala da barra: 1 μ m).....	67
Figura 31 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de células mononucleadas, seta (escala da barra : 1 μ m).....	68

Figura 32 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula mononucleada que apresenta extrusão do conteúdo nuclear, seta (escala da barra : 1 μ m).....	69
Figura 33 –	Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) que apresenta lobulação do núcleo, seta (escala da barra : 1 μ m).....	70
Figura 34 –	Fotomicrografia de células do primeiro trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), binucleadas (2), células mononucleadas maiores (3) e menores (4) e linfócito (5) corada por Giemsa (barra :: 40 μ m).....	88
Figura 35 –	Fotomicrografia de células oriundas do segundo trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), binucleadas (2), trinucleadas (3), células mononucleadas maiores (4) e menores (5) e células com vesículas (6) corada por Giemsa (barra : 40 μ m).....	89
Figura 36 –	Fotomicrografia de células do terceiro trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), multinucleada (2), células mononucleadas menores (3) e maiores (4) e células com vesículas (5) corada por Giemsa (barra : 40 μ m).....	90
Figura 37 –	Fotomicrografias comparativas de células gigantes trofoblásticas binucleadas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (barra : 40 μ m).....	91
Figura 38 –	Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas trinucleadas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócito (L) (barra : 40 μ m).....	92
Figura 39 –	Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas mononucleadas dos três trimestres gestacionais, corada por Giemsa (barra : 40 μ m).....	93
Figura 40 –	Fotomicrografias comparativas das células mononucleadas maiores dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócito (L) (barra : 40 μ m).....	94
Figura 41 –	Fotomicrografias comparativas das células mononucleadas menores dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócitos (L) (barra : 40 μ m).....	95
Figura 42 –	Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas mononucleadas dos três trimestres gestacionais, que apresentam lobulação, descritas como células em forma de granada corada por Giemsa (barra : 40 μ m) setas.....	96

Figura 43 –	Fotomicrografias comparativas das células com vesículas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa, setas (barra : 40 μ m).	97
Figura 44 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células a fresco oriundas do primeiro trimestre gestacional.....	98
Figura 45 –	Análise estatística dos perfis populacionais de células a fresco do primeiro trimestre gestacional.....	99
Figura 46 –	Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	100
Figura 47 –	Análise estatística dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	101
Figura 48 –	Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2 e G3 com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	102
Figura 49 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 5 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	103
Figura 50 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 5 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	104
Figura 51 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 10 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	105
Figura 52 –	A Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G1 e G2 com 10 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional. B Análise estatística dos perfis populacionais de células com 10 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional.....	106
Figura 53 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células a fresco do segundo trimestre gestacional.....	107
Figura 54 –	Análises estatísticas comparativas pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3 e G4-G5 com células a fresco do segundo trimestre gestacional	108
Figura 55 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células a fresco do segundo trimestre gestacional.....	109
Figura 56 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células a fresco do segundo trimestre gestacional.....	110

Figura 57 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	111
Figura 58 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	112
Figura 59 –	Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3, G1-G2 e G3-G4 com 1 dia de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	113
Figura 60 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 5 dias de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	114
Figura 61 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 5 dias de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	115
Figura 62 –	Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3 com 5 dias de cultivo do segundo trimestre gestacional.....	116
Figura 63 –	A: Density Plot; B: Histograma do perfil populacional de células com 10 dias de cultivo do segundo trimestre gestacional analisadas pela citometria de fluxo.....	117
Figura 64 –	A: Density Plot; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células a fresco do terceiro trimestre gestacional	118
Figura 65 –	Análise estatística dos perfis populacionais de células a fresco do terceiro trimestre gestacional.....	119
Figura 66 –	A: Density Plot; B: Histograma do perfil populacional de células com 1 dia de cultivo do terceiro trimestre gestacional.....	120
Figura 67 –	Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do terceiro trimestre gestacional	121
Figura 68 –	A: Density Plot; B: Histograma do perfil populacional de células com 5 dias de cultivo do terceiro trimestre gestacional.....	122
Figura 69 –	A: Density Plot; B: Histograma do perfil populacional de células com 10 dias de cultivo do terceiro trimestre gestacional.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estimativa da idade gestacional segundo Noden e Lahunta (1990)...	38
Tabela 2 –	Frequência dos diferentes tipos celulares de acordo com o trimestre gestacional e o tempo de cultivo, São Paulo, 2006.....	124
Tabela 3 –	Mensuração dos diferentes tipos celulares de acordo com o trimestre gestacional, São Paulo, 2006.....	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 —	Funções das membranas fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994)....	26
Quadro 2 —	Comparação dos perfis populacionais das diferentes regiões analisadas pela citometria de fluxo, de acordo com o terço gestacional e o tempo de cultivo.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVO	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	PLACENTA E PLACENTAÇÃO DOS BOVINOS	25
3.2	CLASSIFICAÇÃO DA PLACENTA BOVINA	27
3.3	IMUNOLOGIA DA PLACENTA	28
3.4	CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS BOVINAS	30
3.5	CULTIVO CELULAR	32
3.6	CITOMETRIA DE FLUXO	34
4	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1	CULTIVO CELULAR	38
4.2	MICROSCOPIA DE LUZ	40
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	41
4.4	CITOMETRIA DE FLUXO	42
5	RESULTADOS	43
5.1	CULTIVO CELULAR	53
5.1.1	Frequência das células <i>versus</i> dias de cultivo	53
5.2	CITOMETRIA DE FLUXO	60
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	62
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE	88

INTRODUÇÃO

Os bovinos são considerados a maior fonte de proteína animal para o homem, razão pela qual se fazem imprescindíveis pesquisas em diversas áreas de produção desses animais com o intuito de minimizar problemas que possam interferir no desenvolvimento e produtividade dos rebanhos (SANTIAGO, 1970). O alto padrão da sanidade e qualidade dos produtos de origem bovina, suína e de aves elevou as exportações do complexo carne, tornando a pecuária brasileira hoje uma das mais modernas do mundo e o Brasil o maior exportador de carne bovina e de frangos. Com o objetivo de se manter esse alto índice produtivo, aspectos relacionados à reprodução desses animais devem ser compreendidos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005). Neste cenário, o estudo da placenta e placentação tem por objetivo conhecer o desenvolvimento embrionário e suas interações fisiológicas entre o feto e o organismo materno, caracterizado pela íntima união entre eles (SPENCER et al., 2004).

Há uma ampla variedade de tipos celulares presentes na placenta de bovinos tais como células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), células gigantes trofoblásticas multinucleadas (CGTMt), leucócitos especializados (células natural killer uterinas, macrófagos uterinos) (WOODING, MORGAM e ADAM, 1997).

O cultivo celular *in vitro* representa um dos caminhos para se conhecer a fisiologia celular, pois está livre das variações do organismo, alterações na homeostase ou condições de estresse (FENG, PETER e ASEM, 2000). Essa técnica possibilita o estudo da atividade intracelular, interação célula a célula, produtos e secreções celulares, engenharia genética, entre outros (FRESHNEY et al., 1994). Pesquisadores tentaram estabelecer linhagens de células trofoblásticas bovina para melhor compreensão da interação materno-fetal por meio do

cultivo celular *in vitro*. Essas linhagens celulares ainda não foram adequadamente caracterizadas e profundos estudos são necessários para o estabelecimento da cultura de células placentárias bovina. A obtenção de culturas puras de tipos celulares distintos pode ser realizada de maneiras diversas, sendo que a maioria dessas técnicas emprega princípios físicos e químicos de separação para tal fim. Nem sempre a utilização desses métodos alcança êxito. A falta de marcadores específicos para células placentárias bovina é a principal barreira para a determinação do perfil morfológico celular presente na interface materno-fetal. Parte da função e caracterização das células placentárias bovinas permanece controversa ou desconhecida e, além disso, várias dessas células sofrem alterações durante o progresso da gestação, razão pela qual seu monitoramento torna-se importante (IGWEBUIKE, 2005). Buscando melhor compreender essas mudanças, este trabalho tem por objetivo avaliar a dinâmica populacional das células placentárias a fresco e pós-cultivo nos diferentes períodos gestacionais pela microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer a dinâmica populacional de células de placenta bovina a fresco e em cultivo por meio de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Caracterizaremos o tipo de placenta e placentação dos bovinos em razão de suas peculiaridades para melhor compreensão.

3.1 PLACENTA E PLACENTAÇÃO DOS BOVINOS

O termo “PLACENTA”, nominado por Realdus Columbus (1516—1559), foi utilizado para descrever as estruturas eliminadas após o parto, em mulheres, como uma afusão de material residual em forma de um bolo circular. Atualmente, o termo placenta se refere tanto às estruturas discoidais encontradas em mulheres, coelhos, ratos, camundongos e cobaias quanto a todas as estruturas que permitam uma aposição ou fusão, entre as membranas fetais e a mucosa uterina, de maneira que ocorram trocas fisiológicas (ATKINSON et al., 1984; CARVALHO, 2004).

A vaca tem um ciclo estral de 21 dias e um período de 280 dias de gestação (270-285, dependendo da raça). Durante o período gestacional, antes da formação da placenta, ocorre a implantação do embrião, ou seja, o blastocisto se fixa e inicia sua interação fisiológica com o útero para estimular o desenvolvimento da placenta e membranas fetais responsáveis pela proteção, nutrição, respiração, controle endócrino e controle da resposta imune (KING et al., 1982). As membranas fetais, amniótica, alantóide e coriônica, estão envolvidas no processo gestacional e desempenham funções específicas (LEISER; KAUFMANN, 1994) (Quadro 1).

Membrana amniótica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteção mecânica, hidratação do feto, nutrição, lubrificação do canal do parto.
Membrana alantóide	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteção mecânica, prevenção ▪ o da desidratação, equilíbrio uterino para evitar rotações, lubrificação do canal do parto.
Membrana coriônica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteção mecânica, interação feto-maternal, composição da parte fetal da placenta, trocas de gases e nutrientes.

Quadro 1 — Funções das membranas fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994)

O estabelecimento e manutenção da gestação resultam da sinalização desencadeada pelo embrião/feto associada às membranas extra-embrionárias; e da necessidade de progesterona produzida pelo corpo lúteo (SPENCER et al., 2004). Em animais domésticos (ruminantes e suínos), hormônios produzidos pelo trofoblasto inibem a luteólise e atuam no endométrio materno prevenindo a liberação de prostaglandina F2alfa (PF2alfa), permitindo a implantação do embrião (SPENCER et al., 2004).

