PATRÍCIA DOS SANTOS CARNEIRO

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE PROLIFERAÇÃO
CELULAR, ATIVIDADE METABÓLICA E ESTÁGIOS DA
GESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLOIDIA E DO CICLO
CELULAR EM CÉLULAS DE PLACENTAS BOVINAS**

**São Paulo
2003**

DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300025802

PATRICIA DOS SANTOS CARNEIRO

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE PROLIFERAÇÃO
CELULAR, ATIVIDADE METABÓLICA E ESTÁGIOS DA
GESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DA PLOIDIA E DO CICLO
CELULAR EM CÉLULAS DE PLACENTAS BOVINAS**

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 (Anatomia)

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profª Drª Maria Angélica Miglino

FMVZ - 022893

São Paulo
2003

ID 2920
N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1514
Fmvz
N.º TOMBO
022893

SAB 278

Sysno: 1369189

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1514
FMVZ

Carneiro, Patrícia dos Santos

Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágios da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas / Patrícia dos Santos Carneiro. – São Paulo : P. S. Carneiro, 2003.
75 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Proliferação celular. 2. Metabolismo celular. 3. Ciclo celular. 4. Placenta. 5. Bovinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Folha de Avaliação

Nome: CARNEIRO, Patrícia dos Santos

Título: Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágios da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Anatomia).

Data: 11 / 11 / 03

Banca Examinadora

Prof. Dr. DURVANI AUGUSTO MARIA Instituição: Inst. Butantan
Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovada

Prof. Dr. Maria Angélica Mighon Instituição: FMVZ USP
Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovada

Prof. Dr. Jose Roberto Krieger Jr. Instituição: FMVZ-USP
Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da relação entre a proliferação e ciclo celular e o estágio da gestação utilizando-se AgNORs como marcadores em placentas bovinas", protocolo nº330/2003, utilizando 30 bovinos, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Angélica Miglino, 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 "Relationship between proliferation and cellular cycle and days of pregnancy using AgNORs as markers in bovine placentas" protocol number 330/2003, utilizing 30 bovines, under the responsibility of Profª. Drª. Maria Angélica Miglino, 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").

São Paulo, 28 de agosto de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Ao meu querido avô,
Antônio dos Santos.

Que certamente estará para sempre orgulhoso de nós.
O meu coração exulta de antever sua obra.

Dedicatória

Ao meu querido avô,
Antônio dos Santos,
Que certamente estará para sempre orgulhoso da neta querida...
O meu coração exulta de antever sua glória...

Agradecimentos

Aos meus pais, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, paixão, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus amigos, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus professores, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus colegas, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus amigos, Sr. e Sra. João Paulo e Sra. Maria Rosa, pelo amor, compreensão, incentivo, dedicação e apoio incondicional, que me permitiram chegar até aqui.

ENFIM, o meu agradecimento a Deus,
Que sempre me deu força, determinação, garra e amor.

Aos meus queridos pais,
João Batista e Ana Maria,
Por todo o amor, paixão, compreensão, solidariedade, felicidade...

A minha indispensável irmã,
Adriana,
Por todo o amor, companheirismo, dedicação e amadurecimento...

A minha avó,
Lucília,
Por ser minha mãe duas vezes...

Que contou e acreditou em minha capacidade...
ENFIM, a essa família,
Que sempre será a melhor representação do amor incondicional.

A minha querida orientadora,
Profª Maria Angelica Miglino,
Que confiou e acreditou em minha capacidade no momento
em que eu mais precisei,
o mais sincero agradecimento e a mais profunda admiração.

A minha querida orientadora,
Profª Maria Angelica Miglino,
Que confiou e acreditou em minha capacidade no momento
em que eu mais precisei,
o mais sincero agradecimento e a mais profunda admiração.

Agradecimentos

Ao meu co-orientador,
Dr. Durvanei Augusto Maria,
Paciência, compreensão, amizade e experiências,
Meu agradecimento por ter tornado esse trabalho possível.

Agradecimentos

Aos amigos desde o princípio, Gustavo e Gabriela, todo o meu amor e a minha lealdade;

Aos amigos que chegam e vão, mas que permanecem eternos: Ana Paula, Patricia Gonzalez, Cadu, Marcelo, Karina, Roberto Gameiro, Lilian Oliveira;

Aos novos amigos, mas não menos importantes: Rosa Eli, Eduardo, Mariana, Mariana, Zilah, Mônica, Carla;

A todos os professores do Setor de Anatomia da FMVZ-USP, em especial ao Prof. Dr. José Roberto Klouy Jr., pela valiosa ajuda desde o princípio;

Aos funcionários do Setor de Anatomia, Jacqueline, Patrícia, Wagner, Rosale, Ednaldo Jindai, Diego, Wanderley pela colaboração e carinho;

Aos amigos para todas as horas da Imunogenética: Luciano, André, Carlos, Ricardo, Fernando, Robertinho, Fran, Robertinha, Vinícius, Beto, Patrícia, André, Amanda, Lary;

A todos os doutores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, por sincera acolhida e esclarecimentos de muitas dúvidas: Agnes, Marcelo, Daniel, Solange, Massao, Maria, Milena, Solange Carbonera e Puchi;

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética, Sônia, Renata, Luciana e Vilma pela atenção e preparo de materiais;

Aos amigos sempre dispostos a ajudar Paula e Renata;

A Dra. Olga Célia Martinez Ibañez,

A todos os colegas Diretora do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan,
Por ter sido compreensiva e principalmente ter me ajudado de maneira decisiva

A todos que de alguma forma em um momento tão importante da minha caminhada;

Agradecimentos

Aos amigos desde o princípio, Gustavo e Gabriela, todo o meu amor e a minha lealdade;

Aos amigos que chegam e vão, mas que permanecem eternos: Ana Paula, Patrícia Gonzalez, Cadu, Marcelo, Karina, Roberto Gameiro, Lílian Oliveira;

Aos novos amigos, mas não menos importantes: Rose Eli, Eduardo, Mariana Matera, Zilah, Maran, Celina;

A todos os professores do Setor de Anatomia da FMVZ-USP, em especial ao Prof Dr. José Roberto Kfoury Jr., pela valiosa ajuda desde o princípio;

Aos funcionários do Setor de Anatomia, Jacqueline, Patrícia, Maicon, Kazue, Edinaldo (Índio), Diogo, Wanderley pela colaboração e carinho;

Aos amigos para todas as horas da Imunogenética: Luciana, Andréa, Carla, Zé Ricardo, Fernanda, Robertinho, Fran, Robertinha, Vinícius, Elida, Patrícia, Amaral, Amanda, Lucy;

A todos os doutores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela sincera acolhida e esclarecimentos de muitas dúvidas, Nancy, Marcelo, Orlando, Solange Massa, Wafa, Milene, Solange Carbonare e Ruth;

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética, Sandra, Neuza, Marinalva e Vilma pela amizade e preparo de materiais;

Aos amigos sempre dispostos a ajudar Paula e Ronaldo;

A todos os colegas da Pós-Graduação da Anatomia;

A todos que de alguma forma ajudaram a construir esse trabalho, muito obrigada.

CARNEIRO, P. S. Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágio da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas. [Relationship among cell proliferation, metabolic activity and days of pregnancy and determination of ploidy and cell cycle in bovine placenta]. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

As regiões organizadoras de nucléolos (Nucleolar Organizer Regions – NORs) são regiões de cromatina fortemente corada em volta da qual, no final da telófase, o nucléolo é novamente formado após a divisão. Um grupo peculiar de proteínas ácidas que tem alta afinidade por prata são localizadas nos mesmos locais que as NORs, o que confere às mesmas a propriedade de serem clara e rapidamente visualizadas por coloração com prata de latrão. As NORs, quando coradas por prata são chamadas de AgNORs. O número de AgNORs está estreitamente relacionado com a atividade transcricional do RNA e com a rapidez e rapidez da proliferação celular. A homeostase celular utiliza-se de mecanismos através dos quais os tecidos de um organismo mantêm-se ou renovam-se e para isso ocorre, ao longo do tempo, dois programas genéticos principais: o ciclo celular e a apoptose. Considerando o crescimento da placenta e consequentemente o crescimento e a diferenciação das células fetais, este trabalho teve dois principais objetivos: 1. determinar a relação quantitativa entre a proliferação celular e o estágio da gestação através da quantificação das AgNORs utilizadas como marcadores em placentas bovinas, evidenciando a intensa atividade proliferativa e metabólica das células binucleadas e estabelecendo o padrão de normalidade para gestações bovinas; e 2. determinar a ploidia das células do placenta bovino e através da análise dos estágios do ciclo celular, estabelecer a cinética celular envolvida na formação e diferenciação das células trofoblásticas binucleadas. Houve um aumento da quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas binucleadas à medida que a gestação avançava, porém, não houve diferença significativa entre as gestações

CARNEIRO, P. S. **Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágios da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas.** [Relationship among cell proliferation, metabolic activity and days of pregnancy and determination of ploidy and cell cycle in bovine placenta]. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

As regiões organizadoras de nucléolos (Nucleolar Organizer Regions – NORs) são regiões de cromatina levemente corada em volta da qual, no final da telófase, o nucléolo é novamente formado após a mitose. Um grupo peculiar de proteínas ácidas que têm alta afinidade por prata são localizadas nos mesmos locais que as NORs, o que confere as mesmas a propriedade de serem clara e rapidamente visualizadas por colorações que utilizam nitrato de prata. As NORs, quando coradas por prata são chamadas de AgNORs. O número de AgNORs está estritamente relacionado com a atividade transcricional do RNAr e com a agilidade e rapidez da proliferação celular. A homeostase celular utiliza-se de mecanismos através dos quais os tecidos de um organismo mantêm-se ou renovam-se, e para que isso ocorra, as células dispõe de dois programas genéticos principais: o ciclo celular e a apoptose. Considerando o crescimento da placenta e conseqüentemente das células trofoblásticas mono e binucleadas, esse trabalho teve dois principais objetivos: 1. determinar a relação quantitativa entre a proliferação celular e o estágio da gestação através da quantificação das AgNORs utilizadas como marcadores em placentas bovinas, evidenciando a intensa atividade proliferativa e metabólica das células binucleadas e estabelecendo o padrão de normalidade para gestações bovinas; e 2. determinar a ploidia das células do placentônio bovino e, através da análise dos estágios do ciclo celular, estabelecer a cinética celular envolvida na formação e diferenciação das células trofoblásticas binucleadas. Houve um aumento da quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas mononucleadas a medida em que a gestação avançou, principalmente no terceiro trimestre de gestação. Isso

indica um aumento na atividade proliferativa e/ou metabólica dessas células. O número de AgNORs expresso pela células binucleadas apenas aumentou do primeiro para o segundo trimestre, permanecendo, após esse estágio, praticamente constante. Isso nos leva a crer que a atividade das células binucleadas atinge seu ponto máximo no segundo trimestre e permanece com o seu metabolismo alto até o final da gestação. Além disso, esse número foi extremamente maior do que o observado nas células trofoblásticas mononucleadas, evidenciando a intensa atividade metabólica dessa célula. Na análise do ciclo celular, dois tipos celulares diferiam quanto ao seu tamanho (área) e quanto a sua granulosidade no placentônio, caracterizando diferenças quanto sua ploidia, sendo uma população diplóide e a outra tetraplóide. Para a fase G0-G1, a porcentagem obtida para o primeiro trimestre foi significativamente maior quanto comparada com o segundo e com o terceiro trimestre. Para a fase G2-M, encontramos um padrão inverso ao observado na fase G0-G1. Assim, podemos concluir que no primeiro trimestre de gestação as células tetraplóides estão formadas, mas não diferenciadas. A medida em que a gestação avança e a demanda metabólica fetal aumenta, essas células entram em processo de diferenciação para sua completa transformação em células capazes de produzir diversas substâncias e suprir as necessidades gestacionais maternas e fetais.

