PATRICIA REGINATO FACCIOTTI

**Influência da idade gestacional sobre as taxas de
proliferação e apoptose placentária em bovinos**

**São Paulo
2009**

PATRICIA REGINATO FACCIOTTI

Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2140
FMVZ

Facciotti, Patricia Reginato

Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos/ Patricia Reginato Facciotti. – São Paulo: P. R. Facciotti, 2009.
176.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1.Bovino. 2. Placenta. 3. Proliferação Celular. 4. Placentônio. 5. Apoptose. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Influências da idade gestacional sobre a taxa de proliferação e apoptose celular em diferentes regiões da placenta de bovinos normais”, protocolado sob o nº1294/2008, utilizando 28 (vinte e oito) 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 “Influences of pregnancy stages on proliferation and apoptosis rates in different regions of normal bovine placenta”, protocol number 1294/2008, utilizing 28 (twenty eight) bovines, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved “ad referendum” of the meeting.

São Paulo, 20 de março de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FACCIOTTI, Patricia Reginato

Título: Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Eu pedi a Deus...

*Eu pedi **força**... e Deus me deu dificuldades para me **fazer forte**.*

*Eu pedi **sabedoria**... e Deus me deu problemas para **resolver**.*

*Eu pedi **prosperidade**... e Deus me deu cérebro e músculos para **trabalhar**.*

*Eu pedi **coragem**... e Deus me deu obstáculos para **superar**.*

*Eu pedi **amor**... e Deus me deu pessoas com problemas para **ajudar**.*

*Eu pedi **favores**... e Deus me deu **oportunidades**...*

*Não recebi nada do que **pedi**... Mas eu recebi tudo o que **precisava**.”*

(Autor desconhecido)

“Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Cândida, a grande responsável por esta realização, por ser sempre um exemplo para mim, um exemplo de mãe e de mulher, o qual busco seguir em todos os momentos de minha vida.

Obrigado pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e por ser minha grande amiga. Esta realização só é possível graças a todo o amor, carinho e confiança dedicados a mim nesta jornada.

Obrigada por me tornar quem sou e, por hoje, chegar onde estou.

Eu te amo muito.”

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Maria Angélica Miglino, por me abrir as portas para o mundo científico e pela confiança em mim depositada. Obrigada pelos preciosos ensinamentos, os quais levarei comigo e serão fundamentais por toda minha vida. Graças a eles, hoje sou uma pessoa muito mais forte e responsável do que quando comecei este trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos da ciência e da vida.

À Dra. Rose Eli Grassi Rici, uma grande professora e mulher, por todos os ensinamentos valiosos, sem os quais este trabalho não seria possível; agradeço o apoio e os laços de carinho e amizade que criamos ao longo desta jornada. Mais do que uma professora, uma amiga e confidente, que me ensinou a vencer qualquer obstáculo que aparecesse em nosso caminho, me mostrando que todos eles, por piores que pareçam, nos fazem crescer e amadurecer.

Ao professor Durvanei Augusto Maria, pelo seu estímulo e orientação e por todo conhecimento transmitido a mim. Obrigado por abrir as portas de seu laboratório para a realização deste trabalho, sempre com uma incrível disposição em ajudar e a ensinar. Sinto orgulho em ter sido sua aluna e ter feito parte de sua equipe.

Ao meu tio Cássio, pelas vezes que ligava em casa só pra saber como estavam indo as coisas e pelos finais de semana tão alegres que passamos juntos. Espero que sinta neste momento o orgulho que um pai sentiria por sua filha, pois este é o meu sentimento em relação a nós. Obrigado por ser tão especial e por fazer parte de minha vida desta forma.

Ao meu noivo Thiago, pelo companheirismo em todos os momentos e pelo estímulo e carinho dedicados a mim. Obrigado pelos conselhos nos momentos de mais dúvidas e pelas risadas nos momentos mais difíceis. Obrigado por muitas vezes simplesmente estar por perto, me abraçar em silêncio, me confortar de uma maneira que só você é capaz de fazer. Jamais esquecerei teu apoio e teu amor. Eu te amo.

Aos colegas do Butantan Adilson Kleber Ribeiro, Ricardo Alexandre Azevedo, Fernanda Faião Flores, Thiago Antônio Fedele e Danilo Fernando de Oliveira Inada, por todas as vezes que me receberam no laboratório com tanta paciência, sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso. Obrigado pelo carinho e amizade.

Aos amigos, Joel, Claudinha e professora Tatiana Carlesso dos Santos, que apesar convivermos apenas no início desta jornada, me ajudaram muito e foram muito companheiros.

Ao amigo Álvaro, que ficou “perdido” junto comigo no início da pós-graduação e se mostrou uma pessoa alegre, serena e um grande amigo, obrigado pela disposição em me ajudar sempre que precisei e por todas as vezes que demos boas risadas! Obrigado por sua amizade.

Ao amigo Carlos Sarmiento, por todo o carinho e amizade especiais durante todo este período de pós-graduação. Obrigado por me escutar, por me ajudar, obrigado pelos conselhos e por tornar alguns momentos tristes alegres tão rápido e por ser sempre um grande amigo.

Aos amigos Joãozinho, André, Marininha, Phelipe, Daniele, Cristiane, Ricardo, Adriana e Maranhão, pela convivência diária e pela troca de experiências. Obrigado principalmente pela amizade pela qual me receberam e por terem sido tão companheiros em muitos momentos ao longo desta jornada.

Aos colegas do laboratório LTIAM, Ana Rita, Janaína, Rose, Taís e Renata, por sempre terem me recebido no laboratório e me ajudado por tantas vezes na aquisição dos dados. Obrigado pelo carinho e amizade.

Ao amigo Ronaldo, por todas as vezes em que me socorreu nos momentos que precisei de ajuda no laboratório. Obrigado principalmente pelos momentos de alegria e por sua amizade.

Aos colaboradores Sandra, Diogo, “Índio”, Raimundo e João, que sempre me acompanharam e ajudaram em todos os momentos durante todo o processo de aprendizado e desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Bertolini, Carlos Eduardo Ambrósio e José Roberto Kfoury pelos conselhos e ensinamentos e por todo o auxílio na realização deste trabalho.

Aos colaboradores e funcionários do departamento da FMVZ-USP: Jaqueline, Maicon, Tatiana e Fátima. Obrigada pelo carinho.

Às funcionárias da comissão de pós-graduação da FMVZ-USP, Cláudia Lima, Dayse Maria e Joana Ferreira, pela colaboração desde o meu ingresso na pós-graduação.

A todos os colegas de pós-graduação, por estarem presentes em todos os momentos e pela amizade.

Ao Frigorífico Mantiqueira, na cidade de São José dos Campos, SP, por fornecer os animais necessários.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

FACCIOTTI, P. R. **Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos** [Influence of gestational stage on cell proliferation and apoptosis in bovine placenta]. 2009. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A placenta dos mamíferos é um órgão transitório formado pela justaposição das membranas fetais e tecidos maternos, sendo responsável pelas trocas fisiológicas entre o feto e a mãe e pela síntese de hormônios fundamentais para o sucesso da gestação. O crescimento placentário e a nutrição fetal requerem altas taxas de crescimento e diferenciação celular, sendo fundamental um balanço adequado entre proliferação e morte celular das células trofoblásticas placentárias. Estas células possuem propriedades particulares no que diz respeito a suas funções metabólicas, endócrinas e angiogênicas, porém a atividade proliferativa destas células em diferentes regiões da placenta bovina é desconhecida. Neste estudo, levantamos a hipótese de que as células de diferentes regiões placentárias de bovinos devem apresentar padrões distintos de atividade proliferativa e morte celular, podendo ser algumas regiões mais ou menos responsáveis pelo desenvolvimento fetal ao longo da prenhez. Para testar esta hipótese, analisamos as células de diferentes regiões da placenta e em diferentes estágios gestacionais através de citometria de fluxo e coloração com marcador histoquímico, além de observações macroscópicas e histológicas para avaliar a morfologia da placenta e suas regiões. Foram analisadas as regiões: central e marginal dos placentônios, área interplacentomal, microplacentônios ($\leq 1,0\text{cm}$) e fusões placentomais. Por meio da citometria de fluxo realizamos uma distribuição das células placentárias nas diferentes fases do ciclo celular, observando a porcentagem de células em proliferação e apoptose. Em nossos resultados, encontramos particularidades macroscópicas, histológicas e metabólicas nas células de cada região placentária. A margem do placentônio apresentou um aumento prematuro de células em apoptose, com um aumento crescente a partir de 170 dias até o final da gestação, sugerindo que nesta região se inicie a desconexão placentomal. As áreas interplacentomais e fusões de placentônios apresentaram um equilíbrio na atividade proliferativa ao longo da gestação, sugerindo que a proliferação celular possua uma menor importância para a homeostase tecidual nestas regiões. Os microplacentônios apresentaram uma

atividade proliferativa mais lenta, porém crescente ao longo da gestação, sugerindo pouca contribuição destas estruturas para a liberação placentária. Estes achados estão de acordo com nossa hipótese de que cada região placentária contribui de forma distinta para o crescimento da placenta bovina, cada uma delas participando de maneira particular no processo de maturação e desconexão placentária e no crescimento e nutrição fetal ao longo da gestação. O entendimento das taxas proliferativas e apoptóticas é importante para a compreensão da patogênese das perdas embrionárias e anormalidades no desenvolvimento placentário. A descrição dos processos de proliferação e morte celular em diferentes regiões da placenta de gestações bovinas poderá ajudar a elucidar processos fisiológicos desconhecidos relacionados ao desenvolvimento do conceito e a falhas gestacionais. Espera-se que este estudo forneça elementos essenciais à melhor compreensão do desenvolvimento placentário, estabelecendo padrões de normalidade para cada região da placenta bovina e auxiliando na compreensão dos mecanismos de falhas gestacionais que levam a anormalidades fetais e placentárias, muito comuns em técnicas avançadas de manipulação embrionárias, como a fertilização *in vitro*, a produção de animais transgênicos e a clonagem animal.

Palavras-chave: Bovino. Placenta. Proliferação celular. Carúncula. Placentônio. Apoptose.

ABSTRACT

FACCIOTTI, P. R. **Influence of gestational stage on cell proliferation and apoptosis in bovine placenta.** [Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos]. 2009. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The mammalian placenta is a transitory organ consisting of maternal-fetal tissues union, responsible for nutrient exchange and synthesis of many hormones which are essential for success of the gestation. Placental growth and fetal nutrition require high rates of cellular turnover and differentiation, and a balance between proliferation and apoptosis in the trophoblastic cells are essential to the placental development. The trophoblastic cells, that form the fetal portion of placenta, has unique properties and a wide range of metabolic, endocrine and angiogenic functions, but the proliferative profile of those cells. In this study we hypothesized that cells from different placental regions on bovine placenta must reveal distinct patterns of proliferative activity and apoptosis, and some regions may be potentially responsible to distinct modulation patterns in fetal growth and nutrition throughout pregnancy. We analyzed cells from different regions of normal bovine placenta, namely the central region of the placentome, the placentomes edges, interplacentomal areas, placentomal fusion, and microplacentomes ($\leq 1.0\text{cm}$). The cells of those regions were analyzed by flow cytometry and with a histochemical marker, as well as macroscopical and histological analysis. Using flow cytometry we performed the percentage of cells in each cell cycle phase, including apoptosis. Our findings indicated macroscopical, histological and metabolic particularities in different placental region. The edges of the placentome revealed a premature increase in apoptotic cells, with a significantly higher number of apoptotic cells from 170 days of gestation. That suggests this region to be the point of initiation of placentomal detachment in cattle. Interplacentomal areas and placentomal fusions showed no significant variations during pregnancy, suggesting that proliferation is minor importance for tissue homeostasis in those regions. Microplacentomes revealed a lower but an ascending proliferative activity, that suggests the relatively small role of those structures, with microplacentomes not contributing significantly to normal of placental functions and conceptus development during pregnancy. Taken together, the complete understanding of placental apoptotic and proliferative profiles at distinct placental

tissue regions during gestation will shed light to unknown physiological processes related to conceptus development, as some regions may be potentially responsible, at different degrees of influence, to distinct modulation patterns in fetal growth and nutrition throughout pregnancy. In that regard, results from the present study using non-manipulated bovine gestations indicated that proliferation and apoptosis exhibit patterns that are specific for the individual placental areas during gestation and at term in normal, non-manipulated pregnancies in cattle. Variations involving proliferation and apoptotic rates may influence placental maturation and detachment, compromising placental functions and leading to fetal stress, abnormalities in development and abortion, as frequently seen in bovine pregnancies from in vitro fertilization and cloning procedures. Our findings describing the pattern of cell proliferation and apoptosis in normal bovine pregnancies may be useful for unraveling some of the developmental deviations frequently seen in nature and after in vitro embryo manipulations.

Key-words: Bovine. Placenta. Cell proliferation. Caruncle. Placentome. Apoptosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO GERAL	3
2.1	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	A placenta bovina	4
3.2	Ciclo celular e apoptose	19
3.3	Proliferação celular e apoptose no desenvolvimento placentário	24
3.4	Citometria de fluxo e ciclo celular	29
3.5	Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) e proliferação celular	30
4	MATERIAL E MÉTODO	33
4.1	Material	33
4.1.1	Animais e composição dos grupos	33
4.1.2	Amostras placentárias	33
4.2	Métodos	34
4.2.1	Macroscopia	34
4.2.2	Microscopia de luz	35
4.2.2.1	Coloração: Hematoxilina-Eosina	35
4.2.2.2	Coloração de Prata (AgNORs)	36
4.2.3	Citometria de fluxo – determinação das fases do ciclo celular	36
4.2.4	Análises estatísticas	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Análises macroscópicas	39
5.1.1	Placentônios	39
5.1.2	Microplacentônios	50
5.1.3	Áreas “nuas”	54
5.1.4	Fusão placentomal	58
5.2	Análises microscópicas	67
5.2.1	Análise histológica	67
5.2.2	Expressão de marcador histoquímico de proliferação celular (AgNORs)	92
5.3	Citometria de fluxo – análise das fases do ciclo celular e apoptose	99
6	DISCUSSÃO	105

6.1 Aspectos macroscópicos.....	105
6.2 Aspectos microscópicos.....	110
6.2.1 Expressão de marcador histoquímico de proliferação celular - AgNORs.	113
6.3 Fases do ciclo celular e apoptose.	116
7 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS	122
ANEXOS	140

1 INTRODUÇÃO

O Brasil exporta, atualmente, carne bovina para mais de 100 países, fortalecendo sua posição como o maior exportador mundial de carne. Porém, a atividade apresentou queda em 2009, atribuída, por pesquisadores financeiros da Abiec (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne), à crise financeira mundial. Pela primeira vez, após nove anos de crescimento contínuo, o rebanho bovino brasileiro mostrou queda de 0,6% em 2008. A conclusão é da Pesquisa de Pecuária Municipal, divulgada em abril de 2009, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Porém, mesmo com a queda, o Brasil continua a ser o segundo maior produtor mundial de bovinos, atrás somente da Índia. Nos próximos anos, o consumo mundial de carne deve aumentar, pois há uma tendência mundial, a longo prazo, de aumento da renda “per capita”. Com uma ascensão social para a classe média, há naturalmente uma mudança no padrão de consumo, sendo a principal delas o consumo de alimentos de origem animal. Este fato vem acontecendo nos últimos anos e deve continuar pelos próximos 10-20 anos. Há uma previsão de fortalecimento do Brasil como grande exportador agropecuário na próxima década, mesmo com a incerteza gerada pela crise mundial (estudo realizado pelo Ministério da Agricultura – “Projeções do Agronegócio - Brasil 2008/2009 a 2018/2019”).

A bovinocultura de corte brasileira caracteriza-se pela criação extensiva associada ao baixo uso de insumos. Este fato é consequência da grande abundância de terras em nosso país, as quais foram incorporadas em detrimento da intensificação da produção. Porém, este sistema de criação extensiva levou a uma preocupação ambiental, e esta preocupação com o meio ambiente tem se tornado destaque mundial desde a década de 1990, causando uma diminuição nos investimentos públicos e conduzindo a pecuária a um novo perfil tecnológico com o uso mais intensivo de capital. É neste cenário que a pesquisa vem procurando desenvolver tecnologias relacionadas com a melhoria da produção de carne no Brasil. Atualmente são desenvolvidas diversas pesquisas direcionadas para o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos, tendo como objetivo o maior número de bezerros e um maior peso ao desmame, aumentando, assim, a produção por área. Com a finalidade de aprimorar as técnicas de produção, avanços

tais como a fertilização *in vitro* de embriões (FIV), a produção de animais transgênicos ou clonagem animal por transferência nuclear (TN) estão sendo amplamente utilizadas com propósitos científicos ou comerciais. Entretanto, esta tecnologia está frequentemente associada a anormalidades gestacionais que podem culminar em abortamentos ou anomalias fetais, prolongamento da gestação, menor preparação ao parto e nascimento de bezerros com menor sobrevivência pós-parto. Estas falhas estão relacionadas principalmente com a receptora do embrião e ao desenvolvimento alterado de sua placenta. Com um papel fundamental para o sucesso da gestação, a placenta e seu desenvolvimento têm sido alvos de diversos estudos científicos, visando melhorar a eficiência e os ganhos na produção.

Durante a formação da placenta muitos fatores interagem de maneira precisa para que haja um desenvolvimento placentário normal. O desenvolvimento placentário é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo dependente de um balanço adequado entre a proliferação e a morte celular. Assim sendo, o entendimento da atividade proliferativa e apoptótica é de grande importância para o desenvolvimento, especialmente se este estiver relacionado a perdas embrionárias e anormalidades placentárias. Considerando as diferentes regiões existentes na placenta bovina, diversos padrões de proliferação e morte celular são esperados, com algumas regiões sendo mais ou menos responsáveis pelo desenvolvimento fetal ao longo da gestação. Avaliando as diferentes regiões da placenta bovina esperamos obter atividades celulares distintas, buscando um maior conhecimento da participação em potencial destas regiões na modulação do crescimento e nutrição fetal ao longo da prenhez, tornando possível estabelecer um padrão de normalidade para cada uma delas ao longo da gestação bovina. Estes dados serão de grande importância para auxiliar na compreensão dos mecanismos de falhas gestacionais que levam a anormalidades fetais e placentárias, especialmente àquelas associadas a técnicas de manipulação embrionárias, como a fertilização *in vitro* e a clonagem animal.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo principal avaliar os índices de proliferação celular e apoptose em diferentes regiões placentárias ao longo de gestações bovinas.

2.1 Objetivos Específicos

- 1) Analisar macroscopicamente a placentação do 1° ao 9° mês de gestação, observando a presença de placentônios, microplacentônios ($\leq 1,0\text{cm}$) e fusões placentomais.
- 2) Analisar histologicamente as regiões placentárias ao longo da gestação:
 - Placentônios: área central e área marginal
 - Placentônios fusionados: área de fusão
 - Área interplacentomal
 - Microplacentônios ($\leq 1,0\text{cm}$)
- 3) Analisar a proliferação celular trofoblástica nas diferentes regiões da placenta, através da contagem do número de AgNORs presente nos núcleos celulares.
- 4) Descrever os processos de proliferação e morte celular nas populações trofoblásticas de diferentes regiões da placenta bovina, através da análise das fases do ciclo celular pela técnica de citometria de fluxo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão a seguir são abordados temas referentes à morfologia da placenta bovina, abrangendo aspectos macroscópicos e histológicos, bem como descrições a respeito da atividade proliferativa e renovação celular necessárias para um completo desenvolvimento placentário. Em seguida são abordados ciclo celular e apoptose, além de métodos para marcação da atividade proliferativa celular, como a marcação histoquímica das NORs e a citometria de fluxo, utilizados neste estudo.

3.1 A placenta bovina

A placenta dos mamíferos é um órgão transitório formado pela justaposição das membranas fetais e tecidos maternos, cuja principal função consiste em regular o intercâmbio fisiológico entre o feto e a mãe, sendo o órgão responsável pelas trocas de nutrientes, excreção e respiração do feto durante o período gestacional. A placenta atua também como importante órgão endócrino durante a gestação, sintetizando hormônios como a progesterona, estradiol e lactogênio placentário, influenciando intensamente o metabolismo materno (WOODING; BURTON, 2008). Desde a fertilização, o embrião inicia uma série de processos de divisão e implantação na parede uterina, culminando com a formação da placenta e dos anexos fetais, que são: córion, âmnio, alantóide e saco vitelínico.

O desenvolvimento embrionário ocorre após a fecundação do oócito, iniciando-se o processo de segmentação, isto é, a divisão da célula ovo até a formação de células chamadas blastômeros. Após diversos estágios de divisão, modelação e compactação celular, o embrião caracteriza seu estágio de mórula. Em seguida inicia-se outra fase de divisão, determinando a fase de blastocisto. Enquanto o blastocisto se desenvolve, o embrião se prepara para ser implantado na parede uterina. A fase de blastocisto ocorre quando o embrião desenvolve uma cavidade central repleta de líquido, a blastocela, a qual é revestida por uma camada simples de células, o trofoectoderma. Estas células assumem funções especializadas e são conhecidas como células trofoblásticas, constituindo uma

camada simples celular que recobre a placenta de todas as espécies domésticas. Juntamente com o mesoderma, estas células constituem a camada mais externa da placenta, o córion. Com o avançar do desenvolvimento, uma maior quantidade de fluido é produzido dentro da blastocela, a qual se tornará a cavidade do saco vitelínico. Durante esta fase, há a replicação de outra população de células, para formar o embrião propriamente dito, formando uma massa celular interna, a qual se concentra em um dos pólos do blastocisto. Esta massa celular é o disco embrionário, o qual se tornará o embrião. Outra camada celular (endoderme) cresce a partir desta última (trofoectoderme), revestindo a cavidade do saco vitelino, e uma terceira, a mesoderme, se estenderá a partir do disco embrionário para formar uma camada entre a trofoectoderme e a endoderme. O blastocisto expandido apresenta estas três camadas: trofoectoderme, mesoderme e endoderme. A seguir o embrião alonga-se. O âmnio se formará através do crescimento do ectoderme e mesoderme ao redor do embrião, juntando-se a ele e criando um espaço cheio de fluidos ao seu redor (SCHLAFER, 2000).

O âmnio representa um envoltório que recobre o embrião, repleto de líquido amniótico, rico em albumina, uréia, sais minerais e açúcar (MIES FILHO, 1987). Trata-se de outra camada epitelial, derivada do ectoderme embrionário e possuidora de um mesênquima de sustentação, embora desprovido de veias, sendo um segundo envoltório embrionário/fetal. Esta estrutura tem a função de proteger o embrião contra choques mecânicos (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Quando o embrião torna-se feto, porém antes do fechamento da parede ventral abdominal, forma-se o alantóide. O alantóide é uma estrutura em forma de saco originária do intestino posterior do embrião que se expande e se funde com o córion, formando o corioalantóide. O corioalantóide é altamente vascularizado e sua face externa é recoberta por células do trofoectoderma. Estas células passam a assumir funções especializadas e serão conhecidas, mais tarde, como células trofoblásticas (SCHLAFER et al., 2000).

O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa do intestino médio embrionário, formada por uma camada de epitélio endodérmico seguido de mesênquima fetal vascularizado. Esta estrutura será incorporada ao embrião, dando origem ao intestino primitivo. Nos ruminantes é uma estrutura rudimentar, não participando das trocas entre mãe e feto (LEISER; KAUFMANN, 1994). Nos

mamíferos, regride simultaneamente à evolução embrionária (MIES FILHO, 1987). O saco vitelino é uma estrutura em forma de saco ligada à região ventral do embrião e está presente nos embriões de todos os vertebrados. Sua principal função é armazenar reservas nutritivas (SANTOS; AZOUBEL, 1996), sendo também responsável pela produção de hemácias (CUMANO; GODIN, 2001).

O embrião passará por um processo de implantação, que consiste na união do trofoblasto na parede uterina, contudo, o grau de união entre esses tecidos varia de acordo com as espécies. Da implantação resulta a conexão do conceito ao endométrio materno, levando a um estabelecimento das estruturas placentárias. O processo de implantação se inicia quando o blastocisto assume uma posição fixa no útero e inicia uma interação fisiológica com o epitélio uterino. O conceito normalmente se fixa próximo à metade do corno ipsilateral ao corpo lúteo, enquanto o córion continua a alongar-se até ocupar toda a extensão do lúmen uterino (KING et al., 1982). De acordo com Guillomot et al. (1981) são descritos três estágios no processo de implantação dos ruminantes: 1) pré-adesão - período no qual o conceito se alonga consideravelmente; 2) aposição – estabilização dos contatos celulares entre a camada trofoblástica fetal e o epitélio uterino materno; 3) adesão – formação da estrutura celular da placenta epiteliocorial. Na espécie bovina este processo inicia-se entre os dias 28-32 de gestação, finalizando-se entre 40-45 dias (NODEN; LAHUNTA, 1985) ou, segundo Roberts (1986), do primeiro ao quarto mês de gestação. Esta fase precede a placentação, que consiste na justaposição das vilosidades do córion fetal (ou porção fetal da placenta), com as criptas da mucosa uterina.

Na placentação dos ruminantes ocorre uma adesão generalizada do córion com o epitélio uterino e modificações nas interfaces carunculares e cotiledonares para formar os placentônios. O córion invade o corpo uterino e seus cornos, acompanhando seu formato. A face externa do córion relaciona-se com a mucosa uterina formando a placenta (KING; ATKINSON, 1987). A placenta é o único canal existente para o transporte de nutrientes para o conceito e a demanda desta estrutura aumenta exponencialmente até o momento do nascimento, aliado a uma grande modificação em sua estrutura (WOODING; FLINT, 1994).

As placentas são classificadas em diversos critérios, os quais podem ser de acordo com o tipo de contato, membranas extra-embrionárias participantes,

implantação, conexões coriônicas e combinação de tecidos maternos e fetais (BANKS, 1992). Ou ainda segundo Leiser e Kaufmann (1994), conforme o tipo de membrana placentária, formato da placenta, a interdigitação materno-fetal e a separação placentária ao nascimento.

De acordo com o número de membranas envolvidas entre a mãe e o embrião, ou seja, o arranjo das membranas fetais, as placentas são classificadas em: coriônica – o cório não está em contato com outra membrana (fases iniciais da placentação), corioamniótica – o córion está em contato com o âmnio (mulher, preguiça e início da placentação de ruminantes e suínos), corioalantóide – cório em contato com o alantóide (maioria dos mamíferos) e coriovitelínica – córion em contato com o saco vitelínico (cadela e roedores) (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Hafez (1954) classificou as placentas dos mamíferos levando em consideração a distribuição e formação dos vilos coriônicos, ou seja, de acordo com o formato da área de junção materno-fetal. O autor descreve a distribuição e a formação dos vilos coriônicos da seguinte forma: placenta difusa, onde os vilos coriônicos estão distribuídos uniformemente sobre toda a superfície do córion (suínos, eqüinos, golfinhos e primatas); placenta cotiledonária ou múltipla, nas quais os vilos são restritos a certas áreas, chamadas cotilédones (ruminantes); placenta zonária (carnívoros) e placenta discoidal (primatas), nas quais a relação materno-fetal se faz em uma faixa ou disco, respectivamente.

A placenta de ruminantes é caracterizada como cotiledonária, devido à presença de cotilédones fetais. Estes, se conectam às carúnculas endometriais, que são espessamentos da parede uterina presentes mesmo em vacas não gestantes. Durante a gestação, estas carúnculas formam conexões com a proliferação do córion, através da penetração das vilosidades coriônicas nas profundas criptas carunculares. Os vilos coriônicos formam os cotilédones, unidade fetal que, junto com as carúnculas, formam as unidades funcionais da placenta de ruminantes, o placentônio. Estes variam em número nas diferentes espécies de ruminantes, sendo de 70 a 142 na vaca (PINTO, 2002).

De acordo com as camadas componentes da membrana inter-hemática (ou barreira materno-fetal), as placentas podem ser classificadas em: epiteliocorial – trofoblasto em contato com o epitélio uterino; endoteliocorial – trofoblasto em contato com o endotélio dos vasos maternos; hemocorial – trofoblasto em contato direto com

o sangue materno (WOODING; FLINT, 1994). Kaufmann e Burton (1994) classificaram a placenta dos ruminantes como epiteliocorial, porém, Leiser et al. (1998) afirmam que a placenta dos ruminantes constitui um subtipo de placenta epiteliocorial, denominada placenta sinepiteliocorial, pois células binucleadas pertencentes ao epitélio trofoblástico migram em direção ao epitélio uterino e se fundem às suas células epiteliais carunculares, originando um sincício materno-fetal. Este sincício está em contato com o trofoblasto (córion), portanto, classificada como sinepiteliocorial.

As placentas também podem ser classificadas quanto ao modelo de interdigitação, ou seja, como estão dispostos geometricamente os tecidos maternos e fetais. De acordo com este critério, as placentas podem ser classificadas em: pregueada (suínos), vilosa (ruminantes, humano), labiríntica (roedores) e lamelar (carnívoros e primatas). Os ruminantes apresentam o tipo viloso, pois o córion forma vilos em forma de árvores que se encaixam perfeitamente ao tecido materno correspondente, as criptas, formadas de tecido endometrial intacto (BANKS, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994).

Outro tipo de classificação placentária diz respeito ao modelo de fluxo sanguíneo materno-fetal, as quais incluem: corrente cruzada (carnívoros), multivilosa (ruminante e mulher) e contra-corrente (roedores). Os ruminantes estão situados entre o fluxo contra-corrente e multiviloso (DANTZER et al., 1988).

Deste modo, a placenta bovina é do tipo cotiledonária, por apresentar áreas restritas de contato materno-fetal, os cotilédones, formando projeções vilosas que se interdigitam com as criptas carunculares maternas (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFMANN, 1994; WOODING; FLINT, 1994); corioalantóica, devido à fusão do córion com o alantóide, os quais, juntos com o âmnio, constituem as membranas extra-embrionárias fetais; sinepiteliocorial, devido a migração das células binucleadas do trofoblasto para o epitélio uterino, formando de um sincício materno-fetal em contato com o córion; e vilosa, devido a formação de árvores vilosas nos cotilédones fetais.

Figura 1 – Fotografia macroscópica e representação esquemática de placenta e feto bovino com 70 dias de gestação, onde se observa o feto envolto pelo líquido amniótico e os anexos fetais, evidenciando os cotilédones presentes na membrana corioalantoideana. (Adaptado de Schlafer et al., 2000)

O período gestacional varia de acordo com a espécie animal e dentro da espécie, variam com a raça, número de crias, sexo, sazonalidade, nutrição e posição geográfica (MIES FILHO, 1987). As vacas apresentam período gestacional variando entre 270 a 290 dias. O período de gestação se divide em duas fases, a embrionária, mais curta e caracterizada por ativa diferenciação celular (45 dias na vaca) e a fase fetal, na qual predomina o crescimento do feto (HAFEZ, 2004).

Durante a gestação, o útero gravídico deve estar preparado para hospedar o conceito, portanto, o endométrio possui papel central, uma vez que é a membrana mucosa que reveste o útero gravídico. As carúnculas endometriais são características das placentas dos ruminantes. O endométrio dos ruminantes é composto de carúnculas uterinas e áreas intercarunculares, nas quais se abrem glândulas uterinas. As carúnculas são espessamentos do tecido sub-epitelial do útero, presentes mesmo em vacas não gestantes. Estas regiões são áreas especializadas de endométrio ausente de glândulas uterinas, além de possuírem uma organização vascular completamente diferente da observada em áreas glandulares (WOODING; MORGAN; ADAM, 1997; KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982). Durante a gestação, as carúnculas se conectam com as proliferações do córion, os cotilédones (MARSHALL, 1952). Nas vacas, as carúnculas são convexas, apresentando aspecto liso no início da gestação, enquanto, da metade para o final da gestação, apresentam aspecto esponjoso devido às criptas (RAM; CHANDRA, 1984).

Na vaca, os cotilédones possuem forma ovóide, com enormes “tufos” de vilos oriundos do córion fetal. Eles são muito ramificados e se adaptam nas criptas carunculares de tamanhos correspondentes, onde o total de agregação das criptas para recepção dos vilos de um único cotilédone termina nas criptas maternas (DRIEUX; THIÉRY, 1951).

Durante a prenhez, a vascularização dos cotilédones e carúnculas e também das áreas intercotiledonárias se intensifica, sendo que nos estágios precoces de prenhez não há contato próximo entre as membranas fetais e cotilédones maternos. Mas com o avanço da prenhez, os vilos aparecem na superfície da membrana coriônica e posteriormente os cotilédones fetais estão visivelmente arranjados em fileiras (HAFEZ, 1954). O mesênquima que preenche as vilosidades coriônicas origina os vasos sanguíneos do embrião, os quais se comunicam com ele através do cordão umbilical, já que a placenta é um órgão extra-embriônico (WOLF et al., 2003).