Durante o desenvolvimento do blastocisto, o embrião desenvolve uma cavidade central preenchida por líquido denominada blastocèle, circundada por uma camada de células conhecidas como trofoectoderma (KING et al., 1982). Essas células contribuem exclusivamente para a formação da placenta e das estruturas extra-embrionárias de vital importância para a sobrevivência de embriões de mamíferos (CROSS et al., 1994).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DA PLACENTA BOVINA

A placenta bovina é classificada como multicotiledonária, zonária; com base no arranjo tridimensional; indecídua epiteliocorial, inicialmente tornando-se sinepiteliocorial funcionalmente com o avanço da prenhez, em razão da fusão do trofoblasto com o epitélio uterino, formando placas sinciciais (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A placenta sinepiteliocorial é classificada de acordo com suas características histológicas, ou seja, o número de camadas celulares que separa a circulação materna da fetal. São elas: endométrio materno; tecido conjuntivo; epitélio materno; trofoblasto; tecido conjuntivo fetal e endotélio fetal (WOODING et al., 1992). Sendo assim, não há possibilidade de transferência de imunidade durante a gestação, pois a placenta bovina é impermeável às imunoglobulinas (GRUNERT, 1982). O fluxo sangüíneo materno-fetal da placenta bovina é, inicialmente, multiviloso e tende a tornar-se contracorrente, o que o diferencia da placenta humana, onde as células trofoblásticas ficam diretamente em contato com o sangue materno (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A placenta de ruminantes tem uma estrutura anatômica uniforme baseada nas áreas de aposição da membrana feto-maternal e sua proliferação para formar placentônios (WOODING et al., 1997). Apresenta áreas específicas de ligação materno-fetal representada pelos placentônios. A porção fetal do placentônio é formada pelo cotilédone, enquanto a porção materna é representada pela carúncula. Nessa íntima união, caracterizamos o trofoblasto, recobrimo as vilosidades fetais. Acredita-se que as primeiras células trofoblásticas binucleadas originam-se de células mononucleadas do trofoblasto por cariocinese (divisão do núcleo) sem a ocorrência de citocinese (divisão do citoplasma) e migram durante toda a gestação através das junções coriônicas (*gap junction*) íntegras em direção ao epitélio uterino para se fundirem a estas células, formando inicialmente células

trinucleadas híbridas fetomaternais (CTH) e subsequentemente a placa sincicial (SP). Essa placa sincicial pode ser transitória ou persistente durante toda a gestação dependendo da espécie; pode estar presente na região interplacentomal, sendo rapidamente dispersas no epitélio uterino ao redor das aberturas das glândulas uterinas em vacas e veados (WOODING et al., 1997). Em veados, linfócitos intraepiteliais são uma característica constante do epitélio uterino de veados, além de linfócitos granulares maternos (LGL) encontrados exclusivamente no epitélio placentomal uterino, intimamente associados com a célula híbrida trinucleada (TNC) e a placa sincicial (SP) (WOODING et al., 1997). O fato é que as células gigantes trofoblásticas bovina (CGTB) estão diretamente envolvidas na modificação do epitélio uterino, desde a implantação do embrião até o término da gestação, sendo essa sua característica mais relevante (WOODING, 1992).

3.3 IMUNOLOGIA DA PLACENTA

A placenta é um órgão transitório de grande importância imunológica presente somente durante a gestação. O feto se apresenta como um tecido semi-alogeneico, ou seja, possui parte da genética materna e parte da paterna, razão pela qual tem sido estudada como modelo de estudos referente a transplantes (HANSEN et al., 1986).

O termo “reconhecimento materno da gestação” é utilizado para descrever a maneira pela qual o organismo materno responde fisiologicamente à presença do conceito em seu trato reprodutivo (DEMMERS et al., 2001). O feto se comporta como um enxerto no útero materno e o sistema imune da mãe tem a capacidade de se organizar de forma a tolerar os antígenos fetais, recrutando macrófagos, monócitos e neutrófilos (fagocitose) (ASBURY et al., 1987). Durante a gestação, há uma maior susceptibilidade a infecções e a imunidade humoral se mantém em níveis normais, porém há uma supressão seletiva de alguns aspectos

da imunidade celular, tanto que o organismo materno aceita o enxerto fetal. Pesquisadores demonstraram que a manutenção da gestação é decorrente da interação entre citocinas pró e antiinflamatórias e do equilíbrio entre a imunidade humoral (linfócitos B) e a imunidade celular (linfócitos T) (COSTEAS et al., 2004).

Falhas na detecção de antígenos fetais por células do sistema imune materno poderão provocar a rejeição do embrião, assim como o desenvolvimento da placenta é fator determinante, por meio do qual o conceito sinaliza sua presença (HANSEN, 1999; ROBERTS et al., 1997). Para que o feto possa sobreviver, ele deve ser protegido do sistema imune materno, pois é reconhecido como um tecido estranho. São necessários dois mecanismos para sua proteção: o controle da expressão do gene do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I na placenta e a supressão local da resposta imune materna.

Estudos demonstraram que eventos locais na interface materno-fetal previnem uma resposta imune efetiva e que numa placenta infectada não há resposta inflamatória mesmo na presença de grande número de bactérias (ASBURY et al., 1987). Foi identificada também diminuição do número de macrófagos presentes nesta interface. Schlafer et al. (2000) estudaram o desenvolvimento de macrófagos placentários em placentas bovinas e demonstraram seu aumento com o avançar da gestação. Há diminuição de células CD4, aumento de células CD8 e a atividade citotóxica das células *natural killer* (NK) parece também estar diminuída (ROBERTS et al., 1997). As células *natural killer* (NK) são encontradas na circulação periférica e no útero e apresentam como característica induzir a morte celular quando ativadas. Além disso, a expressão do gene do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I pelas células trofoblásticas no início da gestação parece estar associado ao aborto imuno mediado (DAVIS et al., 2000). Murphy et al. (2004) constataram que as células trofoblásticas são únicas, porque são um dos poucos tipos

de células de mamíferos que não expressam o gene do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I, nem constitutivamente, nem após exposição ao IFN gama. A ausência da expressão de antígenos MHC de classe I nas células trofoblásticas tem sido postulado como um dos mecanismos essenciais por meio do qual o feto semi-alogeneico consegue escapar da rejeição do sistema imune materno.

3.4 CÉLULAS GIGANTES TROFOBLÁSTICAS BOVINAS

Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que a característica mais importante na placenta de ruminantes é a população fetal de células coriônicas trofoblásticas binucleadas que migram durante toda a gestação, através das *gap junction*; junções coriônicas íntegras para se fundir com as células do epitélio uterino e que, quando maduras, migram em direção à interface e fundem-se com o epitélio uterino, liberando o conteúdo de seus grânulos (WOODING, 1992). A migração das células trofoblásticas binucleadas fetais inicia-se entre os dias 18 a 20 da gestação e permanece por todo o período gestacional (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Dois tipos morfológica e funcionalmente distintos de células têm sido reconhecidos no trofoectoderma da placenta de ruminantes: células trofoblásticas mononucleadas (CTM) e células trofoblásticas binucleadas (CTB) (WIMSATT, 1951; GREENSTEIN et al., 1958; IGWEBUIKE, 2005).

As células trofoblásticas mononucleadas (CTM) formam a maioria da interface materno-fetal e estão primariamente envolvidas com a troca de nutrientes. Em contrapartida, as células trofoblásticas binucleadas (CTB) sintetizam hormônios como o lactogênio placentário, a progesterona, hormônios de crescimento, várias glicoproteínas associadas à gestação (bPAG) e possuem função fagocitária, pois macromoléculas são transportadas

através da placenta por difusão facilitada ou endocitose (DUELLO et al., 1986; IGWEBUIKE, 2005; MYERS; REIMERS, 1988; SCHLAFFER et al., 2000;). Morgan et al. (1989) constataram que a produção sequencial de proteínas indica que as células trofoblásticas bovina (CTB) possuem diferentes funções de acordo com o estágio da gestação e importante papel durante a implantação do embrião e desenvolvimento dos vilos. Klisch et al. (2005) demonstraram que as glicoproteínas bPGAs (—1,—6—7,—17), associadas à gestação, são os maiores produtos secretados pelas células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) no terço médio da gestação.

No início de seu desenvolvimento, as células trofoblásticas binucleadas (CTB) estão dispersas no epitélio coriônico e localizadas profundamente numa posição intra-epitelial dentro do trofoectoderma, de tal modo que não haja contato nem com a membrana basal, tampouco com a borda apical microvilar (WANGO et al., 1990, WOODING, 1994). Essas células imaturas são pequenas, arredondadas ou esféricas, cujo citoplasma apresenta-se mais corado que as células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), em razão da presença de numerosos ribossomos dispersos no citoplasma (WANGO et al., 1990; KLISH et al., 1999).

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) são células cubóides ou colunares que possuem características típicas de células epiteliais, localizadas na lâmina basal e unidas uma às outras por complexos juncionais, incluindo *tight junctions* (DENT, 1973; WOODING et al., 1994). As membranas apicais dessas células mostram microvilos que interdigitam com os microvilos do endotélio uterino, formando a área de contato materno-fetal (BJÖRKMAN et al., 1969; DENT, 1973; IGWEBUIKE, 2005). Constituem cerca de 80% da população celular do trofoblasto. Cada célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) possui um único núcleo de forma irregular e um nucléolo grande com cromatina delicadamente dispersa. O citoplasma contém corpúsculos de Golgi, polissomos, cisternas de

retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias ovóides ou alongadas, localizadas nos pólos das células (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977). Verifica-se também a presença de acúmulo de gotículas de gordura e vesículas de tamanhos diversos no citoplasma, cujo conteúdo é material degenerativo (KING et al., 1980). A célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) freqüentemente exhibe lobulação do núcleo. Isso foi sugerido como um sinal indicativo de que essas células originam-se de mitoses que não se completaram. A ocorrência de células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) foi atribuída à mitose acitocinética tripolar, em razão do arranjo dos cromossomos na metáfase na forma de Y (KLISH et al., 1999).

Vasconcelos et al. (1989) avaliaram populações celulares epiteliais no placentônio de bovinos no periparto e a participação da apoptose (morte celular programada) nos processos de maturação e expulsão placentária. Resultados obtidos demonstraram que o decréscimo da população de células epiteliais carunculares participa da maturação e liberação da placenta e que o número de células gigantes trofoblásticas binucleadas diminui sensivelmente no momento do parto. Os achados sugerem que a apoptose é um mecanismo ativo na maturação placentária, sendo mais intensa no momento do parto, o que favorece a eliminação das membranas fetais; e que a presença de apoptose no endotélio capilar do placentônio pode ser um mecanismo celular importante para a separação dos tecidos fetal e materno.

3.5 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular *in vitro* representa um dos caminhos para se conhecer a fisiologia celular, pois está livre das variações do organismo, alterações na homeostase ou condições de estresse (FENG; PETER; ASEM, 2000). Essa técnica possibilita o estudo da atividade intracelular, interação célula a célula, produtos e secreções celulares, engenharia genética,

entre outros (FRESHNEY, 1994). Quando se deseja inferir características e funções para um grupo de células, o cultivo celular é uma das maneiras de se alcançar tal objetivo, pois mimetizam o que ocorre *in vivo* (FENG; PETER; ASEM, 2000). Fenômenos que ocorrem em culturas são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos intactos. Existem dois tipos básicos: cultivo de explante e cultivo celular. Cultivo de explante é feito com pequenos fragmentos de tecidos oriundos do hospedeiro e mantidos em cultivo, enquanto que o cultivo celular é resultado da dissociação do tecido em células individuais seguido de sua manutenção em cultivo (KAVALCO, 1999).

Atualmente, as culturas são comumente feitas a partir de suspensão de células dissociadas de tecidos. As culturas podem ser classificadas de duas maneiras: culturas primárias, preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem fracionamento das células e culturas secundárias, em que células oriundas de culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar novas culturas, podendo ser repetidamente cultivadas dessa forma (KAVALCO, 1999).