Palavras-chave: Proliferação celular. Metabolismo celular. Ciclo celular. Placenta. Bovinos.

CARNEIRO, P. S. Relationship among cell proliferation, metabolic activity and days of pregnancy and determination of ploidy and cell cycle in bovine placenta. [Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágio da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas]. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Nuclear Organizer Regions (NORs) are weakly stained chromatin regions around which nucleoli reform after mitosis. A group of highly argyrophilic proteins are localized at the same sites as NORs, allowing NORs to be very easily and rapidly visualized by silver nitrate staining procedures. They are called AgNORs. The number of AgNORs is strictly related to rRNA transcriptional activity and to the capacity of cell proliferation. Cellular homeostasis uses two mechanisms to maintain or renew all tissues in organisms: the cell cycle and apoptosis. To comprehend the growth and the maturation of several tissues it is important to understand proliferation cellular kinetics and the cell cycle. The aim of this study was to evaluate the functional activity relation between the proliferative and metabolic capacity of trophoblastic mononucleate and binucleate cells from bovine placentomes at different stages of pregnancy. In addition, this study determined the ploidy and determined the cell cycle involved in cell formation and differentiation through cell cycle analysis. The results demonstrated that: 1. The AgNOR number of mononucleate trophoblastic cells is related to their proliferative activity and stage of pregnancy; 2. The AgNOR number of binucleate trophoblastic cells is related to their level of metabolic activity and stage of pregnancy; 3. The AgNOR number of binucleate cell was just as low as mononucleate cell, evidencing that the metabolism of binucleate cells was much higher than that of mononucleate cells; 4. The AgNOR number was much greater in binucleate cells than in mononucleate cells, evidencing that the metabolism of binucleate cells was much higher than that of mononucleate cells; 5. Two

CARNEIRO, P. S. **Relationship among cell proliferation, metabolic activity and days of pregnancy and determination of ploidy and cell cycle in bovine placenta.** [Determinação da relação entre proliferação celular, atividade metabólica e estágios da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas]. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Nucleolar Organizer Regions (NORs) are weakly stained chromatin regions around which nucleoli reform after mitosis. A group of highly argyrophilic proteins are localized at the same sites as NORs, allowing NORs to be very clearly and rapidly visualized by silver nitrate staining procedures. They are called AgNORs. The number of AgNORs is strictly related to rRNA transcriptional activity and to the rapidity of cell proliferation. Cellular homeostasis uses two mechanisms to maintain or renew all tissues in organisms: the cell cycle and apoptosis. To comprehend the growth and the maturation of several tissues it is important to understand proliferation cellular kinetics and the cell cycle. The aim of this study was to evaluate the functional activity relation between the proliferative and metabolic capacity of trophoblastic mononucleate and binucleate cells from bovine placentomes at different stages of pregnancy. In addition, this study determined the ploidy and established the cellular kinetics involved in cell formation and differentiation through cell cycle analysis. The results demonstrated that: 1. The AgNOR number of mononucleate trophoblastic cells is related to their proliferative activity and stage of pregnancy; 2. The AgNOR number of binucleate trophoblastic cells is related to their level of metabolic activity and stage of pregnancy; 3. The AgNOR number of binucleate cell was just derived metabolic activity, and not proliferative activity, differing to mononucleate cells; 4. The AgNOR number was much greater in binucleate cells than in mononucleate cells, evidencing that the metabolism of binucleate cells was much higher than that of mononucleate cells; 5. Two cell populations form the bovine placentome: one is diploid cells and the other

tetraploid; and 6. In the first trimester, the majority of tetraploid cells are not differentiated; with the progress of pregnancy and the increase in metabolic demands of fetus, the tetraploid cells begin a differentiation process and become cells that are able to supply maternal and fetal needs. These parameters could be applied to investigations about placental abnormalities due to pathologies or gestations derived from manipulated embryos.

Key words: Cell proliferation. Cell Metabolism. Cell cycle. Placenta. Bovine.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	13
3. Referências.....	22
4. Anexo 1 – "Determinação da relação entre a polifecundação e o sucesso reprodutivo e o sucesso da gestação, utilizando-se ACP-Obs como marcadores em plantas humanas".....	23
5. Anexo 2 – "Determinação da polifecundação e das taxas de aborto celular das plantas de polinização batina".....	25
6. Conclusões.....	26

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	16
3. Referências.....	32
4. Artigo 1 – “Determinação da relação entre a proliferação celular e atividade metabólica e o estágio da gestação utilizando-se AgNORs como marcadores em placentas bovinas.”	37
5. Artigo 2 – “Determinação da ploidia e das fases do ciclo celular das células do placentônio bovino”	58
6. Conclusões.....	75

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino é indubitavelmente a maior fonte de proteínas disponíveis no Brasil. Isto se deve à grande capacidade de adaptação que esses animais apresentam quando submetidos a áreas de clima desfavorável e pastagens de baixo valor nutricional, muitas vezes aproveitando solos inadequados para a agricultura ou de topografia acidentada, representando assim, uma grande reserva de proteína animal.

Sabemos que muitas são as pesquisas realizadas com a espécie bovina com o intuito de aumentar os índices reprodutivos, consequentemente, os índices produtivos. Entre os desafios encontrados, destaca-se a dificuldade em entender e reproduzir a interação que ocorre entre mãe e feto desde a concepção até o parto.

Diversos fatores estão envolvidos nessa interação, e apesar de muitos estarem elucidados, poucos são os experimentos em que conseguimos avaliar os efeitos de alterações na adaptação da fêmea e do feto às condições encontradas no útero e genital feminino.

Considerando o crescente aumento da população mundial e a consequente redução da disponibilidade de terras para a produção de alimentos, torna-se indispensável a otimização dos recursos disponíveis.

Assim, a ciência caminha para o aprimoramento das técnicas de produção de alimentos, e nessa linha encontramos a intervenção artificial, a transferência de embriões, a fertilização *in vitro* e, mais recentemente, a clonagem.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino é indiscutivelmente a maior soma de ruminantes explorados em condições extensivas no Brasil. Isto se deve à grande capacidade de adaptação que esses animais apresentam quando submetidos a áreas de climas desfavoráveis e pastagens de baixo valor nutricional, muitas vezes aproveitando solos inadequados para a agricultura ou de topografia acidentada, representando assim, uma grande reserva de proteína animal.

Sabemos que muitas são as pesquisas realizadas com a espécie bovina com o intuito de aumentar os índices reprodutivos e, conseqüentemente, os índices produtivos. Entre os desafios encontrados, destaca-se a dificuldade em entender e reproduzir a interação que ocorre entre mãe e feto desde a concepção até o parto.

Diversos fatores estão envolvidos nessa interação, e apesar de muitos estarem elucidados, poucos são os experimentos em que conseguimos reproduzir as condições encontradas no sistema genital feminino.

Considerando o crescente aumento da população mundial e sua relação inversamente proporcional com a disponibilização de espaços para a produção de alimentos, torna-se indispensável à otimização dos recursos existentes.

Assim, a ciência caminha para o aprimoramento das técnicas de produção de alimento, e nessa linha acompanhamos a inseminação artificial, a transferência de embriões, a fertilização *in vitro* e, mais recentemente, a clonagem.

Esses processos estão tornando-se mais eficientes com o passar do tempo, mas ainda apresentam falhas. Estas estão relacionadas principalmente com a receptora e sua placenta, fator até então esquecido ou tido como de menor importância pelos pesquisadores. Hoje sabemos que grande parte das falhas gestacionais em animais provenientes de embriões manipulados em laboratório são devidas a ineficiência da placenta.

Mas, o que caracteriza essa ineficiência? Quais os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da placenta que estão alterados nessas gestações? E, o mais importante, qual o padrão de normalidade para diversos parâmetros em gestações normais bovinas que podem nos fornecer alguma informação a respeito dessas falhas?

Para a realização dessa dissertação de mestrado escolhemos a proliferação e o metabolismo celulares como parâmetros a serem avaliados nos diferentes trimestres de gestações normais bovinas para estabelecimento dos padrões de normalidade, que posteriormente serão comparados com os padrões expressos por placentas originadas de gestações de clones. Essa escolha foi feita porque entendemos que tanto a proliferação quanto o metabolismo celular estão intimamente envolvidos com o desenvolvimento saudável de qualquer tecido biológico, incluindo a placenta.

Assim, tivemos por objetivo principal avaliar e mensurar a atividade proliferativa e metabólica das células trofoblásticas mono e binucleadas, bem como determinar a ploidia dessas células, separando-as em populações distintas e evidenciando seu estágio do ciclo celular.

1. REVISÃO DE LITERATURA

Após a leitura e análise dos artigos, o autor deve fazer uma síntese dos resultados encontrados, destacando os pontos principais e as conclusões. É importante também indicar as limitações do estudo e as perspectivas para futuras pesquisas. A revisão de literatura deve ser feita de forma crítica e objetiva, apresentando uma visão geral do estado da arte da pesquisa.

Segundo Noden e Lahunta (1985), o livro *Implantação e Manutenção de Implantes* é uma obra fundamental para o entendimento do processo de implantação de implantes dentários. O livro aborda os aspectos biológicos, mecânicos e clínicos da implantação, apresentando uma visão abrangente do tema. A obra é considerada uma referência obrigatória para todos os profissionais da área.

Revisão de Literatura

1. REVISÃO DE LITERATURA

Após a fertilização, o embrião passa por estágios de divisão, modelação e compactação celular, caracterizando a fase de mórula. Logo após, ele inicia outra fase, quando passamos a chamá-lo de blastocisto. Nesse momento o embrião desenvolve uma cavidade central repleta de fluído, a blastocela, que é circundada por uma camada única de células, o trofoderma, que será responsável pela comunicação materno-embrionária. Essas células passam a assumir funções especializadas, e serão mais tarde, conhecidas como células trofoblásticas (SCHLAFFER et al., 2000).

Segundo Noden e Lahunta (1985), o termo implantação é habitualmente utilizado para indicar a união do trofoblasto com a parede uterina, mas o grau de união entre esses tecidos varia de acordo com as espécies. O processo de implantação se inicia quando o blastocisto assume uma posição fixa e passa a interagir fisiologicamente com o epitélio uterino. A essa primeira associação damos o nome de anexação, que pode ser subdividida em um estágio aposicional e um de adesão propriamente dita (SCHLAFKE; ENDERS, 1975). Na espécie bovina, esse processo inicia-se entre os dias 28-32, finalizando-se entre 40-45 dias pós-ovulação (NODEN; LAHUNTA, 1985).

Feto bovino e placenta com cotilédones evidentes (70 dias de gestação).
(Adaptado de Schlafer et al., 2000)

As placentas podem ser classificadas segundo vários critérios. Amoroso (1952), baseado na classificação feita por Grosser em 1909, determinou uma classificação de acordo com o número de camadas celulares que se interpõe entre o sangue materno e o fetal. Assim, a placenta de ruminantes foi classificada como sindesmocorial já que o cório está em contato com um sincício materno-fetal e não o epitélio uterino materno ou tecido conjuntivo. Esse sincício forma-se a partir da fusão das células epiteliais uterinas e das células trofoblásticas binucleadas (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Leiser et al. (1998) classificam a placenta dos ruminantes como epiteliochorial, sub-tipo sinepiteliochorial, uma vez que o trofoblasto produz células binucleadas que migram em direção ao epitélio uterino e fundem-

se com as células epiteliais, dando origem a células híbridas. Dantzer, em 1999, corrobora a classificação de Leiser et al., afirmando que a placenta bovina constitui um sub-tipo de placenta epiteliocorial, a placenta sinepiteliocorial.