Embora o útero da vaca apresente a formação de carúnculas, é importante ressaltar que nem todas formam placentônios durante a gestação. Mesmo que haja um pequeno número de carúnculas, ela é compensada pelo aumento do tamanho

dos placentônios existentes, possibilitando a eficiência na troca de nutrientes (HANADECKY et al., 1988).

A placenta dos ruminantes apresenta duas regiões principais, a região interplacentomal, área lisa da placenta, desprovida de placentônios, envolvida na transferência histiotrófica de nutrientes, e os placentônios, unidade funcional da placenta, responsável pela troca hemotrófica de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (SCHLAFFER et al., 2000). Nas áreas interplacentomais, há uma simples aposição entre as membranas fetais e o epitélio uterino, porém, nos placentônios a face endometrial apresenta profundas criptas carunculares, as quais são penetradas por longos vilos cotiledonários de corioalantóide feral (DAVIES et al., 2000). Estas conexões entre vilosidades fetais e criptas uterinas são intensamente ramificadas, o que aumenta consideravelmente a área de contato entre mãe e feto.

A região intercaruncular é macroscopicamente pregueada e histologicamente possui epitélio simples prismático e lâmina própria. Durante a implantação há o desenvolvimento de papilas trofoblásticas nas áreas em que o conceito se aproxima da abertura das glândulas uterinas, situadas nestas regiões. Nestas regiões, denominadas aréolas, o epitélio uterino não está em contato com o epitélio trofoblástico. O contato destas papilas com o lúmen glandular permite a absorção de proteínas e outras substâncias pelas aréolas placentárias, estruturas absorptivas especializadas da região intercaruncular. Nas aréolas também ocorre a fagocitose de leite uterino pelas células trofoblásticas, o qual constitui-se importante fonte de nutrição para o feto (AMOROSO, 1952; HOYES, 1972; MOSSMAN, 1987; KATHIRESAN et al., 1992; ZELLER; KUHN, 1994; GRAY et al., 2001; DANTZER, 2002).

Figura 2 – Representação esquemática das regiões principais da placenta dos ruminantes (Adaptado de Davies et al., 2000)

A formação do placentônio inicia-se com o crescimento do trofoblasto e a formação das vilosidades coriônicas, que são depois preenchidas por mesênquima vascular. As vilosidades fetais começam a preencher as depressões carunculares (criptas uterinas) e com este crescimento o trofoblasto se torna arranjado como “árvores”, as quais se ramificam com o avançar da gestação. Em bovinos os placentônios estão dispostos em quatro fileiras, acompanhando o arranjo nas carúnculas uterinas: quatro fileiras no corpo do útero, três no centro e dois na extremidade dos cornos uterinos. O tamanho dos placentônios depende do estágio de prenhez, ocorrendo um aumento deste tamanho com o decorrer da gestação. Este crescimento é intenso durante a primeira metade da gestação, tanto em peso e altura como em diâmetro (BJÖRKMAN, 1954).

Na vaca os placentônios desenvolvem-se ao redor do feto e progridem em direção ao limite distal do corioalantóide no corno vazio. Durante a gestação estes placentônios aumentam em diversas vezes seu diâmetro original. São inicialmente discóides adquirindo posteriormente a forma de um cogumelo, pediculado, medindo de 2 a 3 cm de comprimento, com maior desenvolvimento na parte central do corno gestante (LATSHAW, 1987).

Miglino (1991) observou que em *Bos taurus* os cotilédones se distribuem de forma linear em duas fileiras de cada lado da implantação do pedículo umbilical no hilo da placenta. A partir do terceiro mês de gestação há um aumento do número médio de cotilédones, e o corno gestante apresenta um número maior de cotilédones em 97,5% dos casos estudados.

Na placenta bovina, o formato dos placentônios pode ser circular, elíptico ou quadrangular, sendo a maioria ovóide e, em alguns casos, há fusão de placentônios vizinhos em diversos graus (MIGLINO, 1991). Assim como seu formato, o número de placentônios também é variável, sendo sempre o número do corno gestante maior que o do corno não gestante, às vezes até 150% a mais (MARSHALL, 1952). Em placenta de *Bos taurus*, a média de placentônios por placenta é de 88 - com mínimo de 54 e máximo de 147, sendo que desse total, 65 foram encontrados no corno gestante e 27 no corno não-gestante (MIGLINO, 1991).

Figura 3 – Classificação morfológica do formato dos placentônios bovinos proposta por Bertolini et al. (2006). (A) côncavo, (B) achatado, (C) elíptico, e (D) convexo; Barras: 5 cm

Analisando microscopicamente a placenta bovina, observa-se que o epitélio trofoblástico é constituído por dois tipos celulares distintos: as células trofoblásticas mononucleadas e as células trofoblásticas gigantes, podendo estas ser binucleadas ou possuírem apenas um núcleo gigante. Ambos os tipos celulares estão presentes nas regiões placentomais e interplacentomais, sendo as células binucleadas

distribuídas aleatoriamente ao longo do epitélio trofoblástico (WOODING, 1984). Na base do vilo coriônico principal, o trofoblasto pode ser pseudoestratificado, especialmente onde ele se conecta com o septo materno (SHARMA et al., 1983).

As células trofoblásticas mononucleadas são células cubóides ou colunares com características típicas de células epiteliais. Elas estão localizadas na lâmina basal e estão conectadas umas as outras por complexos juncionais (DENT, 1973; WOODING et al., 1994). Estas células constituem aproximadamente 80% da população trofoblástica (BOSHIER; HOLLOWAY, 1977). No ápice destas células sua membrana é formada por processos microvilosos que se interdigitam com processos similares presentes nas células epiteliais uterinas, formando a zona de contato materno-fetal (BJÖRKMAN, 1969; DENT, 1973).

As células trofoblásticas gigantes são em sua maioria binucleadas e não apresentam características morfológicas de células epiteliais, representando aproximadamente de 15 a 20% das células do epitélio trofoblástico em ruminantes (WOODING; WATHES, 1980; WOODING, 1982). Acredita-se que essas células são originárias de células trofoblásticas mononucleadas através de um processo de mitose acitocinética, ou seja, por uma seqüência de mitoses com duplicação cromossômica e cariocinese (divisão nuclear), porém sem citocinese correspondente (divisão citoplasmática), ou seja, os cromossomos e os núcleos estão duplicados, mas o citoplasma não se divide (KLISH et al., 1999). Durante os primeiros estágios de seu desenvolvimento, as células binucleadas são aleatoriamente posicionadas de forma mais profunda no trofoectoderma em uma posição intraepitelial, portanto, estas células não fazem contato com a membrana basal ou com o ápice microvilar do trofoectoderma (WOODING, 1984; WANGO et al., 1990).

As células binucleadas migram rotineiramente do epitélio trofoblástico e se fundem com células colunares do epitélio uterino, formando temporariamente células híbridas trinucleadas (WOODING, 1984; 1992; WANGO et al., 1990). Este mecanismo é importante para que ocorra o transporte e liberação dos seus grânulos no compartimento materno. Estes grânulos contêm hormônios, como o lactogênio placentário (ANTONY et al., 1995), estradiol (METAMOROS et al., 1994) e progesterona (REIMERS et al., 1985; WANGO et al., 1991), além de fatores de

crescimento associados ao desenvolvimento fetal e manutenção da gestação (SCHLAFFER et al., 2000).

Figura 4 – Representação esquemática da migração das células trofoblásticas gigantes (CTG) binucleadas do córion fetal para o endométrio, sua fusão com uma célula epitelial materna, tornando-se trinucleada e posterior liberação de seus grânulos na corrente sanguínea materna

A migração de células binucleadas e a formação de células gigantes ou multinucleadas são acompanhadas da degeneração de células epiteliais maternas mortas possivelmente devido à alteração de seu ambiente local e não por efeito citolítico das binucleadas. As células mortas são subsequentemente removidas do epitélio por fagocitose (KING; ATCKINSON; ROBERTSON, 1982). Morgan et al. (1989) demonstraram, através de métodos citoquímicos, a existência de 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. Gross et al. (1991) sugerem o envolvimento das células binucleadas na liberação placentária. Estas células decrescem em número e viabilidade no momento do parto, fato este que pode estar relacionado à completa expulsão da placenta, mediada pela ação de prostaglandinas e glicocorticóides.

Santos et al. (1996) estimaram a proporção volumétrica de tecido materno e fetal no placentônio de vacas leiteiras, contemplando vacas com e sem retenção placentária. A proporção de células binucleadas era muito superior nas vacas que apresentavam retenção placentária, indicando que estas células estão possivelmente envolvidas com o mecanismo que determina este processo em vacas leiteiras.

Mallard et al. (1996) também estudaram a proporção volumétrica dos componentes estruturais placentários de vacas zebus ao longo da gestação e observaram um aumento relativo do epitélio trofoblástico e uma diminuição dos componentes estruturais maternos ao longo da gestação, os quais relacionaram com as mudanças morfológicas importantes voltadas para a maturação do placentônio e que, possivelmente, influenciam o processo de liberação normal da placenta.

As células trofoblásticas mononucleadas estão envolvidas na fagocitose de macromoléculas, especialmente hemácias. A fagocitose de hemácias pelo trofoblasto ocorre quando há uma área hemófaga no placentônio, levando as células trofoblásticas a fagocitarem as hemácias maternas extravasadas. Este processo é denominado eritrofagocitose e ocorre na zona arcada do placentônio, região correspondente à base dos vilos coriônicos e ao topo das criptas uterinas, onde há o contato entre ambos (PEREIRA et al., 2001). De acordo com Cazerta et al. (2007) a zona arcada da placenta de vacas possui um epitélio modificado, devido a presença de eritrócitos fagocitados dentro das células epiteliais trofoblásticas e, ainda, muitas vesículas lipídicas e pigmentos hematógenos. Estas estruturas também foram encontradas por Murai e Yamauchi (1986); Mossman (1987); Wimsatt (1980); Myagkaya et al. (1979); Leiser e Egloff (1990); Dantzer (1999) em *Bos taurus*, e em búfalos por Pereira (2004).

Vários autores sugerem que as áreas hemófagas ou “hematomas” placentários possuem a importante função de transferência de ferro da mãe para o feto (WIMSATT, 1950; MURAI; YAMAUCHI, 1986; LATSHAW, 1987; MOSSMAN,

1987; SANTOS et al., 1996; PEREIRA, 2004). Enriquez-Yap (1974) e Wimsatt (1980) afirmaram que na placenta de ruminantes as células epiteliais trofoblásticas mononucleadas e binucleadas participam do processo de fagocitose de eritrócitos extravasados. Porém, Santos et al. (1996); Pereira et al. (2004) e Cazerta et al. (2007) demonstraram que somente as células trofoblásticas mononucleadas participam da fagocitose de eritrócitos em placentas de vacas zebu. Leiser e Enders (1980) descreveram hematomas na zona extravasada na placenta bovina, onde inclui áreas juncionais paraplacentárias e hematomas marginais, onde o epitélio uterino torna-se altamente proliferativo, especialmente nas pregas ou protusões.

Em vacas o extravasamento sanguíneo ocorre a partir de 76 dias de prenhez e pode ser visto em áreas nas bases dos vilos – a zona arcada do placentônio. Este acúmulo é resultante da destruição do tecido uterino no topo dos septos maternos, sendo encontrado ocasionalmente em vacas. O sangue extravasado segue em direção ao espaço entre as camadas placentárias maternas e fetais, logo, o extravasamento é dentro da cavidade uterina (LEISER; ENDERS, 1980).

Durante a gestação é possível observar na placenta de bovinos a fusão de carúnculas uterinas vizinhas. Os primeiros relatos da presença de fusões carunculares datam de 1966 por Zieger e Zschiesche, mas ainda hoje a literatura sobre este assunto é escassa. Diversos graus de fusão de placentônios foram macroscopicamente observados por Miglino (1991); Carambula et al. (1996) e Feitosa Junior (1997). Segundo Pereira et al. (2006) a maioria das fusões se encontra na linha antimesometrial na região média do corno uterino, variando em tamanho e número em todas as fases gestacionais. Os placentônios fusionados apresentam formatos variados, de lobulados a ovais, sendo a presença de uma fissura fusional facilmente visível macroscopicamente antes da desconexão cotilédone-carúncula (PEREIRA et al., 2006). Os mesmos autores ainda observaram que as fissuras podem ser únicas ou em par, de um lado a outro ou do centro para a periferia, sempre se dirigindo da superfície em direção ao pedúnculo caruncular. A presença de fusões placentomais também foi observada por Miglino et al. (2007) na placenta de bovinos clonados a termo. Estes autores observaram um elevado número de fusões, resultando em um aumento no tamanho dos placentônios e uma diminuição no número destes nas placentas de clones.

Além da presença de fusões carunculares, é possível observar também na placenta bovina a presença de microplacentônios na área intercaruncular, de diâmetro menor ou igual a 1,0cm (SANTOS et al., 2006), porém pouco se sabe a respeito da função ou atividade celular destas estruturas.

3.2 Ciclo celular e apoptose

O desenvolvimento de uma única célula-ovo fertilizada para formar um organismo multicelular complexo envolve replicação celular, crescimento e especialização progressiva para várias funções (diferenciação). Exceto nos gametas, a replicação celular é conhecida como mitose. O intervalo entre as divisões mitóticas, as quais originam duas células-filhas idênticas é denominado ciclo celular. A divisão e a diferenciação celulares são proporcionais à morte celular ou apoptose, tanto durante o desenvolvimento e crescimento do organismo imaturo quanto no adulto. O ciclo celular divide-se basicamente numa fase mitótica relativamente curta (fase M) e uma de não-divisão (interfase), a qual ocupa maior parte do ciclo. Há ainda um período discreto durante a interfase, quando há replicação de DNA (fase S, ou de síntese), que ocorre antes do início da mitose. A interfase apresenta três fases distintas: a fase G1, mais longa, entre o final da fase M e o início da fase S, onde as células diferenciam-se; a fase G2, entre o final da fase S e o início da fase M, mais curta, onde as células se preparam para a mitose; e a fase G0, para algumas células que deixam o ciclo após a fase M, entretanto num estado de função diferenciada contínua. Cada uma das fases do ciclo leva várias horas para ser concluída, mas apresenta duração relativamente constante (S, G, M); a fase G1 é variável, e a G0 pode durar pela vida toda (YONG; HEATH, 2001).

Figura 5 – Diagrama representativo das fases do ciclo celular em células ativas. Células que não estão em divisão ou que não se dividem, como os neurônios, deixam o ciclo celular e entram na fase G₀ (estado quiescente). Outras células, como os linfócitos, retornam ao ciclo (Fonte: W. B. SANDERS COMPANY, 2002)

Quando não estão em ciclo celular, as células podem estar em um processo fisiológico de morte. A morte celular é um processo tecidual comum, sendo de grande importância para a renovação celular de um tecido, ou como parte do desenvolvimento embrionário normal, podendo também ocorrer em condições patológicas. A apoptose é uma forma de morte celular programada, importante no controle da população celular de um tecido. O conceito de apoptose surgiu na

Austrália em 1971, sendo descrita por Kerr et al. (1972), os quais detectaram alterações morfológicas em células sofrendo desintegração celular e digestão macrofágica das pequenas vesículas resultantes. As células desintegradas tinham aspecto de folhas caídas ao redor de uma árvore, sendo a partir daí adotado o nome grego “apoptosis” para descrever o processo de morte celular, geneticamente determinado, que desempenha um papel crucial na homeostase tecidual, como contrabalanço para a proliferação celular (MARGARETH, WINKERFORD, WALKER, 1997). A apoptose é caracterizada pela condensação e fragmentação nuclear, alterações da membrana plasmática e condensação do citoplasma, com a preservação da integridade das organelas (KERR et al., 1972), e pode estar presente em condições fisiológicas e patológicas.

A apoptose difere da necrose tecidual em diversos aspectos, a qual é sempre um processo patológico e desordenado de morte celular, causado por fatores que levam a uma lesão celular irreversível. A necrose celular ou morte acidental é uma morte passiva (BOOBIS et al., 1989), causada por um extremo trauma ou injúria (KERR et al., 1972), além de apresentar reação inflamatória, caracterizada pela inabilidade das células em produzir ATP necessário para manter a homeostasia tissular. O processo apoptótico requer energia, ao contrário do processo necrótico. A necrose sempre causa dano, ao contrário da apoptose que pode ser um processo útil ou danoso, dependendo das circunstâncias (TRUMP; GINN, 1969). Os mecanismos regulatórios que desencadeiam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular e o sinal para o suicídio freqüentemente provém do exterior, por meio de receptores de superfície (LEHNINGER et al., 2002).

Diversos fatores podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis elevados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTHENER, 2000). Os principais efetores da apoptose são uma família de proteases chamada caspases (RENEHAN et al., 2001).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de

membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação promove o recrutamento da caspase-8, que irá ativar a caspase-3, executando a morte celular por apoptose (BUDIHARDJO et al., 1999). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a deprivação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Esta organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas (Bax) nela presentes (DESAGHER; MARTINOU, 2000). Os diferentes sinais indutores da apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra a liberação do citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (Smac/DIABLO) (GUPTA et al., 2003). No citoplasma, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 (fator de ativação de protease associada a apoptose) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (BUDIHARJO et al., 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3, que vai ocasionar a apoptose (PETROS et al., 2004; RUPNARAIN et al., 2004).

Figura 6 – Esquema do processo de ativação da apoptose pelas vias extrínseca (via dos receptores de morte celular) e intrínseca (via mitocondrial) (Adaptado de http://www.imgenex.com/emarketing/103006_lymphoma/apoptosis-pathway.jpg)

Proteínas pró-apoptóticas como o Bax, que têm como alvo as membranas mitocondriais, podem induzir dano e apoptose mesmo quando as caspases são inativadas (XIANG et al., 1996), sugerindo que há um mecanismo caspase-independente para a morte celular programada e envolvendo a mitocôndria.

3.3 Proliferação celular e apoptose no desenvolvimento placentário

O período gestacional pode ser dividido em fase embrionária e fase fetal, baseado no padrão de crescimento e desenvolvimento do conceito (MÉNÉZO, RENARD, 1993; FARIN et al., 2006). A fase embrionária é um período de diferenciação e se inicia imediatamente após a concepção e segue até que a organogênese se complete. Durante esta fase ocorre a pré-implantação (dias 1 a 18 em bovinos), a implantação do embrião na mucosa uterina e a placentação, na qual a maioria dos tecidos, órgãos, sistemas e membranas extra-embrionárias são formados (dias 18 a 42 em bovinos) (SLOSS; DUFTY, 1980; GUILLOMOT et al., 1993; LEISER; KAUFMANN, 1994; DANTZER, 1999; SCHLAFER et al., 2000). Nos bovinos a fase fetal se inicia a partir do dia 42 de prenhez, período no qual ocorre um rápido crescimento do conceito e mudanças em sua conformação. Enquanto os placentônios se desenvolvem e aumentam de tamanho para acompanhar o crescimento fetal, o tamanho dos órgãos e o peso do feto mudam consideravelmente durante este período (ELEY et al., 1978; PRIOR; LASTER, 1979). O crescimento placentário é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo totalmente dependente de um balanço adequado entre proliferação, diferenciação e morte celular (HALE et al., 1996).

Na formação da placenta dos mamíferos, diversos fatores interagem de forma precisa para que ocorra um desenvolvimento normal. Nos bovinos, o útero aumenta consideravelmente de tamanho para acomodar o feto, porém o tamanho do útero não influencia o tamanho fetal (PRIOR; LASTER, 1979). Contudo, o ambiente uterino materno influencia o crescimento fetal e estas influências são mediadas, em parte, pelo crescimento e maturação dos tecidos carunculares (FERREL, 1991). A alta porcentagem de células em proliferação indica sua contribuição à nutrição fetal (BJÖRKMAN, 1969).

No início da gestação, as carúnculas e cotilédones ainda não estão conectados, portanto, não estão formados os placentônios (BJORKMAN, 1954; LEISER; WILLE, 1975; LEISER; KAUFMANN, 1994). A formação do placentônio pode ser considerada um processo gradual que se inicia imediatamente após o reconhecimento materno da prenhez, sendo concluída até o final da organogênese

(BERTOLINI et al., 2007). Após sua formação, os placentônios bovinos crescem progressivamente ao longo da gestação. Porém, o crescimento placentomal varia consideravelmente durante o curso da prenhez. Após uma fase de crescimento acelerado, com alto ganho de peso entre os dias 100-160, o peso do placentônio aumenta de forma crescente até aproximadamente 200 dias de prenhez. Após esta fase o crescimento placentomal diminui progressivamente (REYNOLDS et al., 1990), sendo mínimo no final da gestação (BJORKMAN, 1954).

Diferentemente das outras espécies de ruminantes, nos bovinos a formação de um grande sincício materno-fetal originário da atividade invasiva das células trofoblásticas gigantes se inicia imediatamente após a implantação. Estágios avançados da gestação são caracterizados pela formação de células híbridas trinucleadas, derivadas da fusão de uma célula trofoblástica gigante com uma célula do epitélio caruncular (WOODING; WATHES, 1980; WOODING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994). No último mês de gestação ocorrem mudanças na microestrutura placentomal. As células cuboidais do epitélio caruncular começam progressivamente a ficar achatadas ao redor do dia 260 de prenhez, até desaparecerem completamente. Consequentemente, nos placentônios de vacas que acabaram de parir a maior parte do trofoblasto está em contato direto com o estroma do septo materno (WOICKE et al., 1986; SCHOON, 1989). Além disso, é observada uma grande diminuição no número e na viabilidade das células trofoblásticas gigantes (GROSS et al., 1991).

A diminuição da taxa de crescimento da placenta próximo ao nascimento foi observada anteriormente em bovinos (FERREL et al., 1976), e a evidência do declínio da taxa de crescimento no final da gestação foi relatada em ovelhas e também na mulher (RATTRAY et al., 1974). Talvez o crescimento do feto próximo ao nascimento exceda a capacidade placentária e materna em manter uma elevada taxa de crescimento fetal. Portanto, um aumento da produção de hormônios pelo feto e/ou pela placenta (estrogênio, corticóides) devem favorecer uma diminuição da taxa de crescimento fetal (ELEY et al., 1978).

O processo de maturação da placenta bovina é caracterizado por alterações histológicas no epitélio das criptas maternas. A altura e número destas células diminuem, achatam e alargam estabelecendo maior contato com as células do epitélio do trofoblasto, além de haver um aumento da proporção de tecido conectivo materno. A maturação da placenta pela regressão das células epiteliais maternas

resulta no afinamento e desnudamento das criptas uterinas, além de diminuir a distância entre o sangue materno e fetal, mecanismo que a placenta encontra para atender à crescente demanda do feto nos últimos meses de gestação. A apoptose reflete o início desta regeneração tecidual e a contínua nutrição histiotrófica do feto, a qual consiste na fagocitose de células epiteliais maternas apoptóticas. Estas características são consideradas parte do processo de maturação placentária, o qual também é um pré-requisito para a desconexão materno-fetal e liberação das membranas fetais após o parto. Desta forma, a apoptose em células das criptas do epitélio materno e em menor proporção em epitélio do trofoblasto é detectada durante toda a gestação no placentônio, refletindo a renovação normal e a necessidade da apoptose para a hemostasia placentária (BOOS et al., 2003).

Boos et al. (2003) relatam ainda que a apoptose é um processo que leva de minutos a horas e uma vez terminado, o corpo apoptótico resultante é rapidamente fagocitado pelos macrófagos presentes nos placentônios. Straszewski-Chavez et al. (2005) relatam que em humanos o processo de apoptose também ocorre com a rápida fagocitose dos corpos apoptóticos, e que este é importante para a modulação da invasão do trofoblasto e modelação das artérias em espirais.

Estudos morfológicos demonstraram que a maturação placentária está relacionada com a diminuição da população celular dos tecidos fetal e maternos no placentônio (BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993; MALLARD et al., 1996; MARQUES JUNIOR, 1988; SANTOS et al., 1997). A apoptose é um evento fisiológico ativo que parece ser requerido tanto para a maturação quanto para a liberação normal da placenta após o parto (NUNES et al., 2001).

Os corpos apoptóticos formados durante a gestação são em grande parte fagocitados por macrófagos presentes no parênquima das carúnculas bovinas. Os macrófagos estão presentes no parênquima das carúnculas durante toda a gestação, sendo encontrados no septo principal e nos secundários. A partir do 6º ao 7º mês de gestação, o número de macrófagos aumenta até atingir a quantidade da hora do parto. A função destes macrófagos parece ser de digerir e modelar os componentes do estroma materno com objetivo de manter o tamanho e formato de cada carúncula. Esse processo ocorre durante toda a gestação, diminuindo a fixação do tecido fetal no materno ao final da gestação para liberação das membranas fetais após o parto. Mesmo após o parto, grande atividade fagocitária dos macrófagos é observada (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

A retenção das membranas fetais é um grande problema na ginecologia bovina, causando problemas reprodutivos e aumentando o custo de produção. A morfologia dos placentônios provenientes de retenção de membranas fetais pode estar associada à maturação insuficiente, ou seja, redução insuficiente no número de células do epitélio das criptas maternas durante o período do pré-parto (BOOS et al., 2003).

Miyoshi e Sawamukai (2004) observaram menor atividade dos macrófagos em placentas provenientes de gestações em que ocorreu retenção das membranas fetais, sugerindo ser mais uma causa do que consequência da retenção placentária, uma vez que isto foi observado antes do parto.

Liu et al. (2003), utilizaram a técnica de TUNEL para avaliar apoptose em placenta de coelhas tratadas ou não com IFN- γ , e anticorpos monoclonais contra BAX, BCL-2 e caspase-3 para imunohistoquímica e “western blotting”. Esses autores demonstraram que a apoptose ocorre na gestação controle, como citado em humano, e resulta em afinamento do trofoblasto que é importante para a difusão passiva, sendo uma resposta adaptativa positiva. Os resultados de Liu et al. (2003) são semelhantes ao de Falco et al. (2001) onde a expressão de BCL-2 na placenta humana encontra-se baixa durante toda a gestação e a expressão de BAX encontra-se mais alta, ambas aumentado progressivamente no decorrer da gestação. A expressão das duas proteínas BAX e BCL-2 individualmente não apresentaram diferença entre o grupo tratado e controle, mas a relação BAX:BCL-2 apresentou diferença, sugerindo que a relação entre as duas proteínas é importante para a determinação da apoptose (LIU et al., 2003).

Liu et al. (2003) relataram ainda que a caspase-3 localizou-se no sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto, mostrando aumento da sua marcação ao decorrer da gestação, sendo mais expresso no grupo tratado com IFN- γ do que no controle. Assim como a disfunção na frequência de apoptose pode gerar distocias, aborto e retenção placentária, a diminuição ou ausência da atividade digestiva dos macrófagos presentes no estroma materno pode estar relacionada com a ausência de regressão das estruturas carunculares, as quais se mantêm intactas, impedindo a desconexão do cotilédone (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

Bjorkman (1969), estudando a apoptose na placenta bovina, observou que as células apoptóticas aumentam do primeiro para o terceiro trimestre. A média de

células e corpos apoptóticos no epitélio materno foi significativamente menor em todos os estágios gestacionais, exceto no último mês. No estroma materno apenas algumas poucas células foram detectadas, sendo que a maioria dos placentônios não apresentou apoptose no estroma. Nestes, a apoptose foi crescente com o decorrer da gestação, principalmente nos dois terços finais. Nos demais grupos houve diferenças entre o primeiro e último terço. Os processos de proliferação e apoptose foram inversamente proporcionais durante a prenhez e próximo ao parto. A proliferação diminui à medida que a apoptose aumenta, sendo mais evidente no epitélio materno. O mesmo autor relata que o compartimento materno apresenta maior capacidade de crescimento do que o fetal. A capacidade de proliferação das células do estroma, entretanto, é relativamente baixa, sendo que o aumento do tecido conjuntivo provavelmente se deva a produção de fibras conjuntivas (BOSS; STELLJES, 2000). Há estudos sugestivos do envolvimento deste tecido na separação no momento pré-parto (SOBIRAJ, 1992).

A alta porcentagem de células em proliferação indica sua contribuição à nutrição fetal (BJÖRKMAN, 1969). Baseia-se na observação de corpúsculos apoptóticos, freqüentemente encontrados entre os epitélios materno e fetal e em maiores taxas no epitélio fetal, relacionados à fagocitose no lado fetal. As células achatadas do epitélio materno, presentes ao final da gestação e positivas quanto à proliferação, sugerem que a mudança no peso celular pode ser consequência de uma alteração nas necessidades metabólicas (STALLMACH et al., 2001).

Maruo et al. (2000) estudaram a regulação da proliferação e da apoptose em placentas humanas, através da expressão de PCNA e ISEL, para detecção da proliferação e fragmentação de DNA, respectivamente. Ambos foram expressos nos citotrofoblastos, sendo mais abundantes no início da placentação, menos abundantes no segundo terço gestacional e menos ainda na placenta a termo. Estes resultados indicam que a placenta jovem caracteriza-se pela alta atividade proliferativa das células do citotrofoblasto, associada à alta ocorrência de apoptose.

Assim sendo, a proliferação e diferenciação celular são proporcionais à apoptose (ou morte celular) durante o desenvolvimento e crescimento dos organismos imaturos ou adultos (YOUNG; HEATH, 2001). No desenvolvimento placentário, é fundamental um balanço entre proliferação e morte celular (LEA,

2001), ambas exercendo um importante papel na função placentária, sendo estes processos inversamente proporcionais ao longo da gestação (BOOS et al., 2003).

3.4 Citometria de fluxo e ciclo celular

A Citometria de fluxo é um método capaz de avaliar um grande número de células em curto período de tempo, surgindo como uma promessa como adjuvante ao diagnóstico citológico das neoplasias. Uma de suas aplicações mais divulgadas é a medida do conteúdo de DNA, que identifica populações de células com quantidades anormais de DNA (aneuploidia) e fornece uma estimativa da atividade proliferativa celular, analisando a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (KEREN, 1994; CIBAS, 1995; ORFAO, 1995; SHAPIRO, 1995; O'LEARY, 1998).

Através da citometria de fluxo é possível observar células individuais obtidas através de uma suspensão celular, com a passagem destas células através de longos tubos capilares, onde um sistema óptico registra o parâmetro que se deseja medir e alimenta um computador com os dados obtidos (RILEY et al., 1993; PROLLA et al., 1992). Este sistema registra como a célula reage após estímulo com laser de argônio em relação a dispersão da luz incidente, bem como sua habilidade em emitir fluorescência. Detectores geram então impulsos elétricos que são convertidos em sinais digitais que são acumulados em uma frequência de distribuição ou histograma (SHAPIRO, 1995).

A citometria de fluxo fornece informações suplementares aos métodos histológicos tradicionais, nos quais as células são examinadas por microscópio óptico e o diagnóstico de uma patologia é estabelecido por reconhecimento de um padrão celular. Prognósticos estabelecidos pela observação microscópica de pleomorfismos celulares e por contagem grosseira do número de figuras de mitoses são subjetivos. Infelizmente, não é sempre possível determinar a precisa origem de uma neoplasia por critérios somente morfológicos, e o pleomorfismo está correlacionado com o comportamento celular (BACAL; FAULHABER, 2003).

O citômetro de fluxo examina quantitativamente a composição da população celular no lugar de sua morfologia. O tipo e a origem de cada célula podem ser com precisão determinados pela elucidação de sua composição antigênica e medidas do conteúdo de DNA e atividade proliferativa são frequentemente melhores indicadores prognósticos dos critérios morfológicos (BACAL; FAULHABER, 2003).

3.5 Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) e proliferação celular

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 DNAr e estão localizadas nas constrições secundárias dos cromossomos, podendo apresentar-se agrupados (*clusters*) ou pulverizados 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).

Segundo Trerè (2000), quando são coradas por prata as NORs podem ser facilmente identificadas por pontos negros (*dots*), de maior ou menor tamanho, exclusivamente localizados na área nucleolar, sendo denominadas AgNORs (*argyrophilic nucleolar organizer regions*). De acordo com o descrito por Crocker et al. (1989), quando os pontos negros, chamados de *dots*, se agregam e não se torna possível a identificação de único um ponto, cada aglomerado de *dots*, agora chamados de *clusters*, podem ser considerados como uma AgNOR.

As AgNORs são unidades estrutural-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; PLOTON, 1991).

Muitos trabalhos demonstram que a quantidade de AgNORs representa um parâmetro válido para a cinética celular, sendo possível mensurar a taxa de proliferação celular (TRERÈ et al., 1989; DERENZINI et al., 1990; OFNER et al., 1992). Esta 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 et al., 1990).