São necessárias placas com meios líquidos contendo quantidades específicas de nutrientes de baixo peso molecular, como sais, glicose, aminoácidos e vitaminas dissolvidos em salina tamponada. O termo “nutriente” é reservado a substâncias que entram nas células e são utilizadas quer como substrato para biossíntese ou metabolismo, ou como catalizadores nesses processos. A maioria dos meios também contém alguns componentes “não nutrientes”, tais como o vermelho de fenol (indicador de pH) e, algumas vezes, o tampão HEPES. O soro animal é adicionado na maioria dos cultivos rotineiros de células, pois poucas células crescem na ausência dele. Mesmo quando ocorre crescimento, ele é sempre melhorado quando se adiciona soro ao meio, sendo o soro fetal bovino o mais utilizado. Condições peculiares são necessárias para cada tipo celular se multiplicar e funcionar normalmente (HAM et al., 1979; WHITAKER, 1972).

Pesquisadores tentaram estabelecer linhagens de células trofoblásticas bovina para melhor compreensão da interação materno-fetal por meio do cultivo celular *in vitro*. Várias dessas células sofrem alterações durante o progresso da gestação, razão pela qual seu monitoramento torna-se importante (IGWEBUIKE, 2005).

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é um recurso emergente na medicina veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001). A citometria de fluxo provou ser uma ferramenta importante utilizada em várias áreas das ciências médicas e biológicas, como imunologia, hematologia, genética, entre outras. O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*). Alguns aparelhos são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as características citométricas (ROITT et al., 1999).

Essa tecnologia, baseada no uso de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática é utilizada para algumas características estruturais e funcionais de células e organelas celulares que fluem em uma suspensão celular (WILKERSON, 2004).

Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada, de forma que estas fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (*sheath fluid*) e saiam uma atrás da outra, de modo que uma única célula por vez seja interceptada pelo laser, perpendicular ao fluxo. Uma vez interceptada pelo *laser*, fenômenos físicos ocorrem e uma parte da luz sofre dispersão quer na direção frontal (*forward scattering*), quer lateral (*side scattering*). A radiação assim dispersa é detectada

diretamente por fotodiodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90°. A combinação desses tipos de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular, a granulosidade/complexidade e a morfologia. A avaliação do tamanho relativo das células (*Forward scatter — FSC*) e da granulosidade ou complexidade interna (*Side scatter — SSC*) permite que as mesmas sejam agrupadas em populações segundo seus parâmetros morfológicos (WILKERSON, 2004).

Figura 1— Esquema da incidência dos feixes de laser e dos filtros de captação
Fonte: Manual Fleury de diagnóstico em hematologia, 2004.

A citometria de fluxo facilita a coleta rápida de células em suspensão, permitindo a definição precisa de subpopulações celulares com base na presença e intensidade de uma combinação de marcadores fenotípicos (SHAPIRO, 1994). A possibilidade de analisar simultaneamente diversas características celulares e um grande número de eventos permite, por um lado, a avaliação concomitante de aspectos morfológicos, fenotípicos e funcionais e, por outro, confere significado estatístico mesmo em fenômenos raros que não são detectáveis por outras metodologias (GRINDEM, 1996).

A amostragem dos dados, as análises e a interpretação podem, então, ser realizadas por meio de *softwares* específicos. Muitos autores têm contribuído com seus experimentos para

desenvolver técnicas que envolvem utilização de anticorpos monoclonais e policlonais direta ou indiretamente conjugados a fluorocromos para indentificar populações celulares, entre outras, agora utilizadas tanto em laboratório de rotina, como na investigação básica e/ou clínica (WILKERSON, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODO

As amostras de placentônios utilizadas neste experimento foram coletadas no Frigorífico Mantiqueira Ltda, localizado na região metropolitana de São José dos Campos, Estado de São Paulo.

Após o abate, as carcaças dos animais foram introduzidas na linha de abate e no momento da evisceração, os úteros gravídicos foram coletados para o processamento imediato. Esses foram incisados na região de sua curvatura maior e cerca de cinco placentônios foram colhidos. Medidas dos fetos foram tomadas a fim de se estimar a idade dos mesmos por meio do método *crow-rump*, ou seja, comprimento equivalente à distância cefalococcígea (CR: *crown-rump*), de acordo com Noden e Lahunta, 1990 (Tabela 1). Considera-se primeiro terço animais até 15 centímetros; segundo terço, animais de 16-53 centímetros; e terceiro terço, de 54-88 centímetros. Nossas amostras giraram em torno de 8 centímetros (primeiro terço), 40 centímetros (segundo terço) e 64 centímetros (terceiro terço).

Placentônios de animais de primeiro, segundo e terceiro terços de gestação (n:10 em cada terço) foram coletados da região dorsal e ventral do útero. Esses foram aspergidos com álcool 70°GL no momento da coleta, imediatamente lavados por três vezes em solução PBS 0,1M (Na_2HPO_4 1.15 g; KH_2PO_4 0,2 g; NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g e água destilada qsp 1000 mL) pH 7,4 estéril por 5 minutos cada um, acondicionados em sacos plásticos contendo a mesma solução e transportados a 4° C ao laboratório.

Tabela 1 — Estimativa da idade gestacional segundo Noden e Lahunta (1990)

<u>Idade (dias)</u>	<u>Crow-rump (cm)</u>
40-60	1-5
60-80	6-10
80-100	11-15
100-110	16-20
110-125	21-25
125-140	26-30
140-150	31-35
150-160	36-40
160-170	41-45
170-180	46-50
180-190	51-55
190-200	56-60
200-210	61-65
210-225	66-70
225-230	71-75
230-240	76-80
240-260	81-85
260-270	86-90
270-280	91-95

4.1 CULTIVO CELULAR

No laboratório, todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis no fluxo laminar. Os placentônios foram lavados em PBS 0,1 M em pH 7.4, a seguir colocados sobre uma bandeja de aço inoxidável para a retirada do excesso de epitélio alantoidiano por

meio de pinça e tesoura esterilizadas. Os placentônios foram, então, seccionados numa espessura de 0,5 cm e colhidos fragmentos de várias regiões da interface entre o cotilédone e a carúncula, na tentativa de homogeneizar a amostra (Figura 2 e 3).

Fonte: Schlafer et al.; 2000

Figura 2 — Esquema de placentônio bovino. A região tracejada é o local de interdigitação materno-fetal onde foram colhidas as amostras

Os fragmentos foram colocados sobre uma peneira de malha fina de 150 mesh acomodada sobre um *becker* contendo cerca de 2ml de meio de cultura *D-MEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (*FBS—Fetal Bovine Serum*); 1U/mL de penicilina; 1µg/mL de estreptomicina; 2,5µg/mL de anfotericina; 0,02 mL de L-glutamina 0,3%; 0,05 mL de HEPES 280 mM e 0,005 mL de NaHCO₃ 7,5%. O tecido foi levemente pressionado contra a peneira promovendo a separação mecânica das células. Em seguida, foram realizadas três lavagens com *D-MEM* para a colheita das células separadas. Essa suspensão celular foi lavada em três ciclos de 550 G por 5 minutos a 20° C. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em volume adequado de *D-MEM*

e procedeu-se à análise da viabilidade utilizando-se o método de exclusão por *Trypan Blue* e concentração celular para obtenção de uma suspensão contendo cerca de 2×10^7 células/mL. A contagem celular foi realizada utilizando-se o hematocítômetro. As células foram cultivadas em placas de poliestireno com 24 poços, contendo cerca de 2×10^7 células/mL em *D-MEM* em incubadora a 37° C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado 24 horas após o cultivo e as culturas foram mantidas por até 10 dias, estabelecendo-se um protocolo de manutenção de células placentárias.

Figura 3 – Placentônio bovino (setas)

4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Esfregaços de células a fresco e em cultura foram realizados, fixados com metanol a 95% e corados com solução de Giemsa comercial (MERCK®) aproximadamente 2 mL por lâmina (solução A constituída por 4 mL de 9,078 g de monofosfato ácido de potássio em 1000

mL de água destilada) acrescida de solução B constituída por solução 6 mL de (9,465 g de fosfato ácido de sódio monobásico em 1000 mL de água destilada), 3 mL de formaldeído, 1,5 mL de ácido acético glacial, 0,9 g de cloreto de sódio e 100 mL de água destilada) e 90 mL de água destilada por um período de 4 horas em temperatura ambiente. Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínula e resina (Alkklan®). A análise morfológica e contagem diferencial foram realizadas por meio de microscopia óptica no microscópio de Zeiss. Avaliaram-se a viabilidade e concentração celular nos intervalos de 1, 5 e 10 dias por meio do método de exclusão por *Trypan Blue*.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após 24 horas de cultivo, as suspensões celulares foram centrifugadas e lavadas em PBS 0,1 M, pH 7.4 (três ciclos de 300 G por 5 minutos a 20°C). Os sobrenadantes foram desprezados e os *pellets* contendo cerca de 5×10^7 células totais foram colhidos e fixados em solução de Karnowsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído, 0,16 g em 2 mL de água ultrapura), permanecendo em gelo por 1 hora. Em seguida, a solução de Karnowsky foi retirada e os “*pellets*” foram descolados e transferidos para um tubo de 1mL com 2 mL de sacarose (1,4 g sacarose, 10 mL tampão fosfato e 10 mL água ultrapura). Foram realizadas 5 lavagens de 20 minutos cada, em gelo, permanecendo a última pelo período de 12 horas a 4°C. Após esse período, a sacarose foi desprezada e substituída por tetróxido de ósmio 1% (1mL de PBS 0,1 M filtrado com 1 mL de ósmio 2%) permanecendo 1 hora em gelo. A seguir, o ósmio foi retirado e procedeu-se à desidratação gradual com etanol (30, 50, 70, 90 e 100° GL) por 10 minutos em gelo, repetindo-se a série com etanol a 100° GL por três vezes consecutivas. A seguir, as amostras foram submetidas por duas vezes à nova desidratação com óxido de propileno durante 10 minutos à baixa rotação e à temperatura ambiente. A resina

SPPUR foi preparada e misturada em proporções iguais ao óxido de propileno. O óxido de propileno foi retirado e aos “*pellets*” foram adicionados 2mL dessa mistura, sendo colocado em um agitador orbital à baixa rotação por 30 minutos e depois substituída por resina SPPUR pura durante 1 hora. Após esse período, a resina foi novamente trocada e as amostras permaneceram por 12 horas no agitador orbital sob baixa rotação. No dia seguinte a inclusão foi realizada, colocando-se os *pellets* no molde, completando-os com resina e incubando-se em seguida em estufa a 60° C por 72 horas para polimerização. Após essa etapa, os blocos foram retirados do molde e armazenados em ambiente com condições de baixa umidade. Em seguida, foram feitos cortes ultrafinos de 70 nanômetros em micrótomo Leica Ultracut R e contrastados em nitrato de chumbo e acetato de uranila em tela de cobre de 200 mesh. As células foram então observadas em microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL modelo 1010, caracterizadas segundo sua ultra-estrutura e contadas diferencialmente para avaliação dos tipos populacionais presentes em cada terço gestacional.

4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Retirou-se uma alíquota da suspensão celular contendo cerca de 2×10^7 células/mL para avaliação da viabilidade, concentração e posterior análise no citômetro de fluxo (FACScalibur) baseado nas características de tamanho (*Forward Scatter Channel*) e complexidade das células”(*Side Scatter Channel*). O mesmo procedimento foi realizado nos intervalos de 1, 5 e 10 dias.