Nos ruminantes os vilos coriônicos estão arranjados em ramos chamados cotilédones, sendo a placenta que apresenta essa característica denominada cotiledonária. Esses cotilédones posicionam-se em áreas elevadas no útero, as carúnculas, adaptando-se em suas criptas. Logo, a localização dos cotilédones é secundária e determinada pela posição das carúnculas maternas, que são áreas do endométrio nas quais o tecido glandular está ausente e que possuem organização vascular completamente diferente das áreas glandulares. A fusão entre o tecido materno e o fetal constitui um órgão de trocas fisiológicas entre a mãe e o feto, os placentomas. No caso de placentação do tipo alantóide, as trocas materno-fetais são mediadas pela aposição da membrana corioalantóide na mucosa uterina (MCEWEN, 1931; BJÖRKMAN; SOLLÉN, 1960; BJÖRKMAN, 1973, WOODING et al., 1997).

Os vilos coriônicos organizam-se em um eixo principal que se ramifica progressivamente. Estes são constituídos de mesênquima vascular recoberto por uma única camada de trofoblasto (BJÖRKMAN, 1976).

Placentão proveniente de gestação a termo. (Adaptado de Schlafer et al., 2000).

Figura esquemática da estrutura do placentão bovino. (Adaptado de Davies et al., 2000)

As células trofoblásticas estão divididas em duas grandes populações: as mononucleadas e as binucleadas, que somam aproximadamente um quinto da população total. Produzem diversos hormônios e fatores de crescimento, que estão associados com o crescimento fetal e a manutenção da gestação (SCHLAFER et al., 2000), como a progesterona, que além do corpo lúteo, tem sua produção comprovadamente efetiva por células trofoblásticas (REIMERS et al., 1985), o lactogênio placentário (bPL) (DUELLO et al., 1986), glicoproteínas associadas a gestação (bPAG-1, bPAG-2, bPAG-3) (ROBERTS et al., 1995), e o Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF-beta) (MUNSON et al., 1996).

Podemos observar nas placentas de ruminantes uma fusão entre o epitélio uterino e as células trofoblásticas. As células binucleadas trofoblásticas migram a partir do violo coriônico, através da zona de contato materno-fetal, em direção ao epitélio uterino, onde se fundem com células do mesmo, formando células trinucleadas. Esse processo facilita a transferência de substâncias pelos grânulos trofoblásticos, uma vez que o conteúdo dos mesmos é lançado diretamente no tecido materno (LEISER; EGLOFF, 1990; ROBERTS; ANTHONY, 1994). Além disso, as células binucleadas estão diretamente envolvidas na modificação do epitélio uterino, desde o início da implantação até o final da gestação (WOODING, 1992).

As células binucleadas são encontradas na placenta de ruminantes desde a implantação até momentos que antecedem o parto e originam-se de células uninucleadas (WOODING, 1982). Em bovinos, essa população celular aparece aos 17 dias de gestação e permanece até o final (GREENSTEIN et al., 1958; BJÖRKMAN, 1968). As células binucleadas são formadas através de processos de cariocinese não seguidos de citocinese, ou seja, ocorre duplicação do núcleo sem haver a divisão do citoplasma (BJÖRKMAN, 1982). Essas células apresentam um número aparentemente estável ao longo da gestação, representando de 15 a 20% do total de células do epitélio coriônico (WOODING; WATHES, 1980; WOODING, 1992), como citado anteriormente. Elas formam-se a partir do 17º dia de gestação e quando jovens estão

intimamente situadas no trofoblasto. Sua divisão nuclear é finalizada por mitose e a divisão do citoplasma nunca ocorre, o que demonstra sua incapacidade proliferativa (WINSATT, 1980).

Flood (1991) cita que, em bovinos, as células binucleadas constituem cerca de 10% das células trofoblásticas nos dias 18-20 e esse percentual aumenta para 20% no restante da gestação e que somente 20% dessas células possuem capacidade de migração. Após a migração, ocorrem as fusões com o epitélio uterino e formam as células multinucleadas gigantes, que correspondem a 50% da área do epitélio materno no 24º dia da gestação.

As células binucleadas têm sua origem a partir de células uninucleadas do trofoectoderma fetal. Inicialmente estão presentes em número reduzido e detêm um denso volume citoplasmático, além de um pequeno número de mitocôndrias, muitos ribossomos, extensa rede de cisternas de retículo endoplasmático e, muitas vezes, grande número de aparelhos de Golgi, responsáveis pela grande quantidade de grânulos característicos dessas células (WOODING, 1982). O aparelho de Golgi está situado em regiões adjacentes aos núcleos, estando sempre rodeado por vacúolos que parecem conter material precipitado em seu interior que pode ser corado por corantes ácidos e básicos. No entanto, devido a basofilia ser neutralizada pela ribonuclease, acredita-se que contenha ácido ribonucléico (CARVALHO, 2000).

As células binucleadas são secretórias, produzindo e

transportando proteínas para o organismo materno. Uma de suas maiores expressões são as glicoproteínas associadas com a gestação (bPAG) (KLISCH et al., 2000; ZOLI et al., 1992). Além dessas proteínas, o lactogênio placentário (WOODING; FLINT, 1994), e esteróides e substância derivadas do metabolismo de prostaglandinas (KLISCH et al., 2000) também têm sua produção e secreção associadas às células binucleadas da placenta de ruminantes.

Morgan et al. (1989) demonstraram, através de métodos citoquímicos, que existe uma produção sequencial e diferencial de proteínas nas células binucleadas ao longo da gestação, indicando que elas possuem diferentes funções de acordo com o estágio gestacional.

Normalmente encontramos células trofoblásticas gigantes em muitas placentas endotélio e hemocoriais (HOFFMAN; WOODING, 1993; ZYBINA; ZYBINA, 1996). Na placenta de ruminantes, que é classificada como sinepteliocorial (WOODING, 1992), elas são geralmente binucleadas, e apresentam uma pequena proporção de células com três ou mais núcleos (WIMSATT, 1951; BJÖRKMAN, 1968; KLISCH et al., 1998, 1999). A porcentagem dessas células no epitélio trofoblástico é aproximadamente 20% durante a maioria do período gestacional com citado anteriormente (WOODING; FLINT, 1994) e declina antes do nascimento (WILLIAMS et al., 1987; GROSS et al., 1991). Acreditava-se que o núcleo das células em questão fosse diplóide (HOFFMAN; WOODING, 1993; WOODING; FLINT, 1994; WOODING et al., 1997),

entretanto, nenhum dado a respeito da quantidade de DNA dessas células havia sido publicado.

A determinação do nível de ploidia por hibridização *in situ* mostrou que a maioria dos núcleos das células fetais são tetraplóides e que geralmente os dois núcleos tetraplóides estão sempre juntos. Estes achados indicam que a poliploidização é um aspecto normal no desenvolvimento da maioria das células binucleadas. Baseados nessas informações, Klisch et al. (1999) propuseram um novo modelo, no qual o desenvolvimento dessas células ocorre primeiramente através de uma mitose acitocinética que origina células binucleadas com dois núcleos diplóides; em seguida a célula entra em uma segunda mitose acitocinética, na qual os cromossomos dos dois núcleos formam uma figura de metáfase comum. O resultado é uma célula com dois núcleos tetraplóides, que passam por uma fase S adicional, sem, entretanto, reiniciarem nova mitose. Assim como esse modelo foi proposto, explicações para esse fenômeno foram indicativas de que a multiplicação do genoma estaria ligada a um aumento da capacidade de síntese, causada pelo aumento do número de genes copiados disponíveis para transcrição.

Figura esquemática do trofoblasto e epitélio uterino bovino demonstrando os estágios de desenvolvimento da célula gigante trofoblástica binucleada (a, b, c, d, e) e a formação da célula híbrida trinucleada materno-fetal (f, g, h, i).

(Adaptado de Klisch et al., 1999)

Essas células que realizam de processos mitóticos incompletos não têm sido caracterizadas detalhadamente. Entretanto a dúvida que existia a respeito da origem dessas células foi elucidada. Wimsatt em 1951 sugeriu que são derivadas de células trofoblásticas gigantes uninucleadas. Já Greenstein et al., em 1958, sugeriram uma derivação direta de uma população de células-tronco trofoblásticas. Finalmente em 1994, Wooding e Flint propuseram que as células trofoblásticas gigantes binucleadas podem ser formadas a partir de qualquer célula trofoblástica uninucleada normal através de duas mitoses subsequentes, modelo que até hoje é aceito.

Informações quantitativas a respeito de características proliferativas de células ou populações celulares são essenciais para a realização de vários estudos biológicos e biomédicos. Podemos

classificar as células como pertencentes a um dos quatro estágios a seguir: em proliferação e capazes de formar clones (proliferating and clonogenic – PC); em proliferação e incapazes de formar clones (proliferating and nonclonogenic – PD); sem atividade proliferativa e potencialmente capazes de formar clones (not proliferating and potentially clonogenic - QC); e sem atividade proliferativa e incapazes de formar clones (not proliferating and not clonogenic – QD). Além disso, células em atividade proliferativa passam por quatro fases denominadas G1, S, G2 e M, onde elas replicam seu DNA e dividem-se. As análises citocinéticas envolvem a determinação quantitativa da distribuição das células entre essas fases e estágios e o padrão seguido do movimento das células entre elas. As informações citocinéticas comumente obtidas incluem as frações celulares nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, assim como a duração das mesmas, a fração de células em atividade proliferativa, a fração de células capazes de formar clones e a taxa de síntese de DNA (GRAY et al., 1990).

Distribuição de células de uma população assincrônica ao longo do ciclo celular. (Adaptado de Gray et al., 1990)

Distribuição de DNA da população hipotética anteriormente ilustrada. (Adaptado de Gray et al., 1990)

Relação entre quantidade de DNA e estágio do ciclo celular. (Adaptado de Gray et al., 1990)

A importância da análise da distribuição do DNA para o estudo do ciclo celular reside no fato de que a quantidade de DNA celular é um marcador para maturidade celular. Assim, células na fase G1 possuem uma quantidade de DNA, células na fase S aumentam sua quantidade de DNA continuamente e tornam-se maduras até a entrada nas fases G2 e M, quando as células possuem duas vezes a quantidade de DNA existente na fase G1.

Teoricamente, as frações de células em cada fase podem ser obtidas através de citometria de fluxo, levando-se em consideração a distribuição do DNA celular. Na prática, essa mensuração pode não funcionar devido a falhas no método, mas a magnitude dos erros é muito baixa, e normalmente obtemos um padrão semelhante ao da figura a seguir (GRAY et al., 1990):

Padrão normal da distribuição de DNA.
(Adaptado de Gray et al., 1990)

Além da análise da quantidade de DNA, podemos utilizar outros métodos para determinação da capacidade proliferativa e metabólica das células trofoblásticas. Entre as técnicas disponíveis, escolhemos uma que é muito utilizada na definição da malignidade e agressividade de tumores através da determinação da quantidade de regiões organizadoras de nucléolos, as NORs.

As regiões organizadoras de nucléolos (nucleolar organizer regions – NORs) foram primeiramente descritas por Heitz (1931) e McClintock (1934) como uma região de cromatina levemente corada em volta da qual, no final da telófase, o nucléolo é novamente formado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula (DERENZINI, 2000).

As NORs são constituídas por cístrons de rDNA e estão localizadas nas constrições secundárias dos cromossomos em metáfase (DERENZINI, 2000).

de células eucarióticas. Na espécie humana, essas constrições localizam-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15 21 e 22. (HOWELL, 1982). Normalmente esses cístrons agrupam-se (clusters), formando um ou mais nucléolos. Entretanto, em determinadas situações, apresentam-se pulverizadas no interior do núcleo, sob a forma de pontos (dots), ou em formas alteradas.

Um grupo peculiar de proteínas ácidas que têm alta afinidade pela prata são localizadas nos mesmos locais que as NORs, o que confere as mesmas a propriedade de serem clara e rapidamente visualizadas através de colorações que utilizam nitrato de prata (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Esse grupo de proteínas é constituído por duas principais, a nucleolina e a nucleofosmina, que são as responsáveis pela coloração. É importante salientar que não ocorre síntese de RNAr na ausência dessas proteínas.