A determinação do número e da área das AgNORs tem sido comparada com outros métodos de mensuração da atividade celular, como a determinação da proliferação celular através da citometria de fluxo (CROCKER et al., 1988) ou com a utilização de marcadores de proliferação celular, como o Ki-67 (COSTA et al., 1999; KLISCH et al., 1999; SCHULER et al., 2000; HOFFMANN; SCHULER, 2002; BOOS et al., 2006) e essa correlação tem mostrado positiva. Estudos revelam uma relação direta na expressão de AgNOR quando realizada uma dupla marcação com o antígeno de proliferação celular Ki-67 em amostras de tecidos parafinizados (MUNAKATA; HENDRICKS, 1994).

Analizando a correlação entre as AgNORs e outros parâmetros proliferativos, Kahn et al. (1993) demonstraram uma relação entre a média do número de AgNORs por núcleo e a fase S do ciclo celular, analisada por citometria de fluxo, em lesões malignas. Trerè et al. (1991) demonstraram a correlação entre os índices de AgNORs, Ki-67 e BrdU (bromodeoxi-uridina) em tumores de diversas origens.

A significância das AgNORs ainda é controversa, podendo representar a ploidia celular ou ser um marcador da replicação celular (SMITH et al., 1993). Além disso, estudos revelam que um aumento no número de AgNORs é compatível com um aumento na síntese protéica celular (CROCKER, 1987; DERENZINI; PLOTON, 1991; CABRINI et al., 1992).

A avaliação das AgNORs pode ser realizada de diversas maneiras. Uma simples contagem numérica é mais comumente usada. Estudos têm demonstrado a importância da avaliação morfológica das AgNORs (METZE; LORAND-METZE,

1993) ou a sua quantificação quanto à área corada (TRERÈ et al., 1991). A morfologia das AgNORs pode ser avaliada de acordo com o método de Crocker et al. (1988), através da contagem de *dots* e *clusters* individualmente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais e composição dos grupos

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP em colaboração com o laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

As placentas e membranas fetais de gestações de bovinos não manipulados foram coletadas no abatedouro Mantiqueira, São José dos Campos, totalizando 28 úteros gravídicos em diferentes fases gestacionais. As medidas cefalococcígeas dos fetos (CR - “Crown-Rump”) foram aferidas para determinar a idade de prenhez pela fórmula: $X = 2,5 (Y + 21)$ (RICHARDSON, 1989). Os grupos foram determinados de acordo com a idade gestacional: grupo I (60-120 dias); II (121- 170 dias); III (171-220 dias) e IV (221-290 dias), totalizando sete animais em cada grupo.

4.1.2 Amostras placentárias

Em cada útero coletado, foram obtidas amostras de diferentes regiões placentárias (Figura 7):

- Placentônios $\left\{ \begin{array}{l} \text{região central} \\ \text{região marginal} \end{array} \right.$
- Área interplacentomal
- Microplacentônios (diâmetro menor ou igual a 1 cm)
- Fusão de placentônios

As amostras foram seccionadas em cubos de aproximadamente 0,5 cm e fixadas em formalina tamponada a 10% em PBS para análise de microscopia de luz e armazenadas em nitrogênio líquido para análise em citômetro de fluxo.

Figura 7 – Representação das diferentes regiões placentárias analisadas.

4.2 Métodos

4.2.1 Macroscopia

As avaliações macroscópicas foram realizadas com auxílio de lupa flexível e paquímetro. Amostras das diferentes regiões placentárias foram coletadas e analisados dados como número, tamanho (largura, comprimento, espessura) e forma dos placentônios, além de descrições do ambiente uterino.

Os úteros foram analisados à fresco e fixados em formol 10% para possível análise posterior. Com auxílio de um paquímetro, foram aferidas as medidas de comprimento, largura e espessura dos placentônios, classificados de acordo com a medida de seu eixo maior em: microplacentônios - menor ou igual a 1,0 cm; pequenos (entre 1,1 a 3,0 cm), médios (entre 3,1 a 6,0 cm), grandes (entre 6,1 a 11,0 cm) e megaplacentônios (maiores que 11,0 cm). Um mapeamento geral de todas as placentas foi realizado, observando a presença de áreas nuas, hematomas e processos de fusão placentomal.

4.2.2 Microscopia de luz

Amostras das diferentes regiões placentárias coletadas foram recortadas em cubos com lados medindo aproximadamente 0,5 cm e colocados em solução fixadora de formalina tamponada a 10%, em PBS, permanecendo por 24-48 horas para completa fixação. Em seguida as amostras foram desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast (Paraplast Embedding Media_Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA). Após a inclusão, foram realizados cortes em micrótomo (Leika, German) com 5µm de espessura sobre lâminas para a realização de métodos de coloração e posterior análise em microscópio de luz.

4.2.2.1 Coloração: Hematoxilina-Eosina

As amostras foram coradas em protocolo de rotina laboratorial com hematoxilina-eosina para observação das particularidades histológicas dos fragmentos. Em seguida procedeu-se a montagem das lâminas e posterior análise em microscópio de luz Nikon Eclipse E-800.

4.2.2.2 Coloração de Prata (AgNORs)

A coloração por Nitrato de Prata (AgNO_3) foi realizada para a análise da atividade proliferativa das diferentes células placentárias. As lâminas foram imersas 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) levada à estufa a 37°C, em câmara úmida e escura, por aproximadamente 20 minutos, dependendo da amostra. Após a lavagem das lâminas com água destilada, aplicou-se a solução de tiosulfato de sódio 1% por um minuto e procedeu-se a nova lavagem, em seguida as lâminas foram secadas a temperatura ambiente e acondicionadas na ausência da luz. A captura e digitalização das imagens e contagem das AgNORs foi realizada através de microscópio de luz, no sistema CCD-IRIS Sony Company. Em todas as regiões propostas o número de AgNORs foi contado em 100 núcleos de células trofoblásticas gigantes e 100 núcleos de células trofoblásticas mononucleadas. Nas células trofoblásticas gigantes binucleadas a quantidade de AgNORs foi considerada em ambos os núcleos. Foi quantificada individualmente a quantidade de *dots* e de *clusters* nos núcleos celulares, além de uma análise do número total de AgNORs em cada tipo celular (*dots* + *clusters*).

4.2.3 Citometria de fluxo – determinação das fases do ciclo celular

As células obtidas dos fragmentos armazenados em nitrogênio líquido foram utilizadas para determinação das fases do ciclo celular e das populações celulares placentárias. Estas células são separadas em tampão citrato pH=7,6, processadas de acordo com a técnica descrita por Vindelov (1983) e filtradas em redes de 30 µm (Spectra Mesh Nylon Filters) para separar as proteínas (o maior componente do estroma tecidual, ou tecido conjuntivo) e os debris celulares, composto por células sanguíneas, células degeneradas ou em processo de degeneração e tecido gorduroso. Rapidamente as células foram incubadas com 30 mg/mL de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 10 min a temperatura ambiente.

Inibidor de tripsina 5 mg/mL de tripsina (Sigma Chemical Co) e 0,1 mg/mL de ribonuclease A (Sigma Chemical Co.) adicionados por 10 minutos para uma ótima resolução do DNA. Finalmente foi adicionado 415 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma Chemical Co.) por 15 min antes da análise no citômetro. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido utilizando o Cell Quest Software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). O conteúdo de DNA analisado no FL2 utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickinson) lâmpada de 15mW, 488 nm argônio íon laser. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular: em apoptose (hipoploidia-G1), G0, síntese (S) e G2/M foi avaliadas pelo software Mod FIT (Beckton Dickinson).

Com esta metodologia, células de diferentes regiões placentárias foram coradas com Iodeto de Propídio, um corante que se intercala ao DNA emitindo fluorescência, e utilizadas para análises em citômetro de fluxo. O leitor do citômetro reconhece esta fluorescência e relaciona com o tamanho da molécula de DNA. Uma distribuição do tamanho do material genético é gerada em formato de histograma e através do Software WinMDI2.8 podemos estimar o número de células em cada fase do ciclo celular e a morfologia celular (Figura 8).

Figura 8 – Programa de análise (Software: MoDFit) utilizado para análise dos dados provenientes da aquisição em citômetro de fluxo, determinando as fases do ciclo celular (Fase G0/G1 – não proliferativa; S – em síntese; G2/M – em divisão) e morte celular (apoptose)

4.2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos dos experimentos foram submetidos a análise estatística através da análise de variância de ANOVA, seguido de procedimentos de comparação múltipla (Student-Newman-Keuls method). Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A fim de facilitar a compreensão, os resultados serão apresentados em quatro sub-itens: análises macroscópicas, microscópicas e a citometria de fluxo, com a análise das fases do ciclo celular e apoptose.

5.1 Análises macroscópicas

As placentas foram analisadas quanto a seus aspectos macroscópicos em 28 gestações bovinas. Considerando o período de gestação da vaca de 290 dias, as placentas foram agrupadas de acordo com a idade gestacional: grupo I) entre 60 e 120 dias, grupo II) entre 121 e 170 dias, grupo III) entre 171 e 220 dias e grupo IV) entre 221 e 290 dias.

Foi observada a composição macroscópica da placenta em duas áreas principais, a região interplacentomal e a placentomal. Os placentônios são as projeções localizadas ao longo de ambos os cornos uterinos. A região interplacentomal, localizada entre os placentônios, representa macroscopicamente uma simples aposição entre as membranas fetais e o útero, correspondendo a área lisa da placenta.

O ambiente uterino apresentou mudanças ao longo das fases gestacionais quanto ao número de placentônios, seus tamanhos, presença de fusões placentomais, microplacentônios, hematomas e existência de áreas nuas.

Os resultados macroscópicos referem-se às características morfológicas das placentas em cada grupo gestacional, nos quais são abordados os seguintes aspectos:

- Placentônios:

- Disposição, formato e tamanho dos placentônios;

- Número de placentônios nos cornos uterinos;
 - Classificação dos placentônios: pequenos, médios, grandes e megas placentônios.
-
- Microplacentônios
 - Áreas nuas placentárias
 - Fusão de placentônios

5.1.1 Placentônios

Após a fecundação, o conceito migra e se fixa à parede uterina em um dos cornos uterinos. O corno no qual está presente o embrião é denominado de corno uterino gestante. O corno oposto, denominado de corno uterino não gestante, apesar de não conter o embrião em seu interior, também apresentou membranas fetais. Apesar de a placentação envolver ambos os cornos uterinos, o feto ocupa apenas um deles, que será, então, o corno gestante. O corno gestante foi facilmente visualizado antes da secção dos úteros, pois apresentava tamanho evidentemente maior do que o corno não gestante (Figura 9).

Figura 9 – Fotografia de útero bovino com 120 dias de gestação. O útero ainda não foi seccionado, sendo possível observar o corno uterino gestante (CG) e o corno uterino não gestante (CNG) com sua curvatura ventral. O corno não gestante está à frente, tornando possível a visualização do ovário direito (OV). Barra: 10 cm

Após a abertura dos cornos uterinos, remoção do feto e observação de suas características, iniciou-se a observação da placenta. A primeira constatação foi a disposição dos placentônios na parede uterina. Em todas as fases gestacionais, os placentônios se apresentaram organizados em quatro fileiras, duas de cada lado da implantação do cordão umbilical, cada fileira apresentando em média 10 a 13 placentônios (Figura 10). Estes apresentaram formatos variados, sendo predominantes os placentônios ovóides. As características de disposição em fileiras e formato dos placentônios estavam presentes em ambos os cornos uterinos.

Porém, em muitos casos foram observados grupos de placentônios isolados ou irregularmente distribuídos, desalinhados das fileiras ao redor do cordão umbilical. A fileira de placentônios mais próxima ao cordão umbilical (fileira proximal), apresentou placentônios mais desenvolvidos, apresentando maior tamanho em relação aos placentônios da fileira distal (Figura 10).

Figura 10 – Fotografia de placenta bovina com 265 dias de gestação, onde se observa o corno uterino gestante (CG) e não gestante (CNG), separados por uma linha pontilhada. No corno gestante observamos ao centro o cordão umbilical (Co). Podemos observar a presença de quatro fileiras de placentônios em cada corno uterino, sendo estes maiores no corno gestante. Barra: 10cm

Ao longo da gestação as características macroscópicas da placenta se modificaram. No início da prenhez, os cornos uterinos e seus placentônios eram evidentemente menores, apresentando um aumento gradativo deste tamanho ao longo da gestação. As figuras 11, 12, 13 e 14 mostram fotografias macroscópicas das placentas analisadas em cada grupo gestacional, nas quais observam-se o aumento gradativo do tamanho dos placentônios.

Figura 11 – Fotografia de placenta bovina com 105 dias de gestação – grupo I.
Barra: 10cm

Figura 12 – Fotografia de placenta bovina com 125 dias de gestação – grupo II.
Barra: 10cm

Figura 13 – Fotografia de placenta bovina com 172 dias de gestação – grupo III.
Barra: 10cm

Figura 14 – Fotografia de placenta bovina com 225 dias de gestação – grupo IV.
Barra: 10cm

Os placentônios foram quantificados individualmente em cada corno uterino e em seu **número** total (corno gestante + corno não gestante). Foi observada uma média de 76 placentônios por placenta, sendo o número máximo de 102 e mínimo de 47. O número total de placentônios por placenta em cada estágio gestacional está demonstrado na tabela 1 e figura 15. A maior quantidade de placentônios foi encontrada nas placentas pertencentes ao grupo II (121 a 170 dias), havendo um decréscimo nos dois últimos grupos gestacionais, no entanto este decréscimo não foi estatisticamente significativo. O menor número de placentônios foi observado no grupo III (171 a 220 dias), porém também não houve diferença estatística significativa, com pouca variação no número total de placentônios ao longo da gestação.

Tabela 1 – Número total de placentônios nas placentas bovinas distribuídas nos grupos gestacionais

Nº. de placentônios	Grupo I (60-120d)	Grupo II (121-170d)	Grupo III (171-220d)	Grupo IV (221-290d)
Média	77 ± 16,4	86 ± 14,4	75,8 ± 9,4	73 ± 17,4
Mínimo	47	64	60	48
Máximo	90	102	85	90

Figura 15 – Variação do número total de placentônios distribuídos nos grupos gestacionais ao longo da prenhez (corno gestante + corno não gestante)

Foram encontradas diferenças quanto ao número de placentônios no corno gestante e não gestante, representadas na tabela 2 e figura 16. O corno gestante apresentou um número significativamente maior de placentônios em relação ao corno não gestante ($p < 0,05$). Analisando somente o corno gestante, o número de placentônios se manteve estável, sem variações significativas ao longo da gestação. No corno não gestante foi observado um decréscimo no número de placentônios a partir do grupo III ($p < 0,05$). Através desta análise macroscópica, foi possível detectar um decréscimo no número de placentônios no corno não gestante, a partir de 171 dias de prenhez.

Tabela 2 – Número de placentônios nos cornos gestantes e não gestante de todas as placentas analisadas

Nº. de placentônios	Corno gestante	Corno não gestante
Média	46 ± 10,9	30,5 ± 6,8
Máximo	67	45
Mínimo	24	10

Figura 16 – Média do número de placentônios no corno gestante e não gestante ao longo da gestação. Barras acompanhadas por letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$). Não houve variações significativas no número de placentônios para o corno gestante

Foram realizadas mensurações para determinar o **tamanho** de cada placentônio, sendo o comprimento aferido em seu diâmetro maior, permitindo classificá-los como pequenos (1,1 a 3,0 cm), médios (3,1 a 6,0 cm), grandes (6,1 a 11,0 cm) e mega placentônios (>11,1 cm). Foi possível observar variações no tamanho dos placentônios entre os grupos gestacionais e também variações entre

os cornos uterinos. Em relação aos microplacentônios ($\leq 1,0\text{cm}$), sua presença e quantidades foram analisadas individualmente.

No **corno gestante** foi observada uma predominância de placentônios pequenos no grupo I ($21,5 \pm 10$), médios no grupo II ($26,5 \pm 15,5$) e grandes nos grupos III ($28,8 \pm 6,4$) e IV ($23,2 \pm 14,4$) (Figura 17). Os mega placentônios foram observados somente no corno gestante e a partir de 190 dias de gestação, localizados nas placentas pertencentes aos grupos III e IV.

O número de placentônios pequenos no corno gestante diminuiu significativamente no grupo III e IV ($p < 0,01$) em relação ao primeiro grupo gestacional. O número de placentônios grandes também variou significativamente, apresentando um aumento nos grupos III e IV em relação ao I e II. Estes resultados evidenciam uma maior quantidade de placentônios pequenos até 170 dias, após este período prevalecem os grandes e mega placentônios.

Figura 17 – Distribuição dos diferentes tamanhos de placentônios no corno gestante ao longo da gestação. Barras acompanhadas por letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$). A, B: para pequenos placentônios. a, b: para grandes placentônios

No **cornio não gestante** foi observada uma predominância de placentônios pequenos nos grupos I e II e uma predominância de placentônios médios nos grupos III e IV (Figura 18). Não foram observados mega placentônios no cornio não gestante. Os placentônios grandes só foram localizados a partir de 187 dias de gestação, encontrando-se presentes apenas nas placentas dos grupos III e IV.

Figura 18 – Distribuição dos diferentes tamanhos de placentônios no cornio não gestante ao longo da gestação. Barras acompanhadas por letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$). A, B: para pequenos placentônios; a, b: para grandes placentônios

Com estes dados, observa-se que os placentônios apresentam um crescimento contínuo ao longo da gestação em ambos os cornos uterinos (Tabela 3). O crescimento é maior no cornio gestante e o crescimento máximo é observado a partir de 171 dias, com a presença de mega placentônios. O cornio não gestante apresentou um menor crescimento de seus placentônios, com a presença de um maior número de placentônios médios e nenhum mega placentônio, mesmo no último estágio da prenhez.

Tabela 3 – Média do número de placentônios pequenos, médios, grandes e megas, distribuídos ao longo dos grupos gestacionais

Grupo gestacional	Pequenos		Médios		Grandes		Mega	
	CG	CNG	CG	CNG	CG	CNG	CG	CNG
Grupo I (60 a 120 d)	21,5	22,3	15,8	2,0	3,8	0,0	0,0	0,0
Grupo II (121 a 170 d)	15,7	29,8	26,5	7,4	3,7	0,0	0,0	0,0
Grupo III (171 a 220 d)	1,8	5,2	15,2	21,8	28,8	1,8	0,8	0,0
Grupo IV (221 a 290 d)	2,2	6,0	14,2	9,8	32,2	7,8	9,6	0,0

Corno gestante (CG) e corno não gestante (CNG)

Observou-se que o tamanho dos placentônios é dependente da fase gestacional e da sua posição no útero. Os placentônios aumentaram de tamanho progressivamente no decorrer da prenhez e as fileiras mais próximas ao cordão umbilical apresentaram placentônios maiores. Além disso, o corno gestante evidenciou, em todos os casos, a presença de placentônios de comprimento maior do que o corno não gestante.

5.1.2 Microplacentônios

Placentônios de tamanho igual ou menor que 1,0 cm de comprimento foram considerados como microplacentônios. Foram observados microplacentônios em 83,33% das placentas do grupo I, em 50% das placentas no grupo II e em apenas 16,66% das placentas nos grupos III e IV. O número de microplacentônios foi decrescente ao longo da gestação. A figura 19 mostra a presença de microplacentônios nos grupos I e II em cornos não-gestantes, onde sua presença foi maior.

Figura 19 – Fotografias de placentas pertencentes aos grupos I (A e B) e II (C e D), evidenciando os cornos uterinos não gestantes. Observa-se a presença de microplacentônios (setas) entre os placentônios maiores ao longo do corno uterino não gestante. Em A, placenta de 105 dias e em B o detalhe dos microplacentônios. As figuras C e D são de placentas distintas, porém ambas com 125 dias de gestação. Barras: A, C, D) 5,0 cm; B) 1,0 cm

Analisando o número total de microplacentônios na placenta, verificou-se um número maior no grupo I quando comparado aos outros grupos gestacionais ($p<0,01$) (Figura 20). Os microplacentônios estavam presentes em maior quantidade no início da gestação, até 120 dias, apresentando uma média de 11,7 microplacentônios por placenta no grupo I. Com o avançar da prenhez, este número diminuiu significativamente, chegando a apresentar uma média de 0,4 microplacentônios no último grupo gestacional.

Figura 20 – Variação do número total de microplacentônios ao longo da gestação. Barras acompanhadas por letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ($p<0,01$)

Em uma análise individual entre os cornos uterinos, foi observado que o corno não gestante apresentou um maior número de microplacentônios em todos os grupos gestacionais, como mostra a figura 21 e tabela 4. No corno gestante, observamos a presença de microplacentônios somente nos grupos I e II, não sendo mais localizados a partir de 171 dias de prenhez. Apesar de observarmos uma distribuição variada de microplacentônios ao longo da prenhez, a diferença entre as fases gestacionais não foi significativa. O maior número de microplacentônios foi observado em uma placenta de 80 dias (grupo I), que apresentou 31 microplacentônios no corno não gestante e 15 no corno gestante.

Figura 21 – Média do número de microplacentônios localizados nos diferentes grupos gestacionais, no corno gestante (CG) e não-gestante (CNG)

Tabela 4 – Número médio de microplacentônios ao longo da gestação

Grupo gestacional	CG	CNG	TOTAL
Grupo I (60 a 120d)	2,8	8,8	11,6
Grupo II (121 a 170d)	0,2	1,2	1,4
Grupo III (171 a 220d)	0,0	0,3	0,3
Grupo IV (221 a 290d)	0,0	0,4	0,4

Corno gestante (CG) e corno não gestante (CNG)

5.1.3 Áreas “nuas”

Como observado anteriormente, os placentônios estão dispostos em fileiras nos cornos uterinos, sendo estas dispostas ao redor do cordão umbilical, o que permite a formação de uma área, na região oposta à implantação do cordão, sem placentônios na sua superfície. Em todas as placentas analisadas foram encontradas estas regiões, localizadas na região dorsal ao feto, que foram consideradas como áreas “nuas”. Estas áreas foram observadas a partir do primeiro grupo gestacional, evidenciando a presença de áreas nuas em todas as idades gestacionais. As figuras 22, 23, 24 e 25 evidenciam a presença de áreas nuas em placentas dos grupos I, II, III e IV.

Figura 22 – Fotografia de placenta bovina do grupo I (90 dias), onde se observa uma área nua (*) no corno gestante. Barra: 5,0cm

Figura 23 – Placenta do grupo II (160 dias), onde se observa uma área nua (*) no corno gestante. Barra: 10cm

Figura 24 – Placenta do grupo III (210 dias), onde se observa uma grande área nua (*) no corno gestante. Barra: 10cm

Figura 25 – Fotografia de placenta bovina do grupo IV (225 dias), onde se observa uma área nua (*) no corno gestante. Barra: 10cm

Os cornos não gestantes, ausentes de cordão umbilical e feto, também apresentaram áreas nuas na região dorsal do corno uterino. Alguns destes cornos apresentaram áreas nuas extensas, com a presença de poucos placentônios na parede uterina. A figura 26 mostra uma placenta do grupo IV (222 dias) com uma grande área nua no corno não gestante, porém, a presença de mega placentônios no corno gestante.

Figura 26 – Placenta bovina do grupo IV, com 222 dias de gestação. Observar em A a presença de mega placentômios (setas) no corno gestante. Em B o corno não gestante, evidenciando a grande área “nua” (*) e a presença de poucos placentômios. Barras: 10cm

5.1.4 Fusão placentomal

Os processos de fusão placentomal foram observados em locais aleatórios da placenta bovina, no corno gestante e também no corno não gestante. As fusões foram visualizadas facilmente através da presença de uma fissura fusional na superfície do placentônio, como mostra a figura 27.

Figura 27 – Fissura fusional na superfície do placentônio (seta), característica macroscópica de fusão placentomal. Placenta com (A) 125 dias de gestação - corno não gestante e (B) 190 dias de gestação - corno gestante. Barras: A) 2,0 cm; B) 10,0 cm

Para certificar o processo de fusão placentomal, ou seja, determinar macroscopicamente a presença de fusão caruncular e/ou cotiledonar foi necessário a desconexão entre os tecidos materno e fetal no placentônio. A figura 28 ilustra a desconexão entre carúncula e cotilédone em placentônios.

Figura 28 – Placentônios bovinos de A, B: 120 dias, C: 222 dias e D: 157 dias. Observamos a desconexão entre carúnculas (car) e cotilédones (cot) (A, B e C) e ambos já desconectados (D). Barras: 1,0 cm

Foram encontrados diversos aspectos macroscópicos de fusão, sendo observada a fusão de carúnculas e cotilédones de forma independente ao longo da gestação. A fusão apenas de cotilédones foi observada em uma placenta do grupo II, nas quais apenas os cotilédones encontravam-se fusionados, porém, sem fusão das carúnculas correspondentes (Figura 29 A, B).

Figura 29 – Fotografia de placenta bovina do grupo II (157 dias), onde se observa o processo de fusão dos cotilédones (seta). A parte fetal foi desconectada, evidenciando a fusão completa dos cotilédones (cot), porém as carúnculas correspondentes (car) estão separadas entre si por uma distância de aproximadamente 0,3 cm e 0,15 cm (A e B, respectivamente). Barra: 2 cm

Um outro tipo de fusão encontrado foi a fusão completa dos cotilédones e a fusão parcial das carúnculas correspondentes, as quais apresentavam uma fissura fusional parcial, como mostra a figura 30.

Figura 30 – Fotografia de placenta do grupo I (105 dias), evidenciando o processo de fusão caruncular no corno não-gestante. Em A estão unidos carúnculas e cotilédones. Em B a parte fetal foi desconectada, evidenciando a incompleta fusão de duas carúnculas, porém, os cotilédones correspondentes totalmente fusionados. Barras: 2,0 cm

Para uma análise mais completa, além da desconexão das membranas materna e fetal, foi realizada uma incisão longitudinal nestes placentônios fusionados, o que nos permitiu observar algumas particularidades. Em alguns placentônios fusionados observamos a presença de tecido entre as carúnculas, formando uma fina barreira entre elas (Figura 31 D). Este tecido foi analisado posteriormente através de métodos histológicos.

Figura 31 – Fotografias de placenta bovina do grupo III (190 dias), evidenciando um processo de fusão de carúncula e cotilédone. Em A observa-se a placenta inteira em menor aumento, evidenciando o corno gestante (CG) e o não gestante (CNG). Em B, detalhe do placentônio no corno gestante que apresenta o processo de fusão (seta). A linha pontilhada demonstra o local que foi seccionado o placentônio fusionado. Na figura C observamos de um lado do corte as carúnculas totalmente fusionadas (seta preta) e do outro a presença de tecido entre as carúnculas (seta branca). Em D, detalhe do tecido entre as carúnculas. Barras: A) 10,0 cm; B) 5,0 cm

Em uma placenta do grupo II foi observada, após a desconexão materno-fetal, a presença de uma fissura fusional característica na região caruncular. Por outro lado, os cotilédones correspondentes não apresentavam sinal de fusão, como mostra a figura 32 A e C. Na figura 33, processo de fusão nas carúnculas e nos cotilédones.

Figura 32 – Fotografias de placentônios bovinos do grupo II (125 dias), onde se observa em A e C processos de fusão caruncular, com a presença de uma fissura na região de carúnculas (seta), porém o aspecto dos cotilédones correspondentes sugere ausência da fusão cotiledonar. Em B e D secção longitudinal das carúnculas. Barras: A, B, C) 2,0 cm; D) 1,0 cm

Figura 33 – Fotografia de placenta bovina do grupo II (125 dias). Em A, dois processos de fusão. Em B a desconexão das membranas materno-fetal, onde se observam as carúnculas e os cotilédones fusionados (setas). Barras: 2 cm

Para todos os procedimentos realizados com fusões carunculares utilizamos as fusões onde houve macroscopicamente fusão de cotilédone e carúncula.

O primeiro processo de fusão foi localizado no corno gestante de uma placenta pertencente ao grupo I, com 87 dias de gestação. A figura 34 mostra o gráfico referente à média do número total de fusões placentomais localizadas. Foi encontrado um número significativamente maior de fusões no grupo III e IV em relação ao grupo I, evidenciando uma maior ocorrência deste processo a partir de 170 dias de prenhez.

Figura 34 – Média do número de fusões placentomais ao longo da gestação. Barras acompanhadas por letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$)

Nos grupos I e II, 20% das placentas apresentaram processos de fusão placentomal, sendo no grupo I apenas no corno gestante. Foram observadas fusões em 66,66% das placentas no grupo III e em 50% das placentas no grupo IV. As variações na presença de fusões carunculares entre os cornos uterinos estão demonstradas na figura 35. O grupo I apresentou poucos processos de fusão, localizados apenas no corno gestante. Apenas o grupo II apresentou um maior número médio de fusões no corno não gestante, inversamente aos outros grupos gestacionais. Os grupos III e IV apresentaram os maiores valores, porém, devido ao

alto desvio encontrado, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 35).

Figura 35 – Média do número de fusões placentomais no corno gestante e não gestante ao longo da gestação

O número de fusões placentomais encontrado foi bastante variável, porém, foi observado que a quantidade de fusões aumenta progressivamente até 220 dias de prenhez, se mantendo então em número estável até o final da gestação. A quantidade de fusões placentomais foi maior no corno gestante, exceto no grupo II, que apresentou um número maior no corno não gestante.

5.2 Análises microscópicas

Para a avaliação de aspectos histológicos, as diferentes regiões placentárias foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para um estudo morfológico geral e por Nitrato de Prata para avaliação da atividade proliferativa das diferentes células trofoblásticas. Os resultados da avaliação microscópica foram subdivididos em três tópicos:

- Análise histológica – coloração por hematoxilina-eosina
- Análise da proliferação celular com marcador histoquímico – coloração por Nitrato de Prata (AgNORs)
- Citometria de fluxo – análise das fases do ciclo celular

5.2.1 Análise histológica

Como observado macroscopicamente, a placenta dos ruminantes é composta de duas áreas principais, a interplacentomal e a placentomal. A área interplacentomal representa uma aposição simples entre as membranas fetais e o epitélio uterino. Já o placentônio constitui a unidade funcional da placenta, formado pela união entre as carúnculas uterinas e os cotilédones fetais. Os resultados foram obtidos a partir da análise de gestações bovinas nas diferentes fases gestacionais e regiões do placentônio, áreas interplacentomal e microplacentônios. Na figura 36 demonstramos as regiões analisadas histologicamente:

Figura 36 – (A) Fotografia demonstrativa das regiões analisadas histologicamente: (B) região interplacentomal, (C) região de fusão placentomal, (D) região central e marginal do placentônio, (E) microplacentônio. Barras: A) 2,0 cm; B) 50 μ m; C e E) 200 μ m; D) 250 μ m

A análise histológica dos placentônios mostrou que o vilo coriônico é formado por mesênquima altamente vascularizado e coberto por uma camada simples de células trofoblásticas. O epitélio trofoblástico é formado predominantemente por células mononucleadas com a presença de algumas células trofoblásticas gigantes. As células mononucleadas possuem formato irregular, núcleo arredondado com grandes nucléolos e se sobressaem entre as porções distais das criptas. As células trofoblásticas gigantes ocupam diferentes posições entre as mononucleadas e algumas vezes também são encontradas no epitélio uterino, como resultado da migração destas células do epitélio trofoblástico para o epitélio materno. A grande maioria das células gigantes está completamente rodeada por células mononucleadas (sem conexão com a membrana basal) (Figura 37).

O epitélio das criptas é composto por células cuboidais simples de origem materna, que possuem um núcleo redondo ou ovóide distalmente e nucléolo evidente. O epitélio uterino é composto de poucas células gigantes, migradas do epitélio fetal (Figura 37 B). No final da gestação apresentam células epiteliais achatadas, com diminuição no número de células binucleadas e aumento de células com características apoptóticas.

A diferença entre estes grupos de células é bem notável, as células gigantes podem ser reconhecidas principalmente pelo seu tamanho, além de possuírem formato esférico, nucléolos bem formados, falta de contato com a membrana basal e por possuírem dois ou mais núcleos, com grânulos característicos. A célula trofoblástica gigante se cora mais do que as células adjacentes e possuem pouco citoplasma, sendo facilmente identificadas no epitélio uterino. Além disso, apresenta grande concentração de material basofílico no citoplasma supra nuclear (Figura 37 A).