5 RESULTADOS

Em nossos estudos, foi possível identificar sete tipos celulares distintos com base em suas frequências e características mais marcantes dentre as populações presentes em nossas amostras de placentônios. A viabilidade das células a fresco foi cerca de 50%, aumentando em média para 60% após um dia de cultivo. A análise morfológica e contagem diferencial foram feitas utilizando-se a coloração de Giemsa. As áreas das células estão dispostas na tabela 1 (Apêndice). A análise estatística foi realizada por meio do teste qui-quadrado, as amostras foram pareadas e consideradas duas hipóteses:

- H_0 : as amostras são iguais e $p > 0,05$ e
- H_1 : as amostras são diferentes e $p < 0,05$.

Os tipos celulares identificados em nossos estudos foram: células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT), células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) em forma de “granada” (CG), células mononucleadas maiores (CMMA), células mononucleadas menores (CMME) e células mononucleadas com citoplasma apresentando vacúolos em grande quantidade (CM com vesículas) (Figura 34 - 36).

As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) apresentam características morfológicas como citoplasma basófilo, dois núcleos simétricos levemente ovalados que ocupam, em conjunto, metade a 2/3 do espaço citoplasmático e área celular em média de $44,6 \pm 17,0 \mu\text{m}^2$ a $549,0 \pm 100,5 \mu\text{m}^2$, de acordo com o terço gestacional. No primeiro terço foi $44,6 \mu\text{m}^2 \pm 17,0 \mu\text{m}^2$, no 2º terço de $166,4 \mu\text{m}^2 \pm 43,7 \mu\text{m}^2$ e no terceiro terço $549,0 \pm 100,5 \mu\text{m}^2$. Apresentam heterocromatina frouxa difusamente distribuída no interior do núcleo, sendo que algumas células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) podem apresentar grumos no

interior do núcleo (Figura 4). Nossos estudos demonstraram maior frequência no terceiro terço gestacional (Figura 5). Não houve diferença estatística entre o 1T/2T e o 2T/3T. Os valores encontrados entre o 1T/2T e 2T/3T foram iguais (teste qui-quadrado, $p>0,05$). Houve diferença estatística entre o 1T/3T. Os valores encontrados entre o 1T/3T foram diferentes (teste qui-quadrado, $p<0,05$) (Figura 5).

Figura 4 – Fotomicrografias de uma célula gigante trofoblástica binucleada (A e B) corada por Giemsa — setas (barra: 40 μ m)

Figura 5 – Frequência da célula gigante trofoblástica binucleada (CGTB) nos terços gestacionais: 1T/2T($p>0,05$); 2T/3T($p>0,05$); 1T/3T($p<0,05$)

As células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) são maiores que as CGTB, apresentam menor volume citoplasmático em comparação às CGTB, três núcleos simétricos que ocupam em conjunto cerca de 2/3 do espaço citoplasmático, citoplasma basófilo e área

celular variando de $109,1 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$ a $1541,7 \pm 189,5 \mu\text{m}^2$ (Figura 6), de acordo com o terço gestacional. No primeiro terço foi $109,1 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$, no 2º terço de $699,0 \pm 74,1 \mu\text{m}^2$ e no terceiro terço $1541,7 \pm 189,5 \mu\text{m}^2$. Podem apresentar-se também com dois núcleos simétricos grandes e um terceiro menor e arredondado, com padrão de núcleo de células epiteliais (Figura 6). Algumas células podem apresentar heterocromatina condensada no interior do núcleo. Nossos estudos demonstram maior frequência no primeiro terço gestacional. Há diferença estatística entre os valores encontrados entre o 1T/2T (teste qui-quadrado, $p < 0,05$). Não há diferença estatística entre os valores encontrados entre o 2T/3T e entre o 1T/3T (teste qui-quadrado, $p > 0,05$) (Figura 7).

Figura 6 — Fotomicrografias de uma célula gigante trofoblástica trinucleada apresentando dois núcleos simétricos e um menor e arredondado (A e B) corada por Giemsa C —Fotomicrografia de célula gigante trofoblástica trinucleada com três núcleos simétricos — setas (barra: 40 μm)

Figura 7 — Frequência da célula gigante trofoblástica trinucleada nos terços gestacionais: 1T/2T ($p < 0,05$); 2T/3T ($p > 0,05$); 1T/3T ($p > 0,05$)

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), por sua vez, apresentam formas mais globosas, menor quantidade de citoplasma, um único núcleo redondo por célula, cromatina densa e citoplasma basófilo (Figura 8). Sua área celular também varia de acordo com o terço gestacional, sendo cerca de $50,0 \pm 6,4 \mu\text{m}^2$ no primeiro terço, $606,9 \pm 442,8 \mu\text{m}^2$ no 2º terço e $905,2 \pm 95,2 \mu\text{m}^2$ no terceiro terço (Tabela 3). Sua maior frequência foi observada no terceiro terço gestacional, sendo iguais entre o 1T/2T ($p > 0,05$) e diferentes entre 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 8 — Fotomicrografia de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (A e B) corada por Giemsa – setas (barra: $40\mu\text{m}$)

Figura 9 — Frequência de uma célula gigante trofoblástica mononucleada nos terços gestacionais: 1T/2T ($p>0,05$), 2T/3T e 1T/3T ($p<0,05$). Houve diferença estatística entre o 2T/3T e entre o 1T/3T

As células mononucleadas maiores (CMMA) possuem um único núcleo redondo com cromatina frouxa dispersa, citoplasma basófilo e áreas celulares médias variáveis na dependência do terço gestacional (Figura 10). No primeiro terço $35,9 \pm 9,8 \mu\text{m}^2$, $172,5 \pm 54,6 \mu\text{m}^2$, no 2º terço e $591,5 \pm 95,5 \mu\text{m}^2$ no terceiro terço (Tabela 3). Nossos estudos demonstram maior frequência no segundo terço gestacional. As amostras são diferentes ($p<0,05$) (Figura 11).

Figura 10 — Fotomicrografia de uma célula mononucleada maior (A e B) corada por Giemsa — setas (barra: $40 \mu\text{m}$)

Figura 11 – Frequência da célula mononucleada maior nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os três terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$)

As células mononucleadas menores (CMME) apresentam um único núcleo pequeno e redondo com cromatina densa, reduzido volume citoplasmático, citoplasma basófilo (Figura 12) e área celular variando de $16,8 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ a $176,4 \pm 52,6 \mu\text{m}^2$, de acordo com o terço gestacional. Varia em média de $16,8 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ no primeiro terço, $48,3 \pm 23,6 \mu\text{m}^2$ no 2º terço e $176,4 \pm 52,6 \mu\text{m}^2$ no terceiro terço (Tabela 3). Nossos estudos demonstram maior frequência no primeiro terço gestacional (Figura 13).

Figura 12 – Fotomicrografia de uma célula mononucleada menor (A e B) corada por Giemsa – setas. Linfócito (L) célula com núcleo redondo, cromatina densa e reduzido volume citoplasmático basófilo (barra: $40 \mu\text{m}$)

Figura 13 — Frequência da célula mononucleada menor nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$)

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) que sofreram uma lobulação, foram descritas por nós como células em forma de granada (CG) (Figura 14). Possuem formas mais globosas, núcleo com cromatina frouxa e área celular de $133,0 \pm 12,4 \mu\text{m}^2$ no primeiro terço e $825,4 \pm 325,2 \mu\text{m}^2$ no segundo terço. Nossos estudos demonstram maior frequência no segundo terço gestacional. Não há diferença estatística entre os terços gestacionais ($p > 0,05$) (Figura 15).

Figura 14 — Fotomicrografias de célula gigante trofoblástica mononucleada (A e B) que sofreram uma lobulação corada por Giemsa — setas (barra: $40 \mu\text{m}$)

Figura 15 — Frequência da célula gigante trofoblástica mononucleada que sofreu uma lobulação (CGTM – granada) nos terços gestacionais. Não há diferença estatística entre os terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p > 0,05$)

As células que apresentam um ou dois núcleos de forma irregular, grande citoplasma basófilo contendo vesículas de tamanhos diversos no citoplasma foram descritas por nós como células CM ou CB com vesículas (Figura 16). Possuem área celular média de $151,1 \pm 23,5 \mu\text{m}^2$ a $346,6 \pm 136,2 \mu\text{m}^2$, de acordo com o avançar da gestação. Varia em média de $151,1 \pm 23,5 \mu\text{m}^2$ no primeiro terço, $267,9 \pm 14,7 \mu\text{m}^2$ no 2º terço e $346,6 \pm 136,2 \mu\text{m}^2$ no terceiro terço. Nossos estudos demonstram maior frequência no terceiro terço gestacional (Figura 17).

Figura 16 — Fotomicrografias de uma célula mononucleada ou binucleada com citoplasma apresentando inúmeras vesículas (CM com vesículas) corada por Giemsa — setas (barra: 40 μ m)

Figura 17 — Frequência da célula com citoplasma apresentando inúmeras vesículas (CM com vesículas) nos terços gestacionais. Há diferença estatística entre os três terços gestacionais: 1T/2T; 2T/3T e 1T/3T ($p < 0,05$)

Observamos também a presença de monócitos (Figura 18) ratificando os achados de Wooding et al. (1992), que constataram a presença de leucócitos especializados (células *natural killer* uterinas, macrófagos uterinos). Da mesma maneira, verificamos a presença de

células híbridas trinucleadas (CHT) descritas por Klisch et al. (1999). De forma geral, a maioria das células sofreu aumento de sua área acompanhando a evolução da gestação (Figuras 37 - 43).

Figura 18 — Fotomicrografias de célula com citoplasma basófilo e núcleo reniforme ou em forma de ferradura (figura), sugerindo tratar-se de monócitos — setas (barra: 40 μm)

5.1 CULTIVO CELULAR

As descrições dos resultados abaixo estão elencados para melhor compreensão.

5.1.1 Frequência das células *versus* dias de cultivo

As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), do primeiro terço gestacional, apresentaram frequências iguais durante todo o cultivo ($p>0,05$). As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), do 2º terço gestacional, apresentaram maior frequência no quinto dia de cultivo (Figura 19). As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), do 2º terço gestacional apresentaram frequências diferentes entre 1D/5D e 5D/10D ($p<0,05$), mas foram iguais entre 1D/10D ($p>0,05$). As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), do terceiro terço gestacional, apresentaram frequências iguais entre 1D/5D ($p>0,05$), entre 5D/10D e 1D/10D foram diferentes ($p<0,05$).

Figura 19 – Frequência das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. Não houve diferença estatística nas CGTB do 1º terço ($p>0,05$). Houve diferença estatística das CGTB do 2º terço entre 1D/5D e 5D/10D ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre 1D/10D ($p>0,05$). No 3º terço não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$). Houve diferença estatística entre 1D/10D e 5D/10D ($p<0,05$).

As células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) oriundas do primeiro terço apresentaram maior frequência no primeiro dia de cultivo e decréscimo acentuado até o 5º dia (Figura 20). Houve diferença estatística entre 1D/5D e 1D/10D ($p>0,05$). As CGTT oriundas do 2º e terceiro terços não apresentaram diferenças estatísticas durante o cultivo ($p>0,05$).

Figura 20 – Frequência das células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1º terço houve diferença entre 1D/5D e 1D/10D ($p<0,05$). No 2º e 3º terços não houve diferença durante o cultivo ($p>0,05$).