As NORs, quando coradas por prata podem ser facilmente identificadas como pontos pretos (DOTs), de maior ou menor tamanho, exclusivamente localizados na área nucleolar e são chamadas de AgNORs (TRERÈ, 2000). Elas são unidades estruturais-funcionais do nucléolo nos quais todos os componentes necessários para a síntese do RNA ribossômico estão localizados. O número de AgNORs está estritamente relacionado com a atividade transcricional do RNAr e com a agilidade e rapidez da proliferação celular no tecido estudado (DERENZINI, 2000).

Lâmina de tecido (tumor de mama) fixado em Formol tamponado 10%, preparada convencionalmente, e corada com nitrato de prata. (Adaptado de Trerè, 2000)

Lâmina de cultura de células periosteais (9 dias), corada com nitrato de prata. (Adaptado de Trerè, 2000)

O número e tamanho das NORs são muito variáveis dentro do nucléolo, de acordo com a atividade transcricional do RNAr. Um nucléolo com baixa taxa de biogênese ribossomal é caracterizado por uma NOR única e grande. Entretanto, o nucléolo de células ativadas exibem um grande número de NORs pequenas (DERENZINI; PLOTON, 1991). Praticamente a área total do nucléolo é ocupada pelas AgNORs (DERENZINI et al., 1998).

Cada ponto (DOT) corado pela prata corresponde, em nível ultraestrutural, ao centro fibrilar em íntima associação ao componente fibrilar denso (DERENZINI et al., 1990; DERENZINI; PLOTON, 1991).

Há evidências de que em células em proliferação a quantidade de AgNORs aumenta progressivamente desde a fase G1, atinge seu valor

máximo na fase S e permanece constante até o final da fase G2. (SIRRI et al., 2000).

O tamanho do nucléolo, assim o número e a área das AgNORs refletem a atividade da célula e variam de acordo com o tipo celular e também com o estágio do ciclo celular (FOLKMAN; MOSCONA, 1978; LISCHWE et al., 1979; WILLIAMS et al., 1982).

A relação entre a quantidade de AgNORs e a duplicação celular pode ser explicada considerando que as células em proliferação precisam produzir um complemento ribossomal adequado para as células filhas. Considerando que o número de AgNORs está estritamente relacionado com a atividade transcricional do RNAr é uma consequência lógica relacionar também a quantidade de AgNORs com células em duplicação (DERENZINI, 2000).

Muitos trabalhos demonstraram que a quantidade de AgNOR representa um parâmetro válido para a cinética celular, significativamente associado com a agilidade de duplicação celular (DERENZINI et al., 1989; TRERÈ et al., 1989; DERENZINI et al., 1990; ÖFNER et al., 1992; DERENZINI et al., 1995).

A determinação do número e da área das AgNORs têm sido comparada com outros métodos de mensuração da atividade celular, como a determinação da proliferação através da citometria de fluxo de DNA (CROCKER et al., 1988) e essa correlação têm mostrado-se positiva. Entretanto, a coloração pela prata representa um método rápido

e barato, que pode ser feito utilizando-se apenas equipamentos de rotina de laboratório, além de um analisador de imagens (FLYNN et al., 2002).

Essa técnica é muito utilizada no diagnóstico e prognóstico de muitos tipos de tumores, por caracterizar com grande eficácia a proliferação celular, já que as células cancerosas possuem uma grande quantidade de AgNORs enquanto que as células de lesões benignas ou normais possuem menor quantidade (DERENZINI, 2000). Entretanto, deve-se observar o fato de que nem sempre a taxa de proliferação celular de tumores malignos é maior do que as células normais ou de tumores benignos.

Em tecidos não-tumorais existem poucos trabalhos realizados. Especialmente em tecido trofoblástico, encontramos algumas referências a respeito de tecidos provenientes de abortos (hidropsia, mola hidatiforme completa ou parcial) (SURESH et al., 1990; NEUDECK et al., 1997), mas nenhuma referência foi encontrada em tecidos placentários normais.

3. REFERÊNCIAS

- AMOROSO, E. G. Placentation. In: LAMMING, G. E. *Marshall's physiology of reproduction*. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1952. v. 2, p. 12-311.
- BJÖRKMAN, N. Fine structure of cytotrial and trophoblastic giant cells in the bovine placenta. *Journal of Ultrastructural Research*, v. 24, p. 249-258, 1968.
- BJÖRKMAN, N. Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. *Acta Anatomica Supplement*, v. 81, p. 1-22, 1973.
- BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- BJÖRKMAN, N.; SÖLLÉN, P. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 1, p. 347-362, 1960.
- CARVALHO, A. F. Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalis bubalis bubalis*) - Linnaeus 1758. 2000. 110 p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.
- CROCKER, J.; MCCARTNEY, J. C.; SMITH, P. J. Correlation between DNA flow cytometric and nuclear organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Pathology*, v. 134, p. 151-156, 1988.
- DANTZER, V. Epitheliochorial placentation. In: KNOBL, E.; NEIL, J. D. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, 1999. v.1, p. 15-28.
- DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAEPER, D. 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.
- DERENZINI, M.; PESSIGN, A.; FARABEGOLI, F.; TRERE, D.; BADIALLI, M.; DEHAN, P. Relationship between interphase's nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *American Journal of Pathology*, v. 134, p. 925-932, 1989.
- DERENZINI, M.; PESSIGN, A.; TRERE, D. The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Pathology Investigation*, v. 85, n. 137-140, 1990.

3. REFERÊNCIAS

- AMOROSO, E. G. Placentation. In: LAMMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1952, v. 2, p. 12-311.
- BJÖRKMAN, N. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 24, p. 249-258, 1968.
- BJORKMAN, N. Fine structure of the fetal-maternal area of exchange in the epitheliochorial and endotheliochorial types of placentation. **Acta Anatomica Supplement**, v. 61, p. 1-22, 1973.
- BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- BJÖRKMAN, N.; SOLLÉN, P. Morphology of the bovine placenta at normal delivery. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 1, p. 347-362, 1960.
- CARVALHO, A. F. **Caracterização da célula binucleada na placenta de búfalos (*Bubalis bubalis bubalis*) – Linnaeus 1758**. 2000. 110 p. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.
- CROCKER, J.; MCCARTNEY, J. C.; SMITH, P.J. Correlation between DNA flow cytometric and nuclear organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Pathology**, v. 154, p. 151-156, 1988.
- DANTZER, V. Epitheliochorial placentation. In: KNOBIL, E. NEIL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, v.1, p. 18-28.
- DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, D. 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.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERE, D.; BADIALI, M.; DEHAN, P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **American Journal of Pathology**, v. 134, p. 925-932, 1989.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERE, D. The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Laboratory Investigation**, v. 63, p. 137-140, 1990.

- DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Reviews of Experimental Pathology**, v. 32, p. 150-192, 1991.
- DERENZINI, M.; SIRRI, V.; TRERÈ, D.; OCHS, R. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. **Laboratory Investigation**, v. 73, p. 497-502, 1995.
- DERENZINI, M.; TRERÈ, D.; PESSI, A.; MONTANARO, L.; SIRRI, V.; OCHS, R. Nucleolar function and size in cancer cells. **American Journal of Pathology**, v. 152, p. 1291-1297, 1998.
- DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, p. 117-120, 2000.
- DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R. B. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, v. 119, n. 3, p. 1351-1355, 1986.
- FLOOD, P. F. The development of conceptus and its relationship to the uterus. In: CUPPS, P. T. (Ed.) **Reproduction of domestic animals**. New York: Academic Press, 1991, p. 315-356.
- FLYNN, J. M.; SHELTON, R. M.; LANDINI, G. Investigation of primary cell-biomaterial interactions using silver nitrate staining of nucleolar organising regions. **Biomaterials**, v. 23, p. 19-26, 1989.
- FOLKMAN, J.; MOSCONA, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, v. 273, p. 345-349, 1978.
- GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 20, p. 37-50, 1975.
- GRAY, J. W.; DOLBEARE, F.; PALLAVICINI, M. G. Quantitative cell-cycle analysis. In: **Flow cytometry and sorting**, 2nd ed., Wiley-Liss, 1990, p. 445-467.
- GREENSTEIN, J. S.; MURRAY, R. W.; FOLEY, R. C. Observations of the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **Anatomical Record**, v. 132, p. 321-325, 1958.
- GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F.; RUSSEK-COHEN, E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. **Placenta**, v. 12, n. 1, p. 27-35, 1991.
- HOFFMAN, L. H.; WOODING, F. B. Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, n. 6, p. 559-577, 1993.

HOWELL, J. N. Quality assurance: the growth of a concept and evolvement of change. **Military Medicine**, v. 147, n. 10, p. 856-860, 1982.

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

KLISCH, K.; SCHULER, G.; MIGLINO, M. A.; LEISER, R. Genome multiplication in trophoblast giant cells of sheep, goat, water buffalo and deer: na image cytophotometric study. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 35, p. 145-148, 2000.

LEISER, R.; EGLOFF, T. Ultrastructural correlates of placental substance transfer a state-of-art-review. **Placental Communications: biochemical, morphological and cellular aspects**, v. 199, p. 219-238, 1990.

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

LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 517-527, 1997.

LISCHWE, M. A.; SMETANA, K.; OLSON, M. O. J.; BUSCH, H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Science**, v. 25, p. 701-708, 1979.

McCLINTOCK, D. J. L. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 21, p. 294-328, 1934.

McEWEN, R. S. **Vertebrate embriology**. New York: Henry Holt and Company, 1931, p. 497-521.

MORGAN, G.; WOODING, F. B. P.; 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, n. 2, p. 745-752, 1989.

MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V. F.; WILKINSON, J. E. Transforming growth factor beta in bovine placentas. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 748-755, 1996.

TRICE, G. P.; FERNAN, A.; MONTANA, M. The placental binucleate cell: a new type of trophoblastic cell. **Experimental Cell Research**, v. 104, p. 131-137, 1986.

NEUDECK, H.; UNGER, M.; HUFNAGL, P.; EIBEN, B.; PETERS, K.; KALLA, J.; GRAF, R.; VOGEL, M. Villous cytotrophoblast proliferating potencial in complete or partial hydatidiform mole: diagnostic value of silver-stained nucleolar organizer region (AgNOR)-associated proteins. **General & Diagnostic Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 179-184, 1997.

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1985. 274 p.

ÖFNER, D.; HITTMAR, A.; MARTH, C.; TOTSCH, M.; DAXENBICHLER, G.; MIKUZ, G.; MARGREITER, R.; SCHMID, K.W. Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. **Pathology Research and Practice**, v. 188, p. 742-746, 1992.

REIMERS, T. J.; ULLMAN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

ROBERTS, R. M.; ANTHONY, R. V. Molecular biology of trofoectoderm and placental hormones. In: FINDLAY, J. K. **Molecular biology of the female reproductive system**. San Diego: Academic Press, 1994. 457 p.

ROBERTS, R. M.; XIE, S.; NAGEL, R. J.; LOW, B.; GREEN, J.; BECKERS, J. F. Glycoproteins of the aspartyl proteinase gene family secreted by the developing placenta. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 362, p. 231-240, 1995.

SCHLAFER, D. H.; FISCHER, 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.

SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biology of Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 41-65, 1975.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 121-126, 2000.

SURESH, U. R.; CHAWNER, L.; BUCKLEY, C. H.; FOX, H. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. **Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 213-215, 1990.

TRERÈ, D.; PESSON, A.; DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Experimental Cell Research**, v. 184, p. 131-137, 1989.

- TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 127-131, 2000.
- WILLIAMS, J. ; MEDEARIS, A. L.; BEAR, M. B.; KABACK, M. M. Chorionic villus sampling is associated with normal fetal growth. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 157, n. 3, p. 708-712, 1987.
- WILLIAMS, M. A.; KLEINSCHMIDT, J. A.; KROHNE, G.; FRANKE, W. W. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus Laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 137, p. 341-51, 1982.
- WINSATT, A. W. Observations on the morphogenesis, cotochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 2, p. 209-243, 1980.
- WOODING, F. B .P.; WATHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 425, 1980.
- WOODING, F. B. P. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 31-39, 1982.
- 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.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMING, G. E. **Marshall's physiology of reproduction**. London: Chapman and Hall, 1994, Part 1, v. 3, p. 233-260.
- 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 and Technique**, v. 38, n. 1-2, p. 88-99, 1997.
- ZOLI, A. P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J. F.; REZNIK, M.; BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 623-629, 1992.
- ZYBINA, E. V.; ZYBINA, T. G. Polytene chromosomes in mammalian cells. **International Reviews of Cytology**, v. 165, p. 53-119, 1996.

4. ARTIGO 1

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E ATIVIDADE METABÓLICA E O ESTÁGIO DA GESTAÇÃO UTILIZANDO-SE AgNORs COMO MARCADORES EM PLACENTAS BOVINAS.

Patrícia dos Santos Carneiro¹, Durvanei Augusto Maria², Maria
Angelica Miglino¹

¹ Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; ² Laboratório de
Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

4. ARTIGO 1

RELATIONSHIP BETWEEN CELL PROLIFERATION AND METABOLIC ACTIVITY AND DAYS OF PREGNANCY IN BOVINE PLACENTA USING AgNORs AS MARKERS.

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E ATIVIDADE METABÓLICA E O ESTÁGIO DA GESTAÇÃO UTILIZANDO-SE AgNORs COMO MARCADORES EM PLACENTAS BOVINAS.

Patrícia dos Santos Carneiro¹, Durvanei Augusto Maria², Maria Angelica Miglino¹

¹ Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; ² Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN CELL PROLIFERATION AND METABOLIC ACTIVITY AND DAYS OF PREGNANCY IN BOVINE PLACENTA USING AgNORs AS MARKERS.

Nucleolar Organizer Regions (NORs) are defined as nucleolar components containing argyrophilic proteins, which are selectively stained by silver methods, so called AgNORs. Several investigations showed that the AgNOR quantity represents a valuable parameter of cell kinetics. The number and area of AgNORs reflect the level of activity and cellular proliferation. The aim of the present study was to evaluate the functional activity as well as the relation between days of pregnancy and the proliferative capacity of trophoblastic mononucleate and binucleate cells from bovine placentomes. The AgNORs number and size was determined in different phases of gestation, using a silver nitrate staining in conventional histological prepared slides. The results demonstrated significant increase of AgNORs numbers per trophoblastic mononucleate cells in 3rd trimester, varying between 1 and 12 AgNORs/cell, with predominance of 4-6 AgNORs/cell. In 1st and 2nd trimester, the number varied from 1 to 9 AgNORs/cell and most cells had 1-3 AgNORs. There weren't significant differences between the amount of AgNORs in 2nd and 3rd trimester, but there were significant differences to 1st trimester in binucleate cells. (19-27 and 10-18 AgNORs/cell respectively), but this number was higher than observed in trophoblastic mononucleate cells in the same period. These data confirmed that AgNORs can be used as markers of the proliferative placental cell cycle and established a relation between AgNORs number and days of gestation. It is important to set up the relation between AgNORs number and cellular metabolic deficiency as well as transcriptional activity. These data could be used in much diagnosis and prognosis of several placental pathologies, including pregnancy losses derived of manipulated embryos.

INTRODUÇÃO

As regiões organizadoras de nucléolos (Nucleolar Organizer Regions – NORs) foram primeiramente descritas por Heitz (1931) e McClintock (1934) como uma região de cromatina levemente corada em volta da qual, no final da telófase, o nucléolo é novamente formado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula.

As NORs são constituídas por cístrons de rDNA. Normalmente esses cístrons agrupam-se (clusters), formando um ou mais nucléolos. Entretanto, em determinadas situações, apresentam-se pulverizadas no interior do núcleo, sob a forma de pontos (dots), ou em formas alteradas.

Um grupo peculiar de proteínas ácidas que têm alta afinidade por prata são localizadas nos mesmos locais que as NORs, o que confere as mesmas a propriedade de serem clara e rapidamente visualizadas por colorações que utilizam nitrato de prata (GOODPASTURE & BLOOM, 1975).

As NORs, quando coradas por prata podem ser facilmente identificadas como pontos pretos, de maior ou menor tamanho, exclusivamente localizados na área nucleolar e são chamadas de AgNORs (TRERÈ, 2000). Elas são unidades estruturais-funcionais do nucléolo nos quais todos os componentes necessários para a síntese do RNA ribossômico estão localizados. O número de AgNORs está estritamente relacionado com a atividade transcricional do RNAr e com a agilidade e rapidez da proliferação celular no tecido estudado (DERENZINI, 2000).

O número e tamanho das NORs são muito variáveis dentro do nucléolo, de acordo com a atividade transcricional do RNAr. Cada ponto (DOT) corado pela prata corresponde, em nível ultraestrutural, ao centro fibrilar em íntima associação ao componente fibrilar denso (DERENZINI et al., 1990; DERENZINI & PLOTON, 1991).

A coloração pela prata é uma técnica muito utilizada no diagnóstico e prognóstico de muitos tipos de tumores, por caracterizar com grande eficácia a proliferação celular, já que as células cancerosas possuem uma grande quantidade de AgNORs enquanto que as células de lesões benignas ou normais possuem menor quantidade (DERENZINI, 2000). Entretanto, deve-se observar o fato de que nem sempre a taxa de proliferação celular de tumores malignos é maior do que as células normais ou de tumores benignos.

Em tecidos não-tumorais existem poucos trabalhos realizados. Especialmente em tecido trofoblástico, encontramos algumas referências a respeito de tecidos provenientes de abortos (hidropsia, mola hidatiforme completa ou parcial) (SURESH et al., 1990; NEUDECK et al., 1997), mas nenhuma referência foi encontrada em tecido normal.

As células trofoblásticas estão divididas em duas grandes populações: as mononucleadas e as binucleadas, que somam aproximadamente um quinto da população total. Produzem diversos hormônios e fatores de crescimento, que estão associados com o crescimento fetal e a manutenção da gestação (SCHLAFFER et al., 2000).

Considerando o crescimento da placenta e conseqüentemente das

células trofoblásticas mono e binucleadas, esse trabalho teve com principal objetivo determinar a relação quantitativa entre a proliferação celular e o estágio da gestação através da quantificação das AgNORs utilizadas como marcadores em placentas bovinas, além de evidenciar a intensa atividade proliferativa e metabólica das células binucleadas, estabelecendo o padrão de normalidade para gestações bovinas, no intuito de compará-las posteriormente com gestações anormais ou provenientes de embriões manipulados em laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 5 amostras de placentônios bovinos do primeiro trimestre da gestação, 9 amostras do segundo e 7 amostras do terceiro trimestre da gestação de úteros provenientes de abatedouros. Os placentônios foram coletados do corno gestante, posicionados dorsalmente ao feto, imediatamente após o útero ser extirpado. Os placentônios foram cortados em cubos de aproximadamente 0,5 cm e acondicionados em frasco com formol tamponado 10%. As amostras foram fixadas por 24 horas, sendo em seguida iniciado o processo de inclusão do material, que consiste de uma série crescente de álcoois para desidratação, xilol para clarificação e posterior inclusão em parafina. As lâminas foram preparadas em duplicata, sendo os cortes feitos com 5 μ m de espessura e colocados em estufa a 56°C para completa fixação dos mesmos e início da desparafinação. O processo foi terminado com a imersão das lâminas em xilol e a série de álcoois decrescente

para rehidratação dos cortes. As primeiras lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE), para correta avaliação do tecido. O par das lâminas foi corado pelo Nitrato de Prata (AgNO_3), onde os cortes são imersos em uma solução final 1:2, que consiste de solução coloidal (gelatina 2% e ácido fórmico 1%) e solução de nitrato de prata (1:1). As lâminas vão à estufa a 37°C , em câmara úmida, por aproximadamente 20 minutos. Após a lavagem das lâminas com água, aplica-se a solução de tiosulfato de sódio 1% por um minuto e procede-se nova lavagem, em seguida da qual as lâminas deverão ser secas a temperatura ambiente. A captura e digitalização das imagens e posterior contagem das AgNORs foram feitas através de microscópio ótico (Leitz Diaplan), aumento de 400X, no sistema CCD-IRIS Sony Company. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes não-paramétricos t-Student e ANOVA One-way para $p < 0.05$, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey.

RESULTADOS

Foram analisadas o número total de AgNORs (dots e clusters) expressas pelas células trofoblásticas mononucleadas nos três trimestres da gestação. Agrupamos as quantidades de AgNORs encontradas por célula (1-3, 4-6, 7-9 e >9) para caracterização dos trimestres.

O primeiro e o segundo trimestre comportam-se de forma semelhante em relação ao número de AgNORs/célula predominante, uma vez que a maioria

das células contadas exibiam de 1 a 3 AgNORs ($26,1 \pm 9,7$ e $24,9 \pm 13,0$ respectivamente), diferindo significativamente ($p < 0,05$) da quantidade encontrada no terceiro trimestre ($8,9 \pm 9,0$). As células que apresentavam de 4 a 6 AgNORs foram maioria no terceiro trimestre ($16,6 \pm 8,9$), sendo a diferença significativa ($p < 0,05$) para o primeiro trimestre ($6,0 \pm 3,8$) mas não para o segundo trimestre ($12,1 \pm 6,9$, $p > 0,05$). Quando analisamos quantidades maiores de AgNORs por célula (7 a 9) percebemos que o terceiro trimestre continua apresentando número maior de células ($7,3 \pm 6,3$) quando comparado com os primeiro e segundo trimestre ($1,6 \pm 0,9$ e $1,6 \pm 1,3$, respectivamente) e que essa diferença é significativa ($p < 0,05$). (Tabela e Figura 1).

Também analisamos o número total de AgNORs (dots e clusters) expressas pelas células trofoblásticas binucleadas nos três trimestres da gestação. Mais uma vez as quantidades de AgNORs encontradas por célula foram agrupadas (10-18, 19-27, 28-36 e >36) para caracterização dos trimestres.

No primeiro intervalo avaliado (10 a 18 AgNORs/célula) não houve diferenças significantes entre os três trimestres mas constatamos que é o intervalo em que a maioria das células do primeiro trimestre estão colocadas ($2,4 \pm 0,4$). Quando avaliamos o segundo intervalo (19 a 27 AgNORs/célula) houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o primeiro ($1,4 \pm 0,0$) e o segundo trimestre ($4,6 \pm 1,8$). Ao comparar o primeiro com o terceiro trimestre ($5,0 \pm 1,2$) a significância encontrada entre as diferenças foi ainda maior ($p < 0,001$). Além

disso, pudemos constatar que a maioria das células binucleadas dos segundo e terceiro trimestres estão colocadas nesse intervalo. Resultados semelhantes foram encontrados para o terceiro intervalo de análise (28 a 36 AgNORs/célula), sendo que o primeiro trimestre ($0,2 \pm 0,0$) diferiu significativamente ($p < 0,05$) do segundo ($2,2 \pm 0,3$) e a diferença foi ainda mais significativa ($p < 0,001$) quando comparada com o terceiro trimestre de gestação ($3,2 \pm 2,0$). A comparação entre os trimestres para o último intervalo (> 36 AgNORs/célula) revelou diferenças significantes ($p < 0,001$) entre o primeiro ($0,2 \pm 0,0$) e o segundo trimestres ($0,2 \pm 0,0$) em relação ao terceiro trimestre ($2,3 \pm 0,9$) (Tabela e Figura 2).