Figura 37 – Fotomicrografia de placentônio bovino pertencente ao Grupo III. Observar em A as células trofoblásticas gigantes (setas) com seu formato esférico e nucléolos evidentes. Estas células estão coradas mais intensamente do que as mononucleadas adjacentes. B) Observar o vilo coriônico em maior aumento, com a presença de células trofoblásticas gigantes (ctg) rodeadas por células mononucleadas (ctm). A seta evidencia uma célula trofoblástica gigante que migrou para o epitélio uterino (Eu). Hematoxilina-Eosina. Barras: A) 40 μ m, B) 20 μ m

O vilo coriônico apresentou-se composto por mesênquima intensamente vascularizado e coberto por uma camada simples de trofoblasto. O epitélio endometrial materno permanece intacto, pois não há invasão pelo trofoblasto, apenas uma aposição entre os epitélios (Figura 38 A). Na interface materno-fetal visualizamos as camadas que compõem a interface materno-fetal: endotélio do vaso fetal, mesênquima (tecido conjuntivo fetal), trofoblasto ou epitélio coriônico, epitélio uterino, estroma endometrial (tecido conjuntivo materno) e endotélio materno. (Figura 38 B).

Figura 38 – Fotomicrografia de placentônio bovino do Grupo III (217 dias). Observar em A o vilo coriônico e suas ramificações compostas por uma grande quantidade de vasos sanguíneos (setas). Em B observa-se a interface materno-fetal, evidenciando as camadas da barreira inter-hemática: vaso sanguíneo fetal (Vf), mesênquima (M), epitélio trofoblástico (T), epitélio uterino (Eu), estroma endometrial (Ee) e endotélio do vaso materno (Vm). Hematoxilina-Eosina. Barras: 20 µm

No placentônio, a superfície endometrial possui profundas criptas carunculares, penetradas por longos e ramificados vilos cotiledonários de corioalantóide fetal, o que aumenta a área de contato entre mãe e feto. Estas ramificações aumentam com o avançar da prenhez, formando vilos intensamente ramificados e vascularizados que se entremeiam nas criptas carunculares maternas.

Nos grupos I, II, III e IV observamos o desenvolvimento dos placentônios, na sua região central, com a penetração dos vilos coriônicos nas criptas endometriais, estabilizando, com o avançar da gestação, a árvore vilosa dos cotilédones nas carúnculas uterinas. No grupo I foi observado na **região central do placentônio** um epitélio uterino bem organizado, com células cuboidais dispostas simetricamente ao longo do epitélio materno. Ainda neste grupo foi possível observar uma árvore vilosa fetal pouco ramificada, o que variou bastante ao longo da gestação (Figura 39 A). Nos grupos II e III foi observada uma ligeira desorganização do epitélio materno, apresentando algumas regiões com epitélio estratificado ao invés do cuboidal simples característico do início da gestação. Nestes grupos observamos uma maior ramificação dos vilos coriônicos, estabilizando a árvore vilosa nas carúnculas uterinas (Figura 39 B e C). No grupo IV, último grupo gestacional, nota-se uma maior desorganização do epitélio das carúnculas uterinas, possivelmente sugerindo uma remodelagem tecidual, com a substituição de fibroblastos por matriz tecidual (Figura 39 D).

Figura 39 – Fotomicrografias de secção transversal de placentônios bovinos ao longo da gestação (região central do placentônio): (A) grupo I – epitélio materno organizado (seta); (B) grupo II e (C) grupo III – aumento das ramificações dos vilos fetais (v); (D) grupo IV – observa-se uma desorganização e achatamento do epitélio uterino (seta). Hematoxilina-Eosina. Barras: 40 µm. Hematoxilina-eosina

A **região interplacentomal**, presente em ambos os cornos uterinos, forma parte da membrana corioalantoideana, sendo desprovida de placentônios. Histologicamente, foi observado nas áreas interplacentomais a aposição simples entre as membranas fetais e o epitélio uterino. Nesta região, o córion está aderido ao endométrio, exceto nas regiões de abertura das glândulas uterinas, onde se formam as aréolas (Figura 40).

Figura 40 – Fotomicrografia da região interplacentomal em placenta bovina com 210 dias de gestação (A). Observar em maior aumento (C) a aposição entre o epitélio uterino (Eu) e o trofoblástico (T), exceto na região das aréolas (Ar) (B). O contato entre o córion e o epitélio materno adjacente à aréola é mantido. Hematoxilina-eosina

Na região interplacentomal, o epitélio uterino é do tipo simples cúbico, se tornando colunar alto em alguns pontos com o avançar da prenhez. O epitélio trofoblástico também sofre alterações ao longo da gestação, formando ondulações em algumas áreas na região interplacentomal, como se observa na figura 41.

Figura 41 – Fotomicrografias da região interplacentomal do grupo e IV (B) e III (A). Em A observa-se o epitélio trofoblástico formando ondulações. Em B, epitélio uterino com aspecto estratificado com o avançar da gestação. Barras: 20 µm. Hematoxilina-eosina

Foi observada a presença de microvilos no topo das células epiteliais uterinas, os quais se interdigitam aos microvilos também existentes nas células trofoblásticas, formando a zona de contato materno-fetal. As microvilosidades foram observadas tanto em células mononucleadas fetais e maternas quanto binucleadas fetais. Na região interplacentomal frequentemente ocorre a desconexão entre os epitélios materno e fetal, tornando possível, mesmo à microscopia de luz, observar os microvilos no epitélio uterino (Figura 42).

Figura 42 – Fotomicrografia do epitélio uterino desconectado do epitélio trofoblástico, evidenciando os pequenos microvilos na superfície das células. Hematoxilina-eosina

A região da **margem dos placentônios** corresponde à chamada “zona arcada” do placentônio (figura 43). Nesta região está localizada a base dos vilos fetais e o topo das criptas uterinas. Foi observado uma vascularização mais intensa nestas regiões e mais próxima das células epiteliais, com extravasamento de sangue na interface materno-fetal na região do topo dos vilos maternos, caracterizadas como áreas hemófagas.

Figura 43 – Fotomicrografias da região da margem do placentônio, onde observa-se a base dos vilos fetais e o topo das criptas uterinas. Nesta região observamos grande quantidade de vasos sanguíneos (Vs) e áreas de extravasamento de sangue na interface materno-fetal (*). Hematoxilina-Eosina. Barras: A) 100 μ m; B) 50 μ m; C) 40 μ m; D) 20 μ m

Na margem dos placentônios, entre o epitélio materno e o fetal foram localizadas áreas de extravasamento de sangue, os hematomas; estas hemácias maternas estavam sendo fagocitadas pelas células trofoblásticas adjacentes, fenômeno denominado eritrofagocitose.

Analisando todas as fases da gestação, os hematomas foram localizados a partir do 157º dia (Figura 44), no grupo II, com seu aspecto microscópico apresentando algumas variações dentro dos grupos gestacionais. As áreas de eritrofagocitose estavam em localizações variadas ao longo do epitélio trofoblástico, sempre na base dos vilos fetais.

No grupo III o processo de eritrofagocitose mostrou-se mais acentuado do que nos outros grupos, apresentando eritrócitos degradados dentro das células em maior quantidade e em maior tamanho (Figuras 45 e 46).

O último grupo gestacional (grupo IV) também apresentou células trofoblásticas em processo de fagocitose, porém em menor quantidade (Figura 47).

Dentro da área com sangue extravasado foram observados também debris celulares e prováveis células em apoptose. Foi possível observar nas células em processo de eritrofagocitose a presença de muitos vacúolos, observados também nas células ao redor desta região (Figura 47). Não foram visualizadas células trofoblásticas gigantes em processo de eritrofagocitose.

Figura 44 – Fotomicrografia de placentônio bovino de do grupo II (157 dias), onde se observa células trofoblásticas em processo de eritrofagocitose (seta). Observar os grânulos de coloração marrom-escuro dentro das células fetais. Em A observamos eritrofagocitose nas células da base do viló fetal (V) e em B disperso ao longo de todo epitélio trofoblástico. Hematoxilina-Eosina. Barras: 20µm

Figura 45 – Fotomicrografias da região marginal de placentônio bovino do grupo III (217 dias), evidenciando células trofoblásticas em processo de eritrofagocitose (setas). Observar este processo ao longo do epitélio trofoblástico (A, B, C e D) e também nas células dos vilos fetais (E e F). Em A evidenciamos a proximidade do vaso materno (Vm) e das células em processo de eritrofagocitose. Hematoxilina-Eosina

Figura 46 – Fotomicrografias de placentônio bovino de 215 dias (grupo III), evidenciando células trofoblásticas em processo de eritrofagocitose (setas). Observar este processo ao longo do epitélio trofoblástico (T). Hematoxilina-Eosina

Figura 47 – Fotomicrografia de placentônio bovino de 240 dias (grupo IV), onde também foi encontrado processo de eritrofagocitose (setas). Hematoxilina-Eosina

As **fusões placentomais** foram encontradas em todos os grupos gestacionais analisados. Os aspectos histológicos foram extremamente variáveis, não havendo correlação entre a idade gestacional e o tipo morfológico de fusão. Devido a essa grande diferença entre aspectos microscópicos, realizamos uma descrição de todas as variações encontrados. No grupo I e II observamos abaixo da fissura fusional uma penetração de tecido fetal (epitélio trofoblástico e mesênquima) na região caruncular com intensa vascularização. O trofoblasto apresentava-se revestido de células cubóides, mononucleadas e gigantes, enquanto que o epitélio na cripta uterina se apresentava organizado com epitélio estratificado em algumas áreas. Foi encontrada uma grande quantidade de sangue extravasado na interface materno-fetal já no grupo I com a presença de eritrofagocitose pelas células trofoblásticas. Ainda no epitélio uterino observamos algumas células com características apoptóticas (Figuras 48 e 49).

Figura 48 – Fotomicrografias de dois processos de fusão caruncular encontrados no grupo I. Em menor aumento observamos a penetração do tecido fetal na área caruncular (A e C). Em maior aumento (B e D), observamos um extravasamento de sangue na interface materno-fetal (*) e células com características apoptóticas (setas). Hematoxilina-Eosina. Barras: A) 200 µm; B e D) 40 µm; C) 100 µm

Figura 49 – Fotomicrografia de região de fusão caruncular localizada no grupo I. Observa-se: em B áreas com eritrofagocitose (seta); em C extravasamento de sangue na interface materno-fetal (*); em D região placentomal logo abaixo da fusão. Hematoxilina-eosina. Barras: A) 500 μm ; B), C), D) 100 μm

No grupo III observamos na região de fusão a presença de um septo contínuo de estroma materno que se estende desde as proximidades das glândulas uterinas até o mesênquima fetal. Também foi observada a presença de eritrofagocitose nos vilos coriônicos (Figura 50).

Figura 50 – Fotomicrografia da região de fusão caruncular do grupo III, visualizada em visão panorâmica em A. Observamos a presença de estroma materno na região fusional - seta (B) e a presença de eritrofagocitose pelas células trofoblásticas – seta (C). Hematoxilina-eosina. Barras: A) 500 µm; B) 300 µm; C) 30 µm

No grupo IV encontramos diferentes aspectos histológicos das fusões placentomais, com o mesênquima atravessando toda a espessura do placentônio, ou com estroma materno se encontrando com o mesênquima fetal na região média do placentônio (Figura 51).

Figura 51 – Fotomicrografias de fusões encontradas no grupo IV. Observa-se em A a penetração de tecido fetal ao longo de todo o placentônio (seta). Em B o tecido fetal e o estroma materno se encontram na região média do placentônio (seta). Hematoxilina-eosina. Barras: 500 μ m

A figura 52 mostra um dos processos de fusão do grupo IV com algumas particularidades, onde observamos um grande extravasamento de sangue na interface materno-fetal e a presença de células trofoblásticas mononucleadas e gigantes com características apoptóticas. Ao longo da região fusional o epitélio uterino se apresentou desorganizado, com a presença de algumas células trofoblásticas gigantes migradas e algumas com características apoptóticas.

Figura 52 – Fotomicrografia de fusão caruncular do grupo IV. Observamos um grande extravasamento de sangue na interface materno-fetal (*) e o epitélio uterino desorganizado (Eu). Presença de células com características apoptóticas (seta). Hematoxilina-eosina. Barras: A) 500 µm; B e D) 30 µm; C) 100 µm

Os **microplacentônios** ($\leq 1\text{cm}$) foram encontrados em todos os grupos gestacionais, como mostra a figura 44. Apresenta estrutura histológica semelhante à dos placentônios de tamanho normal em início de gestação, características estas observadas nos grupos I, II, III e IV (Figura 53). As vilosidades coriônicas adentram as criptas maternas e no centro do microplacentônio o epitélio uterino é organizado e o mesênquima intensamente vascularizado, com a presença de células trofoblásticas gigantes e mononucleadas. Em uma análise simples de figuras apoptóticas nas lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina não foram observadas células com características apoptóticas. Foi observado a presença de sangue extravasado na região marginal do microplacentônio e células em processo de eritrofagocitose (Figura 54).

Figura 53 – Fotomicrografias de microplacentônios bovinos dos grupos I (A e B), II (C), III (D) e IV (E). Hematoxilina-eosina. Barras: 250 µm

Figura 54 – Microplacentônio bovino do grupo II. Em A, detalhe da região central do microplacentônio, evidenciando um epitélio uterino bem organizado (Eu) e mesênquima intensamente vascularizado (Vs). Em B, nota-se a presença de extravasamento sanguíneo (*) e eritrofagocitose na região marginal do microplacentônio (setas). Hematoxilina-eosina. Barras: A) 20 μ m; B) 40 μ m

5.2.2 Expressão de marcador histoquímico de proliferação celular (AgNORs)

A coloração por Nitrato de Prata evidenciou pontos negros intranucleares facilmente visíveis à microscopia óptica, denominadas AgNORs (*argyrophilic nucleolar organizer regions*). Estes foram visualizados nos diversos tipos celulares presentes nas células epiteliais das regiões placentárias analisadas. Estes pontos foram quantificados, tornando possível uma análise estatística precisa.

Foi encontrado um número significativamente maior de AgNORs nas células trofoblásticas gigantes em relação ao número encontrado nas células trofoblásticas mononucleadas ($p < 0,001$) em todas as regiões e grupos gestacionais analisados. A figura 55 mostra uma placenta bovina com 76 dias de gestação, pertencente ao grupo I, caracterizada por diferentes padrões de distribuição de AgNORs. Pequenos e poucos *dots* estão presentes nos núcleos das células trofoblásticas mononucleadas, onde cada *dot* corresponde a um pequeno nucléolo. Observamos outro padrão de distribuição das AgNORs nas células trofoblásticas gigantes, nas quais são visualizados muitos *dots* no núcleo destas células. Numerosos, os *dots* estão frequentemente agrupados em grandes aglomerados, chamados de *clusters*. Cada *cluster* corresponde a um grande nucléolo, muito ativo na biossíntese ribossomal.

Figura 55 – Corte histológico de placenta bovina do grupo I (76 dias), corado com Nitrato de Prata. Em A é possível observar, em menor aumento, os vilos coriônicos impregnados por prata. Em B visualizamos em maior aumento (1000X) as AgNORs como pequenos pontos pretos intranucleares – *dots* – ou em aglomerados – *clusters*. Notar a maior quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas gigantes (CTG) em relação às células trofoblásticas mononucleadas (CTM). Barras: 10 μ m

Em todas as células analisadas a quantidade de *dots* foi significativamente maior que a quantidade de *clusters* ($p < 0,001$). A quantidade de *clusters*, por sua vez, foi significativamente maior nas células trofoblásticas gigantes em todas as regiões analisadas, tanto nas binucleadas como nas que possuíam apenas um núcleo gigante ($p < 0,01$). A figura 56 mostra um corte histológico de um placentônio, evidenciando os vilos coriônicos corados com nitrato de prata. É possível observar uma maior presença de *clusters* nas células trofoblásticas gigantes, enquanto que nas células trofoblásticas mononucleadas há uma predominância de *dots*, e em menor quantidade.

Figura 56 – Cortes histológicos de placenta bovina corados com Nitrato de Prata. Em A, é possível observar, em menor aumento, uma árvore vilosa impregnada por prata. Em maior aumento (1000X) observamos células trofoblásticas gigantes (CTG) e células trofoblásticas mononucleadas (CTM). Observar que as células trofoblásticas gigantes podem ser binucleadas (D, E). As CTG apresentam AgNORs na forma de *dots* (pontos castanhos) e na forma de *clusters* (aglomerados de *dots* dentro do núcleo). Barras: 10 µm

Os valores obtidos do número total de AgNORs e individualmente *dots* e *clusters* nas células trofoblásticas mononucleadas e gigantes estão descritos nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas mononucleadas em diferentes regiões placentárias ao longo da gestação

Regiões placentárias	AgNOR	I (60 a 120d)	II (121 a 170d)	III (171 a 220d)	IV (221 a 290d)
região central do placentônio	DOT	7.95 ± 4.78 ^a	14.70 ± 1.89 ^b	16.58 ± 1.42 ^b	14.29 ± 3.45 ^b
	CLUSTER	0.71 ± 0.76 ^a	2.10 ± 0.35 ^b	1.12 ± 0.49 ^a	0.84 ± 0.41 ^a
	TOTAL	8,65 ± 5,43 ^a	16,79 ± 2,23 ^b	17,7 ± 1,77 ^b	15,12 ± 3,18 ^b
região marginal do placentônio	DOT	12.84 ± 2.99	15.73 ± 3.03	16.62 ± 2.82	13.92 ± 0.67
	CLUSTER	1.36 ± 0.64 ^a	1.77 ± 0.7 ^a	2.32 ± 0.62 ^b	1.13 ± 0.61 ^a
	TOTAL	14,2 ± 3,2	17,5 ± 3,7	18,9 ± 2,4	15,0 ± 0,9
área interplacentomal	DOT	10.54 ± 2.9 ^a	9.48 ± 2.46 ^a	9.45 ± 2.12 ^a	14.94 ± 2.49 ^b
	CLUSTER	0.99 ± 0.81	0.66 ± 0.91	0.77 ± 0.32	1.29 ± 0.24
	TOTAL	11,52 ± 2,93 ^a	10,13 ± 3,34 ^a	10,21 ± 2,16 ^a	16,22 ± 2,57 ^b
microplacentônio	DOT	14.97 ± 0.54	15.16 ± 0.96	16.31 ± 2.08	14.47 ± 1.83
	CLUSTER	1.23 ± 0.06 ^a	1.1 ± 0.03 ^a	1.94 ± 0.61 ^b	1.07 ± 0.04 ^a
	TOTAL	16,19 ± 0,4	16,26 ± 0,9	18,25 ± 2,1	15,54 ± 1,5
fusão placentomal	DOT	13.94 ± 2.01	15.63 ± 1.55	17.73 ± 4.95	15.56 ± 0.17
	CLUSTER	1.72 ± 0.8 ^a	0.98 ± 0.1 ^a	2.48 ± 0.68 ^b	1.07 ± 0.01 ^a
	TOTAL	15,66 ± 1,26	16,61 ± 1,58	20,21 ± 5,51	16,62 ± 0,18

^{a-b} Valores com letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

Tabela 6 – Média e desvio padrão da quantidade de AgNORs nas células trofoblásticas gigantes em diferentes regiões placentárias ao longo da gestação

Regiões placentárias	AgNOR	I (60 a 120d)	II (121 a 170d)	III (171 a 220d)	IV (221 a 290d)
região central do placentônio	DOT	15.62 ± 6.62 ^a	36.36 ± 5.84 ^b	44.44 ± 6.52 ^b	36.01 ± 12.48 ^b
	CLUSTER	2.04 ± 0.69	4.91 ± 2.93	4.02 ± 2.03	2.56 ± 1.03
	TOTAL	17,66 ± 7,27 ^c	41,28 ± 8,47 ^d	48,46 ± 7,33 ^d	38,56 ± 13,44 ^d
região marginal do placentônio	DOT	34.08 ± 9.57 ^a	50.19 ± 5.67 ^b	52.27 ± 3.58 ^b	38.79 ± 11.16 ^a
	CLUSTER	4.16 ± 2.10 ^{a,b}	5.38 ± 2.46 ^{a,b}	7.19 ± 1.7 ^a	2.35 ± 0.81 ^b
	TOTAL	38,2 ± 10,5 ^a	55,9 ± 8,5 ^b	59,47 ± 4,2 ^b	41,1 ± 11,8 ^a
área interplacentomal	DOT	27.73 ± 13.62	24.79 ± 4.09	25.47 ± 6.54	39.83 ± 5.68
	CLUSTER	2.55 ± 0.78	1.62 ± 1.22	2.48 ± 0.49	2.60 ± 1.16
	TOTAL	19,23 ± 13,56	26,40 ± 4,37	27,95 ± 7,0	42,44 ± 6,73
microplacentônio	DOT	45.97 ± 0.9 ^{a,b}	44.54 ± 3.78 ^a	46.31 ± 6.42 ^{a,b}	49.47 ± 1.68 ^b
	CLUSTER	3.82 ± 0.51 ^a	3.1 ± 0.11 ^a	5.44 ± 1.35 ^b	2.45 ± 0.47 ^a
	TOTAL	49,79 ± 1,1	47,64 ± 3,7	51,74 ± 6,0	51,91 ± 1,6
fusão placentomal	DOT	42.8 ± 8.18	52.16 ± 3.93	49.59 ± 14.02	48.50 ± 2.63
	CLUSTER	4.26 ± 2.17 ^a	3.73 ± 1.09 ^a	6.89 ± 2.08 ^b	2.95 ± 0.54 ^a
	TOTAL	47,06 ± 6,59	55,89 ± 3,57	56,49 ± 16,10	51,44 ± 2,92

^{a-b} Valores com letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

^{c-d} Valores com letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa (p<0,01).

A **região central do placentônio** apresentou um padrão de distribuição de AgNORs semelhante para as suas células trofoblásticas mononucleadas e para as células trofoblásticas gigantes. Ambos os tipos celulares apresentaram um número total de AgNORs significativamente menor no grupo I em relação aos demais grupos gestacionais (p<0,05 e p<0,01, respectivamente).

Em ambos os tipos celulares a quantidade de *dots* foi significativamente menor no grupo I em relação aos demais grupos. Porém, a quantidade de *clusters* variou apenas nas células trofoblásticas mononucleadas no grupo II, o qual

apresentou o maior número de AgNORs. A quantidade de *clusters* das células trofoblásticas gigantes não variou estatisticamente ao longo da gestação.

A **região marginal do placentônio** apresentou variações significativas no número de AgNORs ao longo da gestação. As células trofoblásticas mononucleadas não apresentaram variações significativas no número total de AgNORs. Entretanto, as células trofoblásticas gigantes apresentaram um número significativamente maior de AgNORs nos grupos II e III ($p < 0,05$).

Analisando individualmente a quantidade de *dots* e *clusters* nas células trofoblásticas mononucleadas, observamos que há um aumento progressivo de AgNORs nos primeiros grupos gestacionais, atingindo um número máximo, tanto de *dots* como de *clusters*, no grupo III, decaindo no último grupo gestacional. A variação da quantidade de *dots* não foi significativa ao longo da gestação. A quantidade de *clusters*, por sua vez, foi significativamente maior nas células mononucleadas do grupo III em relação ao grupo IV, o que mostra uma queda acentuada no número de *clusters* no último grupo gestacional, que foi inferior ao encontrado no início da gestação. Nas células trofoblásticas gigantes a quantidade de *dots* foi significativamente maior nos grupos II e III, mas a quantidade de *clusters* foi significativamente maior somente no grupo III e significativamente menor no último grupo gestacional.

A **região interplacentomal** apresentou um equilíbrio na atividade proliferativa através da contagem de AgNORs intranucleares, poucas variações significativas foram observadas nesta região. O número total de AgNORs não variou nas células trofoblásticas gigantes, apenas nas mononucleadas, nas quais foi observado um número significativamente maior de AgNORs no grupo IV ($p < 0,05$).

Analisando individualmente a quantidade de *dots* e *clusters* observamos variação significante apenas na quantidade de *dots* das células mononucleadas, os quais apresentaram um maior número no grupo IV. As células trofoblásticas gigantes não apresentaram variações significantes tanto na quantidade de *dots* ou na quantidade de *clusters* ao longo da gestação.

Os **microplacentônios** apresentaram uma distribuição distinta de AgNORs ao longo da gestação. Tanto as células trofoblásticas mononucleadas como as células trofoblásticas gigantes não apresentaram variações significantes do número total de AgNORs entre os grupos gestacionais.

Nas células trofoblásticas mononucleadas foi observada uma diferença significativa no número de *clusters* das células do grupo III, que apresentaram um número significativamente maior de AgNORs em relação aos demais grupos ($p < 0,01$).

As células trofoblásticas gigantes apresentaram uma queda do número de *dots* no grupo II e em seguida um aumento progressivo até o final da prenhez. Houve diferença significativa entre os grupos II e IV, que apresentaram, respectivamente, o menor e o maior número de *dots* ($p < 0,05$). O número de *clusters* foi significativamente maior nas células do grupo III em relação aos demais grupos gestacionais ($p < 0,01$).

A região de **fusão caruncular** não apresentou variações significativas no número total de AgNORs tanto nas células trofoblásticas gigantes como nas células trofoblásticas mononucleadas. A quantidade de *dots* também não apresentou variações significativas ao longo da prenhez em ambos os tipos celulares, havendo um equilíbrio na atividade proliferativa ao longo da gestação nesta região placentária. A quantidade de *clusters*, por sua vez, foi significativamente maior no grupo III nos dois tipos celulares.

5.3 Citometria de fluxo - análise das fases do ciclo celular e apoptose

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada ao longo da gestação nas células de todas as regiões propostas no material e métodos. Além destas regiões, realizamos uma análise em particular para a soma das regiões central e marginal do placentônio, identificada na tabela 7 como placentônio “total”. A descrição dos resultados foi feita para cada grupo gestacional, com a descrição

apenas das variações estatisticamente significantes. Os resultados descritos a seguir foram publicados em revistas internacionais (Anexos I e II).

A figura 57 mostra um histograma representativo da quantidade de DNA na região interplacentomal de placenta bovina, obtido pelo programa Cell-Quest no citômetro de fluxo FacScalibur (BD).

Figura 57 – Histograma representativo da aquisição no programa Cell-Quest (BD) da quantidade e integridade do DNA (eixo x – FL-2) em relação ao número de células (eixo y – counters) nas fases do ciclo celular (Apoptose – DNA fragmentado; G0/G1 – quiescentes; S – síntese e G2/M – em divisão celular)

No **grupo I** (60 a 120 dias) foi observado um menor número de células na fase G2/M e um maior número de células em G0/G1 nos microplacentônios e fusões placentomais em comparação com a região interplacentomal e a margem dos placentônios, indicando uma baixa atividade proliferativa destas estruturas no início da gestação (Figura 58). Em relação à fase apoptótica, foi observado um número significativamente menor de células em apoptose nos microplacentônios em relação às demais regiões, evidenciando a presença de um menor número de células em morte celular neste período gestacional. Não foram observadas diferenças significantes entre as regiões analisadas no grupo I com relação à fase de síntese (S).

Figura 58 – Distribuição das populações trofoblásticas nas fases do ciclo celular em diferentes regiões placentárias do grupo I (60 a 120 dias). ^{a-b} Barras com letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

No **grupo II** (121 a 170 dias), as variações significativas permaneceram nos microplacentônios e nas regiões de fusão placentomal, como mostra a figura 59. Em relação à fase G2/M, estas regiões permanecem com valores significativamente menores que as demais regiões, apresentando um menor número de células em atividade. Em relação à fase G0/G1, estas regiões apresentaram um número significativamente maior de células em relação às demais regiões. Na fase apoptótica o microplacentônio permanece com um número significativamente menor de células em relação à região interplacentomal e margem dos placentônios. Porém, neste período gestacional observamos um número significativamente menor de células apoptóticas também na região de fusão placentomal, indicando uma menor taxa de morte celular neste período gestacional. Na fase de síntese (S) do grupo II não foram encontradas variações significantes no número de células entre as regiões analisadas. Todas as regiões apresentaram uma média de $3,7\% \pm 0,4$ de suas células em fase síntese de material genético – fase S.

Figura 59 – Distribuição das populações trofoblásticas nas fases do ciclo celular em diferentes regiões placentárias do grupo II (121 a 170 dias). ^{a-b} Barras com diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

No **grupo III** (171 a 220 dias), o número de células em G0/G1 variou significativamente na margem dos placentônios ($p<0,05$) e no placentônio total (centro + margem) em relação aos microplacentônios e fusão placentomal (Figura 60). Estas apresentaram um número significativamente maior de células na fase quiescente. O número de células na fase G2/M foi significativamente maior na margem dos placentônios ($p<0,01$) em relação a fusão placentomal. Surpreendentemente, foi observado um número significativamente maior de células em apoptose na região de margem dos placentônios quando comparada às demais regiões, exceto com o placentônio total (centro+margem). No grupo III não foram encontradas variações significantes no número de células na fase de síntese (S) entre as regiões analisadas.

Figura 60 – Distribuição das populações trofoblásticas nas fases do ciclo celular em diferentes regiões placentárias do grupo III (171 a 220 dias).^{a-b} Barras com diferentes letras diferem estatisticamente ($p<0,05$)

No **grupo IV** (221 a 290 dias), último período gestacional, não foram observadas variações significativas nas fases G2/M, S e G0/G1 (Figura 61). Variações significantes foram observadas no número de células apoptóticas na região de margem do placentônio, a qual apresentou um numero maior de células em relação as demais regiões, exceto o placentônio total (centro+margem).

Figura 61 – Distribuição das populações trofoblásticas nas fases do ciclo celular em diferentes regiões placentárias do grupo IV (221 a 290 dias). ^{a-b} Barras com diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Não houve diferenças significativas na taxa de proliferação entre a região interplacentomal e a região central do placentônio (bem como o placentônio total), apresentando estas regiões valores semelhantes de células em todas as fases do ciclo e em todas as fases gestacionais. Analisando as variações de cada região ao longo da gestação, só houve diferença significativa no microplacentônio, o qual apresentou um número maior de células em G2/M nos grupos I e II em relação ao grupo IV. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular por região placentária e por grupo está detalhada na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das fases do ciclo celular (em %) em regiões distintas da placenta bovina em diferentes estágios de gestação

Fases do ciclo celular	Grupos gestacionais	Região placentária					
		Placentônio			Região interplacentomal	Microplacentônio	Fusão placentomal
		Total*	Região central	Margem			
G2/M	G-I: 70 a 120	20,0 ± 11,4 ^{a,b}	16,7 ± 7,0 ^{a,b}	23,4 ± 15,9 ^a	23,6 ± 3,1 ^a	8,9 ± 6,2 ^{b, B}	7,7 ± 4,3 ^b
	G-II: 121 a 170	20,3 ± 10,2 ^a	18,9 ± 9,3 ^a	21,7 ± 11,1 ^a	18,3 ± 9,3 ^a	7,7 ± 2,1 ^{b, B}	5,4 ± 3,4 ^b
	G-III: 171 a 220	21,6 ± 12,1 ^{a,b}	19,6 ± 13,7 ^{a,b}	23,6 ± 10,6 ^a	17,6 ± 9,4 ^{a,b}	13,1 ± 12,4 ^{a,b}	7,3 ± 4,1 ^b
	G-IV: 221 a 290	18,8 ± 7,7	18,6 ± 5,9	19,0 ± 9,6	18,5 ± 6,5	21,8 ± 8,4 ^A	12,1 ± 11,3
S	G-I: 70 a 120	5,6 ± 3,5	5,7 ± 3,4	5,5 ± 3,6	5,6 ± 2,5	3,7 ± 3,1	3,1 ± 0,3
	G-II: 121 a 170	4,4 ± 0,9	4,6 ± 0,9	4,1 ± 1,1	3,0 ± 1,4	3,2 ± 0,7	3,4 ± 1,1
	G-III: 171 a 220	7,4 ± 4,6	10,2 ± 7,4	4,5 ± 1,8	5,0 ± 4,2	5,5 ± 4,6	3,6 ± 1,6
	G-IV: 221 a 290	5,6 ± 3,3	8,2 ± 4,9	3,0 ± 1,8	3,7 ± 2,6	4,4 ± 3,9	3,0 ± 1,5
G0/G1	G-I: 70 a 120	63,7 ± 16,3 ^{a,b}	67,0 ± 13,8 ^{a,b}	60,4 ± 18,9 ^a	57,0 ± 9,1 ^a	84,3 ± 11,8 ^b	80,5 ± 10,9 ^b
	G-II: 121 a 170	60,5 ± 18,1 ^a	64,6 ± 13,8 ^a	56,5 ± 22,3 ^a	64,3 ± 18,3 ^{a,b}	86,4 ± 2,0 ^b	87,7 ± 3,9 ^b
	G-III: 171 a 220	54,2 ± 20,7 ^a	62,2 ± 18,1 ^{a,b}	46,2 ± 23,4 ^a	67,6 ± 15,7 ^{a,b}	78,8 ± 18,5 ^b	83,0 ± 7,1 ^b
	G-IV: 221 a 290	56,1 ± 17,8	62,5 ± 10,0	49,8 ± 25,7	65,1 ± 15,8	71,2 ± 11,0	73,5 ± 22,1
Apoptose	G-I: 70 a 120	10,7 ± 8,5 ^a	10,6 ± 8,5 ^a	10,7 ± 8,5 ^a	13,7 ± 9,8 ^a	3,0 ± 2,6 ^b	8,6 ± 8,5 ^a
	G-II: 121 a 170	14,8 ± 8,9 ^a	12,0 ± 5,7 ^{a,b}	17,7 ± 13,3 ^a	14,4 ± 8,9 ^a	2,7 ± 0,4 ^b	3,5 ± 0,7 ^b
	G-III: 171 a 220	16,9 ± 7,9 ^{a,b}	8,0 ± 3,7 ^b	25,7 ± 13,9 ^a	9,7 ± 8,2 ^b	2,7 ± 2,1 ^b	6,1 ± 3,3 ^b
	G-IV: 221 a 290	19,5 ± 8,3 ^{a,b}	10,7 ± 4,7 ^b	28,2 ± 17,2 ^a	12,7 ± 10,3 ^b	2,6 ± 1,1 ^b	11,4 ± 9,4 ^b

^{a-e} Valores (média ± DP) com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05).