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), do terceiro terço gestacional apresentam maior frequência no primeiro dia de cultivo (Figura 21). No primeiro terço não houve diferença estatística durante o cultivo ($p>0,05$). No segundo terço não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$), mas houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D ($p<0,05$). No terceiro terço houve diferença estatística durante todo o cultivo ($p<0,05$).

Figura 21 –Frequência das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1º terço não houve diferença estatística durante o cultivo ($p>0,05$). No 2º terço não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$), mas houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D ($p>0,05$). No terceiro terço houve diferença estatística durante o cultivo ($p>0,05$).

As células mononucleadas maiores (CMMA), oriundas do segundo terço gestacional, apresentam maior frequência no 5º dia de cultivo (Figura 22). No primeiro e segundo terços, não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$). Houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D. No terceiro terço houve diferença estatística entre 1D/5D e 5D/10D ($p<0,05$), mas não houve diferença estatística entre 1D/10D ($p>0,05$).

Figura 22 — Frequência das células mononucleadas maiores (CMMA) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1º e 2º terços não houve diferença estatística entre 1D/5D ($p>0,05$). Houve diferença estatística entre 5D/10D e 1D/10D ($p>0,05$). No 3º terço houve diferença estatística entre 1D/5D e 5D/10D ($p<0,05$), mas não entre 1D/10D ($p>0,05$)

As células mononucleadas menores (CMME), oriundas do primeiro terço gestacional, apresentam maior frequência no primeiro dia de cultivo, decrescem significativamente entre 1D/5D e 1D/10D ($p<0,05$) e permanecem iguais entre 5D/10D ($p>0,05$). As CMME oriundas do segundo terço apresentam frequências iguais entre 1D/5D ($p>0,05$) e diferentes entre 5D/10D e 1D/10D ($p<0,05$). As CMME, oriundas do terceiro terço, apresentam frequências diferentes durante o cultivo ($p<0,05$) (Figura 23).

Figura 23 – Frequência das células mononucleadas menores (CMME) oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. As CMME do 1º terço gestacional apresentam diferença estatística entre 1D/5D e 1D/10D ($p<0,05$), mas foram iguais entre 5D/10D ($p>0,05$). As CMME oriundas do 2º terço gestacional apresentam frequências iguais entre 1D/5D ($p>0,05$) e diferentes entre 5D/10D e 1D/10D ($p<0,05$). As CMME oriundas do 3º terço apresentam diferença estatística durante o cultivo ($p<0,05$)

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), descritas por nós como células, cujo núcleo se apresenta em forma de granada (CG), oriundas do segundo terço gestacional, apresentam maior frequência no primeiro dia, decrescendo progressivamente até o 10º dia de cultivo ($p < 0,05$) (Figura 24). No primeiro e terceiro terços, não houve diferença estatística durante o cultivo ($p > 0,05$).

Figura 24 – Frequência das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) com núcleo em forma de granada (CG), oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. No 1º e 3º terços, não houve diferença estatística durante o cultivo ($p > 0,05$). No 2º terço, houve diferença estatística durante o cultivo ($p < 0,05$)

As células mononucleadas, com citoplasma apresentando vacúolos em grande quantidade, descritas por nós como células com vesículas (CM) oriundas do terceiro terço gestacional, apresentam maior frequência no primeiro dia de cultivo (Figura 25). Houve diferença estatística no segundo e terceiro terços durante todo o cultivo ($p < 0,05$).

Figura 25 – Frequência das células mononucleadas com citoplasma apresentando vacúolos em grande quantidade, descritas por nós como células mononucleadas com aspecto vesiculoso, oriundas dos terços gestacionais durante o cultivo. Houve diferença estatística nas células oriundas do 2º e 3º terços durante todo o cultivo ($p < 0,05$).

5.2 CITOMETRIA DE FLUXO

As aquisições a fresco das amostras oriundas do primeiro terço gestacional demonstraram a presença de três populações distintas R1, R2 e R3 (Figura 44) em tamanho (*FSC*) e granulosidade (*SSC*), sugerindo ser essas formadas por células de diferentes tamanhos e complexidade, de acordo com a frequência encontrada *em nossos estudos*, tanto em relação ao terço gestacional quanto em relação ao tempo de cultivo. As populações da região R3 apresentaram maior tamanho (*FSC*) e granulosidade (*SSC*), sugerindo ser células maiores e mais complexas, ratificando nossos achados. Em cultivo, não houve alteração nas populações após o primeiro dia (Figura 46). Após cinco dias de cultivo, houve perda de um perfil populacional e presença de duas populações distintas em tamanho (*FSC*) e granulosidade (*SSC*) (Figura 49), que permaneceram até o 10^o dia de cultivo (Figura 51).

As aquisições a fresco das amostras oriundas do segundo terço gestacional demonstraram a diversidade de perfis populacionais com a presença de cinco populações distintas em tamanho (*FSC*) e complexidade (*SSC*), R1, R2, R3, R4 e R5 (Figura 54), sugerindo ser a região R1 e R2 formada por células de menor tamanho e complexidade, de acordo com a frequência encontrada *em nossos estudos*, tanto em relação ao terço gestacional, quanto em relação ao tempo de cultivo. As populações da região R3, R4 e R5 apresentaram maior tamanho (*FSC*) e complexidade (*SSC*), ratificando nossos achados. Em cultivo, não houve alteração nas populações após o primeiro dia (Figura 58). Após cinco dias de cultivo, houve perda de dois perfis populacionais e alteração dos restantes em tamanho (*FSC*) e complexidade (*SSC*) (Figura 61), corroborando com o aumento significativo de células de maior tamanho e complexidade *em nossos estudos*. Esses dados sugerem ser a região R3 constituída de células maiores e mais complexas, que apresentam decréscimo acentuado ($p < 0,05$) até o 10^o dia de cultivo e que justificam o encontro *em nossos estudos*, de apenas um perfil populacional condizente com células menores e menos complexas (Figura 64).

As aquisições a fresco das amostras oriundas do terceiro terço gestacional, demonstraram a presença de duas populações distintas em tamanho e complexidade, sugerindo ser a região R1 formada por células de menor tamanho e complexidade (Figura 65), de acordo com a frequência encontrada *em nossos estudos*, tanto em relação ao terço gestacional quanto em relação ao primeiro dia de cultivo. A população da região R2 apresentou maior tamanho e complexidade, de acordo *com nossos estudos*. Não houve alteração nas populações após o primeiro dia de cultivo (Figura 67). Após cinco dias de cultivo, houve perda de um perfil populacional (Figura 69) e alteração do restante em tamanho e complexidade, que permaneceram até o 10º dia de cultivo (Figura 70).

AMOSTRAS				
	Fresco	1 dia	5 dias	10 dias
1º Terço	3 regiões	3 regiões	2 regiões	2 regiões
2º Terço	5 regiões	5 regiões	3 regiões	3 regiões
3º Terço	2 regiões	2 regiões	1 região	1 região

Quadro 2 – Comparação dos perfis populacionais das diferentes regiões analisadas pela citometria de fluxo, de acordo com o terço gestacional e o tempo de cultivo

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A técnica utilizada não preservou a morfologia dos tipos celulares identificados em nosso trabalho; entretanto algumas características marcantes foram observadas.

O trofoblasto foi evidenciado por ser constituído por células com núcleos densos e nucléolos bem marcados, tamanhos diferentes e com a maioria de células gigantes e células binucleadas. As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) apresentam características morfológicas, dois núcleos simétricos levemente ovalados que ocupam, em conjunto, metade a $2/3$ do espaço citoplasmático. Apresentam heterocromatina frouxa difusamente distribuída no interior do núcleo, sendo que algumas células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) podem apresentar grumos no interior do núcleo (Figura 26). As células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) são maiores que as CGTB, apresentam menor volume citoplasmático em comparação às CGTB, três núcleos, sendo dois núcleos simétricos grandes e um terceiro menor e arredondado, com padrão de núcleo de células epiteliais (Figura 28). Algumas células podem apresentar heterocromatina condensada no interior do núcleo. Outra identificação para as células fetais é a presença de uma quantidade exacerbada de vesículas presentes no citoplasma (Figura 28). Células mononucleadas, apresentando cromatina frouxa com características de células epiteliais foram observadas, sugerindo serem oriundas do epitélio materno (Figura 29). Verificamos a presença de células mononucleadas apresentando extrusão de seu conteúdo nuclear (Figura 30 e 32). As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) apresentam formas mais globosas, maior quantidade de citoplasma e um único núcleo redondo por célula (Figura 27). As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) que sofreram uma lobulação foram observadas em nosso trabalho (Figura 33).

Figura 26 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica binucleada (CGTB) — seta (escala da barra: 1 μ m)

Figura 27 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) – seta (escala da barra: 2 μ m)

Figura 28 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica trinucleada (CGTT) – seta (escala da barra: 1µm)

Figura 29 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de células mononucleadas (CM) – seta (escala da barra: 1 μm)

Figura 30 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula mononucleada apresentando extrusão de conteúdo do núcleo, – seta (escala da barra: 1 μm)

Figura 31 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de células mononucleadas – seta (escala da barra: 1μm)

Figura 32 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula mononucleada que apresenta extrusão do conteúdo nuclear, seta (escala da barra: 1µm)

Figura 33 – Eletromicrografia eletrônica de transmissão de uma célula gigante trofoblástica mononucleada (CGTM) que apresenta lobulação do núcleo, seta (escala da barra: 1µm)

6 DISCUSSÃO

A existência de uma dinâmica das diversas populações de células na placenta bovina, na dependência do trimestre gestacional e do tempo de cultivo, foi demonstrada com êxito por este trabalho. Essa diversidade de tipos celulares observada assemelha-se aos descritos por Wooding, Morganet e Adam (1997) e, em razão dela, Klisch et al. (1999), baseada, em características morfológicas (Volume Nuclear Total–VNT), sugeriram uma nomenclatura apropriada para essas células: células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) e células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT).

Nosso trabalho evidenciou a presença de células trofoblásticas binucleadas (CTB), pequenas, arredondadas ou esféricas, de diferentes tamanhos no primeiro terço gestacional, que evoluem posteriormente para as células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), com citoplasma abundante e núcleo com heterocromatina frouxa, confirmando o relato de Klisch et al. (1999a, 1999b) e Carvalho (2004). Nossos resultados demonstram a presença dessas células em todos os terços gestacionais, sendo maior sua frequência no terceiro terço gestacional.

A frequência das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) e células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT), encontrada nos três terços gestacionais, explica o envolvimento dessas células na modificação do epitélio uterino desde a implantação do embrião até o término da gestação, sendo essa sua característica mais relevante (WOODING, 1992; KLISCH et al., 1999). Além disso, observamos na microscopia óptica maior frequência dessas células no segundo e 3º terços gestacionais, sugerindo ser esta uma fase de grande atividade celular, na qual ocorre maior interação feto-maternal. Morgan et al. (1989) constataram que a produção sequencial de proteínas indica que as células trofoblásticas

bovina (CTB) possuem diferentes funções de acordo com o estágio da gestação e importante papel durante a implantação do embrião e desenvolvimento dos vilos. Esse aumento da atividade celular é justificado pelos relatos de Klisch et al. (2005) que demonstraram que as glicoproteínas associadas à gestação (bPGA -1,-6,-7,-17) são os maiores produtos secretados pelas células gigantes trofoblásticas binucleadas no segundo trimestre da gestação. Essa variação de tamanho e frequência infere que as células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) possuem diferentes funções de acordo com o estágio da gestação. As células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB, oriundas do segundo terço gestacional, mantiveram uma morfologia e apresentaram, na contagem diferencial, maior frequência no 5º dia de cultivo. Esta manutenção da morfologia pode estar relacionada à presença de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino (FBS) (FENG; PETER; ASEM, 2000). Todas as células estudadas mostraram uma capacidade adaptativa às condições de cultivo.