FIGURA 1 - Distribuição das células trofoblásticas mononucleadas do placental bovino segundo os trimestres de gestação e o número de AgNORs expressas por célula.

* diferenças entre primeiro e terceiro trimestres;

* diferenças entre segundo e terceiro trimestres.

* ou **: $p < 0,05$

TABELA 1 - Células trofoblásticas mononucleadas do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação (%) e número de AgNORs expressas.

AgNORs	1 a 3	4 a 6	7 a 9	> 9
1º trimestre n=5	26,1 ± 9,7	6,0 ± 3,8	1,6 ± 0,9	0,4 ± 0,0
2º trimestre n=9	24,9 ± 13,0	12,1 ± 6,9	1,6 ± 1,3	1,3 ± 0,5
3º trimestre n=7	8,9 ± 8,9	16,6 ± 8,9	7,3 ± 6,3	3,7 ± 3,5

FIGURA 1 - Distribuição das células trofoblásticas mononucleadas do placentônio bovino segundo os trimestres da gestação e o número de AgNORs expressas por célula.

* diferenças entre primeiro e terceiro trimestres;

diferenças entre segundo e terceiro trimestres.

* ou # : $p < 0,05$

TABELA 2 - Células trofoblásticas binucleadas do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação (%) e número de AgNORs expressas.

AgNORs	10 a 18	19 a 27	28 a 36	> 36
1º trimestre n=5	2,4 ± 0,4	1,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2º trimestre n=9	3,5 ± 1,3	4,6 ± 1,8	2,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0
3º trimestre n=7	4,0 ± 2,5	5,0 ± 1,2	3,2 ± 2,0	2,3 ± 0,9

FIGURA 2 - Distribuição das células trofoblásticas binucleadas do placentônio bovino segundo os trimestres da gestação e o número de AgNORs expressas.

Figura 3: Fotomicrografia das células trofoblásticas binucleadas do placentônio bovino, primeiro trimestre da gestação (A) e (C) podem ser observados pontos de AgNORs. (A) Aumento 100X, coloração nitrito de prata (AgNO₃); (C) Aumento 400X, coloração nitrito de prata (AgNO₃).

Ø diferenças entre primeiro e segundo trimestres;

* diferenças entre primeiro e terceiro trimestres;

°, *: p < 0,05 ;

°, **: p < 0,01 ;

°, ***: p < 0,001

Figura 3: Fotomicrografias de cortes histológicos de placentônios bovinos, primeiro trimestre de gestação. Nas figuras (B) e (C) podem ser observados pontos pretos intranucleares que representam as AgNORs. **(A)** Aumento 100X, coloração hematoxilina-eosina (HE); **(B)** Aumento 40X, coloração nitrato de prata (AgNO_3); **(C)** Aumento 100X, coloração nitrato de prata (AgNO_3).

Figura 4: Fotomicrografias de cortes histológicos de placentônios bovinos, segundo trimestre de gestação. Nas figuras (B) e (C) podem ser observados pontos pretos intranucleares que representam as AgNORs. **(A)** Aumento 100X, coloração hematoxilina-eosina (HE); **(B)** Aumento 40X, coloração nitrato de prata (AgNO_3); **(C)** Aumento 100X, coloração nitrato de prata (AgNO_3).

Figura 5: Fotomicrografias de cortes histológicos de placentônios bovinos, terceiro trimestre de gestação. Nas figuras (B) e (C) podem ser observados pontos pretos intranucleares que representam as AgNORs. **(A)** Aumento 40X, coloração hematoxilina-eosina (HE); **(B)** Aumento 40X, coloração nitrato de prata (AgNO_3); **(C)** Aumento 100X, coloração nitrato de prata (AgNO_3).

DISCUSSÃO

Atualmente, já está estabelecido que a quantidade de AgNORs varia dependendo da atividade celular (LEEK et al., 1991). Muitos trabalhos demonstraram que a quantidade de AgNORs representa um parâmetro válido para a cinética celular, significativamente associado com a agilidade de duplicação celular (DERENZINI et al., 1989; TRERÈ et al., 1989; DERENZINI et al., 1990; DERENZINI et al., 1995). Nossos resultados confirmaram aumento da quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas mononucleadas a medida em que a gestação avançou, principalmente no terceiro trimestre de gestação. Isso indica um aumento na atividade proliferativa e/ou metabólica dessas células. A relação entre a quantidade de AgNORs e a duplicação celular pode ser explicada considerando que as células em proliferação precisam produzir um complemento ribossomal adequado para as células filhas. Considerando que o número de AgNORs está estritamente relacionado com a atividade transcricional do RNAr é uma consequência lógica relacionar também a quantidade de AgNORs com células em duplicação (DERENZINI, 2000).

O aumento da proliferação celular é facilmente justificável, já que em muitas espécies de mamíferos o peso do feto, e consequentemente sua placenta, aumentam exponencialmente ao longo da gestação, sendo esse aumento mais evidenciado durante os últimos meses (EVANS & SACK, 1973; FERRELL et al., 1976). Uma correlação positiva entre o peso fetal e o peso da placenta têm sido descrita para diversas espécies (IBSEN, 1928; WARWICK, 1928). Reynolds em 1991 descreveu que o aumento do peso da carúncula

(tecido materno) foi 2 a 4 vezes maior do que do cotilédone (tecido fetal) durante os últimos dois trimestres de gestação. Entretanto, a concentração de DNA caruncular permaneceu relativamente constante do dia 100 ao 250, enquanto a quantidade de DNA cotiledonária aumentou, indicando que a densidade celular nos cotilédones aumentou ao longo da gestação, apesar da sua massa absoluta aumentar mais devagar do que a da carúncula (BASERGA, 1985; REYNOLDS, 1991).

Além disso, considerando que essas células, juntamente com as binucleadas, são responsáveis pela produção de diversos hormônios e fatores de crescimento associados ao desenvolvimento e manutenção da gestação (SCHLAFFER et al., 2000), é natural que sua atividade metabólica aumente a medida em que a gestação passa a requerer maiores esforços do animal. Sabemos que o principal da placenta é suprir as demandas metabólicas do feto. Assim, está claro que a função placentária deve aumentar proporcionalmente para acompanhar o crescimento fetal (METCALFE et al., 1988; FERRELL, 1989). Isso implica necessariamente em uma maior produção de hormônios, citocinas e fatores de crescimento, como a progesterona, que além do corpo lúteo, tem sua produção comprovadamente efetiva por células trofoblásticas (REIMERS et al., 1985), o lactogênio placentário (bPL) (DUELLO et al., 1986), glicoproteínas associadas a gestação (bPAG-1, bPAG-2, bPAG-3) (ROBERTS et al., 1995), e o Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF-beta) (MUNSON et al., 1996).

O número de AgNORs expresso pela células binucleadas apenas aumentou do primeiro para o segundo trimestre, permanecendo, após esse estágio, praticamente constante. Isso nos leva a crer que a atividade das células binucleadas atinge seu ponto máximo no segundo trimestre e permanece com o seu metabolismo alto até o final da gestação. Além disso, esse número foi extremamente maior do que o observado nas células trofoblásticas mononucleadas, evidenciando a intensa atividade metabólica dessa célula. O número e tamanho das AgNORs são muito variáveis dentro do nucléolo, de acordo com a atividade transcricional do RNAr. Um nucléolo com baixa taxa de biogênese ribossomal é caracterizado por uma NOR única e grande. Entretanto, o nucléolo de células ativadas exibem um grande número de NORs pequenas (DERENZINI & PLOTON, 1991). O tamanho do nucléolo, assim o número e a área das AgNORs refletem a atividade da célula e variam de acordo com o tipo celular e também com o estágio do ciclo celular (FOLKMAN & MOSCONA, 1978; LISCHWE et al., 1979; WILLIAMS et al., 1982).

As células binucleadas são formadas através de processos de cariocinese não seguidos de citocinese, ou seja, ocorre duplicação do núcleo sem haver a divisão do citoplasma (BJÖRKMAN, 1982). Sua divisão nuclear é finalizada por mitose e a divisão do citoplasma nunca ocorre, o que demonstra sua incapacidade proliferativa (WINSATT, 1980). Considerando sua grande capacidade de síntese de material nuclear e incapacidade proliferativa, podemos inferir que a grande quantidade de AgNORs encontrada nessas

células pode ser devida a esse processo de formação. Mas, se esse fosse o único motivo para sua grande quantidade de AgNORs, ele deveria ser constante ao longo de toda a gestação, fato que não ocorre, já que temos um aumento significativo do primeiro para o segundo trimestre. Morgan et al. (1989) demonstraram, através de métodos citoquímicos, que existe uma produção seqüencial e diferencial de proteínas nas células binucleadas ao longo da gestação, indicando que elas possuem diferentes funções de acordo com o estágio gestacional. Além disso, as células binucleadas são secretórias, produzindo e transportando proteínas para o organismo materno. Uma de suas maiores expressões são as glicoproteínas associadas com a gestação (bPAG) (KLISCH et al, 2000; ZOLI et al., 1992) e, além dessas proteínas, o lactogênio placentário (WOODING & FLINT, 1994), esteróides e substância derivadas do metabolismo de prostaglandinas (KLISCH et al., 2000) também têm sua produção e secreção associadas às células binucleadas da placenta de ruminantes. Essa intensa atividade de síntese e secreção de substâncias pode explicar a grande quantidade de AgNORs apresentadas por essas células. Além disso, essa célula, devidamente estimulada por fatores de crescimento e diferenciação, pode ser a responsável pela produção de várias substâncias sabidamente existentes na placenta, mas que, até o momento, tem a sede de sua produção desconhecida.

Assim, podemos estabelecer uma relação entre o número de AgNORs expressas nas células trofoblásticas mononucleadas com o estágio da gestação a que pertence o tecido avaliado e também entre o número de AgNORs

expressas nas células trofoblásticas binucleadas com o nível de atividade metabólica dessas células. Esses dados tornam-se importantes a medida em que podem apresentar-se alterados em placentas com alterações patológicas ou, o que atualmente interessa mais a diversos grupos de pesquisa, em placentas com seu desenvolvimento comprometido devido a gestações de embriões manipulados em laboratório. Poderemos então obter informações precisas sobre o grau de atividade proliferativa e/ou metabólica das células trofoblásticas (mono e binucleadas) avaliadas e comparar o tecido do qual se originaram com o padrão de normalidade aqui estabelecido.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Genética do Instituto Butantan, ao Laboratório de Histologia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP e principalmente ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan e sua diretora, Dra Olga Célia Martinez Ibañez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASERGA, R. **The Biology of Cell Reproduction**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1985.
- BJÖRKMAN, N. Placentação. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERÈ, D.; BADIALI, M.; DEHAN, P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **American Journal of Pathology**, v. 134, p. 925-932, 1989.

DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÈ, D. The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Laboratory Investigation**, v. 63, p. 137-140, 1990.

DERENZINI, M.; SIRRI, V.; TRERÈ, D.; OCHS, R. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. **Laboratory Investigation**, v. 73, p. 497-502, 1995.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v. 31, p.117-120, 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Reviews of Experimental Pathology**, v. 32, p. 150-192, 1991.

DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R. B. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, v. 119, p. 1351-1355, 1986.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. **Zentralbl Veterinarmed**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FERRELL, C. L.; GARRETT, W. N.; HINMAN, N.; GRICHTING, G. Energy utilization by pregnant and non-pregnant heifers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 937-950, 1976.

FOLKMAN, J.; MOSCONA, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, v. 273, p. 345-349, 1978.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 20, p. 37-50, 1975.

IBSEN, H. L.. Prenatal growth in guinea-pigs with special reference to environmental factors affecting weight at birth. **Journal of Experimental Zoology**, p. 51-59, 1928.

KLISCH, K.; SCHULER, G.; MIGLINO, M. A.; LEISER, R. Genome multiplication in trophoblast giant cells of sheep, goat, water buffalo and deer: na image cytophotometric study. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 35, p.145-148, 2000.