^{A-B} Valores (média ± DP) com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05).

* “total” significa: região central do placentônio + margem do placentônio

6 DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão dos dados comparados com outros estudos realizados, dividimos esta discussão em três tópicos principais, sendo:

6.1 Aspectos macroscópicos;

6.2 Aspectos microscópicos: histologia e marcação histoquímica;

6.3 Citometria de fluxo: fases do ciclo celular e apoptose.

6.1 Aspectos macroscópicos

A placenta dos animais há muitos anos estimula a curiosidade dos pesquisadores, sendo atualmente utilizadas as mais diversas técnicas para analisar sua estrutura. Por ser um órgão transitório, bastante dinâmico e mutável, são difíceis mensurações exatas, principalmente quando se analisa grupos de diferentes idades gestacionais.⁵

A placenta de bovinos segundo Miglino (1991) é do tipo cotiledonária, ou seja, constituída por cotilédones, palavra derivada do grego *Kotyle*, que significa “copo”. A autora relata que cada proeminência convexa ou carúncula materna corresponde a um cotilédone fetal côncavo e o conjunto recebe o nome de placentônio, cujo sufixo é característico de unidades morfofuncionais, amplamente utilizadas em outros órgãos. Assim, o termo “placentoma” (MARSHALL, 1952; BARONE, 1976; NODEN, DELAHUNTA, 1990) tem sido criticado por alguns autores, tais como Björkman (1954). Miglino (1991) evitou o termo “placentoma”, optando por “placentônio” à semelhança com os nomes de outras unidades morfofuncionais, levando em consideração que o sufixo “-oma” está frequentemente associado a neoplasias. No presente trabalho utilizou-se o termo placentônio.

O formato do **placentônio** é muito variado, mas existe um consenso entre os autores em afirmar que os placentônios apresentam a forma ovóide (GROSSER, 1909; DRIEUX; THIERY, 1951; ABDEL-RAOUF et al., 1966; MIGLINO, 1991;

CARAMBULA et al., 1996; FEITOSA JUNIOR, 1997). Observamos neste estudo a presença de formatos variados de placentônios, com a predominância dos ovóides. Marshall (1952) e Abdel-Raouf et al. (1966) afirmam que os placentônios apresentam variações de tamanho, forma e estrutura, abrangendo todas as formas irregulares apresentadas pelos placentônios em fusão. Ram e Chandra (1984) afirmam que os placentônios apresentam, no início da gestação, formato esférico, em ferradura, em forma de feijão ou de rim. Todos estes formatos podem ser considerados como ovóides, enquanto que os formatos em forma de cogumelo, “S” ou em forma de conta observados no meio e no final da gestação constituem formatos totalmente irregulares, característicos de fusão entre os placentônios. Os mesmos autores afirmam que no meio e no final da gestação observaram placentônios com forma elíptica que também corresponde à forma ovóide.

A disposição dos cotilédones na placenta de ruminantes não é inteiramente irregular, mesmo nos desenhos de Leonardo da Vinci (KELLY, 1983) é visto fileiras de cotilédones. De acordo com Marshall (1952) e Bjorkman (1954) o arranjo linear dos cotilédones nos ruminantes resulta em quatro fileiras, dispostas seguindo as curvaturas maior e menor dos cornos uterinos. A disposição dos placentônios em quatro fileiras, duas de cada lado da implantação do cordão umbilical, foi descrita por diversos autores (HAFEZ, 1954; 1955; ABDEL-RAOUF et al., 1966; DUFTY, 1974; ROBERTS, 1999; SLOSS; DUFTY, 1980; LATSHAW, 1987; HRADECKY et al., 1988; MIGLINO, 1991; CARAMBULA et al., 1997) e observada nos resultados apresentados neste estudo. Foi observada a presença de duas fileiras dorsais e duas ventrais de carúnculas, ao longo do comprimento dos cornos uterinos a cada lado da implantação do hilo da placenta, como descrito por Noden e Lahunta (1985); Miglino (1991) e Neves (1996). As fileiras de cotilédones estavam presentes em ambos os cornos uterinos e em todas as idades gestacionais, porém em muitos casos foram observados grupos de placentônios isolados ou irregularmente distribuídos, fora do alinhamento nas fileiras.

Em relação à quantidade de placentônios por placenta, diversos autores observaram o número médio de placentônios em diferentes raças bovinas. Há uma variação no limite superior e inferior para cada autor, como mostra a tabela 8.

Tabela 8 – Número de carúnculas ou placentônios em várias espécies de ruminantes

AUTOR E ANO DE PUBLICAÇÃO	NÚMERO DE CARÚNCULAS OU PLACENTÔNIOS
SILVA et al., 2004	38 a 106
MIGLINO, 1991	54 a 147
LATSHAW, 1987	70 a 140
JAINUDEEN e HAFEZ, 1995	70 a 120
AMOROSO, 1952	70 a 142
NODEN e LAHUNTA, 1990	75 a 120
SCWARZE et al., 1950	80 a 120
GROSSER, 1909	80 a 120
LEISER et al., 1994	80 a 140
BARONE, 1976	100 a 120
DRIEUX e THIERY, 1951	120 a 140

No presente estudo foram analisadas 28 placentas de animais mestiços, observando em média 76 placentônios por placenta, sendo o máximo encontrado de 102 e o mínimo de 47, dados estes mais próximos aos descritos por Silva et al. (2004), que encontraram um máximo de 106 e um mínimo de 38 placentônios.

Foram encontradas diferenças quanto ao número de placentônios no corno gestante e não gestante nas 24 placentas analisadas. O corno gestante apresentou um número maior de placentônios em 95% das placentas analisadas, observação também realizada por Miglino (1991) e Silva et al. (2004). Muitos outros autores observaram um número de placentônios no corno gestante que pode chegar até 150% maior do que no corno não gestante em bovinos (BERGMAN, 1922) ou até a 600% em búfalos (HAFEZ ,1955). Bhosrekar et al. (1972) afirmam que o corno gestante pode apresentar até 60 % a mais de placentônios em relação ao corno não gestante, em vacas azebuadas, fato confirmado por Kadu e Kaikini (1974) que observam um percentual de 62,8 % no corno gestante, em vacas zebuínas.

O presente estudo encontra uma média de 46 placentônios no corno gestante e 30,5 no corno não gestante, abaixo da média encontrada por Abdel-Raouf e Badawi (1966), que notificaram 68 cotilédones em média no corno gestante e 55 no corno não gestante, e Miglino (1991), que observou 65 cotilédones no corno gestante em média e 27 no corno não gestante.

A variação no número total de placentônios foi pequena ao longo da gestação, havendo apenas uma elevação ao redor do 121-170 dias de gestação (grupo II), resultado também observado por Laven e Peters (2001), sugerindo que o feto não reage à grande demanda nutricional no terço final da prenhez para a formação de mais cotilédones para as carúnculas já disponíveis na parede uterina.

Ao estabelecer uma correlação entre o corno uterino e o tamanho predominante de placentônios, nossos resultados são semelhantes aos relatados por Miglino (1991), quanto ao corno gestante, com uma predominância de placentônios de tamanho médio neste corno uterino. Porém, quanto ao corno não gestante, os resultados divergem dos da autora, que notificou média maior entre os placentônios de tamanho médio. Em nossos estudos o corno não gestante apresentou uma maior quantidade de placentônios pequenos, quase três vezes maior que a média de placentônios do tamanho médio.

As **fusões** carunculares foram primeiramente descritas em 1976 por Zieger e Zschiesche, porém, pouco é conhecido sobre o papel destas estruturas no desenvolvimento placentário. Observações da presença de vários graus de fusão de placentônios foram realizadas posteriormente por Miglino (1991); Carambula et al. (1996) e Feitosa Junior (1997), também observada e avaliada neste estudo. Miglino afirma que os cotilédones vizinhos podem se fundir em diversos graus, o que está de acordo com o encontrado neste estudo, nas quais as fusões carunculares localizadas se apresentavam em diferentes fases, inclusive com a fusão ou não dos cotilédones correspondentes. As fusões placentomais foram facilmente visíveis macroscopicamente, o que está de acordo com os achados de Pereira et al. (2006), os quais afirmam as fusões serem visualizadas com facilidade devido à presença da fissura fusional, localizada antes da desconexão cotilédone-carúncula.

As fusões placentomais foram localizadas em locais aleatórios da placenta bovina, porém, Pereira et al. (2006) localizou grande parte destes processos de fusão na linha antimesometrial na região média do corno uterino em gestações

bovinas normais. Neste estudo, observamos fusões placentomais em ambos os cornos uterinos, exceto no grupo I, no qual estas foram localizadas apenas no corno gestante. Com exceção do grupo II, as fusões placentomais foram observadas em maior quantidade no corno gestante. Estes dados evidenciam que a maior quantidade de fusões ocorre predominantemente no corno gestante, independente da fase gestacional.

A variação no número de fusões carunculares foi observada por Pereira et al. (2006), que afirmam apresentarem variações no seu tamanho e número em todas as fases gestacionais. Neste estudo encontramos um número bastante variável de fusões, porém, foi observado que sua quantidade aumenta progressivamente até 220 dias de prenhez, se mantendo em número estável até o final da gestação. Santos et al. (2006) e Miglino et al. (2007), analisando a placenta a termo de gestações de clones bovinos, observaram a presença de uma grande quantidade de megaplacentônios, sugerindo que estes provavelmente foram formados pela fusão de vários placentônios de menor tamanho. Os autores sustentam esta hipótese devido à presença de grandes áreas na placenta completamente desprovidas de placentônios ou carúnculas.

A classificação macroscópica das fusões carunculares foi proposta por Pereira et al. (2006), na qual afirmam existirem dois formatos de fusão: ovais (mais frequentes) e lobulados. Concordamos com esta classificação macroscópica, a qual leva em consideração o formato resultante da fusão das carúnculas, porém, neste estudo realizamos uma avaliação apenas da região de fusão, classificando este processo somente após a desconexão do cotilédone da carúncula. Desta forma, observamos diferentes tipos de fusão: fusão de carúnculas, fusão de cotilédones e fusão de placentônios (carúncula e cotilédone), sendo estas observadas de forma independente ao longo da gestação. Estes dados divergem dos encontrados por Pereira et al. (2006), que afirmam não haver nenhum indício de fusão cotiledonária, sugerindo que a fusão caruncular ocorra antes da total fixação do cotilédone no epitélio caruncular.

Áreas “nuas” foram localizadas em todas as fases gestacionais, não havendo, portanto, nenhuma correlação entre a presença de áreas “nuas” e a idade gestacional. A presença destas regiões também foi observada por Miglino et al. (2007) em placenta de bovinos clonados a termo. Os autores se referem a estas regiões como áreas livres de cotilédones e de membrana corioalantoideana. Nas

placentas com a presença de muitos megaplacentônios no corno gestante, foi observada uma área “nua” mais extensa no corno não gestante, com um menor número de placentônios neste corno. Este fato sugere que no caso de uma elevada demanda nutricional para o feto, o corno gestante apresenta um desenvolvimento máximo de seus placentônios, enquanto que o corno não gestante tem a sua formação de placentônios reduzida, com um menor desenvolvimento de cotilédones para as carúnculas correspondentes.

6.2 Aspectos microscópicos

A placenta dos ruminantes é caracterizada quanto às camadas da membrana inter-hemática como sinepiteliocorial por Amoroso (1952); Latshaw (1987); Leiser e Kaufmann (1994) e Enders et al. (1998), com a presença de todas as seis camadas que compõem a barreira hemato-placentária. No entanto, alguns autores como Lordy (1940); Amoroso (1952) e Latshaw (1987) classificam a placenta de ruminantes como sindesmocorial. Posteriormente, Leiser et al. (1998) e Dantzer (1999) descrevem-na nos bovinos como sinepiteliocorial, sendo esta um sub-tipo da placenta epiteliocorial devido ao fato das células binucleadas migrarem para o epitélio uterino. A capacidade das células binucleadas de migrarem e se fundirem com as células do epitélio materno resulta na formação de placas sinciciais, por isto a classificação da placenta dos ruminantes como sinepiteliocorial (WOODING, 1992). Concordamos com esta última classificação, levando em consideração que a migração das células binucleadas ocorre em todos os períodos gestacionais.

Examinando os cortes histológicos de diferentes regiões da placenta de bovinos, mais precisamente das carúnculas uterinas, o epitélio encontrado foi do tipo cúbico, semelhante às descrições feitas por King et al. (1979, 1980). O epitélio caruncular da placenta de ruminantes foi descrito como sendo formado por células cuboidais ou colunares em bovinos (BJÖRKMAN; SOLLÉN, 1960; KING et al., 1979, 1980) em ovinos (DAVIES; WINSATT, 1966) e nos búfalos (KATHIRESAN et al., 1992), o que é sustentado pelos resultados dessa pesquisa durante todas as fases gestacionais estudadas. O epitélio uterino bovino mostrou-se simples e cúbico,

diferindo apenas na manutenção dessa uniformidade ao longo da gestação. Foram observadas áreas esporádicas com epitélio uterino colunar. O epitélio uterino evidenciou a presença de algumas células gigantes, binucleadas ou multinucleadas, como resultado da migração do epitélio coriônico e posterior fusão ao epitélio materno. Estas células migradas foram facilmente identificadas, pois possuem tamanho muito maior que as mononucleadas, núcleos esféricos e são coradas mais intensamente que as células adjacentes.

Alguns autores observaram a diminuição e o achatamento de células maternas nas criptas das carúnculas uterinas, como Grunert (1986); Marques Junior (1988); Barreto Filho (1992) e Barreto Filho e Marques Junior (1993). Neste estudo também foi observada a diminuição celular, principalmente no final da gestação, sugerindo um processo fisiológico de maturação placentária. Além da desorganização e achatamento do epitélio materno, notamos uma menor adesão entre os epitélios das criptas carunculares e dos vilos fetais no final da gestação, o que segundo Jeffrey, Ehlich e Roswit (1991) se deve aos períodos alternados de hiperemia e isquemia e às enzimas proteolíticas, como a colagenase, que diminuem a adesão da matriz extracelular na interface materno-fetal. A proteólise do cotilédone e a diminuição da adesividade na interface carúncula-cotilédone resultam na liberação placentária sendo, portanto, um processo fisiológico. Segundo Gross et al. (1985), a atividade destas enzimas é aumentada nas vilosidades de vacas saudáveis e diminuída em vacas com retenção placentária. Com o início das contrações uterinas há uma compressão mecânica dos placentônios, induzindo o relaxamento das vilosidades coriônicas, o qual favorece o desprendimento dos cotilédones (GROSS; WILLIAMS, 1986).

A camada de células trofoblásticas é formada por uma camada com predominância de células mononucleadas e, entremeadas a estas células, encontraram-se as células trofoblásticas gigantes, binucleadas ou não, da mesma forma que o observado nos ruminantes por Steven (1984); King e Atkinson (1987); Leiser e Kaufmann (1994); Enders et al. (1998); Leiser et al. (1998) e Dantzer (1999) e, mais especificamente, em bovinos por Björkman e Sollén (1960); King et al. (1980) e Latshaw (1987).

As células trofoblásticas binucleadas estavam presentes em todos os grupos gestacionais aqui estudados, confirmando os achados de Winsatt (1980) em placentas cotiledonárias. Encontramos células trofoblásticas gigantes ao longo de

toda a gestação, sendo estas binucleadas ou com a presença de apenas um núcleo gigante. As células trofoblásticas gigantes ocupam diferentes posições entre as células mononucleadas da placenta, fato também observado por Winsatt (1980). O autor sugere que esta variação no posicionamento destas células pode estar relacionada com um processo de maturação, pois para liberarem seus grânulos na interface materno-fetal, estas células se aproximam do epitélio uterino ao longo do tempo de sua formação. Na região interplacentomal, foram observadas áreas de aberturas de glândulas uterinas, as aréolas, sendo estas regiões ausente de contato entre córion e endométrio. Durante a gestação, um fluido albuminoso rico em proteínas é liberado na região interplacentomal, entre o epitélio uterino e o cório. Este fluido é absorvido pelo trofoblasto, sendo uma importante fonte de nutrientes para o feto (GRAY et al., 2001; DANTZER, 2002; MOSSMAN, 1987). Além da importância na nutrição histiotrófica fetal, a região interplacentomal possui um importante papel no transporte ativo de cálcio pela placenta de ruminantes (NIKITENKO et al., 1998)

A região marginal dos placentônios foi caracterizada neste estudo pela presença de hematomas a partir do 157º dia de gestação, com um aumento da frequência destes com o avançar da prenhez. Cazerta et al. (2007) denominam a região marginal do placentônio como “zona arcada” do placentônio em ovelhas e cabras. Estes autores revelam que em pequenos ruminantes esta região é caracterizada pela presença de extravasamento de sangue, com o surgimento de áreas hemófagas. O epitélio desta região em placentônios bovinos é modificado, sugerindo propriedades secretórias, absorptivas e fagocíticas que facilitam a nutrição fetal. Além disso, as áreas hemófagas da placenta bovina parecem ser importantes sítios de transferência de ferro mãe para o feto (WIMSATT, 1950; MURAI; YAMAUCHI, 1986; LATSHAW, 1987; MOSSMAN, 1987; SANTOS et al., 1996; PEREIRA, 2004), os quais podem estar envolvidos na hematopoiese fetal (CAZERTA et al., 2007).

Nas áreas hemófagas, as hemácias maternas extravasadas são fagocitadas pelo trofoblasto, tornando possível a observação de hemácias digeridas no interior destas células, indicando um processo de eritrofagocitose. Estas áreas estavam presentes a partir do grupo II, tornando-se mais intensas com o avançar da prenhez, dados estes que estão de acordo com Pereira et al. (2004), os quais afirmam estas

áreas serem mais freqüentes nas etapas finais da gestação, aos 9-10 meses de prenhez, sugerindo uma maior demanda de ferro fetal com o avançar da prenhez.

As **fusões placentomais** analisadas neste estudo apresentaram aspectos histológicos variáveis, sem correlação entre a idade gestacional e o tipo morfológico de fusão. Observando histologicamente as fusões placentomais, Pereira et al. (2006) relatam que a fissura fusional é formada por um eixo de estroma endometrial de idêntica constituição histológica do estroma criptal, sendo este mais largo e perpendicular ao pedúnculo, além de se estender sem grandes ramificações linearmente da base ao ápice da carúncula, apresentando vasos sanguíneos de maior calibre. De acordo com os autores, esta é a fusão classificada como verdadeira, com a determinação de mais dois tipos distintos de fusão: pseudofusão, com dois eixos paralelos se comunicando entre si formando um “H” e a falsa fusão onde não há eixo fusional abaixo da fissura. Complementando os tipos citados, encontramos neste estudo uma quarta característica de fusão, com a presença de mesênquima fetal perpendicular ao pedúnculo caruncular. Segundo Pereira et al. (2006) há a presença de células trofoblásticas gigantes migradas no eixo fusional, no estroma e no epitélio materno em todas as fases gestacionais. Nesta região foi observada a presença de áreas com extravasamento sanguíneo e muitas células trofoblásticas em eritrofagocitose, sugerindo esta região contribuir para a transferência de ferro entre mãe e feto.

6.2.1 Expressão de marcador histoquímico de proliferação celular - AgNORs

O protocolo original para a coloração com Nitrato de Prata foi realizado por Howell e Black em 1980, porém, atualmente diversas técnicas para esta coloração já foram estabelecidas, de acordo com o tipo de fixação das amostras e o tipo de tecido a ser analisado. O método de coloração por Nitrato de Prata foi originalmente descrito por Ploton et al. (1986) e posteriormente modificado por Ofner et al. (1992) para amostras fixadas em formalina. Neste estudo foi utilizado o protocolo de

coloração de Aubele et al. (1994) com algumas adaptações e variações no tempo de incubação, os quais apresentaram diferenças entre as regiões analisadas.

Foram identificadas AgNORs em todos os tipos celulares do epitélio trofoblástico, com marcação nos núcleos de células mononucleadas e células gigantes, inclusive nas binucleadas. Em análise imunohistoquímica com o antígeno de proliferação Ki-67, Schuler et al. (2000) também observaram marcação positiva nas células mononucleadas e nas células trofoblásticas gigantes. Os mesmos autores encontraram reação positiva também nas células binucleadas. Como as células trofoblásticas gigantes são consideradas como células que não se dividem completamente, presumivelmente estas células Ki-67 positivas são células trofoblásticas gigantes imaturas em estágios de multiplicação do genoma (KLISCH et al., 1999), fato este que também pode estar relacionado à presença de um grande número de AgNORs nas células binucleadas.

Todas as regiões analisadas apresentaram um maior número de AgNORs nas células trofoblásticas gigantes do que nas células mononucleadas. Wooding e Wathes (1980) afirmam que a função normal de uma célula trofoblástica gigante madura em todos os estágios da prenhez de bovinos é a sua migração para o epitélio uterino para a liberação de seus grânulos e em seguida sua condensação a uma célula remanescente, a qual será fagocitada pelo epitélio coriônico. Estas células produzem proteínas e, através da liberação de seus grânulos, secretam e transportam substâncias para o organismo materno. Além de proteínas, estas células também sintetizam progesterona (REIMERS et al., 1985; ULLMAN; REIMERS, 1989; BOSS et al., 2003, 2006), importante para a manutenção da homeostase na interface materno-fetal, atuando no crescimento e diferenciação celular como também na regulação placentária (BOSS et al., 2003). Essa intensa atividade de síntese e secreção de substâncias pode explicar a grande quantidade *clusters* apresentada nestas células, já que estes estão relacionados a uma proliferação de maneira mais intensa e desordenada nos tecidos (TREERE, 2000), sugerindo uma alta atividade de síntese destas células entre 171 a 220 dias de gestação.

Analisando individualmente cada região placentária, foi observado que muitas delas não apresentaram variações significativas quanto ao número total de AgNORs, porém, foi encontrada variação significativa quanto ao número de *clusters*.

A região central do placentônio apresentou uma menor quantidade de AgNORs no grupo I em todas as células trofoblásticas, demonstrando uma atividade proliferativa menor no início da gestação. Hoffmann e Schuler (2002) determinaram a atividade proliferativa através de marcação imunohistoquímica com o antígeno Ki-67 em diversos tipos celulares no placentônio bovino. Os achados destes autores indicam que as células trofoblásticas apresentaram uma maior porcentagem de células positivas no placentônio com 220 dias de gestação, decaindo ao seu menor valor com 240 dias. Estes resultados estão de acordo com o encontrado neste estudo, no qual observamos uma maior quantidade de AgNORs na região central do placentônio no grupo III (171 a 220 dias), decaindo no último grupo gestacional. Mas ao analisarmos separadamente as células trofoblásticas, observamos que a maior atividade proliferativa ocorre nas células trofoblásticas gigantes, com um valor maior que o dobro do encontrado nas células mononucleadas.

Na margem do placentônio, o maior número total de AgNORs foi observado nos grupos II e III nas células trofoblásticas gigantes, enquanto que a quantidade de *clusters* foi significativamente maior no grupo III nos dois tipos celulares. Analisando o placentônio como um todo, observamos que a região central inicia uma atividade proliferativa mais intensa no grupo II, observada pelo número de *clusters*, enquanto que a margem do placentônio apresenta uma maior quantidade de *clusters* no grupo III. Estes dados sugerem que a região central do placentônio inicia uma intensa atividade proliferativa, em prior a sua margem, Porém, observando o número total de AgNORs nas células trofoblásticas gigantes, nota-se que a atividade proliferativa na margem do placentônio diminui significativamente no último grupo gestacional, enquanto que na região central do placentônio esta atividade se mantém estável até o final da gestação, sem variações significativas. Os microplacentônios e fusões placentomais não apresentaram variações significantes no número total de AgNORs ao longo da gestação, apenas na análise individual entre *dots* e *clusters*. Ambas as regiões apresentaram uma maior quantidade de *clusters* no grupo III, sugerindo uma intensa atividade proliferativa neste período gestacional.

A área interplacentomal apresentou um padrão diferenciado na quantidade de AgNORs ao longo da gestação, com valores que permaneceram sem alterações significativas até 220 dias de prenhez, o que é consistente com a composição uniforme do trofoblasto bovino nesta região durante a maior parte da gestação (WOODING; WATHES, 1980). Em uma análise geral, observamos nas células

trofoblásticas mononucleadas interplacentomais um maior número de AgNORs no último grupo gestacional, sugerindo uma maior atividade proliferativa destas células no final da prenhez. Este aparente equilíbrio na atividade proliferativa da região interplacentomal na maior parte da gestação pode estar relacionado com o estudo realizado por Boos et al. (2006), que utilizaram a marcação com Ki-67 nas células da região interplacentomal. Estes autores sugerem que a proliferação celular não é o principal fator responsável pelo crescimento da massa uterina interplacentomal, na qual não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de células marcadas no epitélio trofoblástico.

Utilizando uma técnica acurada e acessível para medir a atividade proliferativa celular na placenta bovina, obtivemos neste estudo a presença de padrões específicos não somente para cada tipo de célula trofoblástica, mas também para cada região específica da placenta ao longo da gestação.

6.3 Fases do ciclo celular e apoptose

Nossos achados por citometria de fluxo indicam que as taxas de proliferação e apoptose celular apresentam variações de acordo com a região placentária e o estágio gestacional em que se encontram as células. Analisando as fases do ciclo celular foi encontrado um elevado desvio padrão entre as amostras, provavelmente devido à grande variação na proporção de células coriônicas:uterinas. Porém, a finalidade deste estudo foi determinar a atividade proliferativa e apoptótica nas células de todas as regiões placentárias propostas, analisando a região como um todo, incluindo tecidos materno e fetal, portanto, um elevado desvio padrão já era esperado.

Em uma análise da região central juntamente com a região marginal do placentônio, ou seja, o placentônio como um todo, observamos que o número de células envolvidas com a proliferação é inversamente proporcional ao número de células em apoptose ao longo da gestação. Esta característica não foi observada quando as regiões foram analisadas separadamente. De acordo com Boos et al. (2003), a apoptose reflete o início da regeneração tecidual e a nutrição histiotrófica do feto, a qual consiste na fagocitose de células epiteliais maternas apoptóticas.

Estas variações fazem parte do processo de maturação placentária o qual, de acordo com Bjorkman (1954) e Stallmach et al. (2001), pode ser um pré-requisito para a desconexão materno-fetal e a liberação das membranas fetais. Estas variações não foram detectadas em placentas provenientes de gestações de bovinos clonados. Utilizando citometria de fluxo, Rici et al. (2008) observaram uma maior atividade proliferativa e uma menor taxa de apoptose na região central dos placentônios e áreas interplacentomais. Este fenômeno pode estar associado a falhas placentárias no início da prenhez, insuficiência ou mesmo a falta de maturação da placenta ou feto que frequentemente ocorrem no final da prenhez.

A região marginal do placentônio analisada separadamente da região central, apresentou um aumento prematuro de células em apoptose, com um número significativamente maior de células apoptóticas nos grupo III e IV em relação às demais regiões analisadas. Segundo Pfarrer et al. (1999), a apoptose no decorrer da gestação pode mesmo estar envolvida no remodelamento do órgão e homeostase tissular, mas ao final sugere uma função de eliminação das células produtoras de sinais progestagênicos. De acordo com Leers et al. (1999) o elevado número de células em apoptose no final da gestação ocorre como um mecanismo associado à desconexão dos tecidos maternos e fetais. Portanto, o alto número de células apoptóticas na região da margem do placentônio a partir de 170 dias sugere que esta região seja o ponto de início da desconexão placentomal. Neste contexto, podemos considerar a margem do placentônio uma região importante na maturação e liberação placentária. Com estes resultados, podemos inferir que o processo de desconexão placentomal se dá de forma centrípeta, ou seja, a maturação ocorre da margem para o centro do placentônio.

Procedimentos realizados com a técnica de TUNEL e com o marcador de proliferação Ki-67 demonstraram que a proliferação não é o principal fator responsável pelo crescimento na região interplacentomal, incluindo as membranas fetais aderidas, região na qual o crescimento ocorre principalmente por hipertrofia (BOOS et al., 2006). Os achados deste estudo somam-se às nossas observações na região interplacentomal, a qual não mostrou variações significantes ao longo da gestação, sugerindo que a proliferação tem uma menor importância para a homeostase tecidual na região interplacentomal.

Neste estudo, o microplacentônio apresentou padrões diferenciados de proliferação e apoptose ao longo da gestação. Com a diminuição do número de

células na fase G0/G1, houve um aumento proporcional no número de células em G2/M, o que indica uma progressão no ciclo celular, já que as células saíram do seu estado quiescente para entrar em proliferação. O número de células em G2/M aumentou ao longo da gestação, com variações significativas nos grupos I e II em relação ao grupo IV. Por outro lado, a proporção de células em apoptose no microplacentônio se manteve em níveis baixos e estáveis em todos os períodos gestacionais, com valores significativamente menores em relação às demais regiões no grupo I; ao placentônio total (região central + margem), à margem do placentônio e região interplacentomal no grupo II e à margem do placentônio nos grupos III e IV. Estes resultados sugerem que os microplacentônios possuem uma taxa proliferativa mais lenta nos grupos I e II, o que pode ser a razão de seu tamanho reduzido na placenta bovina. Aparentemente, estas estruturas permanecem em estado quiescente no grupo I, com pouca remodelação tecidual, não seguindo o padrão de maturação e crescimento observado em placentônios de tamanho normal. Além disso, as observações descritas acima estão relacionadas a uma contribuição relativamente pequena destas estruturas, não contribuindo significativamente para as funções placentárias normais ou no desenvolvimento do conceito ao longo da gestação.

Em relação às outras regiões, a fusão placentomal apresentou uma menor atividade proliferativa no início da gestação (Grupos I e II), semelhante aos microplacentônios. No grupo IV, o número de células em G2M aumentou, porém também aumentou o número de células em apoptose, demonstrando um equilíbrio entre proliferação e morte celular. A região de fusão é formada por um eixo de estroma endometrial (PEREIRA et al., 2006) e, de acordo com nosso estudo, as células desta região estão em equilíbrio, sugerindo que o estroma materno na região de fusão participa na manutenção fisiológica da gestação, porém pouco contribui para a maturação e liberação placentária.

Procedimentos laboratoriais com manipulação de embriões bovinos estão frequentemente associados ao desenvolvimento de anormalidades nos fetos e bezerros (FARIN; FARIN, 2000; WILLADSEN et al, 1991; KEEFER et al, 1994; WILSON et al, 1995). Quando se trata de transferência de embriões produzidos *in vitro* (FIV) ou por transferência nuclear (TN) as anormalidades descritas incluem alta taxa de morte embrionária e aborto, produção de fetos e bezerros gigantes, má-formações no esqueleto e anormalidades na vascularização e desenvolvimento

placentários. Estas anormalidades têm sido consideradas como um fator limitante do sucesso das gestações de bovinos derivadas de fertilização *in vitro* (FIV) e procedimentos de transferência somática de células nucleares (TSCN) (BERTOLINI et al., 2007; LONERGAN et al., 2007). Estudos recentes revelam alterações distintas na estrutura e na microvascularização placentária em gestações bovinas provenientes de FIV e clonagem (MILES et al., 2005; MIGLINO et al., 2007), com a descrição de um número significativamente maior de microcotilédones, dilatação das criptas carunculares, anormalidades na vascularização, remodelamento, diferenciação e maturação do tecido placentário no terço médio e final da prenhez. Neste período, qualquer alteração no desenvolvimento ou na formação da placenta afeta o desenvolvimento fetal e o sucesso da gestação (REDMER et al., 2004), com alterações na apoptose nas células placentárias, levando a uma gestação anormal (RUNIC et al., 1996; HUNT et al., 1997; UCKAN et al., 1997; GULLER, LACHAPELLE, 1999). Falhas gestacionais representam um problema econômico de grande impacto na indústria bovina. A melhor compreensão dos padrões proliferativos e apoptóticos em regiões placentárias distintas ao longo da gestação podem ajudar a elucidar processos fisiológicos desconhecidos relacionados ao desenvolvimento do conceito e como algumas regiões podem ser potencialmente responsáveis, em diferentes graus de influência, pelo crescimento e nutrição fetal ao longo da prenhez.