No primeiro trimestre gestacional, houve diferença na frequência das células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT), células mononucleadas maiores (CMMA) e células mononucleadas menores (CMME). Este fato pode ser devido ao evento de migração das células gigantes trofoblásticas binucleadas e posterior fusão com células do epitélio uterino com liberação dos produtos secretados pelas CGTB. Esses dados justificam o reconhecimento materno feito por meio da sinalização pelos produtos secretados das CGTB.

Em cultivo, o segundo trimestre gestacional demonstrou ser o período de maior variação nas frequências dos tipos celulares estudados. Isso pode estar relacionado ao fato das células nessa fase encontrarem-se num estado de atividade funcional intenso (KLISCH et al., 2005), condição que estaria mantida durante o cultivo, sugerindo sua importância para a nutrição do feto (CGTM).

As células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) no terceiro trimestre apresentaram frequências iguais às do segundo. Isso pode ser devido, em parte à proximidade

da idade fetal de nossas amostras e em função da gestação estar chegando ao fim. As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) apresentaram frequências diferentes, aumentando de acordo com a evolução da gestação, inferindo sua importância na nutrição do feto até o momento do parto.

Constatamos a ocorrência de células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) formadas por um processo de mitose acitocinética tripolar, em que os núcleos se apresentam simétricos em razão do arranjo dos cromossomos na metáfase na forma de Y, conforme reportado por Klisch et al. (1999).

Foi possível identificar as células gigantes trofoblásticas trinucleadas (CGTT) com dois núcleos simétricos grandes e um terceiro menor e arredondado, com padrão de núcleo de células epiteliais no primeiro trimestre gestacional, o que poderia sugerir o evento de migração das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), com posterior fusão com as células colunares do epitélio uterino formando células híbridas trinucleadas, justificado pela maior frequência encontrada no primeiro trimestre gestacional, ratificando os achados de Klisch et al. (1999). Wooding (1984) demonstrou que as células híbridas trinucleadas e as placas sinciciais (PS) são utilizadas para levar o conteúdo dos grânulos das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) fechados à circulação materna, migram em direção à interface e fundem-se com o epitélio uterino liberando o conteúdo de seus grânulos (WOODING, 1992). O destino dessa placa sincicial (PS) varia de acordo com a espécie, podendo ser transitória ou persistir durante toda a gestação, dependendo da espécie. Em vacas e veados, a placa sincicial (PS) está presente na implantação, mas torna-se dispersa em razão do crescimento acentuado de células epiteliais uterinas mononucleadas (WOODING et al., 1997). Essas células são descritas *em nosso trabalho* como células mononucleadas maiores (CMMA). Nossa observação do aumento de tamanho dessas células com o avançar da gestação está de acordo com os trabalhos de Wooding et al. (1997).

As células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM) formam a maioria da interface materno-fetal; desta forma, espera-se que sejam encontradas durante toda a gestação. Isto foi confirmado por sua presença em todos os trimestres gestacionais; contudo, nossa observação mostrou que elas apresentam aumento significativo entre o primeiro e o terceiro trimestres, e entre segundo e o terceiro trimestres. O decréscimo da frequência dessas células entre o primeiro e o segundo trimestres é justificado, pois as células gigantes trofoblásticas mononucleadas originam as células gigantes binucleadas do trofoblasto por cariocinese (divisão do núcleo) sem a ocorrência de citocinese (divisão do citoplasma) (IGWEBUIKE, 2005).

Células gigantes mononucleadas, apresentando lobulação do núcleo, descrito por nós como “células em forma de granada” (CG) foram observadas em todos os terços gestacionais, sugerindo que esse tipo celular não demonstra alteração de sua dinâmica. Esses dados sugerem tratar-se das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM), cuja lobulação poderia ser resultante de mitoses que não se completaram, conforme relatado por Klisch et al. (1999).

Sinais característicos de apoptose (morte celular programada) como núcleo de forma irregular contendo grumos de heterocromatina condensada, grande citoplasma basófilo com vesículas de tamanhos diversos no citoplasma, foram observados em tipos celulares anteriormente elencados e classificados por nós como “células com vesículas”. A maior frequência dessas células foi observada no terceiro trimestre gestacional, sugerindo ser a apoptose um mecanismo celular importante para a separação dos tecidos fetal e materno, além de um mecanismo ativo na maturação placentária, sendo mais intensa no momento do parto. Tal resultado ratifica os achados de VASCONCELOS (1989), que avaliou populações celulares epiteliais no placentônio de bovinos no periparto e a participação da apoptose (morte celular programada) nos processos de maturação e expulsão placentária, sugerindo a presença

de apoptose no endotélio capilar do placentônio como um sinal indicativo da participação desse mecanismo no processo de maturação e expulsão placentária. Resultados obtidos demonstraram que o decréscimo da população de células epiteliais carunculares participa da maturação e liberação da placenta e que o número de células gigantes trofoblásticas binucleadas diminui sensivelmente no momento do parto.

Encontramos também células pequenas com citoplasma basófilo e núcleo reniforme ou em forma de ferradura, sugerindo tratar-se de monócitos, células essas presentes no sangue periférico que migram para o útero, se diferenciam em macrófagos e participam do sistema imune uterino, da mesma forma que células *natural killer* (LGL) e neutrófilos (ASBURY e GOLDSMITH, 1987). Schlafer, Fischer e Davies (2000) estudaram o desenvolvimento de macrófagos placentários em placentas bovinas e demonstraram aumento quantitativo com a evolução da gestação, sugerindo sua participação no processo de expulsão do feto e anexos. Miyoshi, Sawamukai e Iwanaga (2002) evidenciaram a presença de macrófagos tanto em placentônios de animais sem retenção de placenta, quanto em animais com placenta retida, além de seu aumento em número com o avançar da gestação. Entretanto, a atividade da fosfatase ácida, uma das enzimas presentes nos lisossomos dos macrófagos, estava diminuída no parto e pós-parto, indicando a redução da atividade fagocitária dos macrófagos em bovinos com retenção de placenta.

Verificamos ainda a presença de células mononucleadas maiores (CMMA) em todos os trimestres, contudo, a diminuição de sua frequência no terceiro terço gestacional, sugere seu envolvimento com o mecanismo de apoptose, descritas por Vasconcelos (1989) como células epiteliais carunculares. O decréscimo da população dessas células e das células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) participa do processo de maturação e liberação da placenta no momento do parto, conforme proposto por (HANSEN et al., 1999).

De forma geral, a maioria das células por nós estudada sofreu aumento de suas áreas, com a evolução da gestação, fato mais evidenciado no aumento das células mononucleadas maiores (CMMA) nos diferentes terços gestacionais.

Pela observação microscópica, evidenciamos a presença das células mononucleadas menores (CMME) durante o progresso da gestação principalmente no primeiro trimestre, inferindo que o decréscimo de sua frequência pode estar associado ao mecanismo de apoptose e também ser decorrente do aumento de sua área com a evolução da gestação.

Células mononucleadas, com citoplasma apresentando inúmeras vesículas em todos os trimestres gestacionais, com evidente aumento de sua frequência na contagem diferencial constatada no terceiro trimestre gestacional sugere o envolvimento dessas células com o mecanismo de apoptose. Pela observação microscópica, constatamos ser o terceiro trimestre rico em células com as características acima descritas, explicando em parte o mecanismo de expulsão do feto e seus anexos e a placenta como um órgão transitório, assim como o desenvolvimento da placenta é fator determinante, por meio do qual o conceito sinaliza sua presença (HANSEN et al., 1999; ROBERTS et al., 1997).

A citometria de fluxo também demonstrou a existência de perfis populacionais distintos em tamanho (*FSC*) e complexidade (*SSC*), tanto em relação ao terço gestacional quanto ao tempo de cultivo.

As aquisições a fresco de amostras oriundas do primeiro terço gestacional demonstraram a presença de três populações distintas R1, R2 e R3, sugerindo serem essas formadas por células mononucleadas maiores (R1–CMMA) e células mononucleadas menores (R2–CMME), fato confirmado pela frequência encontrada na contagem diferencial dessas células, tanto em relação ao terço gestacional quanto em relação ao tempo de cultivo. As populações da região R3 apresentaram maior tamanho (*FSC*) e granulosidade (*SSC*), sugerindo serem células gigantes mononucleadas, binucleadas ou trinucleadas, fato ratificado

por nossa contagem diferencial. Quando em cultivo, nota-se a perda de um perfil populacional e remanescência de duas populações distintas até o 10º dia de cultivo.

As aquisições a fresco de amostras oriundas do segundo terço gestacional demonstraram uma diversidade de perfis populacionais com a presença de cinco populações distintas, sugerindo tratar-se a região R1 e R2 formadas por células mononucleadas maiores (CMMA, 40%) e células mononucleadas menores (CMME, 40%) respectivamente, de acordo com a frequência encontrada na contagem diferencial, tanto em relação ao terço gestacional, quanto em relação ao tempo de cultivo. As populações da região R3, R4 e R5 apresentaram maior tamanho (*FSC*) e granulosidade (*SSC*), sugerindo serem células gigantes mononucleadas, binucleadas ou trinucleadas. *Em nossos estudos*, após cinco dias de cultivo, observamos a perda de dois perfis populacionais e alteração dos perfis dos restantes, aliado ao aumento significativo de células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB) no 5º dia de cultivo. Esses dados sugerem ser a região R3 constituída por CGTB, que após esse aumento decresceram acentuadamente até o 10º dia de cultivo. Além disso, conforme constatado na observação microscópica, nota-se nesse período a presença de apenas um perfil populacional condizente com células mononucleadas maiores (CMMA 45%) e células mononucleadas menores (CMME 45%).

As aquisições a fresco de amostras oriundas do terceiro terço gestacional demonstraram a presença de duas populações diferentes em tamanho e granulosidade, sugerindo ser a região R1 formada por células mononucleadas maiores (CMMA 30%) e células mononucleadas menores (CMME 20%), de acordo com a frequência encontrada na contagem diferencial, tanto em relação ao terço gestacional quanto em relação ao primeiro dia de cultivo. A população da região R2 apresentou maior tamanho e granulosidade, inferindo ser constituída por células gigantes trofoblásticas mononucleadas (CGTM 8%), binucleadas (CGTB 3%) ou trinucleadas (CGTT 1,5%). Após cinco dias de cultivo, houve a perda de uma

população e alteração do restante em tamanho e complexidade, corroborando com o decréscimo significativo de células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), observada na contagem diferencial durante todo o cultivo. Esses dados sugerem ser a região R2 constituída por células gigantes trofoblásticas binucleadas (CGTB), que apresentam um decréscimo acentuado até o 10^o dia de cultivo, condizente com os achados da observação microscópica, de apenas um perfil populacional compatível com células mononucleadas maiores (CMMA 45%) e células mononucleadas menores (CMME 45%) no 10^o dia de cultivo.