LEEK, R. D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C. E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **Journal of Pathology**, v. 165, p. 43-51, 1991.

LISCHWE, M. A.; SMETANA, K.; OLSON, M. O. J.; BUSCH, H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Science**, v. 25, p. 701-708, 1979.

McCLINTOCK, D. J. L. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 21, p. 294-328, 1934.

METCALFE, J.; STOCK, M. K.; BARRON, D. H. Maternal physiology during gestation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.; EWING, L. L.; GREENWALD, G. S.; MARKERT, C. L.; PFAFF, D. W. **The physiology of reproduction**, Raven Press, New York, 1988, p. 2145-2176.

MORGAN, G.; WOODING, F. B. P.; 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, n. 2, p. 745-752, 1989.

MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V. F.; WILKINSON, J. E. Transforming growth factor beta in bovine placentas. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 748-755, 1996.

NEUDECK, H.; UNGER, M.; HUFNAGL, P.; EIBEN, B.; PETERS, K.; KALLA, J.; GRAF, R.; VOGEL, M. Villous cytotrophoblast proliferating potential in complete or partial hydatidiform mole: diagnostic value of silver-stained nucleolar organizer region (AgNOR)-associated proteins. **General & Diagnostic Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 179-184, 1997.

REIMERS, T.J.; ULLMAN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

REYNOLDS, L. P.; MILLAWAY, D. S.; GRSCHJ, D. I.; INFELD, J. E.; REDMER, D. A. Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, n. 1, p. 237-245, 1991.

ROBERTS, R. M.; XIE, S.; NAGEL, R. J.; LOW, B.; GREEN, J.; BECKERS, J. F. Glycoproteins of the aspartyl proteinase gene family secreted by the developing placenta. **Advances of Experimental Medicine and Biology**, v. 362, p. 231-240, 1995.

SCHLAFFER, D. H.; FISCHER, 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.

SURESH, U. R.; CHAWNER, L.; BUCKLEY, C. H.; FOX, H. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. **Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 213-5, 1990.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p. 127-131, 2000.

TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Experimental Cell Research**, v. 184, p. 131-137, 1989.

WARWICK, B. L. Prenatal growth of swine. **Journal of Morphology and Physiology**, p. 46-59, 1928.

WILLIAMS, M. A.; KLEINSCHMIDT, J. A.; KROHNE, G.; FRANKE, W. W. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus Laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 137, p. 341-51, 1982.

WINSATT, A. W. Observations on the morphogenesis, histochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. **American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 2, p. 209-243, 1980.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMING, G. E., **Marshall's physiology of reproduction**, Part 1, v.3, Chapman and Hall, London, 1994, p. 233-260.

ZOLI, A. P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J. F.; REZNIK, M.; BECKERS, A. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 623-629, 1992.

5. ARTIGO 2

DETERMINAÇÃO DA PLOIDIA E DAS FASES DO CICLO
CELULAR DAS CÉLULAS DO PLACENTÔNIO BOVINO

Patrícia dos Santos Carneiro¹, Durvanei Augusto Maria², Rosêmela
Aparecida Roela dos Santos³, Maria Angelica Miglino¹.

¹ Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, FMVZ-USP; ² Laboratório de
Imunogenética, Instituto Butantan; ³ Departamento de Radiologia, Laboratório
de Oncologia, FM-USP, Brasil.

5. ARTIGO 2

Determination of ploidy and cell cycle phases of bovine placental cells.

Cellular homeostasis uses two mechanisms to maintain or renew all tissues in organisms: the cell cycle and apoptosis. To comprehend the growth and the maturation of several tissues it is important to understand proliferation cellular

DETERMINAÇÃO DA PLOIDIA E DAS FASES DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DO PLACENTÔNIO BOVINO

Patrícia dos Santos Carneiro¹, Durvanei Augusto Maria², Rosemeire

Aparecida Roela dos Santos³, Maria Angelica Miglino¹.

¹ Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, FMVZ-USP; ² Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan; ³ Departamento de Radiologia, Laboratório

de Oncologia, FM-USP, Brasil.

ABSTRACT**Determination of ploidy and cell cycle phases of bovine placentome cells.**

Cellular homeostasis uses two mechanisms to maintain or renew all tissues in organisms: the cell cycle and apoptosis. To comprehend the growth and the maturation of several tissues it is important to understand proliferation cellular kinetics and the cell cycle. The aim of this study was to determine the ploidy and to establish the cellular kinetics involved in cell formation and differentiation through cell cycle analysis of trophoblastic binucleate cells. Placentomes samples were collected and put in liquid nitrogen. The process followed Vindelov's preparation to determine DNA content. FACScalibur (BD) performed the acquisition in CellQuest program and the analysis was performed in ModFitLT program. The statistical analysis was performed by One-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Two cell populations were different about size (area) and granularity and form the bovine placentome: one is diploid cells and the other tetraploid. The percentage of tetraploid cells in second trimester was significant higher ($p < 0.01$) than first trimester. The tetraploid value found to third trimester was similar that second and different that first trimester. In the first trimester, the majority of tetraploid cells are not differentiated; with the progress of pregnancy and the increase in metabolic demands of fetus, the tetraploid cells begin a differentiation process and become cells that are able to supply maternal and fetal needs.

INTRODUÇÃO

A homeostase celular utiliza-se de mecanismos através dos quais os tecidos de um organismo mantêm-se ou renovam-se, e para que isso ocorra, as células dispõem de dois programas genéticos principais: o ciclo celular, que sempre é acompanhado pela mitose e a apoptose ou morte celular programada (LARSEN, 1998).

Compreender a cinética de proliferação celular e o ciclo de replicação celular é importante para entender o crescimento e a maturação dos diversos tipos de tecido. O ciclo celular pode ser entendido como um conjunto de eventos responsável pela duplicação celular. Didaticamente pode ser dividido nas fases G1 ou fase pré-sintética (inicia-se no fim da mitose), fase S ou fase de síntese de DNA, fase G2 e mitose propriamente dita. O termo G0 foi introduzido para nomear células que não estão no ciclo, mas que podem ser recrutadas a qualquer momento.

Informações quantitativas a respeito de características proliferativas de células ou populações celulares são essenciais para a realização de vários estudos biológicos e biomédicos. Células em atividade proliferativa passam por quatro fases denominadas G1, S, G2 e M, onde replicam seu DNA e dividem-se. As análises citocinéticas envolvem a determinação quantitativa da distribuição das células entre essas fases e estágios e o padrão seguido do movimento das células entre elas. As informações citocinéticas comumente obtidas incluem as frações celulares nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, assim como a duração das mesmas, a fração de células em atividade

proliferativa, a fração de células capazes de formar clones e a taxa de síntese de DNA (GRAY et al., 1990).

A importância da análise da distribuição do DNA para o estudo do ciclo celular reside no fato de que a quantidade de DNA celular é um marcador para maturidade celular. Assim, células na fase G1 possuem uma quantidade de DNA, células na fase S aumentam sua quantidade de DNA continuamente e tornam-se maduras até a entrada nas fases G2 e M, quando as células possuem duas vezes a quantidade de DNA existente na fase G1.

Teoricamente, as frações de células em cada fase podem ser obtidas através de citometria de fluxo, levando-se em consideração a distribuição do DNA celular. Na prática, essa mensuração pode não funcionar devido a falhas no método, mas a magnitude dos erros é muito baixa (GRAY et al., 1990).

Assim, este trabalho teve como objetivo a determinação da quantidade de DNA das células do placentônio bovino em diferentes estágios da gestação. Além disso, procuramos determinar a ploidia dessas mesmas células e, através da análise dos estágios do ciclo celular, estabelecer a cinética celular envolvida na formação e diferenciação das células trofoblásticas binucleadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 5 amostras de placentônios bovinos do primeiro trimestre da gestação, 13 amostras do segundo e 9 amostras do terceiro trimestre da gestação de úteros provenientes de abatedouros. Os placentônios foram coletados do corno gestante, posicionados dorsalmente ao feto,

imediatamente após o útero ser extirpado. Para a coleta, utilizou-se material cirúrgico estéril para manter a integridade do material nuclear celular, e as amostras foram acondicionadas em tubos para congelamento e mergulhadas em nitrogênio líquido, onde permaneceram até o processamento. Para processar as amostras, pedaços de 0,5 cm² foram mergulhados em 1 ml de solução de tampão citrato (pH 7,6) e desagregados manualmente. O material obtido foi filtrado em malha de 30 µm (SpectraMesh Nylon Filters) e do filtrado foram separados 200 µl, em tubos para FACS. O material seguiu a preparação descrita por Vindelov et al., 1985, para determinação da quantidade de DNA através de citometria de fluxo. Após o processamento do material, as aquisições foram realizadas em aparelho FACScalibur, BD, no programa CellQuest e as análises foram processadas no programa ModFitLT. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico ANOVA One-way para valores de $p < 0,05$, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey.

RESULTADOS

Neste trabalho foram analisadas as populações celulares encontradas nos placentônios bovinos ao longo da gestação. Duas populações que se apresentavam distintas na aquisição, ou seja, dois tipos celulares que claramente diferiam quanto ao seu tamanho (área) e quanto a sua granulosidade, foram identificadas. Ao transpor os dados das aquisições para o programa de análise, encontramos diferenças quanto a ploidia dessas células,

sendo uma população diplóide e a outra tetraplóide.

No primeiro trimestre, foi obtido que 78,1% ($\pm 5,2$) das células analisadas (média de 10000 eventos contados em cada aquisição) pertenciam a primeira população e apresentavam-se diplóides. A segunda população somava 21,9% ($\pm 5,2$) das células analisadas e apresentavam-se tetraplóides. No segundo trimestre, as células diplóides somavam 84,9% ($\pm 3,4$), enquanto as tetraplóides perfaziam 15,1% ($\pm 3,4$). A porcentagem de células tetraplóides no segundo trimestre foi significativamente maior ($p < 0,01$) quando comparada a porcentagem encontrada no primeiro trimestre. No terceiro trimestre, obtivemos 86,4% ($\pm 2,9$) de células diplóides e 13,6% ($\pm 2,9$) de células tetraplóides e o valor encontrado para células tetraplóides foi semelhante estatisticamente ao segundo trimestre e diferente significativamente ($p < 0,01$) da porcentagem encontrada no primeiro trimestre. Os valores encontrados para células diplóides não diferiram estatisticamente (Tabela e Figura 1).

Além do número total de células diplóides e tetraplóides, foi realizada uma análise diferencial quanto ao estágio do ciclo celular em que as células encontravam-se. O número total de células diplóides, em todos os estágios da gestação, apresentava-se em G0-G1. Já a população tetraplóide apresentou diferenças estatísticas quanto a sua distribuição no ciclo celular.

O primeiro trimestre apresentou 80,4% ($\pm 16,8$) das células tetraplóides localizadas na fase G0-G1, 1,4% ($\pm 2,9$) na fase S e 18,7% ($\pm 13,9$) na fase G2-M. O segundo trimestre apresentou 45,3% ($\pm 20,1$) de células tetraplóides na fase G0-G1, 0,25% ($\pm 0,8$) na fase S e 54,5% ($\pm 20,0$) na fase G2-M.

Finalmente o terceiro trimestre apresentou 35,7% ($\pm 30,0$) de células tetraplóides na fase G0-G1, 2,2% ($\pm 6,0$) na fase S e 62,1% ($\pm 27,2$) na fase G2-M. Quando comparamos as porcentagens de células dentro da mesma fase do ciclo celular, obtivemos que o segundo e o terceiro trimestre comportam-se de forma semelhante, não havendo diferenças significativas entre eles. Mas, quando comparamos o primeiro com o segundo e terceiro trimestres, estas passam a existir. Para a fase G0-G1, a porcentagem obtida para o primeiro trimestre foi significativamente maior quando comparada com o segundo ($p < 0,05$) e quando comparada com o terceiro trimestre ($p < 0,01$). Para a fase S não encontramos diferenças entre os trimestres. Para a fase G2-M, encontramos um padrão inverso ao observado na fase G0-G1, já que a porcentagem encontrada para o primeiro trimestre foi significativamente menor quando comparada ao segundo ($p < 0,05$) e quando comparada com o terceiro trimestre ($p < 0,01$) (Tabela e Figura 2).