7 CONCLUSÕES

- Os placentônios bovinos apresentam variações macroscópicas consideráveis ao longo da prenhez, com aumento de tamanho progressivo e sem variações significativas quanto ao número total. O corno gestante manteve um número estável de placentônios ao longo da gestação, porém, o corno não gestante apresentou um menor número de placentônios a partir de 171 dias de prenhez.
- O número de microplacentônios foi observado de uma maneira decrescente ao longo da gestação, predominante no corno não gestante. O inverso ocorre com as fusões placentomais, as quais aumentam em número com o avançar da gestação e predominam no corno gestante.
- A coloração das NORs por Nitrato de Prata se mostrou uma técnica acurada e acessível para medir a atividade proliferativa das diferentes células trofoblásticas. Através da contagem de AgNORs, concluímos que as células trofoblásticas gigantes apresentam uma maior atividade proliferativa em relação às mononucleadas em todas as regiões placentárias e fases gestacionais.
- Na região central do placentônio, obtivemos pela contagem de AgNORs uma maior atividade proliferativa das células trofoblásticas a partir de 171 dias de prenhez, dados confirmados com a proliferação celular através da citometria de fluxo, com um aumento no número de células em G2/M a partir da mesma idade gestacional.
- A margem do placentônio apresenta áreas de extravasamento sanguíneo e células trofoblásticas em eritrofagocitose, processo este que se torna mais intenso com o avançar da gestação. A intensificação destes hematomas ocorre simultaneamente ao aumento da apoptose das populações trofoblásticas desta região, observada por citometria de fluxo, sugerindo ser esta região o ponto de início da desconexão placentomal, sendo este um processo fisiológico para a maturação e liberação placentária.

- As fusões placentomais são histologicamente formadas por tecido materno e fetal, em sua maior parte tecido conjuntivo, perpendicular ao pedúnculo caruncular, diminuindo a superfície de contato entre os epitélios materno e fetal. Na região de fusão houve um equilíbrio entre as células em atividade proliferativa e em morte celular, detectadas pela citometria de fluxo e AgNORs, sugerindo que este estroma materno participa na manutenção fisiológica da gestação, porém pouco contribui para a maturação e liberação placentária.

Estas análises em conjunto revelam particularidades macroscópicas, histológicas e metabólicas distintas para cada região placentária. Há uma contribuição diferenciada de cada região no crescimento da placenta bovina, cada uma delas participando de maneira mais ou menos intensa no processo de maturação e desconexão placentária e no crescimento e nutrição fetal ao longo da prenhez.

A melhor compreensão histológica e dos padrões proliferativos e apoptóticos através de diferentes técnicas poderá ajudar a elucidar processos fisiológicos desconhecidos relacionados ao desenvolvimento do conceito e a falhas gestacionais. Estes padrões de normalidade estabelecidos em diferentes regiões placentárias através de técnicas distintas poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de falhas gestacionais que levam a anormalidades fetais e placentárias, muito comuns em técnicas avançadas de manipulação embrionárias, como a fertilização *in vitro* e a clonagem animal.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, M.; BADAWI, H. M. Morphological study of uterine caruncles in Egyptian Buffalo Cows. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 13, n. 1, p. 252-263, 1966.
- AMOROSO, E. C. Placentation. In: PARKES, A. S. (Ed.) **Marshall's Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Longmans, p. 127-311, 1952.
- ANTHONY, R. V.; LIANG, R.; KAYL, E. P.; PRATT, S. L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 83-95, 1995. Supplement.
- ATKINSON, B. A.; KING, G. J.; AMOROSO, E. C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 763-774, 1984.
- AUBELE, M.; BIESTERFELD, S.; DERENZINI, M.; HUFNAGL, P. H. Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology. **Zentralblatt für Pathologie**, v. 140, n. 1, p. 107-108, 1994.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Manole. 1992, p. 565-584.
- BARONE, R. **Anatomie comparée des mamíferes domestiques**. Paris: Vigot, fac. LL, 1976, p. 579-605.
- BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Aspectos histológicos da placenta de vacas Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 4, p. 385-393, 1993.
- BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, p. 181-187, 2002.
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R.; GERGER, R. P. C.; BATCHELDER, C. A.; ANDERSON, G. B. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 391-405, 2007.
- BERTOLINI, M.; WALLACE, C. R.; ANDERSON, G. B. Bovine placental lactogen (bPL) and bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) as indirect measures of placental function in *in vitro*-derived bovine pregnancies. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 204, 2004.
- BHOSREKAR, M. R.; SHARMA, K. N. S. Studies on foetal placentae of cattle and in Murrah buffaloes of different breeds. **Indian Journal of animal Production**, v. 3, n. 1, p. 8-15, 1972.
- BJÖRKMAN, N. Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. **Acta anatomica**, v. 22, p. 1-91, 1954, Supplement 22.

BJÖRKMAN, N. Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. **Anatomical Record**, v. 163, p. 17-30, 1969.

BJÖRKMAN, N. Morphological studies on the epithelia of the intercotyledonary component of the bovine placenta. **Department of Anatomy and Histology, Royal Veterinary College, Stockholm 51, Sweden**, 1956.

BJÖRKMAN, N.; SOLLEN, N. Morphology of the bovine placenta at normal delivery **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 1, p. 347-362, 1960.

BOOBIS, A. R.; FAWTHROP, D. J.; DAVIES, D. S. Mechanism of cell death. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, p. 275-280, 1989.

BOOS, A., JANSSEN, J., MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomas during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v. 126, p. 469-480, 2003.

BOOS, A.; KOHTES, J.; JANSSEN, V.; MÜLLING, C.; STELLJES, A.; ZERBE, H.; HÄSSIG, M.; THOLE, H. H. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 55-76, 2006.

BOOS, A.; STELLJES, A. Immunohistochemical detection of collagen types I, III and IV in the bovine uterus during pregnancy. **Reproduction on Domestic Animals**, v. 35, p. 174-175, 2000.

BOSHIER, D. P.; HOLLOWAY, H. The sheep trophoblast and placental function: an ultrastructural study, **Journal of Anatomy**, v. 124, p. 287-298, 1977.

BRODSKY, W. Y.; URYVAEVA, I. V. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. **International Review of Cytology**, v. 50, p. 275-332, 1977.

BUDIHardJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Reviews of Cell Development Biology**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CABRINI, R. L.; SCHWINT, A. E.; MENDEZ, A.; FEMOPASE, F.; LANFRANCHI, H.; ITOIZ, M. E. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 21, p. 275-279, 1992.

CARAMBULA, S.; MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. A.; TEIXEIRA FILHO, A.; SOUZA, W. M. Pesquisa anatômica sobre a ramificação e disposição das artérias e veias das placentas de bovinos azebuados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 3-4, p. 131-137, 1996.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 46, p. 1-15, 2004.

CAZERTA, S. M. M.; MIGLINO, M. A.; MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 229-235, 2007.

CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn Cytopathol**, v.13, p.166-171, 1995.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J. L.; RENARD, J. P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 122-130, 2006

COSTA, A. L. L.; ARAUJO, N. S.; PINTO JR., D. S.; ARAUJO, V. C. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, p. 438-41, 1999.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs. Proposals for a standardized approach. **The Journal of Pathology**, v.158, p. 185-188, 1989.

CROCKER, J.; MACARTNEY, 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.

CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **The Journal of Pathology**, v. 151, p. 111-118, 1987.

CUMANO, A.; GODIN, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 2, p. 166-171, 2001.

DANTZER, V. Endometrium of epitheliochorial and endotheliochorial placentae, p.325-368. In: GLASSER S.; APLIN J.; GIUDICE L.; TABIBZADEH, S. (ed.). **The Endometrium**. New York: Taylor and Francis, 2002.

DANTZER, V. Epitheliochorial placentation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, v. 1.p. 18-28, 1999.

DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research**, v. 3, p. 325-360, 1988.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, p. 194-202, 2000.

DAVIES, J.; WIMSATT, W. A. Observations on the fine structure of the sheep placenta. **Acta anatomica**, v. 65, p. 182-223, 1966.

DENT, J. Ultrastructural changes in the intercotyledonary placenta of the goat during early pregnancy, **Journal of Anatomy**, v. 114, p. 245–259, 1973.

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

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

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 369-376, 2000.

DRIEUX, H.; THIÉRY, G. La placentation chez les mamiferos domestiques III. Placenta dès Bovidés. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 127, n. 1, p. 5-25, 1951.

DUELLO, T. M.; BYATT, J. C.; BREMEL, R. D. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. **Endocrinology**, v. 119, n. 3, p. 1351-55, 1986.

DUFTY, J. H. Clinical studies on the foetal membranes of Hereford cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 5, p. 181-184, 1974.

ELEY, R. M.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; WILCOX, C. J.; BECKER, R. B.; HEAD, H. H.; ADKINSON, R. W. Development of the conceptus in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 467-473, 1978.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S.S. Morphological variation in the interhemal areas of chorioallantoic placentae. **Trophoblast Research**, v. 12, p. 1-19, 1998.

ENRIQUEZ-YAP, E. L. The placentome of the philippine carabao (*Bubalus bubalis*) In mid-pregnancy: a study to establish the basis of clinicopathological analysis on the possible causes of early reproductive failures. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 1-25, 1974.

FALCO, M.; LUCA, L.; ACANFORA, F.; CAVALLOTTI, I. Alteration of the Bcl-2: Bax Ratio in the Placenta as Pregnancy Proceeds. **The Histochemical Journal**, v. 33, n. 7, p. 421-425, 2001.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 38–43, 2004.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.

FEITOSA JR., F. S. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em búfalos**. 1997. 237 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FERRELL, C. L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow : I growth of tissues of the grand uterus. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1945-1953, 1991.

FERRELL, C. L.; GARRETT, W. N.; HINMAN, N. Growth, Development and Composition of the Udder and Gravid Uterus of Beef Heifers during Pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 42, p. 1477-1489, 1976.

FRANDSON, R. D. **Anatomy and physiology of farm animals**. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986, p. 427-30.

FRANKFURT, O. S.; GRECO, W. R.; SLOCUM, H. K.; ARBUCK, S. G.; GAMARRA, M.; PAVELIC, Z. P.; RUSTUM, Y. M. Proliferative characteristics of primary and metastatic human solid tumors by DNA flow cytometry. **Cytometry**, v. 5, n. 6, p. 629-635, 1984.

GONZÁLEZ-FERNANDEZ, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Duration of the division cycle in Binucleate and Mononucleate Cells. **Experimental Cell Research**, v. 43, p. 255-267, 1966.

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

GRAY, A. C.; BARTOL, F. F.; TARLETON, B. J.; WILEY, A. A.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental Biology of Uterine Glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311-1323, 2001.

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.; MORELAND, T. W. Prevention of the retained fetal membrane syndrome (retained placenta) during induced calving in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 26, p. 365-70, 1986.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F.; RUSSEK-COIHEN, E. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. **Placenta**, v. 12, p. 27-35, 1991.

GROSSER, O. **Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihäute und placenta**. Wien: Wilhelm Braumüller, 1909, p. 89-110.

GRUNERT, E. Etiology and pathogenesis of retained bovine placenta. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology II**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986.

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

GULLER, S.; LACHAPELLE, L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal–foetal interfaces. **Semin Reprod Endocrinol**, v. 17, p. 39-44, 1999.

GUPTA, S.; DWARAKANATH, B. S.; MURALIDHAR, K.; JAIN, V. Role of apoptosis on photodynamic sensitivity of human tumour cell lines. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 33-40, 2003.

HAFEZ, E. S. E. Foetal-maternal attachments in buffalo and camel. **Indian Journal Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 25, p. 109-15, 1955.

HAFEZ, E. S. E. The placentome in the buffalo. **Acta Zoologie**, v. 35, n. 1-2, p. 177-191, 1954.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HALE, A. J.; SMITH, C. A.; SUTHERLAND, L. C.; STONEMAN, V. E. A.; LONGTHORNE, V. L.; CULHANE, A. C.; WILLIAMS, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 1-26, 2004.

HANDECKY, P.; MOSSMAN, H. W.; STOTT, G. G. Comparative development of ruminant placentomes. **Theriogenology**, v. 29, n. 3, p. 715-729, 1988.

HEDLEY, D. W.; FRIEDLANDER, M. L.; TAYLOR, I. W.; RUGG, C. A.; MUSGROVE, E. A. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 3, n. 11, p.1333-1335, 1983.

HEITZ, E. Nukleolen und chromosomen in der gattung vicia. **Planta**, v. 15, n. 3, p. 495-505, 1931.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURTHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6-13, 2002.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T. E.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. E. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 1787-1794, 2000.

HILL, J. R.; SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. "Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response¹". **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 55–63 2002.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 309-320, 2002.

HOFFMAN, L. H.; WOODING, F. B. P. giant and binucleate trophoblast cells of mammals. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 559-577, 1993.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 336, p. 1014-1015, 1980.

HOYES, A. D. The endometrial glands of the pregnant sheep: an ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v. 111, p. 55–67, 1972.

HRADECKY, P.; MOSSMAN, H. W.; STOTT, G. G. Comparative development of ruminant placentomes. **Theriogenology**, v. 29, n. 3, p. 715-729, 1988.

HUNT, J. S.; VASSMER, D.; FERGUSON, T. A.; MILLER, L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 4122-4128, 1997.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestaço, fisiologia pr-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E. **Reproduço animal**. 6. ed. So Paulo: Manole, 1995, p. 141-155.

JEFFREY, J. J.; EHLICH, L. S.; ROSWIT, W. T. **Journal of Cellular Physiology**, v. 146, p. 399–406, 1991.

KADU, M. S.; KAIKINI, A. S. Studies on foetal placenta in Sahiwal cows. **Indian Veterinary journal**, v. 52, n. 1, p. 6-11, 1974.

KAMAT, B. R.; BROWN, L. F.; MANSEAU, E. J.; SENGHER, D. R.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 157-165, 1995.

KATHIRESAN, R.; RAJASUNDARAM, R. C.; PATTABIRAMAN, S. R. Histological and histochemical changes in the endometrium and placenta during different stages of gestation in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Indian Veterinary Journal**, v. 69, p.326–328, 1992.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1-7, 2003.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. J. Anatomy and genesis of the placenta. **The Physiology of Reproduction**, v. 8, p. 441-484, 1991.

KEEFER, C. L.; STICE, S. L.; MATTHEWS, D. L. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 935-939, 1994.

KELLY, J. R. **Leisure identities and interactions**. Australia: Allen & Unwin Pty., 1983.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue genetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KEREN D. F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN D. F., HANSON C. A., HURTUBISE P. E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994.

KHAN, M. A.; MINCER, H. H.; DOCKTER, M. E.; HERMANN-PETRIN, J. M. Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 22, n. 6, p. 257-262, 1993.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. **Domestic Animal Endocrinology**, n. 23, p. 321-328, 2002.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 469-474, 1981.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A. The bovine intercaruncular placenta throughout gestation. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 241-254, 1987.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentome during second month of gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 95-100, 1980.

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

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

LATSHAW, W. K. **Veterinary developmental anatomy**. A clinically oriented approach. Toronto: B. C. Becker, 283 p, 1987.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentoma during gestation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 289-296, 2001.

LEA, R. G. Proliferation, differentiation and apoptosis in pregnancy and cancer. In: BARNEA, E. R.; JAUNIAUX, E.; SCHWARTZ, P. E.; SCHOFIELD, P. N. **Cancer and Pregnancy**. London: Springer Verlag, 2001, p 216–228.

LEE, D.; PARK, C.; LEE, H.; LUGUS, J. J.; KIM, S. H.; ARENTSON, E. ER71 Acts Downstream of BMP, Notch, and Wnt Signaling in Blood and Vessel Progenitor Specification. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 5, p. 497-507, 2008.

LEERS M. P. G.; WENDY KÖLGEN, VIVEKA BJÖRKLUND, TOMAS BERGMAN, GORDON TRIBBICK, BENGT PERSSON, PETER BJÖRKLUND, FRANS C. S. RAMAEKERS, BERTIL BJÖRKLUND, MARIUS NAP, HANS JÖRNVALL, BERT SCHUTTE. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. **The Journal of Pathology**, v. 187, p. 567 – 572, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

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.; ENDERS, A. C. Light and electron-microscopic study of the near-term paraplacenta of the domestic cat, I. Polar zone and paraplacental junctional areas. **Acta Anatomy**, v. 106, p. 293-311, 1980.

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

LEISER, R. KREBS, B.; KILSCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Fetal vilosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 571-527, 1997.

LEISER, R.; PFARRER, C.; ABD-ELNAEIM, M.; DANTZER, V. Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endothelial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. **Trophoblast Research**, v. 12, p. 21-39, 1998.

LEISER, R.; WILLE, K. H. Alkaline phosphatase in the bovine endometrium and trophoblast during the early phase of implantation. **Anatomy and Embryology**, v. 148, p. 145-157, 1975.

LI, W.; ALFAIDY, N.; CHALLIS, J. R. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2897-2904, 2004b.

LI, N.; OLIVER, J. E.; MILLER, A. L.; TUCKER, F. C.; BREIER, B.; WELLS, D. N. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than

contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1-11, 2004a.

LIU, Z.; SUN, Q. H.; YING, Y.; LIU, J. M.; PENG, J. P. Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. **Cytokine**, v. 7, p. 201-209, 2003.

LIU, X.; KIRSCHENBAUM A.; YAO, S.; LEE, R. J. F. inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. **The Journal of Urology**, v. 164, n. 3, p. 820-825, 2000.

LOI, P.; CLINTON, M.; VACKOVA, I.; FLUKA, J.; FEIL, R.; PALMIERI, C.; DELLA SALDA, L.; PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, v. 65, p. 1110-1121, 2005.

LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; BOLAND, E.; RIZOS, D.; FAIR, T. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 8, p. 1128-1137, 2007.

LORDY, C. **Embriologia humana e comparada**. Onto e teratogênese. São Paulo: Melhoramentos, 799p, 1940.

MALLARD, P. F.; BARRETO FILHO, J. B.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Proporção volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas Zebu ao longo da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 5, p. 553-558, 1996.

MARGARET, C.; WINKERFORD, C. M.; WALKER, N. I. Apoptosis. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 21, p. 88-101, 1997.

MARQUES JUNIOR, A. P. **Leukocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cocas with normal delivery and retained placenta**. 1988. 182f, Thesis (Doctorate) - University of Illinois, Urbana, 1988.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; BARRETO FILHO, J. B.; SATURNINO, H. M. Aspectos morfológicos da placenta de vacas Zebu (*Bos taurus indicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 2, p. 213-219, 1993.

MARSHALL, F. H. A. **Physiology of reproduction**. London : Longmans, 1952. p. 189-211.

MARUO, T.; ISHIHARA, N.; SAMOTO, T.; MURAKOSHI, H.; LAOAG-FERNANDEZ, J. B.; MATSUO, H. Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. In: WORLD CONFERENCE ON EARLY PREGNANCY, 4. Hungary. 2001. v. 5, p. 28-29.

MAURO, J. E. DIXON. "Zip codes" direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular "address". **Trends in Biochemical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 151-155, 1994.

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

MÉNÉZO, Y.; RENARD, J. P. The life of the egg before implantation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. (Ed). **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. 1993, p. 349-367.

MESSMER, U. K.; LAPETINA, E. G.; BRUNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C and protein kinase A-activating compounds. **Molecular Pharmacology**, v. 47, p. 757, 1995.

METAMOROS, R. A.; CAAMANO, L.; LAMB, S. V.; REIMERS, T. J. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 486-492, 1994.

METZE, K.; LORAND-METZE, I. G. Interpretation of the AgNOR pattern in hematologic cytology. **Acta Haematologica**, v. 89, n. 2, p. 110-112, 1993.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987, v. 2,. 434p.

MIGLINO, M. A. **Pesquisa anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta de bovinos**. São Paulo, 1991, 303 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; AMBROSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.

MILES, J. R.; FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E. Angiogenesis and Morphometry of Bovine Placentas in Late Gestation from Embryos Produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1919-1926, 2004.

MILES, J. R.; FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E. Effects of Embryo Culture on Angiogenesis and Morphometry of Bovine Placentas During Early Gestation. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 663-671, 2005.

MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, p. 1451-1465, 1999.

MILOSAVLJEVIC, M.; DUELLO, T. M.; SCHULER, L. A. *In situ* Localization of Two Prolactin-Related Messenger Ribonucleic Acids to Binucleate Cells of Bovine Placentomes. **Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 883-889, 1989.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 2228-2234, 1978.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific Localization of Macrophages in Pregnant Bovine Caruncles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 125–128, 2004.

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

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, p. 745-752, 1989.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate Fetal Membranes**. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987.

MUNAKATA, S.; HENDRICKS, J. B. A Multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantification of ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNOR) in paraffin embedded tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 42, n. 6, p. 789-793, 1994.

MURAI, T.; YAMAUCHI, S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placentome. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 48, p. 75-88, 1986.

MYAGKAYA, G.; DAEMS, W. T. Fusion of erythrolysosomes en epithelial cells of the sheep placenta. **Cell Tissue Research**, v. 203, p. 209-221, 1979.

NEVES, W. C. **Pesquisa Anatômica sobre a ramificação e distribuição das artérias e veias da placenta em caprinos**. São Paulo, Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, 1996.

NIKITENKO, L.; MORGAN, G.; KOLESNIKOV, S. I.; WOODING, F. P. B. Immunocytochemical and in-situ hybridization studies of the distribution of Calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, p. 679-688, 1998.

NODEN, D.; DE LAHUNTA, A. Respiratory system and partitioning of body cavities. In: *The Embryology of Domestic Animals*. Baltimore: Williams & Wilkins; p. 288-291, 1985.

NODEN, D. M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos mecanismos de desarrollo y malformaciones**. Zaragoza: Acribia, 1990.

NOVELLINO, A. T. N.; AMORIM, R. F. B.; QUEIROZ, L. M. G.; FREITAS, R. A. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas, **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 458-464, 2003.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V. Bovine placental elimination and maturation and their relationship with apoptosis. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 25, p. 513-525, 2001.

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 (AgNORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. **Pathology Research and Practice**, v. 188, p. 742-746, 1992.

O'LEARY T. J. Flow cytometry in diagnostic cytology. **Diagnostic Cytopathology**, v. 18, p. 41-46, 1998.

ORFAO, A.; CIUDAD, J.; GONZALEZ, M. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 221, p. 145-152, 1995.

PEREIRA F.T.V. **Eritrofagocitose placentária em búfalos (*Bubalus bubalis* *bubalis* Simpson, 1945)**. 2004, 102 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo -USP, São Paulo, 2004.

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A. F.; BEVILACQUA, E. Development of placentation in water buffalo (*Bubalus Bubalis*-Linnaeus-1758). **Buffalo Journal**, v. 2, p. 217-229, 2001.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PFARRER, C.; MACARA, L.; LEISER, R.; KINGDOM, J. Adaptive angiogenesis in placentas of heavy smokers. **The Lancet**, v. 354, p. 303, 1999.

PINTO, L. M. **Caracterização da célula binucleada na placenta de vacas nelore (*Bos indicus*-Linnaeus, 1758)**. 2002. 87 p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochemical Journal**, v. 8, p. 5-14, 1986.

PRIOR, R. L.; LASTER, D. B. Development of the bovine fetus. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 1546-1553, 1979.

PROLLA, G. **A citometria de fluxo**. In: FLECK, J. **Câncer: Integração clínico-biológica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies on the placenta of buffalo (*Bubalus bubalus*). **Indian Veterinary Journal**, v. 61, n. 6, p. 458-462, 1984.

RATTRAY, P. V. ; GARRET, W. N.; EAST, N. E.; HINMAN, N. Growth, development and composition of the ovine conceptus and mammary gland during pregnancy. **Journal of Animal Science** , v. 38, p. 613-626, 1974.

REDMER, D. A.; WALLACE, J. M.; REYNOLDS, L. P. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 3, p. 199-217, 2004.

REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and Prostanoid Production by Bovine Trophoblastic Cells. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 1227-1236, 1985.

REYNOLDS, L. P.; MILLA WAY, D. S.; KIRSCH, I. D.; INFELD, J. E.; PEDMER, 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. 89, p. 213-222, 1990.

RENEHAN, A. G.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. What is apoptosis, and why is it important ? **British Medical Journal**, v. 322, p. 1536-1538, 2001.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1033-1040, 2001.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Utero-placental vascular development and placental function. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 6, p. 1839-1851, 1995.

RICHARDSON, C. Personal Communication. In: ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E. PEARSON, H. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 6. ed. London: Baillière Tindal, 1989.

RICI, R. E. G.; FACCIOTTI, P. R.; AMBRÓSIO, C. E.; MARIA, D. A.; KFOURY, J. R. JR.; BERTOLINI, M.; MIGLINO, M. A. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae. **Animal Reproduction Science**, Nov 27, 2008. [Epub ahead of print].

RILEY, R. S.; MAHIN, E. J.; ROSS, W. DNA ploidy and cell cycle analysis. In: RILEY, R. S.; MAHIN, E. J.; ROSS, W. **Clinical applications of flow cytometry**. New York: Igaku Shoin Medical Publication, 1993.

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

ROBINSON, J.; CHIDZANJA, S.; KIND, K.; LOK, F.; OWENS, P.; OWENS, J. Placental control of fetal growth. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 333-344, 1995.

RUNIC, R.; LOCKWOOD, C. J.; MA, Y.; DIPASQUALE, B.; GULLER, S. Expression of Fas ligand by human cytotrophoblast: implications in placentation and foetal survival. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, p. 3111–3122, 1996.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Journal of Biological Chemistry**, v. 385, p. 449-464, 2004.

SANTOS, H. S. L.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. Jaboticabal: FUNEP, 1996, 188p.

SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P. Morfofisiologia da placenta bovina. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**, UFMG, n. 15, p. 27-36, 1996.

SANTOS, T. C.; PEREIRA, F. T. V.; ASSIS NETO, A. C.; AMBRÓSIO, C. E.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M.; MARIA, D. A.; CARVALHO, A. F.; MIGLINO, M. A. What is the Uterine Response in a Cloned Bovine Pregnancy? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 144 – 144, 2006.

SHAH, M.; STANEK, J. HANDWERKER, S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. **Histochemical Journal**, v. 30, p. 509-518, 1998.

SHAPIRO H. M. Overture. In: SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**, 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.

SHARMA, R. D.; NANDA, B. S.; SAIGAL, R. P.; KHATRA, G. S.; GUPTA, S. K. Histomorphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. **Indian Journal Animal Science**, v. 53, n. 9, p. 964-67, 1983.

SHAWN L. S.; ABRAHAM, V. M.; MOR, G. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 877–897, 2005.

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.

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

SCHOON, H-A. Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der endphase der graviditat. **Vet Med Habil-Schrift**, Hannover, 1989.

SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; FAILING, K.; HOFFMANN, B. Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 157-162, 2000.

SILVA, D. F. P.; MORAIS-PINTO, L.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A. Aspectos macroscópicos e vascularização da placenta e do cordão umbilical de bovinos da raça nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 5, p. 256-267, 2004.

SLOSS, V.; DUFTY, J. H. **Handbook of bovine obstetrics**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1980, p. 25-27.

SMITH, F. G.; MURRAY, P. G.; CROCKER, J. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 28-31, 1993.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 177, n. 1, p. 57-65, 1997.

SOBIRAJ, A. Untersuchungen zur morphologie sowie zeer histochemie und biochemic des uterus bei rindern in der frichen postpartalen periode. Habilitation thesis. Giessen: University of Giessen, 1992.

STALLMACH, T.; HEBISCH, G. MEIER. K.; DUDENHAUSEN, J. W.; VOGEL, M. Rescue by birth: detective placental maturation and late fetal mortality. **Obstetrics and Gynecology**, v. 97, p. 505-509, 2001.

STEVEN, D. H. Comparative placentation essays in structure and function. **Monographs for students of Medicine**, 1975.

STEVEN, D. H. Interespecies differences in the structure and function of trophoblast. In: WHITE, A.; LOKE, Y. M. **Biology of trophoblast**. Amsterdam: Elsevier, 1984, 706p.

STICKLAND, N. C.; PURTON, M. D. A quantitative evaluation of placentome development in Zebu cattle (*bos indicus*). **Zentralblatt für Veteriärmedizin C-Anatomica Histológica Embryologica**, v. 6, n. 1, p. 81-86, 1977.

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.

TRUMP, B. F.; GINN, F. L. Pathogenesis of subcellular reaction to lethal injury. In: BAJUSZ, E.; JASMIN, G. (Ed.). **Examples of descriptive and functional morphology**. Basel: Karger, 1969. p. 1-29. (Methods and achievements in experimental pathology, v. 4), 1969.

UCKAN, D.; STEELE, A.; CHERRY, A. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 655-662, 1997.

ULLMANN, M. B.; REIMERS, T. J. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 173-179, 1989. Supplement.

VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O.; PURUP, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; PEDERSEN, H. G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing the high efficiency *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 571-578, 2003.

VAJTA, G.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; PÁLDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A. O.; CALLESEN, H. A new method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 256-264, 2000.

VERECHIA, F. T.; MIGLINO, M. A.; VISITIN, M. B.; MANSANO, J.; YAMASAKI, W.; AMBRÓSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; BRAGA, F. C.; SANTOS, T. C.; LEISER, R. Placentação em bovinos clonados: arquitetura microvascularização e estrutura. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003. Ribeirão Preto, 2003.

VINDELOV, L. L.; CHRISTENSEN, I. J.; NISSEN, N. I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, v. 3, p. 323-327, 1983.

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

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.60, p. 996-1005, 1999.

WILLADSEN, S. M.; JANZEN, R. E.; MCALISTER, R. J.; SHEA, B. F.; HAMILTON, G.; MCDERMAND, D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 161-170, 1991.

WILSON, R. P. Lipid nutrition of finfish. Nutrition and utilization technology. In: LIM, C; SESSA, D. J. (Ed.) **Nutrition and utilization technology in aquaculture**. Champaign: AOAC Press, 1995, p. 74-81.

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

WOICKE, J.; SCHOON, H. A.; HEUWIESER, W.; SCHULZ, L. C.; GRUNERT, E. Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 559-556, 1975.

WOLF, E. E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FRÖHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KÖLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H-D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.

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

WOODING, F. B. P. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. **American Journal of Anatomy**, v. 170, p. 233-250, 1984.

WOODING, F. B. P. Structure and function of placental binucleate ('giant') cells. **Bibliotheca anatômica**, n. 22, p.134-139, 1982.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: LAMMING, G. E. (Ed) Marshall's, **Physiology of reproduction**, 4th ed. London: Chapman and Hall, 1994, v. 3, cap. 4, p. 233–460.

WOODING, F. B. P.; 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, p. 88-89, 1997.

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

WOODING, P.; BURTON, G. Comparative placentation structures - Functions and evolution. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

XIANG, J.; CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 93, p. 14559-14563, 1996.

YAMAUCHI, S.; KOTERA, K.; KAKISHITA, T. Histological study of the pregnant uterus in the cow – I. General histology of the endometrium of the intercaruncular area. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v. 39, n. 12, p. 4897-4504, 1968.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheather – Histologia functional**: texto e atlas em cores. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap. 9, p. 171.

ZARBO, R. J. Quality control tissues and technical considerations in flow cytometric DNA and cell cycle analysis of solid tumors. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P. E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994.

ZELLER, U.; KUHN, H. J. Postpartum erythrophagocytosis, iron storage and iron secretion in the endometrium of the tree shrew (Tupaia) during pregnancy. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 597–606, 1994.