Pelos métodos utilizados, foi possível observar a dinâmica das células placentárias bovinas e sugerir que essas variações devem estar relacionadas com os diferentes papéis que elas desempenham de acordo com a evolução da gestação.

7 CONCLUSÕES

Pelos métodos utilizados, foi possível observar a dinâmica das células placentárias bovinas e concluir que:

- as células placentárias bovinas, oriundas das nossas amostras, apresentaram variação de padrões morfológicos de acordo com o trimestre gestacional;
- as células placentárias bovinas, oriundas das nossas amostras, apresentaram frequências variáveis de acordo com o trimestre gestacional e o tempo de cultivo;
- a utilização da citometria de fluxo em nosso trabalho corroborou para a identificação de uma dinâmica populacional com perfis celulares distintos, confirmando a diversidade de tipos morfológicos presentes na placenta bovina, de acordo com o trimestre gestacional e o tempo de cultivo;
- todas as células, independentemente do trimestre gestacional de origem, não apresentaram alterações marcantes de suas populações entre as aquisições a fresco e após 1 dia de cultivo;
- todas as células, independentemente do trimestre gestacional de origem, após cinco dias de cultivo, perderam uma população no primeiro trimestre, duas populações no segundo trimestre e uma população no terceiro trimestre ;
- de forma geral, a maioria das células sofreu aumento de sua área acompanhando o desenvolvimento da gestação; e
- foi possível avaliar a dinâmica populacional das células placentárias a fresco e pós-cultivo nos diferentes períodos gestacionais pela microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

- ASBURY, A. K.; GOLDSMITH, C. H. The role of voluntary agencies in the funding of biomedical research. **New England Journal Medicine**, v. 316, n. 26, p.1665, 1987.
- ATKINSON, Y. H.; GOGOLIN-EWENS, K.J., HOUNSELL, E. F., DAVIES, M. J.; BRANDON, M. R.; SEAMARK, R. F. Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 26679-26685, 1993.
- BJÖRKMAN, N. H. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells In: The bovine placentome. **Ultrastructural Research**, v. 24, p. 249-258, 1968.
- BJÖRKMAN, N. H. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **The Anatomical Record**, v. 163, p. 17-30, 1969.
- BOSHIER, O. P.; HOLLOWAY, H. The sheep trophoblast and placental function: an ultrastructural study. **Anatomy**, v. 124, p. 287-298, 1977.
- CARVALHO, A. F. Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalus bubalis bubalis*) – Linnaeus, 1758. 2000.110f. Tese (Doutorado Em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- CARVALHO, I. Expressão e distribuição da conexina 43 nas células trofoblásticas gigantes bovinas em três fases gestacionais. 2004. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) - Universidade de São Paulo.
- COSTEAS, P. A.; KOUMOULI, A.; GIANTSIOU-KYRIAKOU, A.; PAPALOIZOU, A.; KOUMAS, L. Th2/Th3 Cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. **Human Immunology**, v. 65, p. 135-141, 2004.
- CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, p. 1508-1518, 1994.
- DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, n. 2-3, p.194-202, 2000.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v.121, p. 41-49, 2001.
- DENT, J. Ultrastructural changes in the intercotyledonary placenta of the goat during early pregnancy. **Journal of Anatomy**, v. 114, p. 245-259, 1973.
- DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R.;D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, v. 119, p. 1351-1355. 1986.

FENG, S.; PETER, A. T.; ASEM, E. Establishment of a pure culture of distinct cell types from bovine placental cotyledon. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 101-106, 2000.

FALDYNA, M.; LEVA, L.; KNOTGOVA, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FALDYNA, M.; KNOTIGOVA, P.; REHAKOVA, Z.; MORAVKVA, A.; TOMAN, M. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.95, n. 3-4, p. 165-176, 2003.

FRESHNEY, N. W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1039-49, 1994.

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

GREENSTEIN, J. S.; MURRAY, R. W.; FOLEY, R. C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical Record**, v. 132, p. 321–341, 1958.

GRUNERT, E. **Obstetrícia Veterinária**. Porto Alegre (RS): Editora Sulina, 1982. 323 p.

GUILLOMOT, M.; FLECHON, J. E.; WINTENBERGER-TORRES, S. Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. **Placenta**, v. 2, p. 169–182, 1981.

GUILLOMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surface of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in cow. **The Anatomical Record**, v. 204, p. 315-322, 1982.

GUILLOMOT, M.; REINAUD, P.; LABONNARDIERE, C.; CHARPIGNY, G. Characterization of conceptus produced goat interferon-tau and analysis of its temporal and cellular distribution during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 149–156, 1998.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 513

HAM, R.G.; PUCK, T.T. A regulated incubator controlling CO₂ concentration, humidity and temperature for use in animal cell culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.67-71, 1979.

HANSEN, T. R.; AUSTIN, K. J.; PERRY, D. J.; PRU, J. K.; TEIXEIRA, M. G.; JOHNSON, G. A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 329–339, 1999.

HANSEN, P. J.; BAZER, F. W.; SEGERSON, E. C. Skin graft survival in uterine lumen of ewes treated with progesterone. **American Journal Reproductive Immunology Microbiology**, v. 12, p. 48-54, 1986.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas- A minireview. **Animal reproduction Science**, p. 2-13, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Brasília 2004 – Disponível em: <Internet: www.ibge.gov.br >. Acesso em: 26 fev. 2006.

JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; JOYCE, M. M.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; GRAY, C. A.; PFARRER, C. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. **Biology and Reproduction**, v. 69, p. 92-98, 2003.

JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Ovine osteopontin I: cloning and expression of mRNA in the uterus during the peri-implantation period. **Biology and Reproduction**, v. 61, 884-891, 1999a.

JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; SPENCER, T. E.; NEWTON, G. C. R.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Ovine osteopontin II: osteopontin and alpha (v) beta (3) integrin expression in the uterus and conceptus during the pre-implantation period. **Biology and Reproduction**, v. 61, p. 892-899, 1999b.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 95-100, 1980.

KAVALCO, K. F. Cultura de Células. Disponível em :<Internet: <http://www.biociencia.org>>. Acesso em 12 set 2005.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 17-30, 1982.

KLISCH, K.; HECHT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. DNA content and ploidy level of bovine placental trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 20, p. 451-458, 1999 (a).

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMAN, B.; LEISER, R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. **Anatomy and Embryology**, v. 200, p. 229-237, 1999 (b).

KLISCH, K.; DE SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; LEISER, R.; PICH, A. Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. **Molecular Reproduction Development**, v.4, p.453-60, 2005.

KUBOTA, C., YAMAKUCHI, H., TODOROKI, J., MIZOSHITA, K., TABARA, N., BARBER, M. and YANG, X.: Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **PNAS**, v. 97, p. 990-995, 2000.

LEE, C. S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placenta of the deer and cow using the monoclonal antibody SBU3. **Journal of Anatomy**, v. 147, p. 163-180, 1986a.

LEE, C. S.; WOODING, F. B. P.; BRANDON, M. R. Ultrastructural immunogold investigations of the function and diversity of binucleate cells in the sheep placenta using a monoclonal antibody. **Placenta**, v.7, p. 495-504. 1986b.

LEE, C. S., WOODING, F. B. P., BRANDON, M. R. Light and electron microscopic immunocytochemical studies on the role of binucleate cells in villus growth in goat placentomes. **Submicroscopy and Cytology**, v. 18, p. 661- 672, 1986c

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Disponível em:
< <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 jan. 2006.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39, n. 3, p. 125 -128, 2004.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 53-56, 2002.

MORGAN, G.; WOODING, F. B. P. Cell migration in the ruminant placenta, a freeze fracture study. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 83, p. 148-160, 1983.

MORGAN, G.; WOODING, F. B.; BECKERS, J. F.; FRIESEN, H. G. An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 745-752, 1989.

MURPHY, S.P.; GOLLNICK, S.O.; PAZMANY, T.; MAIER, P.; ELKIN, G.; TOMASI, T.B.
Repression of MHC class II gene transcription in trophoblast cells by novel single-stranded DNA binding proteins. **Molecular Reproduction and Development**. v.4, p.390-403, 1997.

MYERS, D.A., REIMERS, T.J. Purification and endocrine evaluation of bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. **Tissue Culture and Method**, v. 11, p. 83-88, 1988.

PEREIRA, F. T. Y.; MIGLINO, M. A.; BEVILACQUA, E.; Carvalho, A. F. Morphological aspects of placental haematomes of water buffalo placenta (*Buballus buballis bubalis* Linnaeus, 1758). **Brazil Veterinary Animal Science**, v. 38, p.151-154, 2001.

PFARRER, C.; EBERT, B.; MIGLINO, M. A.; KLISCH, K.; LEISER, R. The three-dimensional feto-maternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. **Journal of Anatomy**, v. 198, p. 591-602, 2001.

POPESCU, C. P. Les anomalies chromosomiques des bovins (*Bos taurus* L.). État actuel des connaissances. **Annales de Génétique et de Sélection Animale**, v. 9, p. 463-470, 1977a.

POPESCU, C. P. A new type of Robertsonian translocation in cattle. **Journal of Hereditary**, v. 68, p.139-142, 1977b.

ROITT, I. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. 424p.

ROBERTS, R. M. O.; BAZER, F. W. The function of uterine secretions. **Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 875-892, 1988.

ROBERTS, R. M.; EALY, A. D.; ALEXENKO, A. P.; HAN, C. S.; EZASHI, T. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, p. 259-264, 1999.

ROBERTS, R. M.; LIU, L.; ALEXENKO, A. P. New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures and evolutionary relationships. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 56, p. 287-325, 1997.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 237-247, 2004.

ROBERTSON, S. A.; INGMAN, W. V.; O'LEARY, S.; SHARKEY, D. J.; TREMELLEN, K. P. Transforming growth factor β – a mediator of immune deviation in seminal plasma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1-2, p. 109-128, 2002.

SAITO, S. Cytokine network at feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 2, p. 87-103, 2000.

SANTIAGO, A. A. **Pecuária de Corte no Brasil Central**. Publicado pelo fundo de pesquisa do Instituto de Zootecnia (Água Branca), Secretaria da Agricultura de São Paulo, 1970. 635 p.

SCHLAFER, D. H. Placental development, anatomy and pathology: Before and after birth. **BCVA (Cattle Practice)** 10 (Part 2): 169-174, 2002.

SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 145-160, 2000.

SHAPIRO, H.M. - **Practical flow cytometry**. Alan R. Liss, Inc., 1985.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 4-13, 2004.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology Reproduction**, v. 71, n. 2- 10, 2004.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Tau-interferon: pregnancy recognition in ruminants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 21, p. 215-229, 1996.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILVA, H. M.; REIS, R. B.; SILVA, N. Retenção de placenta em gado leiteiro. 1. Efeito dos tratamentos hormonais com reflexo na contaminação uterina pós-parto. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, n. 4, p. 323-330, 1989.

WANGO, E. O.; HEAP, R. B.; WOODING, F. B. P. Progesterone and 513-pregnanediol production by isolated fetal placental binucleate cells from sheep and goats. **Endocrinology**, v. 129, p. 283-289, 1991.

WANGO, E. O.; WOODING, F. P.; HEAP, R. B. The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. **Journal of Anatomy**, v. 171, p. 241-257, 1990.

WATHES, D. C.; WOODING, E. B. P. An electron microscopic study of implantation in the cow. **American Journal of Anatomy**, v. 159, p. 285-306, 1980.