TABELA 1 - Populações celulares do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação.

	Diplóides	Tetraplóides
1º trimestre n=5	78,1 ± 5,2	21,9 ± 5,2
2º trimestre n=13	84,9 ± 3,4	15,1 ± 3,4
3º trimestre n=9	86,4 ± 2,9	13,6 ± 2,9

FIGURA 1 - Distribuição das populações celulares do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação.

* diferenças entre primeiro e segundo trimestres;

diferenças entre primeiro e terceiro trimestres.

** ou ## : p < 0,01

TABELA 2 - População tetraplóide do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação quanto a sua distribuição nas fases do ciclo celular.

	G0-G1	S	G2-M
1º trimestre n=5	80,4% ($\pm 16,8$)	1,4% ($\pm 2,9$)	18,7% ($\pm 13,9$)
2º trimestre n=13	45,3% ($\pm 20,1$)	0,3% ($\pm 0,8$)	54,5% ($\pm 20,0$)
3º trimestre n=9	35,7% ($\pm 30,0$)	2,2% ($\pm 6,0$)	62,1% ($\pm 27,2$)

FIGURA 2 - Distribuição da população tetraplóide do placentônio bovino nos diferentes trimestres da gestação quanto ao ciclo celular.

Ø diferenças entre primeiro e segundo trimestres;

* diferenças entre primeiro e terceiro trimestres;

°, *, *: $p < 0,05$; °°, **: $p < 0,01$.

1º trimestre

Gráfico de distribuição das células do placentônio bovino nas fases do ciclo celular. Observar a baixa porcentagem de células tetraplóides em G2-M.

Fases do ciclo celular, diferentes fases da gestação. Em azul, debris celulares; em vermelho, fase G0-G1 da população diplóide; em amarelo entre os canais 50-100, fase G2-M da população diplóide; em verde, fase G0-G1 da população tetraplóide; em amarelo entre os canais 100-200, fase G2-M da população tetraplóide.

2º trimestre

Gráficos da aquisição das células do placentônio bovino. Observar a determinação dos gates.

Gráfico de distribuição das células do placentônio bovino nas fases do ciclo celular. Observar aumento na porcentagem de células tetraplóides em G2-M.

Fases do ciclo celular, diferentes fases da gestação. Em azul, debris celulares; em vermelho, fase G0-G1 da população diplóide; em amarelo entre os canais 50-100, fase G2-M da população diplóide; em verde, fase G0-G1 da população tetraplóide; em amarelo entre os canais 100-200, fase G2-M da população tetraplóide.

DISCUSSÃO

3º trimestre

Gráficos da aquisição das células do placentônio bovino. Observar a determinação dos gates. No gate 2, notar células fora da área delimitada.

Gráfico de distribuição das células do placentônio bovino nas fases do ciclo celular. Observar aumento na leitura de debris celulares.

Fases do ciclo celular, diferentes fases da gestação. Em azul, debris celulares; em vermelho, fase G0-G1 da população diplóide; em amarelo entre os canais 50-100, fase G2-M da população diplóide; em verde, fase G0-G1 da população tetraplóide; em amarelo entre os canais 100-200, fase G2-M da população tetraplóide.

DISCUSSÃO

A determinação do nível de ploidia por hibridização *in situ* mostrou que a maioria dos núcleos das células fetais são tetraplóides e que geralmente os dois núcleos tetraplóides estão sempre juntos. Estes achados indicam que a poliploidização é um aspecto normal no desenvolvimento da maioria das células binucleadas (KLISCH et al., 1999). Os resultados acima descritos foram obtidos por hibridização *in situ*, sendo então qualitativos e não quantitativos. Através da citometria de fluxo, pudemos confirmar dados anteriores que classificavam as células binucleadas como tetraplóides, assim como pudemos determinar a porcentagem de células, nos diferentes estágios da gestação, que pertenciam a essa população. Segundo WOODING (1982) as células binucleadas são encontradas na placenta de ruminantes desde a implantação até momentos que antecedem o parto e originam-se de células uninucleadas. Em bovinos, essa população celular aparece aos 17 dias de gestação e permanece até o final (GREENSTEIN et al., 1958; BJÖRKMAN, 1968). Essas células apresentam um número aparentemente estável ao longo da gestação, representando de 15 a 20% do total de células do epitélio coriônico (WOODING & WATHES, 1980; WOODING, 1992). Mas, se o número de células binucleadas é constante ao longo de toda a gestação, só decaindo nas últimas semanas que antecedem o parto, quais seriam os motivos pelos quais nossos resultados apontam um decréscimo na população tetraplóide a medida em que a gestação avançou? A nossa hipótese é baseada nos dados obtidos quantitativamente por citometria de fluxo que se restringe à análise de tipos

celulares com diferenças pleiomórficas, o que poderia excluir a separação de subpopulações multinucleadas. FLOOD (1991) cita que, em bovinos, as células binucleadas constituem cerca de 10% das células trofoblásticas nos dias 18-20 e esse percentual aumenta para 20% no restante da gestação e que somente 20% dessas células possuem capacidade de migração. Após a migração, ocorrem as fusões com o epitélio uterino e formam-se as células multinucleadas gigantes. Como pudemos observar nos gráficos de aquisição do terceiro trimestre, muitas células podem ter ficado fora da área de análise devido ao seu tamanho. Como são células grandes e extremamente complexas, o programa utilizado para análise provavelmente considerou-as como debris ou agregados celulares, os chamados "doublets". Talvez por isso nossos dados apontem para uma diminuição na porcentagem de células tetraplóides na transição do primeiro para o segundo trimestre de gestação.

A respeito da gênese das células tetraplóides, KLISCH et al. (1999) propuseram um novo modelo, no qual o desenvolvimento dessas células ocorre primeiramente através de uma mitose acitocinética que origina células binucleadas com dois núcleos diplóides; em seguida a célula entra em uma segunda mitose acitocinética, na qual os cromossomos dos dois núcleos formam uma figura de metáfase comum. O resultado é uma célula com dois núcleos tetraplóides, que passam por uma fase S adicional, sem, entretanto, reiniciarem nova mitose. Assim como esse modelo foi proposto, explicações para esse fenômeno foram indicativas de que a multiplicação do genoma estaria ligada a um aumento da capacidade de síntese, causada pelo aumento do número de genes copiados disponíveis para transcrição. Estando a teoria da

gênese da célula binucleada e sua ploidia confirmadas, e a partir da quantificação do número total das células da população tetraplóide, um estudo diferencial das fases do ciclo celular nas quais as células tetraplóides estão distribuídas foi realizado. Nossos resultados indicaram que o primeiro trimestre comporta-se de maneira diversa e os segundo e terceiro trimestres são estatisticamente semelhantes. O primeiro trimestre apresenta a maioria de suas células tetraplóides em G0-G1, o que significa que elas estão entrando no ciclo celular, ou seja, em processo de divisão primária que, no caso das células binucleadas, acreditamos ser o próprio processo de formação. Já as células do segundo e terceiro trimestre estão em sua maioria na fase G2-M, o que pode significar que essas células estão em processo de diferenciação e finalização de mitose. Então, a hipótese provável é que no primeiro trimestre de gestação as células tetraplóides estão formadas, mas não diferenciadas. A medida em que a gestação avança e a demanda metabólica fetal aumenta, essas células entram em processo de diferenciação para sua completa transformação em células capazes de produzir diversas substâncias e suprir as necessidades gestacionais maternas e fetais.

Assim, podemos concluir que o desenvolvimento normal da placenta de bovinos e suas células binucleadas obedecem ao padrão acima descrito. Da mesma forma que outros parâmetros anteriormente avaliados, este se torna extremamente importante na medida em que pode indicar alterações no correto desenvolvimento de placentas bovinas.

WOODING, F. B. P. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 31, p. 31-38, 1982.

AGRADECIMENTOS

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v. 13, p. 101-113, 1992.

Agradecemos ao Laboratório de Oncologia da FM-USP e sua diretora Dra Maria Mitzi Brentani e principalmente ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan e sua diretora Dra Olga Célia Martinez Ibañez.

REFERÊNCIAS

BJÖRKMAN, N. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. *Journal of Ultrastructural Research*, v. 24, p. 249-258, 1968.

FLOOD, P. F. The development of conceptus and its relationship to the uterus. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**, New York Academic Press, 1991, p. 315-356.

GRAY, J. W.; DOLBEARE, F.; PALLAVICINI, M. G. Quantitative cell-cycle analysis. In: **Flow cytometry and sorting**, 2nd ed, 445-467, Wiley-Liss, 1990.

GREENSTEIN, J. S.; MURRAY, R. W.; FOLEY, R. C. Observations of the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anatomical Record*, v. 132, p. 321-325, 1958.

KLISCH, K.; HECHT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. DNA Content and Ploidy Level of Bovine Placentomal Trophoblast Giant Cells. *Placenta*, v. 20, p. 451-458, 1999.

LARSEN, Ch-J. De la régulation/dérégulation du cycle cellulaire et ses conséquences. *Annales de Pathologie*, v. 18, n. 3, p. 163-164, 1998.

WOODING, F. B. P.; WATHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 59, n. 2, p. 425-430, 1980.

WOODING, F. B. P. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 31-39, 1982.

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 101-113, 1992.

6. CONCLUSÕES

- O número de AgNORs das células trofoblásticas mononucleadas está relacionado com sua atividade proliferativa, metabólica e com o estágio da gestação;
- O número de AgNORs das células trofoblásticas binucleadas está relacionado com sua atividade metabólica e com o estágio da gestação;
- O número de AgNORs apresentado pelas células binucleadas foi devido apenas a sua atividade metabólica, diferindo das células mononucleadas;
- O número de AgNORs foi muito maior em células binucleadas, evidenciando que o metabolismo dessas células é muito mais alto do que o apresentado pelas células mononucleadas;
- O placentário bovino é formado por duas populações celulares: uma a diploide e a outra tetraploide;
- No primeiro trimestre, a maioria das células tetraploides não está diferenciada; com o avanço da gestação e o aumento da demanda metabólica do feto, as células tetraploides iniciam o processo de diferenciação e tornam-se células capazes de suprir as necessidades maternas e fetais;
- Estes parâmetros poderão ser aplicados em investigações sobre anomalias placentárias devidas a patologias ou a gestações provenientes de embriões manipulados em laboratório.

6. CONCLUSÕES

- O número de AgNORs das células trofoblásticas mononucleadas está relacionado com sua atividade proliferativa, metabólica e com o estágio da gestação;
- O número de AgNORs das células trofoblásticas binucleadas está relacionado com sua atividade metabólica e com o estágio da gestação;
- O número de AgNORs apresentado pelas células binucleadas foi devido apenas a sua atividade metabólica, diferindo das células mononucleadas;
- O número de AgNORs foi muito maior em células binucleadas, evidenciando que o metabolismo dessas células é muito mais alto do que o apresentado pelas células mononucleadas;
- O placentônio bovino é formado por duas populações celulares: uma é diploide e a outra tetraploide;
- No primeiro trimestre, a maioria das células tetraploides não está diferenciada; com o avanço da gestação e o aumento da demanda metabólica do feto, as células tetraploides iniciam o processo de diferenciação e tornam-se células capazes de suprir as necessidades maternas e fetais.
- Estes parâmetros poderão ser aplicados em investigações sobre anormalidades placentárias devidas a patologias ou a gestações provenientes de embriões manipulados em laboratório.