ANEXOS

Accepted Manuscript

Title: Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae

Authors: R.E.G. Rici, P.R. Facciotti, C.E. Ambrósio, D.A. Maria, J.R. Kfoury Jr., M. Bertolini, M.A. Miglino

PII: S0378-4320(08)00470-3
DOI: doi:10.1016/j.anireprosci.2008.11.015
Reference: ANIREP 3744

To appear in: *Animal Reproduction Science*

Received date: 2-4-2008
Revised date: 10-11-2008
Accepted date: 19-11-2008

Please cite this article as: Rici, R.E.G., Facciotti, P.R., Ambrósio, C.E., Maria, D.A., Kfoury Jr., J.R., Bertolini, M., Miglino, M.A., Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae, *Animal Reproduction Science* (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.11.015

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae

R.E.G. Rici¹, P.R. Facciotti¹, C.E. Ambrósio¹, D.A. Maria², J.R. Kfoury Junior¹, M. Bertolini³,
M.A. Miglino^{1*}

¹*São Paulo University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo, SP, Brazil;* ²*Butantan Institute, São Paulo, SP, Brasil;* ³*UDESC, School of Veterinary Medicine, Lages, Santa Catarina, Brazil*

Corresponding author: M. Angelica Miglino miglino@usp.br, Phone/fax 55-11-3091-7690. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

The bovine maternal epithelium is composed of cuboidal cells interspersed with low columnar cells having centrally located nuclei. Bovine trophoblast is composed of two cell types: mononuclear trophoblastic and giant trophoblastic cells that can have two or more nuclei. Number of apoptotic cells and proliferative cells are variable in both cell populations. This study compared tissue growth and apoptosis by flow cytometry in the cell population found at distinct placental regions (central region of placentomes, $\leq$ 1-cm microplacentomes and the interplacentomal region) between normal and cloned near-term bovine pregnancies. After a morphological comparison between regions and groups (controls vs. clones), a lesser proportion of diploid to tetraploid cells was observed in the central region of placentomes and in microplacentomes from cloned-derived pregnancies. In addition, cloned animals had a fewer apoptotic cells in the central region of the placentome and in interplacentomal region and a greater proliferative capacity in all regions (cells in G₂/M) near term as opposed to control animals. These results may reveal the existence of a relationship between such changes in the proportions of uterine and trophoblastic epithelial cells at the end of pregnancy and normal placental function. This could be related to faulty placentation in early pregnancy, placental insufficiency during pregnancy or lack of placental and/or fetal maturation in late pregnancy, which may contribute to some of the abnormalities after *in vitro* embryo manipulations, such as poor preparation and initiation of parturition, prolonged gestation and lesser post-natal survival in some cloned animals.

Keywords: Cattle - Placenta, Cell cycle, Cloning, Placentome, Trophoblast

1. Introduction

The ruminant placenta is classified as synepitheliochorial and has a cotyledonary organization in which both fetal and maternal villi are discernible as discrete structures (placentome) on the uterine epithelium. Close contact between maternal and fetal tissues occurs only in the placentome, which is the most highly vascularized portion of the placenta (Leiser and Kaufmann, 1994, Cross et al., 1994; Wooding and Flint, 1994).

In the bovine placenta, approximately 15 to 20% of the fetal trophoblast is comprised of giant trophoblastic (GT) cells, producing hormones and bioactive products important for conceptus growth and development (Wooding, 1982; Green et al., 2000; Schlafer et al., 2000). Previous findings indicate that polyploidy is a normal feature in the development of most GT cells (Klisch et al., 1999). Thus, GT cells arise from a completion of karyokinesis (mitosis) not followed by cytokinesis, which characterizes proliferative inability (Winsatt, 1980). Such cells appear as early as day 17 of gestation in cattle, being, in their initial forms, deeply within the trophoblast, migrating later from the trophoblast cell layer to fuse with uterine epithelial cells, forming short-lived trinucleate cells (Wooding, 1992). This phenomenon occurs throughout pregnancy in cattle, with the number of GT cells slightly increasing throughout pregnancy, but the number and period of existence of trinucleate cells declining towards the end of gestation (Wooding, 1992; Green et al., 2000), as the placenta matures and parturition approaches.

Development of a fertilized egg into a multicellular complex organism involves cell replication and growth, as well as a progressive cell differentiation. Cell division and differentiation are proportional to cell apoptosis or cell death during the development and growth of both immature and adult organisms (Young and Heath, 2001). In development of the placenta, the balance between cell proliferation and cell death by apoptosis is important (Lea, 2001),

65 having an important role in placental function, with both processes being inversely proportional
 66 throughout gestation (Boos *et al.*, 2003). Flattened cells in the maternal epithelium are present at
 67 the end of gestation, which are committed to cell proliferation, suggesting that changes of
 68 cellular weight could be a consequence of alterations in metabolic needs (Stallmach *et al.*, 2001).
 69 Likewise, apoptotic corpuscles can be found in maternal and fetal epithelium and at a greater
 70 percentage in the fetal epithelium, due to phagocytosis by the fetal tissue, being important for
 71 tissue remodeling (Miyoshi; Sawamukai, 2004). Previous reports implicated certain *in vitro*
 72 embryo manipulations, such as *in vitro* fertilization (IVF) and cloning by nuclear transfer (NT)
 73 procedures, as predisposing factors to abnormal placental development during pregnancy,
 74 affecting fetal growth and viability, including life *ex utero* (Behboodi *et al.*, 1995; Bertolini *et al.*,
 75 2002b, 2004; Batchelder *et al.*, 2005, 2007ab; Cibelli *et al.*, 1998; Hashizume *et al.*, 2002, Hill
 76 and Chavatte-Palmer, 2002; Hill *et al.*, 1999, 2000, 2001; Miglino *et al.*, 2007).

77 The extent of tissue proliferation/apoptosis can be determined by flow cytometry, which
 78 enables the evaluation of a large number of cells in a short period of time. With the evaluation of
 79 DNA content, proportion of cells with abnormal amounts of DNA (aneuploidy) and at different
 80 phases of the cell cycle, DNA degradation, and amount of cell proliferation can be easily and
 81 readily determined (Cibas, 1995; Keren, 1994; O'leary, 1998; Orfao *et al.*, 1995; Shapiro, 1995).
 82 Such evaluation is important for the evaluation of both normal and abnormal conditions in
 83 different tissues. In this view, the use of flow cytometry analyses for the study of placental
 84 abnormalities after cloning by NT procedures may be valuable for the identification of cause-
 85 and-effect mechanisms responsible for variations in development and for the uncovering of
 86 novel, unknown physiological processes during pregnancy. Therefore, the aim of this study was
 87 to compare the patterns of cell cycle, cell proliferation, apoptosis and proportion of diploid to

88 tetraploid cells in uterine and trophoblastic epithelium by flow cytometry in samples of tissue
 89 collected from distinct placental regions (central region of placentomes, $\leq$ 1-cm
 90 microplacentomes, and the interplacentomal region) between near-term control and cloned
 91 bovine pregnancies.

92

93 **2. Materials and methods**

94 *2.1 Animals and tissue sampling*

95 Near-term bovine placentae from normal pregnancies ($n = 5$) were obtained at a local
 96 slaughterhouse in São Paulo State. Upon collection, the uterus was opened, the fetus removed,
 97 and the crown-rump length used to estimate the stage of gestation. Placentomes of cloned cattle
 98 ($n = 5$) produced by nuclear transfer (NT) were obtained at CYAGRA Brasil Inc., delivered at
 99 term (290 days) by cesarean section. Placental tissues from controls and clones were excised, cut
 100 into various small fragments (0.5 cm) from different placentomal regions (central region of the
 101 placentome, interplacentomal region and ≤ 1.0 -cm microplacentomes) and immediately snap-
 102 frozen in liquid nitrogen to be used for flow cytometric analysis. Tissues for histology from the
 103 same three areas were transferred to 10% formalin in 0.1 M phosphate buffer for 48 h, embedded
 104 in paraplast and sectioned at 5 μ m using an automatic microtome (Leica RM2155, Germany).
 105 Sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) and were examined with an Olympus
 106 BX40 microscope (Zeiss KS400 image analysis system 3.4; Figure 1A-G), for placental
 107 methodology, complete description and morphology data see our previous publications (Miglino
 108 *et al.*, 2007; Miglino *et al.*, 2008).

109 *Flow cytometry (FACS) – DNA content and cell cycle analysis*

Fragments stored in liquid nitrogen were placed into citrate buffer, pH 7.6, and processed according to Vindelov et al. (1983). In brief, samples were filtered through a 30- μ m mesh (Spectra Mesh Nylon Filters, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to separate stroma and debris, to be subsequently incubated in 30 mg/mL trypsin (Sigma Chemical Co.) for 10 min, followed by 10 min in 5 mg/mL trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.) and 0.1 mg/mL ribonuclease A (Sigma Chemical Co.), all at RT. Then, 415 μ g/mL propidium iodide (Sigma Chemical Co.) was added to the samples 15 min prior to flow cytometric analysis. At least 10,000 events were acquired using Cell Quest Software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). DNA content was measured using a FACSCalibur Flow Cytometer (Beckton Dickinson) equipped with an air-coupled 15-mW, 488-nm argon ion laser. The proportion of cells in apoptosis (sub-G₁ or DNA fragmentation) or in each phase of the cell cycle (G₀/G₁, S, G₂/M) was calculated using the ModFit Software analysis (Beckton Dickinson). Data were analyzed by the χ^2 test or Fisher's Exact test, for P<0.05. Flow cytometry was used to quantify the DNA content identifying different cell populations (aneuploid, diploid, tetraploid and polyploid) and analyze cell proliferative activity related to cell distribution on cell cycle.

3. Results

The flow cytometric analysis of samples from control placentomes had two cell populations with distinct characteristics in size and granularity: diploid cells and tetraploid cells (Figure 2). There were distinctions in cell cycle phases between placental regions classified as interplacentomal, central region and microplacentomes, and between groups (Figure 3).

In control animals (Figure 2), proportion of diploid to tetraploid cells was different (P < 0.05) in interplacentomal regions (89.1% $\pm$ 4.1 to 10.9% $\pm$ 4.1) in comparison with the central region of placentomes (19.7% $\pm$ 2.8 to 80.3% $\pm$ 2.8) and with microplacentomes (20.7% $\pm$ 1.4 to

133 79.3% $\pm$ 1.4). In addition, there was a significant increase in number of cells in apoptosis and a
 134 decrease in quiescent cells (G_0/G_1) in the interplacentomal region (26.2% $\pm$ 6.4 and 46.8% $\pm$ 7.0,
 135 respectively) when compared with the central placentomal regions (11.1% $\pm$ 5.3 and 61.2% $\pm$
 136 10.6, respectively) and microplacentomes (1.0% $\pm$ 0.1 and 56.1% $\pm$ 0.1, respectively), as
 137 depicted in Figure 3. An increased proliferative capacity (G_2/M) was observed in the region of
 138 the microplacentomes (33.1% $\pm$ 0.1) in comparison with central placentomal (20.4% $\pm$ 5.4) or
 139 interplacentomal (24.0% $\pm$ 0.5) regions, while no differences between regions were observed for
 140 the proportion of cells at the S phase.

141 In cloned animals (Figure 2), the proportion of diploid to tetraploid cells was different
 142 between interplacentomal regions (83.3% $\pm$ 4.8 to 16.0% $\pm$ 4.6) and both central region of
 143 placentomes (38.7% $\pm$ 4.2 to 59.0% $\pm$ 4.7) and the microplacentomes (57.4% $\pm$ 3.5 to 41.5% $\pm$
 144 3.4). Also, a greater percentage of quiescent cells (G_0/G_1 phases) was observed in
 145 interplacentomal regions (40.1% $\pm$ 6.5) and in microplacentomes (38.5% $\pm$ 7.9), whereas an
 146 increased proliferative capacity (G_2/M phases) was observed (Figure 3) in the central region of
 147 placentomes (71.6% $\pm$ 7.2) compared with interplacentomal regions (53.6% $\pm$ 9.7) and
 148 microplacentomes (59.1% $\pm$ 6.2).

149 Differences ($P < 0.05$) in ploidy and cell cycle were also observed between the placentae
 150 of control and cloned animals in the regions that were assessed. The proportion of diploid
 151 compared with tetraploid cells was different in the central region of placentomes and in
 152 microplacentomes ($P < 0.001$), with cloned animals showing an increase in tetraploid cells, being
 153 similar in the interplacentomal regions (Figure 2). Moreover, the number of apoptotic cells was
 154 less in the central region of placentomes (1.1% $\pm$ 0.5) and in interplacentomal regions (1.1% $\pm$
 155 0.8) from cloned than control animals (11.1% $\pm$ 5.3 and 26.2% $\pm$ 6.4, respectively). Moreover,

the percentage of quiescent cells (G_0/G_1) was less ($P < 0.05$) in cloned animals than controls in the central region of placentomes ($27.0\% \pm 6.5$ compared with $61.2\% \pm 10.6$, respectively) and in microplacentomes ($38.5\% \pm 7.9$ compared with $56.1\% \pm 0.1$, respectively). In all regions where assessments were made, a greater number of cells (Figure 3) at the G_2/M phase was detected in the cloned group ($59.3\% \pm 12.2$) compared with the control group ($22.4\% \pm 6.3$).

4. Discussion

Through the combination of beams of radiation, important information from a tissue can be obtained by flow cytometry, such as size, granularity/complexity and morphology of cells (Silva et al., 2004). In cattle, determination of ploidy by *in situ* hybridization indicated most nuclei of trophoblast cells are tetraploid and that both nuclei always lie together. These findings show that polyploidy is a normal feature of the development of most binucleated cells in normal placentae of cattle (Klisch et al., 1999).

Binucleate cells (BNC) usually take part of about 20% of the trophoblast cells, serving for at least two functions during pregnancy: to form the maternal-fetal junction and to produce hormones and bioactive products, which are essential to the success of implantation, subsequent placentomal development and regulation of fetal growth (Wooding, 1982, 1992; Green et al., 2000; Schlafer et al., 2000). Ruminant BNC(s) are filled with granules that contain gestation-specific proteins and glycoproteins, such as placental lactogen hormone (PL) and other bioactive substances (Wooding & Wathes, 1980, Landim *et al.*, 2007). Interestingly, proportion of binucleate cells in normal near-term placentas is in accordance with the flow cytometric analysis used in the present study, in which around 20% of tetraploid cells were found in the central region of placentomes and microplacentomes. Most likely, such tetraploid cells represent the binucleated cell population rather than dividing cells. Presence of tetraploid cells in

179 interplacentomal regions was also found in the present study. These findings are in agreement
 180 with Wooding et al. (1996) where there were binucleated cells in cotyledonary and
 181 intercotyledonary regions. These studies indicate the presence of functionally specialized regions
 182 of the placenta, emphasizing the multifunctional activity of binucleated cells in ruminants.

183 Under physiological conditions, the placenta grows continuously during pregnancy,
 184 developing faster than fetus in early pregnancy, reaching a peak by the beginning of the third
 185 trimester, to subsequently reduce its pattern of tissue growth by late pregnancy (Eley et al., 1978;
 186 Prior and Laster, 1979; Ferrell, 1989; Reynolds *et al.*, 1990). Flow cytometry in normal near-
 187 term bovine placenta in the present study confirmed that pattern, as the presence of a lesser
 188 percentage of cells in G₂/M and greater percentages in G₀/G₁ indicates cell proliferation is
 189 decreased in term placentae.

190 During placental development, cell proliferation and cell death by apoptosis are inversely
 191 proportional processes throughout gestation, being relevant for normal conceptus growth (Boos
 192 et al., 2003). In early gestation, the human placenta is characterized by a proliferative activity of
 193 cytotrophoblast cells (Mochizuki et al., 1998), with cells in proliferation having an important role
 194 in the nutrition of the concept (Björkman, 1969). However, in late gestation there is no
 195 physiological significance for maintaining or continuing the proliferation process. This appears
 196 to have occurred in the control pregnancies because fewer cells at the G₂/M phases and greater
 197 numbers of cells in G₀/G₁ were observed in all placental regions.

198 As expected, a greater rate of apoptotic figures was detected in placentomal or
 199 interplacentomal regions in this study. Physiologically, apoptosis allows elimination of
 200 unnecessary cells to maintain tissues homeostasis (Barreto Filho & Marques Junior, 1993) and
 201 has been postulated to have a role on placenta maturation and detachment in late pregnancy

(Martins et al., 2004). Results from the present study in normal term placentae of cattle are consistent with these previous reports (Smith et al., 1997; Leers et al., 1999; Pfarrer et al., 1999; Austgulen et al., 2002) with a large number of cells in apoptosis at term contributing to maternal-fetal disconnection. Also, apoptosis in organ remodeling may serve the function of prostagentic producing cell removal.

In the present study, the increase in tetraploid cells in placentomes or microplacentomes of cloned pregnancies may be more a reflection of compensatory tissue growth or angiogenic activity for a less efficient placenta than due to a greater number of binucleate cells. The relative population of binucleate cells changes in late gestation and at the time of parturition in normal cows, and its proportion is altered in placentae of cloned calves (Hashizume et al., 2002). This is consistent with findings by Miles et al. (2004), in which a reduction in fetal villi and binucleate cell volume densities in Day-222 IVF-derived placentomes appeared to compensate for decreased feto-maternal contact with an increased proportion of tissue volume of blood vessels in the maternal caruncles and the ratios of blood vessel volume density to-placentome surface area within the cotyledonary and caruncular tissues. The mRNA relative abundance and protein contents for angiogenic factors in cotyledonary and caruncular tissues from control versus IVF-derived pregnancies were not different between groups, except for IVF-derived caruncles, which had an increased in protein peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), a factor that upregulates VEGF, gene expression being associated with angiogenesis and tissue remodeling in the mammalian placenta and other organs (Barak et al., 1999; Bamba et al., 2000). Interestingly, Bertolini et al. (2006) demonstrated that maternal concentrations of bovine PL in IVF-derived pregnancies were less than controls during the last 8 weeks of gestation, becoming similar as parturition approaches. When combined, those results indicated differential patterns of

225 placental function and secretion exist between control and manipulated animals, supporting the
 226 concept that compensatory growth or functional mechanisms exist during late gestation of *in*
 227 *vitro*-derived pregnancies in cattle.

228 Greater rates of cells in G₂/M, less apoptosis and fewer cells in G₀/G₁ in cloned placental
 229 tissues may reflect a need for placental growth or activity due to placental gene deregulations,
 230 dysfunctions or insufficiency. Disturbances in placentation and placental function after *in vitro*
 231 embryo manipulations by cloning or IVF have been associated with changes in pattern of fetal
 232 growth in early and late gestation, affecting pre- and post-natal survival (Behboodi et al., 1995;
 233 Stice et al., 1996; Cibelli et al., 1998; Hill et al., 1999, 2000, 2001; Bertolini et al., 2002a;
 234 Batchelder et al., 2005, 2007ab). Placental underdevelopment in early pregnancy appears to
 235 precede growth restriction or fetal demise (Hill et al., 2000; Bertolini et al., 2002b). If early
 236 pregnancy is not terminated by faulty placentation, a biphasic conceptus growth pattern usually
 237 follows, with an initial period of growth restriction (Bertolini et al., 2002b; Chavatte-Palmer et
 238 al., 2006), followed by a period of compensatory growth, which is preceded by changes in
 239 placental development (Bertolini et al., 2002b, 2004; Batchelder et al., 2005). Such events
 240 culminate either with fetal death or with the delivery of larger IVF and SCNT calves with less
 241 postnatal survival and morphologically altered placentae (Bertolini & Anderson, 2002; Bertolini
 242 et al., 2002a, 2004, 2006; Batchelder et al., 2005; Miglino et al., 2007). Changes in placental
 243 micro-architecture have been postulated to cause faulty placentation and compensatory growth
 244 (Hill et al., 2000; Bertolini et al., 2002b, 2004). This placental compensatory mechanism and
 245 morphological changes are not surprising because placental tissue can have great plasticity under
 246 unfavorable conditions through mechanisms to adapt to adverse nutritional (McEvoy et al., 1997;
 247 Perry et al., 1999) and environmental (Ferrell, 1989; Krebs et al., 1997; Penninga and Longo,

1998) circumstances, which can promote morpho-histological changes in the placenta to compensate and modulate fetal and placental growth, in atypical pattern as seen after *in vitro* embryo manipulations by IVF and cloning by NT.

Binucleated cells in cattle synthesize progesterone (Reimers et al., 1985; Ullman and Reimers 1989; Boss et al., 2003, 2006), being also implicated in estrogen synthesis (Ben David et al., 1990; Shuler et al., 2005). Progesterone has an important role in maintaining the homeostasis of the maternal-fetal interface regulating cell differentiation and growth and on placental development. In cloned animals, a proportion of 61.3% of tetraploid cells (putative binucleated cells) were present in placentomes in the present study. This value is greater than in control pregnancies (19.7%), suggesting placental regulation exerted by these cells may be altered in pregnancies of cloned animals. Moreover, results in the present study comparing pregnancies of cloned and control cattle indicated a lesser frequency of apoptosis in all regions of the placenta from cloned animals. Boos et al. (2003) and Miyoshi and Sawamukai (2004) reported a lesser percentage of cells in apoptosis in pregnancies with placental retention and absence of placental maturity. This observation could be an indicator of inefficient maturation of the placenta of cloned pregnancies of cattle near term. Indeed, a large proportion of IVF- and NT-derived pregnancies fail to terminate normally, resulting in prolonged gestation of grossly over-sized fetuses with poor post-natal survival.

5. Conclusion

In summary, flow cytometric data obtained in the present study from the near-term placenta in control pregnancies of cattle revealed proliferation and apoptotic patterns and proportion of diploid to tetraploid cells at each distinct region that were in the expected normal physiological range. Conversely, placental tissues from cloned animals had more proliferation

activity and a reduced rate of apoptosis in the central region of placentomes and interplacentomal areas when compared with control animals. Such phenomena may be associated with faulty placentation in early pregnancy, placental insufficiency or even a lack of placental and/or fetal maturation towards the end of pregnancy, events that are common after *in vitro* embryo manipulations such as cloning by NT.

Acknowledgements

The present study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We gratefully acknowledge Frigorífico Mantiqueira, in São José dos Campos, SP, and CYAGRA Brasil Inc., in Mogi-Mirim, São Paulo, which provided the animals and the cloned placentae for this study, respectively. The authors also thank R.P.C. Gerger for suggestions in the final version of the manuscript.

Conflict of interest statement

There are no financial competing interests for all authors.

References

- Austgulen, R., Chedwick, L., Isaksen, C.V., Vatten, L., Craven, C., 2002. Trophoblast apoptosis in human placenta at term as detected by expression of a cytokeratin 18 degradation product of caspase. *Archives of Pathology of Laboratory Medicine*, 126, 1480-1486.
- Bamba, H., Ota, S., Kato, A., Kawamoto, C., Fujiwara, K., 2000. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 485–491.

- 292 Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A.,
 293 Evans, R.M., 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue
 294 development. *Molecular Cell*, 4, 585–595.
- 295 Barreto Filho, J.B., Marques Junior, A.P., 1993. Aspectos histológicos da placenta de vacas
 296 Zebu. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 45, 385-393.
- 297 Batchelder, C.A., Hoffert, K.A., Bertolini, M., Moyer, A.L., Mason, J.B., Petkov, S.G., Famula,
 298 T.R., Anderson, G.B., 2005. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor
 299 on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Cloning and Stem*
 300 *Cells*, 7, 238-254.
- 301 Batchelder, C.A., Bertolini, M., Mason, J.B., Moyer, A.L., Hoffert, K.A., Petkov, S.G., Famula,
 302 T.R., Angelos, J., George L.W., Anderson, G.B., 2007a. Perinatal physiology in cloned
 303 and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning and Stem Cells*, 9, 63-
 304 82.
- 305 Batchelder, C.A., Bertolini, M., Mason, J.B., Moyer, A.L., Hoffert, K.A., Petkov, S.G., Famula,
 306 T.R., Angelos, J., George L.W., Anderson, G.B., 2007b. Perinatal physiology in cloned
 307 and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning and Stem Cells*, 9, 83-
 308 96.
- 309 Behboodi, E., Anderson, G.B., Bondurant, R.H., Cargill, S.L., Kreuscher, B.R., Medrano, J.F.,
 310 Murray, J.D., 1995. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine
 311 embryos. *Theriogenology*, 44 227-232.

- 312 Ben David, E., Shemesh, M., 1990. Ultrastructural localization of cytochrome P-450scc in the
313 bovine placentome using protein A-gold technique. *Biology of Reproduction*, 42, 131-
314 138.
- 315 Bertolini, M., Anderson, G.B., 2002. The placenta as a contributor to production of large calves.
316 *Theriogenology*, 57, 181-187.
- 317 Bertolini, M., Mason, J.B., Beam, S.W., Carneiro, G.F., Sween, M.L., Moyer, A.L., Famula,
318 T.R., Sainz, R.D., Anderson, G.B., 2002a. Morphology and morphometry of in vivo- and
319 in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high
320 birth weights. *Theriogenology*, 58, 973-994.
- 321 Bertolini, M., Beam, S.W., Shim, H., Bertolini, L.R., Moyer, A.L., Famula, T.R., Anderson,
322 G.B., 2002b. Growth, development and gene expression by in vivo- and in vitro-produced
323 day-7 and day-16 bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 318-
324 328.
- 325 Bertolini, M., Moyer, A.L., Mason, J.B., Batchelder, C.A., Hoffert, K.A., Bertolini, L.R.,
326 Carneiro, G.F., Cargill, S.L., Famula, T.R., Calvert, C.C., Sainz, R.D., Anderson, G.B.,
327 2004. Evidence of increased substrate availability to in vitro-derived bovine foetuses and
328 association with accelerated conceptus growth. *Society for Reproduction and Fertility*,
329 128, 341-354.
- 330 Bertolini, M., Wallace, C.R., Anderson, G.B., 2006. Expression profile and protein levels of
331 placental products as indirect measures of placental function in in vitro-derived bovine
332 pregnancies. *Reproduction*, 131, 163–173.

- 333 Björkman, N., 1969. Light and electron microscopic studies on celular alterations in the normal
334 bovine placentome. *Anatomical Record*, 163, 17-30.
- 335 Boss, A., Janssen, V., Mülling, C., 2003. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes
336 during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows
337 retaining the fetal membranes. *Reproduction*, 126, 469-480.
- 338 Boss, A., Kohtes, J., Janssen, V., Mülling, C., Stelljes, A., Zerbe, H., Hässig, M., Thole, H.H.,
339 2006. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor,
340 glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal
341 uterine wall and foetal membranes. *Animal Reproduction Science*, 91, 55-76.
- 342 Cibas, E.S., 1995. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology.
343 *Diagnostic Cytopathology*, 13, 166-171.
- 344 Challis, J.R., Thorburn, G.D., 1975. Prenatal endocrine function and the initiation of parturition.
345 *British Medical Bulletin*, 31, 57-61.
- 346 Chavatte-Palmer, P., de Sousa, N., Laigre, P., Camous, S., Ponter, A.A., Beckers, J.F., Heyman,
347 Y., 2006. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion
348 in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*, 66, 829-
349 840.
- 350 Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A.,
351 Robl, J.M., 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-
352 derived stem-like cells. *Nature Biotechnology*, 16, 642-646.

- 353 Conley, A.J., Ford, S.P., 1987. Effect of prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis on in vivo
354 and in vitro progesterone production by individual placentomes of cows. *Journal of*
355 *Animal Science*, 65, 500-507.
- 356 Conley, A.J., Mason, J.I., 1990. Placental steroid hormones. *Baillieres Clinical Endocrinology*
357 *and Metabolism*, 4, 249-272.
- 358 Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J., 1994. Implantation and the placenta: Key pieces of the
359 development puzzle. *Science*, 266, 1508-1518.
- 360 Eley, R.M., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Wilcox, C.J., Becker, R.B., Head, H.H., Adkinson,
361 R.W., 1978. Development of the conceptus in the bovine. *Journal of Dairy Science*, 61,
362 467-473.
- 363 Ferrell, C.L., 1989. Placental regulation of fetal growth. In: Campion, D.R., Hausman, G.J.,
364 Martin, R.J. (ed.): *Animal growth regulation*. New York: Plenum Press, 1989, 1-19.
- 365 Green, J.A., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J.F., Roberts, R.M.,
366 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and
367 temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction*, 62,
368 1624-1631.
- 369 Keren, D.F., 1994. History and evolution of surface marker assays. In: Keren DF, Hanson CA,
370 Hurtubise PE. *Flow cytometry and clinical diagnosis*. Chicago: American Society of
371 *Clinical Pathologists*, 1994, 197-308.
- 372 Hashizume, K., Ishiwata, H., Kizaki, K., Yamada, O., Takahashi, T., Imai, K., Patel, O.V.,
373 Akagi, S., Shimizu, M., Takahashi, S., Katsuma, S., Shiojima, S., Hirasawa, A.,

- 374 Tsujimoto, G., Todoroki, J., Izaike, Y., 2002. Implantation and placental development in
375 somatic cell clone recipient cows. *Cloning Stem Cells*, 4, 197-209.
- 376 Hill, J.R., Chavatte-Palmer, P., 2002. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In: Cibelli,
377 J., Lanza, R.P., Campbell, K.H.S., West, M.D. (eds.): *Principles of Cloning*, Amsterdam
378 and others, 2002, Academic Press, 247-266.
- 379 Hill, J.R., Roussel, A.J., Cibelli, J.B., Edwards, J.F., Hooper, N.L., Miller, N.W., Thompson,
380 J.A., Looney, C.R., Westhusin, M.E., Robl, J.M., Stice, S.L., 1999. Clinical and
381 pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies).
382 *Theriogenology*, 51, 1451-1465.
- 383 Hill, J.R., Burghardt, R.C., Jones, K., Long, C.R., Looney, C.R., Shin, T., Spencer, T.E.,
384 Thompson, J.A., Winger, Q.A., Westhusin, M.E., 2000. Evidence for placental
385 abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine
386 fetuses. *Biology of Reproduction*, 63, 1787-1794.
- 387 Hill, J.R., Edwards, J.F., Sawyer, N., Blackwell, C., Cibelli, J.B., 2001. Placental anomalies in a
388 viable cloned calf. *Cloning*, 3, 83-88.
- 389 Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R., 1999. DNA content and
390 ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta*, 20, 451-458.
- 391 Krebs, C., Longo, L.D., Leiser, R., 1997. Term ovine placental vasculature: comparison of sea
392 level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta*, 18,
393 43-51.

- 394 Landim, L.P. Jr., Miglino, M.A., Pfarrer, C., Ambrósio, C.E, Garcia, J.M., 2007 Culture of
395 mature trophoblastic giant cells from bovine placentomes. *Animal Reproduction Science*,
396 98, 357-364.
- 397 Leers, M.P.G., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P.,
398 Ramaekers, F.C.S., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B., 1999.
399 Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed
400 during early apoptosis. *Journal of Pathology*, 187, 567-572.
- 401 Leiser, R., Kaufmann, P., 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin.*
402 *Endocrinol.*, 102, 122-34.
- 403 Mallard, P.F., Barreto Filho, J.B., Santos, R.L., Marques Junior, A.P., 1996. Proporção
404 volumétrica dos componentes estruturais da placenta de vacas Zebu ao longo da gestação.
405 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 48, 553-558.
- 406 Martins, V.M.V., Marques Junior, A.P., Vasconcelos, A.C., Martins, E., Santos, R.L., Lima,
407 F.P.C., 2004. Maturação e expulsão placentária em vacas das raças Holandesa e Nelore.
408 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56, 157-167.
- 409 McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Findlay, P.A., Roberston, I.S., 1997. Dietary
410 excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos
411 and may affect fetal growth among survivors. *Animal Reproduction Science*, 47, 71-90.
- 412 Miglino, M.A., Pereira, F.T.V., Visintin, J.A., Garcia, J.M., Meirelles, F.V., Rumpf, R.,
413 Ambrósio, C.E., Papa, P.C., Santos, T.C., Carvalho, A.F., Leiser, R., Carter, A.M., 2007.
414 Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology*,
415 68, 604-617.

- 416 Miglino, M.A., Francioli, A.L.R., Oliveira, M.F., Ambrósio, C.E., Bonatelli, M., Machado,
 417 M.R.F., Mess, A., 2008. Development of the inverted visceral yolk sac in three species of
 418 Caviids (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Placenta*, 29, 748-752.
- 419 Miles, J.R., Farin, C.E., Rodriguez, K.F., Alexander, J.E., Farin, P.W., 2004. Angiogenesis and
 420 morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in
 421 vitro. *Biology of Reproduction*, 71, 1919–1926
- 422 Miyoshi, M., Sawamukai, Y., 2004. Specific localization of macrophages in pregnant bovine
 423 caruncles. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 125-128.
- 424 Mochizuki, M.; Maruo, T.; Matsuo, H.; Samoto, T.; Ishihara, N. 1998. Biology of human
 425 trophoblast. *Internacional Journal of Gynecology & Obstetrics*, 60, 21-28.
- 426 O’Leary, T.J., 1998. Flow cytometry in diagnostic cytology. *Diagnostic Cytopathology*, 18, 41-
 427 46.
- 428 Orfao, A., Ciudad, J., Gonzalez, M., 1995. Flow cytometry in the diagnosis of cancer.
 429 *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation (Oxford)*, Suppl. 221, 145-
 430 152.
- 431 Penninga, L., Longo, L.D., 1998. Ovine placentome morphology: effects of high altitude, long-
 432 term hypoxia. *Placenta*, 19, 187-193.
- 433 Perry, V.E.A., Norman, S.T., Owen, J.A., Daniel, R.C.W., Phillips, N., 1999. Low dietary
 434 protein during early pregnancy alters bovine placental development. *Animal*
 435 *Reproduction Science*, 55, 13-21.