WHITAKER, A. M. **Tissue and Cell Culture**. Hardcover, 1972. 119 p.

WILKERSON, M. J. **Principles of flow cytometry and cell sorting**. In: 55 th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39 th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), 2004.

WIMSATT, W. A. New histological observations on the placenta of the sheep. **American Journal of Anatomy**, v. 87, p. 391-436, 1950.

WIMSATT, W. A. Observations of the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, v. 89, p. 233-282, 1951.

WOODING, F. B. P. Electron microscopic localization of binucleate cells in the sheep placenta using phosphotungstic acid. **Biology and Reproduction**, v. 22, p. 357-365, 1980.

- WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 101-113, 1992.
- WOODING, F. B. P. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. **Placenta**, v. 4, p. 527-540, 1983.
- WOODING, F. B. P. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. **Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 31-39, 1982.
- WOODING, F. B. P. Role binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. **American Journal of Anatomy**, v. 170, p. 233-250, 1984.
- WOODING, F. B. P.; BECKERS, I. E. Trinucleate cells and the ultra structural localization of bovine placental lactogen. **Cell Tissue Research**, v. 247, p. 667-673, 1987.
- WOODING, F. B. P.; CHAMBER, S. G.; PERRY, L. S.; GEORGE, M.; HEAP, R. B. Migration of binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy. **Anatomy of Embryology**, v. 158, p. 361-370, 1980.
- WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. E; HEAP, R. B.; HOBBS, T. Autoradiographic evidence for migration and fusion of cells in the sheep placenta: resolution of a problem in placental classification. **Cell Biology International Reports**, v. 5, p. 821- 827, 1998.
- WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F.; HEAP, R. B.; MORGAN, B.; BUTTLE, H. L.; YOUNG, I. R. Control of binucleate cell migration in the placenta of ruminants. **Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 499-512, 1986.
- WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. Chapter 4. In: LAMMING, G.E. ed. **Marshall's Physiology of Reproduction**, 4th ed. v 3, Part 1. Chapman & Hall, 1994, pp. 233-460.
- WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. E. Placentation. In: LAMMING, G. E. (Ed.), **Marshall's Physiology of Reproduction**, 4th ed., Chapman and Hall, 1994, pp. 230-466.
- WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; BRANDON, M. R.; CAMOUS, S. Membrane dynamics during migration of placental cells through trophoctodermal tight junctions in sheep and goats. **Cell Tissue Research**, v. 276, p. 387-397, 1994.
- WOODING, F. B.; MORGAN, G.; ADAM, C. L. Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. **Microscopy Research Techniques**, v. 38, p.88-99, 1997.
- WOODING, F. B. P.; STAPLES, L. D.; PEACOCK, M. A. Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation. **Anatomy**, v. 134, p. 507-516, 1982.
- WOODING, F. B. P.; WATHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 1, p. 425-430, 1980.

XIAO, C. W.; LIU, L. M.; SIROIS, L.; GOFF, A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 2293-2299, 1998.

ZIELER, C. G., KESSLER, M. A., SCHULER, L. A. Characterization of a novel prolactin-related protein from bovine fetal placenta. **Endocrinology**, v.126, p. 2377-2382, 1990

APÊNDICE

Figura 34 - Fotomicrografia de células do primeiro trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), binucleadas (2), células mononucleadas maiores (3) e menores (4) e linfócito (5) corada por Giemsa (barra :: 40 μ m)

Figura 35 - Fotomicrografia de células oriundas do segundo trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), binucleadas (2), trinucleadas (3), células mononucleadas maiores (4) e menores (5) e células com vesículas (6) corada por Giemsa (barra : 40 μ m)

Figura 36 - Fotomicrografia de células do terceiro trimestre gestacional. Células gigantes trofoblásticas mononucleadas (1), multinucleada (2), células mononucleadas menores (3) e maiores (4) e células com vesículas (5) coradas por Giemsa (barra : 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 37 – Fotomicrografias comparativas de células gigantes trofoblásticas binucleadas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (barra: 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 38 - Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas trinucleadas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócito (L) (barra: 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 39: Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas mononucleadas dos três trimestres gestacionais, coradas por Giemsa (barra: 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 40 - Fotomicrografias comparativas das células mononucleadas maiores dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócito (L) (barra: 40 μ m)

Figura 41 - Fotomicrografias comparativas das células mononucleadas menores dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa (setas) e linfócitos (L) (barra: 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 42 – Fotomicrografias comparativas das células gigantes trofoblásticas mononucleadas (seta) dos três trimestres gestacionais, que apresentam lobulação, descritas como células em forma de granada corada por Giemsa (barra: 40 μ m)

Primeiro trimestre

Segundo trimestre

Terceiro trimestre

Figura 43 – Fotomicrografias comparativas das células com vesículas dos três trimestres gestacionais coradas por Giemsa, setas (barra: 40 μ m)

Figura 44 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células a fresco oriundas do primeiro trimestre gestacional

Figura 45 – Análise estatística dos perfis populacionais de células a fresco do primeiro trimestre gestacional

Figura 46 – Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional

Histogram Statistics

File: animal 1 cult pura 1 ter.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: animal 1 cult pura 1 ter Patient ID:
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 25-Aug-05 Gate: G1
 Gated Events: 2574 Total Events: 10000
 X Parameter: FSC-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2574	100.00	25.74	5.82	4.67	69.28	4.29	2

Histogram Statistics

File: animal 1 cult pura 1 ter.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: animal 1 cult pura 1 ter Patient ID:
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 25-Aug-05 Gate: G2
 Gated Events: 2527 Total Events: 10000
 X Parameter: FSC-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2527	100.00	25.27	45.54	44.81	18.19	44.51	44

Histogram Statistics

File: animal 1 cult pura 1 ter.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: animal 1 cult pura 1 ter Patient ID:
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 25-Aug-05 Gate: G3
 Gated Events: 2048 Total Events: 10000
 X Parameter: FSC-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2048	100.00	20.48	140.91	128.94	46.10	119.71	83

Figura 47 – Análise estatística dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional

Figura 48 – Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2 e G3 com 1 dia de cultivo do primeiro trimestre gestacional

Figura 49 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células, com 5 dias de cultivo, do primeiro trimestre gestacional

Figura 50 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 5 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional

Figura 51 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 10 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional

Figura 52 – A: Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G1 e G2 com 10 dias de cultivo do primeiro trimestre gestacional. B: Análise estatística dos perfis populacionais de células, com 10 dias de cultivo, do primeiro trimestre gestacional

Figura 53 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células a fresco, do segundo trimestre gestacional

Figura 54 – Análises estatísticas comparativas pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3 e G4-G5 a fresco, do segundo trimestre gestacional

Histogram Statistics										
File: Data.005					Log Data Units: Linear Values					
Sample ID: 2 terco-animal 3 cp					Patient ID:					
Tube:					Panel:					
Acquisition Date: 25-Aug-05					Gate: G1					
Gated Events: 3159					Total Events: 10000					
X Parameter: FSC-H (Log)										
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	3159	100.00	31.59	5.12	4.16	70.59	3.62		1

Histogram Statistics										
File: Data.005					Log Data Units: Linear Values					
Sample ID: 2 terco-animal 3 cp					Patient ID:					
Tube:					Panel:					
Acquisition Date: 25-Aug-05					Gate: G2					
Gated Events: 1440					Total Events: 10000					
X Parameter: FSC-H (Log)										
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	1440	100.00	14.40	36.47	35.86	18.35	36.03		34

Histogram Statistics										
File: Data.005					Log Data Units: Linear Values					
Sample ID: 2 terco-animal 3 cp					Patient ID:					
Tube:					Panel:					
Acquisition Date: 25-Aug-05					Gate: G3					
Gated Events: 2376					Total Events: 10000					
X Parameter: FSC-H (Log)										
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	2376	100.00	23.76	71.34	68.25	30.73	65.52		52

Figura 55 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células a fresco, do segundo trimestre gestacional

Figura 56 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células a fresco, do segundo trimestre gestacional

Figura 57 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 58 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células, com 1 dia de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 59 – Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3, G1-G2 e G3-G4, com 1 dia de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 60 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células, com 5 dias de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 61 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células, com 5 dias de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 62 – Análise estatística comparativa pelo método Kolmogorov-Smirnov dos perfis populacionais de células presentes em G2-G3, com 5 dias de cultivo, do segundo trimestre gestacional

Figura 63 – A: *Density Plot*; B: Histograma do perfil populacional de células, com 10 dias de cultivo, do segundo trimestre gestacional analisadas pela citometria de fluxo

Figura 64 – A: *Density Plot*; B: Histograma comparativo dos perfis populacionais de células, a fresco, do terceiro trimestre gestacional

Figura 65 – Análise estatística dos perfis populacionais de células a fresco, do terceiro trimestre gestacional

Figura 66 – A: *Density Plot*; B: Histograma do perfil populacional de células com 1 dia de cultivo do terceiro trimestre gestacional

Figura 67 – Análises estatísticas dos perfis populacionais de células com 1 dia de cultivo do terceiro trimestre gestacional

Figura 68 – A: *Density Plot*; B: Histograma do perfil populacional de células com 5 dias de cultivo do terceiro trimestre gestacional

Figura 69 – A: *Density Plot*; B: Histograma do perfil populacional de células com 10 dias de cultivo do terceiro trimestre gestacional

Tabela 2 - Frequência dos diferentes tipos celulares de acordo com o trimestre gestacional e o tempo de cultivo, São Paulo, 2006

		Dia 1 Células totais (%)	Dia 5 Células totais (%)	Dia 10 Células totais (%)
Primeiro Terço	CGTB	1	1	1
	CGTT	2	0	0
	CGTM	3	0	0
	CMMA	19	24	12
	CMME	55	36	18
	CGTM (“Granada”)	0	0	0
	CM com vesículas	0	0	0
		Dia 1 Células totais (%)	Dia 5 Células totais (%)	Dia 10 Células totais (%)
Segundo terço	CGTB	2	6	1
	CGTT	1	1	0
	CGTM	2	3	0
	CMMA	42	45	7
	CMME	39	45	32
	CGTM (“Granada”)	1	1	0
	CM com vesículas	8	0	0
		Dia 1 Células totais (%)	Dia 5 Células totais (%)	Dia 10 Células totais (%)
Terceiro Terço	CGTB	3	2	0
	CGTT	1	2	0
	CGTM	8	1	0
	CMMA	27	33	14
	CMME	20	26	36
	CGTM (“Granada”)	1	0	0
	CM com vesículas	18	0	0

Tabela 3 - Mensuração dos diferentes tipos celulares de acordo com o trimestre gestacional, São Paulo, 2006

MICROSCOPIA ÓPTICA						
ÁREA (μm^2)						
	1º TERÇO		2º TERÇO		3º TERÇO	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
CGTB	44,6	17,0	166,4	43,7	549,0	100,5
	109,5	17,5	--	--	--	--
CGTT	109,1	17,1	699,0	74,1	1541,7	189,5
CGTM	50,0	6,4	606,9	442,8	905,2	95,2
CMMA	35,9	9,8	172,5	546,0	591,5	95,5
CMME	16,8	1,3	48,3	23,6	176,4	52,6
CGTM (“Granada”)	133,0	12,4	825,4	325,2	--	--
CM com vesículas	151,1	23,5	267,9	14,7	346,6	136,2