- 436 Pfarrer, C., Wirth, C., Schuler, G., Klisch, K., Leiser, R., Hoffman, B., 1999. Frequency,
437 ultrastructural features, and relevance of apoptosis in the bovine placenta. *Biology of*
438 *Reproduction*, 60, Suppl.1, 222.
- 439 Prior, R.L., Laster, D.B., 1979. Development of the bovine fetus. *Journal of Animal Science*, 48,
440 1546-1553.
- 441 Reimers, T.J., Ullman, M.B., Hansel, W., 1985. Progesterone and prostanoid production by
442 bovine binucleate trophoblast cells. *Biology of Reproduction*, 33, 1227-1236.
- 443 Reynolds, L.P., Millaway, D.S., Kirsch, J.D., Infeld, J.E., Redmer, D.A., 1990. Growth and in
444 vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation.
445 *Journal of Reproduction and Fertility*, 89, 213-222.
- 446 Santos, R.L., Marques Junior, A.P., Barreto Filho, J.B., 1997. Morphometric analysis of collagen
447 in placentomes of dairy cows with normal delivery and with placental retention. *Brazilian*
448 *Journal of Veterinary Research Animal Science*, 34, 240-242.
- 449 Schlafer, D.H., Fisher, P.J., Davies, C.J., 2000. The bovine placenta before and after birth:
450 placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science*,
451 60-61, 145-160.
- 452 Shapiro, H.M., 1995. Overture. In: Shapiro H.M. *Practical Flow Cytometry*, 3^a ed. New York:
453 Wiley-Liss, 1995, 142.
- 454 Schuler, G., Oezalp, G.R., Hoffman, B., Harada, N., Browne, P., Conley, A.J., 2005. Reciprocal
455 expression of 17alpha-hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) and aromatase during bovine
456 trophoblastic differentiation: A two-cell system drives placental estrogen synthesis.
457 *Reproduction*, 131, 669-679.

- 458 Silva, T.L., Reis, A., Hewitt, C., Roseiro, J.C., 2004. Citometria de fluxo – funcionalidade
459 celular em bioprocessos. Métodos em Biotecnologia – Citometria de Fluxo II. Boletim
460 de Biotecnologia, 32-40.
- 461 Smith, S.C., Baker, P.N., Symonds, E.M., 1997. Placental apoptosis in normal human pregnancy.
462 American Journal of Obstetrics and Gynecology, 171, 57-65.
- 463 Stallmach, T., Hebisch, G., Méier, K., Dudenhausen, J.W., Vogel, M., 2001. Rescue by birth:
464 detective placental maturation and late fetal mortality. Obstetrics and Gynecology, 97,
465 505-509.
- 466 Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L., Matthews, L., 1996. Pluripotent bovine embryonic
467 cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. Biology of
468 Reproduction, 54, 100-110.
- 469 Uckan, D., Steele, A., Cherry, Wang, B.Y., Chamizo, W., Koutsonikolis, A., Gilbert-Barness, E.,
470 Good, R.A., 1997. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune
471 privilege in placenta and maternal invasion. Molecular Human Reproduction, 3, 655-662.
- 472 Ullman, M.B., Reimers, T.J., 1989. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of
473 cows. Journal of Reproduction and Fertility, 37, 173-179.
- 474 Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I., 1983. A detergent-trypsin method for the
475 preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis, Cytometry, 3:323- 327.
- 476 Winsatt, W. A., 1980. Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of
477 the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. American Journal Anatomical,
478 159, 2, 209-243.

- 479 Wooding, F.B., 1982. Structure and function of placental binucleate ('Giant') cells. *Bibliotheca*
480 *Anatômica*, 22, 134-139.
- 481 Wooding, F.B., 1992. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate
482 cell fusions and hormone production. *Placenta*, 13, 101-113.
- 483 Wooding, F.B., Flint, A.P.F., 1994. Placentation. In *Marshall's Physiology of Reproduction 3*.
484 Ed. GE Lamming: Chapman & Hall, London, p.p. 233-460.
- 485 Wooding F.B., Wathes, D.C., 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *Journal*
486 *of Reproduction and Fertility*, 59, 425-430.
- 487 Wooding, F.B., Morgan, G., Monaghan, S., Hamon, M., Heap, R.B., 1996. Functional
488 specialization in the ruminant placenta: Evidence for two populations of fetal binucleate
489 cells of different selective synthetic capacity. *Placenta*, 17, 75-86.
- 490 Young, B., Heath, J.W., 2001. *Wheather histologia funcional: Texto e atlas em cores*, 4. ed. Ed.
491 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.p. 409.

492

Figure Legends

Fig. 1. Photography of normal and cloned placentae at 290 days of pregnancy. A – B: Bovine control placentomes. C - D Bovine cloned placentomes. Note the placentome size in C and D related to A e B. Light microscopy of placentomes related to position and type. E) Central region of the cloned cattle placentome with uterine cell presence, well organized, mononuclear trophoblastic cells and BNC, with few apoptotic cell in this region. F) Interplacentomal region showing trophoblastic epithelium with folds and G) microplacentomes in cloned cattle placenta showing all histological aspect of the tissue and relation with uterus. HE stains. Scale bars: E: 40 μ m, F: 40 μ m, G: 250 μ m

Fig. 2. Flow cytometric population profile from the central region of placentomes, interplacentomal region and microplacentomes obtained from normal and cloned bovine placentae, showing two populations of cells: diploid cells and tetraploid cells. a,b,c: columns for diploid cells; A,B,C: columns for tetraploid cells; Column bars without common superscripts differ, $P < 0.05$.

Fig. 3: Flow cytometric analysis of the distribution of cell cycle phases from the central region of placentomes, interplacentomal regions and microplacentomes obtained from normal and cloned bovine placentae. a,b,c,d: Column bars, within the same phase of the cell cycle, without common superscripts differ, $P < 0.05$.

New Figure 1

New Figure 2

New Figure 3

Research

Open Access

Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy

Patricia R Facciotti¹, Rose EG Rici¹, Durvanei A Maria², Marcelo Bertolini³, Carlos E Ambrósio⁴ and Maria A Miglino*¹

Address: ¹Department of Surgery of the São Paulo University, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo, SP, 05508-270, Brazil, ²Biochemical and Biophysics Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, 05503-900, Brazil, ³UDESC – Santa Catarina State University, School of Veterinary Medicine, Lages, Santa Catarina, 88520-000, Brazil and ⁴Department of Basic Science/EZEA, São Paulo University, Faculty of Veterinary Medicine, Pirassununga, SP, 13635-900, Brazil

Email: Patricia R Facciotti - patfacciotti@usp.br; Rose EG Rici - roseeli@usp.br; Durvanei A Maria - durvanei@usp.br; Marcelo Bertolini - mbertolini@gmail.com; Carlos E Ambrósio - ceambrosio@usp.br; Maria A Miglino* - miglino@usp.br

* Corresponding author

Published: 30 March 2009

Received: 29 October 2008

Reproductive Biology and Endocrinology 2009, **7**:25 doi:10.1186/1477-7827-7-25

Accepted: 30 March 2009

This article is available from: <http://www.rbej.com/content/7/1/25>

© 2009 Facciotti et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Placental and fetal growth requires high rates of cellular turnover and differentiation, which contributes to conceptus development. The trophoblast has unique properties and a wide range of metabolic, endocrine and angiogenic functions, but the proliferative profile of the bovine placenta characterized by flow cytometry analysis and its role in fetal development are currently uncharacterized. Complete understanding of placental apoptotic and proliferative rates may be relevant to development, especially if related to the pathogenesis of pregnancy losses and placental abnormalities.

Methods: In this study, the proliferation activity and apoptosis in different regions of normal bovine placenta (central and boundary regions of placentomes, placentomal fusion, microplacentomes, and interplacentomal regions), from distinct gestation periods (Days 70 to 290 of pregnancy), were analyzed by flow cytometry.

Results: Our results indicated that microplacentomes presented a lower number of apoptotic cells throughout pregnancy, with a higher proliferative activity by the end of gestation, suggesting that such structures do not contribute significantly to normal of placental functions and conceptus development during pregnancy. The placentome edges revealed a higher number of apoptotic cells from Day 170 on, which suggests that placentome detachment may well initiate in this region.

Conclusion: Variations involving proliferation and apoptotic rates may influence placental maturation and detachment, compromising placental functions and leading to fetal stress, abnormalities in development and abortion, as frequently seen in bovine pregnancies from in vitro fertilization and cloning procedures. Our findings describing the pattern of cell proliferation and apoptosis in normal bovine pregnancies may be useful for unraveling some of the developmental deviations seen in nature and after in vitro embryo manipulations.

Background

In ruminants, the placenta is classified as cotyledonary on the basis of its gross anatomical features. The immediate feto-maternal contact in the bovine placenta is restricted to multiple discrete structures called placentomes, consisted of the maternal part, the caruncle, and the fetal part, the cotyledon. In early gestation, caruncles and cotyledons are not connected yet, without formation of placentomes [1-3]. Placentome formation can be considered a gradual process that takes place immediately after pregnancy recognition, being fairly completed by the end of organogenesis [4]. Once established, bovine placentomes grow continuously throughout pregnancy. However, placentome growth varies considerably in the course of gestation. Between days 100–160, placentomes show an accelerated growth pattern, reaching its plateau by around day 199. After this phase, placentome growth decreases progressively [5] and is minimal in late gestation [1]. The growth of the foetal and maternal structures that compose the placentomes are different in feature and are differentially regulated, and the proportion of foetal to maternal tissue is specifically controlled by unknown factors that do not act consistently throughout gestation [6].

Coalescence between two or more neighboring caruncles was observed in Egyptian buffalo cows [7]. Those authors observed that the unusual lobulated shape of caruncles may result from the fusion of four or more adjacent ones. Fusion between the neighboring caruncles occurred only in the fibrillar region and thus deep fissures are found on their free convex surface. Most of the caruncles were found at the antimesometrial region of the uterine horn varying in size, number and shape during all pregnancy phases [8,9]. The placentomal fusion presence was also observed in cloned cattle term placenta [10] and was observed a high number of fusions resulting in a increase of placentome size and decrease in numbers.

Bovine normal placentae also presented microplacentomes called accessories placentomes, which have a diameter less than 1.0 cm and with different numbers both found at the extremities of pregnant or not horns. [1,11].

In the formation of mammalian placenta, many factors must interact in a precise manner to a normal placental development. The uterus increases in size to accommodate the bovine fetus, with the size of the uterus not influencing fetal size [12]. However, maternal uterine environment influences fetal growth and those influences may be mediated, in part, by growth and function of caruncular tissues [13].

Placental growth is complex and influenced by many factors, and it is dependent upon a delicate balance between cell proliferation, differentiation, and death [14]. Consid-

ering the distinct macroscopic and functional regions existent at the bovine placenta, diverse patterns of cell proliferation and apoptosis are expected in those regions. A few studies have evaluated the proliferative activity in bovine placentomes [15,16] or the trophoblastic cell density at the end of gestation in cattle [17], but the spatial and temporal profiles for cell proliferation and apoptosis characterized by flow cytometry in the bovine placenta are yet to be described. The understanding of such profiles may assist in sorting out mechanisms leading to placental and fetal abnormalities, especially those associated with certain in vitro embryo manipulations, such as in vitro fertilization (IVF) and cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedures [4,18]. Despite their wide use around the world today, such embryo technologies are associated with pre- and postnatal abnormalities, including increased rates of pregnancy losses, hydrops of the fetal membranes, prolonged gestation, diminished signs of parturition, dystocia, and birth of large calves with lower postnatal survival [4]. Placental tissues from cloned bovine gestations had shown more proliferation activity and a reduced rate of apoptosis in the central region of the placentomes and interplacentomal areas that may be associated with the uncommon abnormalities after in vitro embryo manipulations [19]. The appearance of such a diverse range of abnormalities does compromise the practical application of those technologies [20], but also ensures that novel knowledge is gained in mammalian developmental biology, as for one to know the abnormal, the characterization of the normalcy is essential. Therefore, the aim of this study was to characterize normal placenta development during gestation in cattle, describing cell proliferation and apoptotic profiles in distinct topographic regions of the placenta based on the DNA content analysis by flow cytometry. The choice of each placental region was based on different areas in the same placentome (central and edges), interplacentomal areas, placentomal fusion and microplacentome, which show different cell activities during placentation, however with low number of studies in this field.

Methods

Animals and tissue sampling

A total of 28 bovine placentas (*Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds) at different gestational phases were collected at a local abattoir. The uterus of each animal was cut open, the fetus removed, and the crown-rump length used to estimate the stage of gestation [21,22]. Placentae were divided into four groups of 7 animals each: group I (70 to 120 days), group II (121 to 170 days), group III (171 to 220 days), and group IV (221 to 290 days).

Different regions of each placenta were collected, namely the central region of the placentome, the placentome edges, interplacentomal areas, placentomal fusion, and

microplacentomes (≤ 1.0 cm), as illustrated in Figure 1. Two placental tissue pieces, collected from each placental region from each animal, were gently excised and cut into numerous small fragments of around 0.5 cm, to be immediately plunged into liquid nitrogen and subsequently used for flow cytometry analysis. Due the anatomical particularities of interplacentomal region during the mechanic dissection, myometrium was gently extracted and kept the total tissue with fetal and maternal epithelia, also fetal mesenchyme for flow cytometry analyses. All placental tissue pieces contained both maternal and foetal tissue, including connective tissue and uterine and trophoblastic epithelia. Therefore, the flow cytometric analysis was performed on a cell population composed largely of epithelial cells, with a rare proportion of maternal stroma and foetal mesenchyme, such as fibroblasts and endothelial cells. The uterine subepithelial cell in bovines is richly vascularized and composed by a great amount of fibrocytes [23], which are in quiescent metabolic status [24], and not significantly interfering on the proportion of cells in the proliferation (S, G2/M) or in apoptosis.

Flow cytometry analysis – DNA content and cell cycle distribution

Fragments stored in liquid nitrogen were placed in citrate buffer, pH 7.6, and processed according to previous experiments [25], being subsequently filtered through a 30 μ m mesh (Spectra Mesh Nylon Filters, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to separate proteins (a large component of the tissue stroma, or connective tissue) and cell debris, composed of blood cells, degenerating/degener-

Figure 1
Representation of the distinct placental regions from which tissue samples were collected for flow cytometry analysis. (1) Central region of the placentome, (2) Placentome edges, (3) Microplacentome, (4) Interplacentomal region, (5) Placentomal fusion. Bovine pregnant tract at 122 days of gestation.

ated cells and adipose tissue. Samples were incubated in 30 mg/mL trypsin (Sigma Chemical Co.) for 10 min at room temperature. Then, 5 mg/mL trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.) and 0.1 mg/mL of ribonuclease A (Sigma Chemical Co.) were added for 10 min at room temperature (for optimal DNA resolution), and 415 μ g/mL propidium iodide (Sigma Chemical Co.) was added 15 min before the flow cytometry analysis. At least 10,000 events were acquired using Cell Quest Software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). The DNA content was measured using a FACScalibur Flow Cytometer (Beckton Dickinson) equipped with an air-coupled 15-mW, 488-nm argon ion laser. The percentage of cells in each phase of the cell cycle, namely apoptosis (sub-G1, DNA fragmentation), G0/G1 (quiescent cells), synthesis (S), and G2/M (proliferative phase) was determined with ModFit Software analyses (Beckton Dickinson).

Data from cytometry experiments were subjected to one-way ANOVA followed by pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls method) using GraphPad Instat 3.0 software.

Results

The cell cycle analysis was performed in placental tissues throughout pregnancy, starting at a time when placentomes are already well formed. The percentage of cells in each phase of the cell cycle for each topographic region of the bovine placenta by group is displayed in Table 1.

In group I, a lower number of G2/M cells ($P < 0.05$) and a higher number of G0/G1 cells ($P < 0.05$) were observed in microplacentomes and placental fusions in comparison with the interplacentomal region and the edges of the placentomes, indicating a lower proliferative activity in the former structures, along with a lower cell death rate. In this gestational group, the incidence of apoptotic cells were lower in microplacentomes ($P < 0.05$) in comparison with the other placental regions (Figure 2a).

Significant variations remained on microplacentomes and placental fusions on Group II, as shown in Figure 2b. Those structures remained with a lower number of cells in proliferative activity in relation to the other regions, demonstrating significantly lower values for cells in G2/M phase ($P < 0.05$) and higher number of cells in G0/G1 phase ($P < 0.01$). The number of apoptotic cells was also lower in microplacentomes in relation to the other regions ($P < 0.05$), except the central region of placentome. However, a lower number of apoptotic cells were also observed in placental fusions in Group II, indicating a lower cell death rate.

In Group III, the number of G0/G1 cells differed significantly in the edges of placentomes ($P < 0.05$) and in total

Table 1: Distribution of the cell cycle phases (in %) in distinct topographic regions of placentae at different stages of gestation in cattle

Cell cycle phase	Groups: Days in gestation	Placental region					
		Placentome Total*	Central region	Edges	Interplacentomal region	Microplacentomes	Placentomal fusion
G2/M	G-I: 70 to 120	20.0 ± 11.4 ^{a, b}	16.7 ± 7.0 ^{a, b}	23.4 ± 15.9 ^a	23.6 ± 3.1 ^a	8.9 ± 6.2 ^{b, B}	7.7 ± 4.3 ^b
	G-II: 121 to 170	20.3 ± 10.2 ^a	18.9 ± 9.3 ^a	21.7 ± 11.1 ^a	18.3 ± 9.3 ^a	7.7 ± 2.1 ^{b, B}	5.4 ± 3.4 ^b
	G-III: 171 to 220	21.6 ± 12.1 ^{a, b}	19.6 ± 13.7 ^{a, b}	23.6 ± 10.6 ^a	17.6 ± 9.4 ^{a, b}	13.1 ± 12.4 ^{a, b}	7.3 ± 4.1 ^b
	G-IV: 221 to 290	18.8 ± 7.7	18.6 ± 5.9	19.0 ± 9.6	18.5 ± 6.5	21.8 ± 8.4 ^a	12.1 ± 11.3
S	G-I: 70 to 120	5.6 ± 3.5	5.7 ± 3.4	5.5 ± 3.6	5.6 ± 2.5	3.7 ± 3.1	3.1 ± 0.3
	G-II: 121 to 170	4.4 ± 0.9	4.6 ± 0.9	4.1 ± 1.1	3.0 ± 1.4	3.2 ± 0.7	3.4 ± 1.1
	G-III: 171 to 220	7.4 ± 4.6	10.2 ± 7.4	4.5 ± 1.8	5.0 ± 4.2	5.5 ± 4.6	3.6 ± 1.6
	G-IV: 221 to 290	5.6 ± 3.3	8.2 ± 4.9	3.0 ± 1.8	3.7 ± 2.6	4.4 ± 3.9	3.0 ± 1.5
G0/G1	G-I: 70 to 120	63.7 ± 16.3 ^{a, b}	67.0 ± 13.8 ^{a, b}	60.4 ± 18.9 ^a	57.0 ± 9.1 ^a	84.3 ± 11.8 ^b	80.5 ± 10.9 ^b
	G-II: 121 to 170	60.5 ± 18.1 ^a	64.6 ± 13.8 ^a	56.5 ± 22.3 ^a	64.3 ± 18.3 ^{a, b}	86.4 ± 2.0 ^b	87.7 ± 3.9 ^b
	G-III: 171 to 220	54.2 ± 20.7 ^a	62.2 ± 18.1 ^{a, b}	46.2 ± 23.4 ^a	67.6 ± 15.7 ^{a, b}	78.8 ± 18.5 ^b	83.0 ± 7.1 ^b
	G-IV: 221 to 290	56.1 ± 17.8	62.5 ± 10.0	49.8 ± 25.7	65.1 ± 15.8	71.2 ± 11.0	73.5 ± 22.1
Apoptosis	G-I: 70 to 120	10.7 ± 8.5 ^a	10.6 ± 8.5 ^a	10.7 ± 8.5 ^a	13.7 ± 9.8 ^a	3.0 ± 2.6 ^b	8.6 ± 8.5 ^a
	G-II: 121 to 170	14.8 ± 8.9 ^a	12.0 ± 5.7 ^{a, b}	17.7 ± 13.3 ^a	14.4 ± 8.9 ^a	2.7 ± 0.4 ^b	3.5 ± 0.7 ^b
	G-III: 171 to 220	16.9 ± 7.9 ^{a, b}	8.0 ± 3.7 ^b	25.7 ± 13.9 ^a	9.7 ± 8.2 ^b	2.7 ± 2.1 ^b	6.1 ± 3.3 ^b
	G-IV: 221 to 290	19.5 ± 8.3 ^{a, b}	10.7 ± 4.7 ^b	28.2 ± 17.2 ^a	12.7 ± 10.3 ^b	2.6 ± 1.1 ^b	11.4 ± 9.4 ^b

^{a-c} Values (mean ± SD) in the same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{A-E} Values (mean ± SD) in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

* Total means: central plus edges region of placentome

placentome (central region plus edges) in relation to microplacentomes and placentomal fusions (Figure 2c). The number of G2/M cells was significantly higher in the edges of placentomes ($P < 0.01$) in relation to placentomal fusions. Surprisingly, there were a significantly higher number of apoptotic cells in those boundary areas in groups III and IV ($P < 0.001$), except the total placentome related to central region plus edges areas.

Significant variations were observed in numbers of apoptotic cells in Group IV, as shown Figure 2d. The incidence of apoptotic cells was significantly higher in the placentome edges ($P < 0.001$) in relation to the other regions, except the total placentome (central region + edges).

There were no significant differences in proliferation activity between the interplacentomal region and the central region of placentome, those regions revealed similar values in both cell cycle phases and gestational groups.

Discussion

Our findings by flow cytometric analysis indicated variations in proliferation and apoptosis in different placental regions at each gestational phase. Analyzing the cell cycle phases were found a high standard deviation among the samples, probably due to the high variation of chorionic:uterine cells proportion. However, we aimed to determine the proliferative activity and apoptosis in all studied placental regions like as maternal and fetal tissue and the high standard deviation were expected.

By analyzing the total placentomes, area, i.e., cells from the edge and from the central placentome region, we observed a proliferative activity that was inversely proportional to the apoptotic rate throughout gestation, which was not detected when regions were analyzed separately. According to a previous report [16], apoptosis reflects the beginning of tissue regeneration and continuing histiotrophic nutrition to the fetus, which consists in phagocytosis of maternal apoptotic epithelial cells. Such variations are considered part of the placental maturation process, which can be a requirement to materno-fetal detachment and fetal membranes release [1,16]. Such variations were not detected in term placentas from clone cattle. Using flow cytometry, [19] showed more proliferation activity and a reduced rate of apoptosis in the central region of the placentomes and interplacentomal areas. Such phenomena may be associated with faulty placentation in early pregnancy, placental insufficiency or even a lack of placental and/or fetal maturation towards the end of pregnancy.

When placentome's edges were analyzed separately from the central region of the placentome, a premature increase in apoptotic cells was detected, with a significantly higher number of apoptotic cells than in the other regions as pregnancy progressed, well observed in Groups III and IV. According to [16], the large number of apoptotic cells by the end of gestation occurs as a mechanism associated with maternal-fetal detachment. Therefore, the high number of apoptotic cells in the placentome's edge from

Figure 2
Distribution of the phases of the cell cycle (G2/M, S, G0/G1, apoptosis) in distinct placental regions. (a) Group I (Days 70 to 120 of gestation), (b) Group II (Days 121 to 170 of gestation), (c) Group III (Days 171 to 220 of gestation), (d) Group IV (Days 221 to 270 of gestation).^{a-b} Bars with different superscripts differ; $P < 0.05$.

170 days on suggests this region to be the point of initiation of placentomal detachment in cattle. In this context, the edges of placentome may play an important role in placental maturation and release. These results suggest that placentomal detachment occurs in a centripetal way; therefore, the placentomal maturation occurs from the edges to the center of the placentomes.

TUNEL procedure and Ki-67 proliferation marker demonstrated proliferation not to be the main factor responsible for growth in interplacentomal uterine wall, including adherent fetal membranes, which predominantly should be achieved by hypertrophy [26]. Findings from that study gives support to ours for the interplacentomal region, which showed no significant variations during pregnancy, suggesting that proliferation is of minor importance for tissue homeostasis in the interplacentomal region.

In this study, microplacentomes showed different proliferative patterns throughout pregnancy. The G2/M cells increased in numbers throughout gestation, with significant variations in groups I and II in relation to group IV, suggesting cell cycle progression from a quiescent to a proliferative state. On the other hand, the proportion of apoptotic cells in microplacentomes remained low in all gestational periods, with percentile values being significantly lower than the other studied regions in Group I; the total placentome (central region + edges), the placentome's edges and interplacentomal region in Group II; and the placentome's edges in Groups III e IV. Such results suggest microplacentomes to have a slower proliferation activity in Groups I and II, which could be linked to its limited size in bovine placenta. Apparently, such structures remain at a quiescent state in group I, with low tissue plasticity or remodeling, not following the pattern of maturation and growth seen in normal placentomes. Most likely, the observations above are related to the relatively small role of those structures, with microplacentomes not contributing significantly to normal of placental functions and conceptus development during pregnancy.

Placentomal fusion showed a lower proliferative activity in Groups I and II compared to the other regions, which was similar to microplacentomes. The number of proliferative cells increases on Group IV, however, the number of apoptotic cells also increases in the same period, demonstrating a balance between proliferative and apoptotic cells number in placentomal fusion. The region of fusion is composed by endometrial stromal axis [8], formed by cells in a balance/equilibrium state of proliferative activity, suggesting maternal stromal axis have a functional role in physiological maintenance of gestation, however, a little contribution to maturation and placental release.

Abnormal placental development has been implicated as the main factor limiting the success in ruminant pregnan-

cies derived from IVF and cloning procedures by SCNT [4,18]. Recent studies have described structural and microvascular architecture distinctions in bovine IVF and clone placentae [10,27], with the description of increased number of functional and accessory microcotyledons, dilated caruncular crypts accommodating more than one primary villous with a lack of dense complexes of capillary loops and sinusoidal dilations, abnormal vascularization, tissue remodeling, differentiation and maturation of placental tissue in mid- to late pregnancy. In that period, any alteration in placenta development may affect fetal development and the success of gestation [28], with disturbances in programmed cell death in placenta seeming to be associated with an abnormal pregnancy outcome [29-32]. Taken together, the complete understanding of placental apoptotic and proliferative profiles at distinct placental tissue regions during gestation will shed light to unknown physiological processes related to conceptus development, as some regions may be potentially responsible, at different degrees of influence, to distinct modulation patterns in fetal growth and nutrition throughout pregnancy. In that regard, results from the present study using non-manipulated and crossbred bovine gestations indicated that proliferation and apoptosis exhibit patterns that are specific for the individual placental areas during gestation and at term in normal, non-manipulated pregnancies in cattle.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PRF, REG, DAM and MAM collected the materials, established the pregnancy groups, performed the cytometry analysis, carried out the experiment and wrote major parts of the manuscript. MB wrote parts of the manuscript regarding the physiology of reproduction. CEA, MB and MAM reviewed the manuscript and the quality of the written English. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2007/59744-8 and 2007/52137-9). We gratefully acknowledge Frigorífico Mantiqueira, which provided the animals for this study.

References

1. Bjorkman N: **Morphological and histochemical studies on the bovine placenta.** *Acta Anat* 1954, **22**:1-91.
2. Leiser R: **Development of contact between trophoblast and uterine epithelium during the early stages on implantation in the cow.** *Zentralbl Veterinarmed* 1975, **4**:63-86.
3. Leiser R, Kaufmann P: **Placental structure: in a comparative aspect.** *Exp Clin Endocrinol* 1994, **102**:122-134.
4. Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA, Anderson GB: **Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations.** *Rev Bras Reprod Anim* 2007, **31**:391-405.
5. Reynolds LP, Millaway DS, Kirsch JD, Infeld JE, Redmer DA: **Growth and in vitro metabolism of placental tissues of cows from day 100 to day 250 of gestation.** *J Reprod Fertil* 1990, **89**:213-222.

6. Laven RA, Peters RA: **Gross morphometry of the bovine placentome during gestation.** *Reprod Dom Anim* 2001, **36**:289-296.
7. Abdel-Raouf M, Badawi HM: **Morphological study of uterine caruncles in Egyptian buffalo cows.** *Zbl Vet Med* 1965, **13**:252-263.
8. Pereira FTV, Barreto RSN, Miglino MA, Silva SM, Burioli KC: **Fusão caruncular em vacas prenhes.** *Acta Sci Vet* 2006, **34**:586.
9. Cazerta SMM, Miglino MA, Marques RS, Vulcano M, Pereira FTV: **Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina.** *Pesq Vet Bras* 2007, **27**:229-235.
10. Miglino M, Pereira F, Visintin J, Garcia J, Meirelles F, Rumpf R, Ambrosio C, Papa P, Santos T, Carvalho A: **Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture.** *Theriogenology* 2007, **68**:604-617.
11. Andresen A: **Die placentome der wiederkauer.** *Morphologisches Jahrbuch* 1927, **57**:410-485.
12. Prior RL, Laster DB: **Development of the bovine foetus.** *J Anim Sci* 1979, **48**:1546-1553.
13. Ferrel CL: **Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: growth of tissues of the gravid uterus.** *J Anim Sci* 1991, **69**:1945-1953.
14. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT: **Apoptosis: molecular regulation of cell death.** *Eur J Biochem* 1996, **236**:1-26.
15. Schuler G, Wirth C, Klisch K, Failing K, Hoffmann B: **Characterization of Proliferative Activity in Bovine Placentomes Between Day 150 and Parturition by Quantitative Immunohistochemical Detection of Ki67-Antigen.** *Reprod Dom Anim* 2000, **35**:157-162.
16. Boos A, Janssen V, Mülling C: **Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes.** *Reproduction* 2003, **126**:469-480.
17. Miles JR, Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Farin PW: **Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro.** *Biol Reprod* 2004, **71**:1919-1926.
18. Lonergan P, Evans ACO, Boland E, Rizos D, Fair T, Duffy P, Sung LY, Duc F, Chaubal S, Xu J, Yang X, Tian XC: **Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos.** *Theriogenology* 2007, **68**:1128-1137.
19. Rici REG, Facciotti PR, Ambrósio CE, Maria DA, Kfoury JR Jr, Bertolini M, Miglino MA: **Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae.** *Anim Reprod Sci* 2008 in press. 2008 Nov 27
20. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I: **Large offspring syndrome in cattle and sheep.** *Rev Reprod* 1998, **3**:155-163.
21. Richardson C: **Veterinary reproduction and obstetrics** 6th edition. Edited by: Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. London: Baillière Tindall; 1989.
22. Assis Neto AC, Pereira FTV, Santos TC, Ambrosio CE, Leiser R, Miglino MA: **Morpho-physical Recording of Bovine Conceptus (Bos indicus) and Placenta from Days 20 to 70 of Pregnancy.** *Reprod Domest Anim* 2009 in press. 2009 Feb 25
23. Friedlins J, Leiser R: **Female Reproductive System.** In *Textbook of Veterinary Histology* 5th edition. Edited by: Dellmann HD, Eurell J. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 1998:247-286.
24. Kierszenbaum AL: **Histology and cell biology. An introduction to pathology.** Mosby: St Louis; 2002:106-108.
25. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: **A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis.** *Cytometry* 1983, **3**:323-327.
26. Boos A, Kohtes J, Janssen V, Mülling C, Stelljes A, Zerbe H, Hässig M, Thole HH: **Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes.** *Anim Reprod Sci* 2006, **91**:55-76.
27. Miles JR, Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Farin PW: **Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation.** *Biol Reprod* 2005, **73**:663-671.
28. Redmer DA, Wallace JM, Reynolds LP: **Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development.** *Domest Anim Endocrinol* 2004, **3**:199-217.
29. Runic R, Lockwood CJ, Ma Y, DiPasquale B, Guller S: **Expression of Fas ligand by human cytotrophoblast: implications in placentation and foetal survival.** *J Clin Endocrinol Metabol* 1996, **81**:3111-3122.
30. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L: **Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus.** *J Immunol* 1997, **158**:4122-4128.
31. Uckan D, Steele A, Cherry A: **Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion.** *Mol Hum Reprod* 1997, **3**:655-662.
32. Guller S, Lachapelle L: **The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-foetal interfaces.** *Semin Reprod Endocrinol* 1999, **17**:39-44.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp