LUCAS LUIZ ROCHA ROSESTOLATO

**Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta
bovina**

São Paulo

2020

LUCAS LUIZ ROCHA ROSESTOLATO

**Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta
bovina**

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.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto

São Paulo

2020

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3965
FMVZ

Rosestolato, Lucas Luiz Rocha
Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta bovina / Lucas
Luiz Rocha Rosestolato. – 2020.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto.

1. Célula binucleada. 2. NG2. 3. PDGFR β . 4. Lin28. 5. Let-7. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 07 de julho de 2020
CEUax N [2772050719](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Rodrigo Da Silva Nunes Barreto

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Lucas Luiz Rocha Rosestolato - [executor](#) (fmvz/usp); Rodrigo Da Silva Nunes Barreto (orientador)

Título do projeto: "Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta bovina.".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 27/11/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROSESTOLATO, Lucas Luiz Rocha

Título: **Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta bovina**

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Nancy Rocha Rosestolato
e ao meu pai, César Luiz Rodrigues
Rosestolato. Por me apoiarem em todos
os momentos e por acreditarem em mim
durante a trajetória. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**), proporcionado o desenvolvimento deste projeto no qual sem esta não seria possível.

A Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (**FMVZ**) e especialmente ao **Departamento de Cirurgia** por permitirem o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

A toda equipe de **funcionários da FMVZ** que nunca se ausentaram na resolução das pendências que envolviam meu projeto durante toda a pós-graduação, além do agradecimento ao CADI-FMZ conduzido pela **Dra. Rose Eli** pelo apoio nas imagens presentes nesse trabalho.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto** por todos os conselhos, apoios, ensinamentos, conversas e auxílio. Através de sua disponibilidade consegui aliar dois objetivos em conjunto e conduzi-los com maestria. Sua orientação me trouxe a possibilidade de almejar objetivos mais altos. Agradeço a contribuição em meu desenvolvimento científico e em meu crescimento como pessoa.

Aos grandes amigos e amigas de departamento, especialmente **Igor, Henrique, Mônica, Dara, João e Cristiano** pelas conversas, estudos e pelo companheirismo e apoio nessa trajetória. Vocês são parte importante nesse trabalho.

Aos companheiros de equipe **Amanda, Rafael, Kadija, Tarley** e aos meus alunos de iniciação científica, **Ricardo e Thomas** pelo companheirismo e ajuda em laboratório em diversos momentos.

A todos os **docentes** do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Por fim, agradeço ao excelente **Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres** por abrir as portas e me permitir realizar este projeto de pesquisa.

RESUMO

ROSESTOLATO, L.L.R. **Estudo da formação de células gigantes trofoblásticas em placenta bovina**. 2020. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As células trofoblásticas gigantes (CTGs) possuem papel central na placentação bovina, entretanto sua formação e funções ainda não são completamente elucidadas. Em humanos, é conhecido que células similares são formadas pela regulação entre LIN28 (proteína de ligação a RNA) e a família de miRNAs Let-7. Ainda, pela ampla presença de processos angiogênicos, hipotetizamos que os pericitos podem ser importantes para o desenvolvimento de CTGs. Neste contexto, o objetivo do trabalho é determinar se LIN28 (a e b) e Let-7 são importantes na formação de CTGs, além de estudar a interação das mesmas com pericitos no microambiente placentário. Para tanto, 8 placentas de vacas azebuadas (4 em terço inicial e 4 em terço final de gestação) produzida por monta natural e/ou inseminação artificial foram estudadas através de imunohistoquímica e reação de polimerase em cadeia (qPCR). As análises demonstraram que LIN28A pode estar expresso em maior número em células indiferenciadas, induzindo assim a proliferação e LIN28B parece estar relacionado com migração em CTGs, papel importante para manutenção da placentação bovina e muito associado na literatura com inflamação e malignidade na oncogênese. Foram observadas diferenças apenas para a isoforma Let-7f, tendo aumento de expressão ao final da gestação. Histologicamente, foi possível localizar os pericitos no entorno de capilares encontrados dispersos pelo estroma endometrial, mesênquima ou abaixo do trofoblasto. Porém até o momento não foi possível presenciar possíveis interações com as CTGs, pelo fato das proteínas de marcação serem facilmente detectadas nas CTGs e não serem detectadas nos pericitos.

Palavras-chave: Célula binucleada, NG2, PDGFR β , Lin28, Let-7.

ABSTRACT

ROSESTOLATO, L.R.R. **Study of the formation of trophoblastic giant cells in bovine placenta**. 2020. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Giant trophoblastic cells (GTCs) play a central role in bovine placentation, however their formation and functions are not yet fully elucidated in cattle. In humans, it is known that CTGs are formed by the regulation between LIN28 (RNA-binding protein) and the Let-7 miRNA family. Also, due to the wide presence of angiogenic processes, we hypothesized that pericytes may be important for the development of CTGs. In this context, the objective of this work will be to determine if LIN28 (A and B) and Let-7 are important in the formation of CTGs, besides studying their interaction with pericytes in the placental microenvironment. To this end, 8 placentas of cows azebuadas (4 in one third and 4 in one third of gestation) produced by natural mating and / or artificial insemination will be studied through protocols of immunohistochemistry and polymerase chain reaction (qPCR). Analyzes so far have demonstrated that LIN28a may be expressed in greater numbers in undifferentiated cells, thereby inducing proliferation and Lin28b appears to be related to migration in CTGs, an important role for maintenance of bovine placentation and very associated in the literature with inflammation and malignancy in oncogenesis. Differences were observed only for the Let-7f isoform, with increased expression at the end of gestation. Histologically, it was possible to locate the pericytes around small blood vessels found dispersed by the endometrial stroma, mesenchyme or below the trophoblast, evidencing that they may be fulfilling their functions within the placental microenvironment. However, until now, it has not been possible to see possible interactions with CTGs, because the labeling proteins are easily detected in the CTGs and are not detected in the pericytes.

Keywords: Binucleated cell, NG2, PDGFR β , Lin28, Let-7.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1.	Células trofoblásticas gigantes	13
2.2.	Placentação e oncogênese.....	15
2.3.	O papel dos pericitos no microambiente placentário.....	18
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1.	Desenho experimental.....	21
3.2.	Obtenção das gestações	22
3.3.	Imunohistoquímica	22
3.4.	Análise das imagens.....	23
3.5.	Reações de polimerase em cadeia (qPCR)	23
4.	RESULTADOS.....	25
4.1.	Deteção de LIN28a e LIN28b em placenta bovina	25
4.2.	Expressão da família de miRNAs Let-7 na placenta bovina.....	28
4.3.	Interação de CTGs com pericitos placentários.....	29
5.	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÕES	32
	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro e possui números expressivos no cenário mundial. A produção nacional de carnes deverá suprir, em 2020, 44,5% do mercado mundial, relativas a produção, participação no mercado mundial, exportação e consumo de produtos agropecuários segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018). As condições territoriais e climáticas para produzir de forma sustentável e eficiente fazem com que a atividade possua importância econômica em relação ao Produto Interno Bruto do país (CEPEA, 2018).

Para a manutenção de um rebanho, é necessária a produção de novas gerações. Para tanto, a placenta é o ambiente no qual ocorre intensas trocas fisiológicas entre mãe e feto. Em bovinos, a placentação é classificada como sinepiteliocorial, por possuir uma população trofoblástica com característica migratória (WOODING; BURTON, 2008). Basicamente, as células trofoblásticas gigantes (CTGs) iniciam um processo de migração em direção ao epitélio uterino, fusionando com estas células e originando células híbridas trinucleadas. Esse processo de migração seguido de fusão está relacionado com o reconhecimento da gestação, além de evitar resposta imune materna contra os tecidos fetais, ou seja, desempenha papel central na placentação bovina.

Diversos autores demonstram funções importantes relacionadas a essas células, contribuindo para homeostase da gestação bovina, porém o entendimento da sua formação e comportamento ainda não é completo. Em humanos, é conhecido que a formação das CTGs tem como um dos reguladores a proteína LIN28 que tem função de ligação a RNA, especificamente com a família de miRNAs Let-7. Entretanto a formação de célula híbrida (CTG e epitélio endometrial) parece ser regulada pela

sincitina. Ainda, o padrão capilar também possui certa dependência de sinalização trofoblástica, assim como de pericitos. Portanto, compreender os eventos direta ou indiretamente relacionados à formação das CTGs em bovinos é de suma importância, para um entendimento da homeostase placentária nessa espécie, e de processos patogênicos com hiperplasia de CTGs. Ainda tais mecanismos de acitoquinese, migração, invasão, fusão celular, angiogênese também são compartilhados com o tumorigênese.

Neste cenário, o objetivo deste trabalho é estudar mecanismos responsáveis pelo comportamento de formação e migração de células trofoblásticas gigantes, além de estudar suas relações com os pericitos placentários. Os objetivos específicos desse trabalho, bem como suas hipóteses, estão descritos abaixo:

1- Determinar os perfis de células trofoblásticas gigantes de acordo com os níveis de expressão de LIN 28 A/B (por imunohistoquímica) e de microRNA let 7 (por qPCR).

- *Existem dois perfis de CTGs que são modulados por expressão de LIN28 e Let-7, sendo uma com perfil proliferativo e outra com perfil migratório.*

2. Estudar a atividade de pericitos (NG2 e PDGFR β), através da imunohistoquímica, no microambiente placentário bovino, buscando entender o padrão de localização e sua interação com CTGs.

- *Os pericitos estão presentes no entorno das CTGs e são importantes para o seu desenvolvimento.*

2. REVISÃO DE LITERATURA

A placenta, responsável pela comunicação entre a mãe e o feto, é o ambiente no qual ocorrem intensas trocas fisiológicas entre os organismos. Para que consiga desenvolver seu papel, a placenta é dependente de diversos processos que modulam um desenvolvimento adequado, tais como angiogênese, imunomodulação e diferenciações celulares (LEORNARD 2006; CORRÊA, 2012).

A placenta possui a maior heterogeneidade morfológica entre todos os órgãos em mamíferos (MOSSMAN, 1987). A classificação da placenta bovina, assim como a de outros ruminantes, é corioalantoidiana (fusão das membranas coriônica e alantoidiana), zonária cotiledonária (interação materno-fetal formadas por placentônios), vilosa (interdigitação materno-fetal em forma de vilos) e sinepiteliocorial (todas as seis camadas de tecidos preservadas na interface materno-fetal, além da ocorrência de sincício) (LEISER; KAUFMANN, 1994; MOSSMAN, 1987).

Antigamente, classificava-se a placenta dos ruminantes como sindesmocorial, dizendo que o epitélio uterino estava extinto, de modo que as células trofoblásticas se ligavam diretamente com o tecido conjuntivo materno (GROSSER, 1909). Porém, determinou-se através de novas análises que as células binucleadas, ao longo da gestação, modificam o epitélio uterino formando placas sinciciais na junção materno-fetal, essenciais para o crescimento das vilosidades e consequente diminuição da distância entre os capilares maternos e fetais (WOODING, 1984). Estas células binucleadas correspondem a cerca de 15-20% das células trofoblásticas nos placentônios dos ruminantes (WOODING, 1984).

A placenta sinepiteliocorial possui três características importantes: células trofoblásticas binucleadas e uninucleadas com mesma origem e na mesma camada;

placas sinciciais formadas pela migração e fusão de células binucleadas fetais com o epitélio endometrial; comunicação materno-fetal concentrada em regiões denominadas placentônio (AMOROSO, 1952). Os placentônios são formados por uma porção materna (carúncula) e uma porção fetal (cotilédone) (WILEY et al. 1987), resultando em um aumento na área de troca materno-fetal quando comparada com placentas difusas (BAUR, 1977).

2.1. Células trofoblásticas gigantes

Na fase de implantação em ruminantes, o blastocisto se alonga e estende papilas trofectodérmicas no útero, aumentando a superfície de contato (GUILLOMOT; GUAY 1982). À medida que isso ocorre, o trofectoderma secreta interferon-tau, atuando como sinalizador, bloqueando os pulsos de prostaglandina, evitando a luteólise, sinalizando a gestação e mantendo a secreção de progesterona (SPENCER et al. 2007).

A prenhez bem-sucedida requer uma complexa conexão entre células trofoblásticas e endometriais, guiadas por uma série de eventos. Pioneiramente, segundo Assheton (1906), a implantação e formação do placentônio estão diretamente envolvidas com a atividade das células trofoblásticas gigantes (CTGs), sendo que estas podem ser bi- ou polinucleadas.

O trofoblasto bovino é formado por uma camada de células uninucleadas intercaladas por CTGs, muitas vezes binucleadas (WOODING 1984; WANGO et al., 1990). Segundo Winsatt (1980), as CTGs são maiores que células trofoblásticas adjacentes e possuem núcleos diploides, formato arredondado, volume aumentado e com presença de grânulos citoplasmáticos, que distinguem seu estado de maturação. Essas células binucleadas se desenvolvem a partir de células trofoblásticas

uninucleadas, pela mitose acitoquinética (KLISCH et al.1999). A maioria das CTGs de ruminantes contém dois núcleos, porém também existe a presença de mononucleares e trinucleares (KLISCH et al., 1999).

A formação dos diferentes tipos celulares do trofoblasto se dá através de uma cascata de eventos, dependente de genes específicos, amplamente estudada em camundongos (HEMBERGER, 2010). Essa cascata é essencial para a diferenciação do trofoblasto e formação das CTGs. Em bovinos sabe-se apenas da expressão destes genes no trofotoderma, mas pouco se sabe exatamente sobre os mecanismos para sua diferenciação em CTG a partir do trofoblasto mononuclear (FUJII et al., 2010).

Em estudos com bovinos, Björkman (1968) e Greenstein *et al.* (1958) relataram que as CTGs não são derivadas de linhagem celular específica, iniciando seu surgimento no epitélio coriônico aos 17 dias de gestação e assim permanecendo até o final da gestação. Essas células se originam a partir das células trofoblásticas mononucleadas por meio de cariocinese sem citocinese acompanhante (WOODING *et al.* 1982). Ainda, pesquisas relatam que as CTGs podem originar-se de células trofoblásticas através de mitoses incompletas, mais adiante denominadas como mitose acitoquinética (KLISCH *et al.*, 1999).

As CTGS são continuamente produzidas ao longo da gestação, e migram em direção ao epitélio materno (IGWEBUIKE, 2004), para que ocorra fusão com uma única célula epitelial uterina, formando assim uma célula trinucleada (WOODING; BURTON, 2008). Essas células trinucleadas liberam grânulos na membrana basal do epitélio uterino, facilitando assim o transporte de sinalizações derivadas do trofoblasto (WOODING et al., 1980). Em todos os ruminantes, a função principal dessas células é transferir hormônios fetais e efetores para modificar o ambiente materno para

favorecer o feto tanto metabolicamente quanto imunologicamente (WOODING; BURTON, 2008). A divisão celular rápida no epitélio uterino em conjunto com a contribuição da migração das CTGs binucleadas e da formação de trinucleadas é suficiente para acompanhar a expansão trofotodérmica na vaca (WOODING; BURTON, 2008).

As CTGs binucleadas também podem ter um papel importante no momento do parto, precisamente quando o assunto é retenção placentária (GROSS et al. 1991). Próximo ao momento do parto, verificou-se a necessidade de ocorrer uma diminuição significativa das células binucleadas, para que se dê a liberação normal da placenta (WILLIAMS et al., 1987).

As CTGs podem ser isoladas porque são robustas o suficiente para sobreviver ao procedimento (WOODING; BURTON, 2008). A maioria dos estudos com CTGs isoladas demonstrou liberação, e não síntese, de progesterona, prostaglandinas ou lactogênio placentário, geralmente em taxa decrescente (REIMERS 1985). Além disso, as CTGs em cultivo têm demonstrado deficiências na proliferação e consequentemente tendem a morrer rapidamente.

2.2. Placentação e oncogênese

Os processos neoplásicos, resumidamente, giram em torno de proliferação, migração e invasão. Logo, o estabelecimento e desenvolvimento da placenta, bem como o metabolismo das CTGs, possuem diversas semelhanças com a oncogênese. Informalmente, as células trofoblásticas invasivas são classificadas como um “tumor de bom comportamento” (SOUNDARARAJAN; RAO, 2004). Além disso, a implantação embrionária é uma etapa que culmina na união dos tecidos materno-

fetais, geneticamente diferentes, estimulando células inflamatórias, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão celular (KIMBER, 2000).

Dentre as diversas proteínas relacionadas ao processo tumorigênico, existe a LIN28 em suas duas isoformas: LIN28A e LIN28B (TSIALIKAS; SEIBERT, 2015). Sendo que a LIN28A está localizada no citoplasma das células (BALZER; MOSS, 2007), enquanto a LIN28B, é encontrada especificamente no nucléolo (PISKOUNOVA et al., 2011). A expressão de LIN28A está associada a tumores menos diferenciados e mais agressivos, entretanto sua expressão em tumores bem diferenciados está relacionada com mau prognóstico (HAMANO, 2012). Pelo fato da presença de LIN28A estar mais relacionada à promoção de pluripotência, essa proteína é mais presente em tumores indiferenciados e amplamente expresso em células embrionárias e células pluripotentes induzidas (RICHARDS et al., 2004; HANNA et al., 2009).

A LIN28B é descrita como importante para a transformação celular, além de resultar em aumento de crescimento e motilidade celular (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009), ou seja, contrário à manutenção da diferenciação que ocorre na presença de LIN28A. Ainda, Canfield et al. (2019) mostraram que o decréscimo de expressão de LIN28B pode desempenhar um papel importante na pré-eclampsia, reduzindo a invasão do trofoblasto e promovendo a inflamação.

A modulação da expressão de LIN28A e LIN28B é controlada pela família de microRNA (miRNA) Let-7, ou seja, quando há aumento da expressão de Let-7 há a diminuição da expressão de LIN28A e LIN28B, e vice-versa, resultando em manutenção da pluripotência (VISWANATHAN, 2009; VAN WYNSBERGHE et al., 2011) e transformação celular (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009), respectivamente.

Os miRNAs, no geral, possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e regulam a expressão de RNAs mensageiros complementares envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo a resposta imune inflamatória (YEE; COLES; LAGOS, 2017). Eles estão envolvidos em diversas funções biológicas, incluindo desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação, apoptose e metabolismo (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006). Em conjunto, possui participação em muitas doenças, como doenças genéticas, infecções virais e muitos tipos de câncer (STEFANI; SLACK, 2008). Alexander (2015) revelou que microRNAs liberados por exossomos estão envolvidos na formação do microambiente inflamatório.

Ativações estudadas da via do NF- κ B mostram que a mesma está correlacionada com a oncogênese (LUO et al., 2005). Enquanto isso, o miRNA Let-7 é regulado negativamente em vários cânceres (SAMPSON et al., 2019). Consequente a isso, LIN28a é superexpressa em tumores primários humanos (VISWANATHAN et al., 2009).

A gestação, como um estado fisiológico que se assemelha à tumorigênese, como supracitado, possui células com alto perfil proliferativo e migratório, que na gestação bovina é representada pelas CTGs. Já é evidenciado que LIN28A tem um papel funcional na regulação da diferenciação do trofoblasto em placentas humanas e de camundongos (SEABROOK et al., 2013). Ao contrário dos camundongos, estudos subsequentes revelaram que a placenta humana no primeiro trimestre contém principalmente LIN28B, localizadas no citotrofoblasto, e que essa proteína está envolvida diretamente com a invasão trofoblástica no endométrio (CANFIELD et al., 2018). Em gestações bovinas produzidas por transferência nuclear de célula somática (TNCS) há um maior número de CTGs (RICI et al., 2009), assim como de modulação do tecido conjuntivo no placentônio (BARRETO et al., 2009; MIGLINO et al., 2007).

Portanto torna-se importante o conhecimento do perfil de expressão de LIN28a/b como seus inibidores Let-7 no estado fisiológico da gestação bovina, para seu posterior entendimento nas gestações TNCS.

2.3. O papel dos pericitos no microambiente placentário

Os pericitos vasculares foram descobertos em 1873 (ROUGET, 1873) e eram chamados de células de “Rouget”, referência ao seu descobridor. Posteriormente, Zimmermann (1923) introduziu o termo pericito e o descreveu como uma célula de suporte endotelial, que envolvia o comprimento dos microvasos. São células encontradas ao redor de arteríolas, vênulas e capilares sanguíneos e possuem grande importância na hemodinâmica, promovendo vasoconstrição e vasodilatação, sendo assim importante na regulação do fluxo sanguíneo. Possuem numerosas funções, incluindo estímulos angiogênicos e modulação de células endoteliais vasculares. Os pericitos ainda possuem capacidade de se diferenciar em outras células, como por exemplo osteoblastos, condrócitos e adipócitos (BIRBRAIR et al., 2013).

As células endoteliais e os pericitos se comunicam por contato direto e por sinalização parácrina, e conseqüentemente ocorre interferência na taxa mitótica de ambos. Os pericitos inibem o crescimento das células endoteliais e induzem sua diferenciação (SIMS, 2000).

Além das funções relacionadas aos vasos, há evidências de que os pericitos se relacionam ao sistema imune, facilitando a migração de células para locais inflamados (PROEBSTL et al., 2012). Tem sido notado que preferivelmente eles envolvem junções das células endoteliais, especialmente durante a inflamação (SIMS, 2000). Além disso, são capazes de detectar padrões moleculares relacionados ao perigo, desencadeando um processo pró-inflamatório, aumentando a migração de

células relacionadas ao sistema imune inato, como os macrófagos (STARK et al., 2013).

Nos últimos anos, existiu um renovado interesse da pesquisa nestas células por suas inúmeras funções. Características específicas dos pericitos pressupõem que os mesmos são imprescindíveis para o desenvolvimento normal da placenta nos animais.

Em outras palavras, os pericitos também podem modular as células-tronco, principalmente as hematopoiéticas (KUNISAKI et al. 2013; BANDEIRA et al. 2017). Os tecidos placentários são conhecidos por serem um rico nicho de células-tronco, característica essa que leva a possibilidade concomitante de grande presença de pericitos na placenta. Comprovado isso, a diversidade de funções do pericito poderia ser semelhante no microambiente placentário. Em uma placenta mais madura, foi possível encontrar pericitos que aparentemente possuem morfologia diferente (PRAZERES et al. 2017). Portanto, os pericitos podem ser importantes para o desenvolvimento placentário e homeostase.

A sinalização de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é importante para atrair pericitos pelo receptor PDGFR β e controlar assim o recrutamento, proliferação e diferenciação de pericitos (MOREAU et al. 2014). Aparentemente, o PDGFR β também é expresso em células gigantes trofoblásticas sinusoidais de camundongos (MOREAU et al. 2014). A sinalização entre endotélio e pericitos controla o recrutamento de pericitos e a falta dessa sinalização, por nocaute desses genes ou de algumas doenças placentárias, poderia diminuir o número e a cobertura do pericito e aumentar o diâmetro e a permeabilidade capilar, além de interferir no desenvolvimento de trofoblasto (BARRETO et al., 2019).

Em suma, os pericitos têm uma infinidade de funções que atendem à homeostase placentária, podendo ser associados a alguma função placentária, como controle vascular, ativação de células imunes e diferenciação trofoblástica; no entanto, os mecanismos detalhados ainda são desconhecidos (BARRETO et al., 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa de mestrado teve como Instituição Sede a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, contando com toda a estrutura do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia. Abaixo serão descritas as amostras e técnicas utilizadas no presente projeto de mestrado. A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, aprovou o protocolo sob nº 2772050719 o estudo acima referenciado.

3.1. Desenho experimental

Figura 1 - Desenho esquemático dos experimentos.

Legenda: Placentônios bovinos derivados de 8 gestações, sendo 4 de primeiro trimestre e 4 de terceiro trimestre, serão usados para investigar LIN28a e LIN28b em células binucleadas por imunohistoquímica, além da interação com pericitos. A expressão da família miRNA let-7 serão observadas por qPCR.

Fonte: Rosestolato (2020)

3.2. Obtenção das gestações

Foram utilizadas no experimento 8 placentas de vacas azebuadas (4 de terço inicial de gestação e 4 de terço final de gestação), provenientes de gestações produzidas por monta natural e/ou inseminação artificial, tendo sua idade gestacional estimada de acordo a distância entre a crista nugal ao início cauda (“crown-rump lenght” – CRL). As amostras foram derivadas de outros projetos de pesquisa finalizados e previamente aprovados pela CEUA, desta mesma instituição, sob protocolos 447/2004, 1678/2009, 9408110315 e 9050171115.

3.3. Imunohistoquímica

Os placentônios foram seccionados e fixados em paraformaldeído 4% tamponado. As amostras preservadas em paraformaldeído tamponado 4%, foram rotineiramente desidratadas, diafanizadas e embebidas em parafina histológica. Os blocos de parafina foram seccionados com espessura de 5 µm e montados em lâminas de vidro e desparafinados em xilol e reidratados em séries crescente de álcool.

As amostras foram utilizadas para reações de imunohistoquímica para localização e presença de proteínas LIN28 (LIN28a e LIN28b) e pericitos (NG2 e PGDFRβ). Resumidamente, após os cortes serem desparafinados em xilol e reidratados em séries crescente de álcool foi realizada a recuperação antigênica induzida por calor e o bloqueio da peroxidase endógena utilizando reagentes do kit EnVision FLEX mini (Dako) de acordo com recomendação do fabricante. O bloqueio de ligações inespecíficas realizado com 2% de albumina sérica bovina em solução fosfato tamponada (PBS; 136,9 mM de NaCl; 26,8 mM de KCl; 14,7 mM de KH₂PO₄; e 8,1 mM de Na₂HPO₄.7H₂O; pH 7,2) por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram

incubados com o anticorpo primário (concentração de 1 para 200) por aproximadamente 16 horas (*overnight*) em câmara úmida a 4°C. As reações foram visualizadas com EnVision FLEX DAB + cromógeno e contra-coradas com hematoxilina. Entre cada passo, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada.

3.4. Análise das imagens

Das lâminas obtidas após o processo de imunohistoquímica, cinco campos aleatórios (de cada amostra) foram fotografados com magnificação de 40 vezes, usando o microscópio Zeiss Axioplan 2 e câmera Axiocan HRc e analisados por intensidade de pixels com o complemento “IHC profiler” do programa ImageJ (v.1.44p). Foram consideradas a porcentagem de pixel com intensidade variando de 0 a 120, ou seja, com maior intensidade.

Os dados foram analisados pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans – least square means) do programa SAS (Versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo e idade gestacional) e erro padrão.

3.5. Reações de polimerase em cadeia (qPCR)

O RNA total das amostras de placentônio foram extraídas utilizando o kit RNAeasy (Qiagen, cat. # 74104) segundo recomendações do fabricante.

Para análise de mRNAs, o RNA total foi transcrito reversamente para formar DNA complementar, e o material resultante analisado por qPCR em tempo real. Os níveis de microRNAs Let-7 foram determinados com o kit de detecção de miRNA miRNA-PCR mirVana e os conjuntos de primers qRT-PCR, de acordo com as instruções do fabricante, com o miRNA RNU48 usado como controle endógeno. As

amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real time PCR System).

A análise estatística realizada dos resultados obtidos foi a do método de 2^{-ddCT} segundo Livak & Schmittgen (2001).

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de LIN28a e LIN28b em placenta bovina

De modo geral, a reação imunohistoquímica para LIN28a (assim como LIN28b) na placenta bovina pode ser visualizada por coloração marrom acastanhada no citoplasma celular (Figuras 2 e 3).

No primeiro trimestre gestacional, o LIN28a é intensamente detectado em CTGs (Figura 2a,c), diminuindo a intensidade no terceiro trimestre (Figura 3a,c). Padrão oposto ocorreu para LIN28b, sendo baixa intensidade no primeiro trimestre (Figura 2b, d) e alta no terceiro trimestre gestacional (Figura 3b, d). Ambos, LIN28a e LIN28b, estão presentes apenas no trofoblasto e no epitélio endometrial. A presença de LIN28a e LIN28b foi similar nos dois trimestres do trofoblasto mononuclear.

Quando quantificado por intensidade de pixel, em todas as células da placenta, foi possível observar que tanto o LIN28a como LIN28b aumentam no decorrer da gestação (Figura 4).

Figura 2 - Detecção de LIN28a e b em placenta bovina de primeiro trimestre de gestação.

Legenda: Em A e C, LIN28a no placentônio de primeiro trimestre de gestação. Em B e D, LIN28b no placentônio de primeiro trimestre de gestação. Ambos, LIN28a e LIN28b, estão presentes apenas no trofoblasto e no epitélio endometrial. Observe que LIN28a e LIN28b têm padrão oposto de presença nas CTGs, sendo mais intenso para LIN28a do que para LIN28b no primeiro trimestre de gestação. Marrom, produto de reação imunológica; azul, contrastante de hematoxilina. Barra = 100 µm.

Fonte: Rosestolato (2020)

Figura 3- Detecção de LIN28a e b em placenta bovina de terceiro trimestre de gestação.

Legenda: Em A e C, LIN28a no placentônio de terceiro trimestre de gestação. Em B e D, LIN28b no placentônio de terceiro trimestre de gestação. Ambos, LIN28a e LIN28b, estão presentes apenas no trofoblasto e no epitélio endometrial. Observe que LIN28a e LIN28b têm perfil oposto nas CTGs, sendo menos intenso para LIN28a do que para LIN28b no terceiro trimestre de gestação. Marrom, produto de reação imunológica; azul, contrastante de hematoxilina. Barra = 100 μ m.

Fonte: Rosestolato (2020)

Figura 4 – Porcentagem de pixel com maior intensidade (0 a 120) em imunohistoquímica para LIN28a e LIN28b em placenta bovina em início e final de gestação.

Legenda: Observe que houve aumento de intensidade de pixel tanto para LIN28a e LIN28b no decorrer da gestação. Asterisco representa diferença estatística ($P > 0,05$).

Fonte: Rosestolato (2020)

4.2. Expressão da família de miRNAs Let-7 na placenta bovina

Em geral, por qPCR não foram observadas diferenças na família de miRNAs let-7 com o avanço da gestação, exceto para a isoforma Let-7f que diminuiu sua expressão ao final da gestação, como demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Expressão da família de miRNAs Let-7 em placentônios bovinos no primeiro e terceiro trimestres de gestação

Legenda: Observe que não ocorreram diferenças de expressão entre as amostras do primeiro e terceiro trimestres, exceto para Let-7f. Asterisco representa diferença estatística ($P > 0,05$).

Fonte: Rosestolato (2020)

4.3. Interação de CTGs com pericitos placentários

Histologicamente, foi possível localizar os pericitos ao entorno daqueles pequenos vasos sanguíneos encontrados dispersos pelo estroma endometrial, mesênquima ou abaixo do trofoblasto (Figura 6). Tais células tem como marcadores moleculares as proteínas NG2 e PDGFR β , entretanto essas não foram detectados nos pericitos por imunohistoquímica, mas sim nos núcleos das CTGs.

Figura 6- Utilização dos anticorpos NG2 e PGDRFB em placentas bovinas em terço final de gestação

Legenda: Em A e C, NG2 no cotilédone de terceiro trimestre de gestação. Em B e D, PGDRFB no cotilédone de terceiro trimestre de gestação. Os anticorpos NG2 e PDGFRB foram expressos nos núcleos das CTGs. Observar o pericitos identificados pelas setas. Seta: Pericitos em volta dos capilares; *: CTGs. Marrom, produto de reação imunológica; azul, contrastante de hematoxilina. Barra = 100 μ m.

Fonte: Rosestolato (2020)

5. DISCUSSÃO

Com relação a detecção de Lin28a e Lin28b nos períodos gestacionais, os resultados corroboram com os estudos de Seabrook et al. (2013) no qual estudando placenta humana e de camundongos, encontraram a proteína LIN28a diminuída nas CTGs já diferenciadas em comparação com células proliferativas. Ainda, consensual que LIN28b é descrito como importante para o aumento de proliferação celular e motilidade, eventos importantes para o avanço gestacional (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009).

O ciclo de formação, migração e degeneração das CTGs se processa durante toda a prenhez com maior intensidade no terço final (RICI et al., 2009). Essa intensidade pode estar relacionada com o aumento de LIN28a e LIN28b na placenta, conforme verificado pela análise de intensidade de pixel. Portanto, pode-se sugerir que tais proteínas possuam um papel funcional na regulação da diferenciação e migração do trofoblasto na gestação em vacas.

Com base nos resultados obtidos através da análise de qPCR, como as proteínas LIN28a/b são reguladoras da expressão de miRNA Let-7 (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009), e ambas estão presentes, como mostrado anteriormente, provavelmente o balanço de LIN28A e LIN28B mantém os níveis de miRNA let-7. A LIN28, em suas isoformas A e B, são importantes na regulação da família let-7 dos miRNAs (ZHANG et al., 2016). Quando há aumento da expressão de Let-7 há a diminuição da expressão de LIN28A e LIN28B, e vice-versa, resultando em manutenção da pluripotência (VISWANATHAN, 2009; VAN WYNSBERGHE et al., 2011) e transformação celular (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009), respectivamente. Ainda, sabe-se que Let-7 inibe a proliferação e invasão de várias

células cancerígenas, no entanto, o seu efeito na migração e invasão em células trofoblásticas ainda não é conhecido (ZHANG et al., 2019).

A proteína NG2, além de amplamente presente nos pericitos, está presente em células com o perfil de proliferação, migração e adesão celular (BURG; GRAKO; STALLCUP, 1998). Esses processos são comuns às CTGs (VAN SINDEREN et al., 2013). Por esse motivo, NG2 também está presente em parte das CTGs, resultado encontrado nesse estudo. É provável que, pelo menos em parte, essa proteína seja produzida localmente e são importantes à placentação (VAN SINDEREN et al., 2013).

O PDGFR β é normalmente expresso no citotrofoblasto humano (ANDRAE et al., 2008; HOLMGREN et al., 1992), além dos pericitos. Dentro de nosso conhecimento, é a primeira vez que é descrito em CTGs bovinas, entretanto sabe-se que células do trofotoderma bovino e suíno expressam fortemente o PDGFR β , sendo provável que participe da diferenciação celular e do alongamento do blastocisto antes da implantação nessas espécies (APPIAH-KUBI et al., 2016). A perda de expressão do ligante (PDGF-B) ou do receptor (PDGFR β) leva a uma diminuição de células trofoblásticas e pericitos na placenta, assim como uma dilatação da vasculatura, devido à perda de controle vascular (OHLSSON et al., 1999). Os sinais de PDGF-B através do seu receptor influenciam a diferenciação celular, proliferação, migração e sobrevivência em vários órgãos (TALLQUIST; KAZLAUSKAS, 2004). Ainda, o PDGF-B atua como um fator de crescimento no citotrofoblasto, atuando positivamente na sua proliferação, e sua desregulação pode levar a uma proliferação descontrolada do trofoblasto (HOLMGREN et al., 1992).

Os pericitos são importantes no microambiente placentário e podem ter influências diretas com as CTGs, pois na insuficiência placentária ocorre proliferação alterada de trofoblasto, diminuição de pericitos e aumenta o número de CTGs na

camada do labirinto em placentas de camundongos (NATALE et al., 2018). Esse fato mostra uma relação direta entre ambos e os resultados futuros deste projeto poderão evidenciar essa associação.

6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que Lin28a/b possuem importância na formação e modulação das CTGs. No terço inicial de gestação as CTGs parecem ser moduladas primeiramente por LIN28a e em contrapartida, no terço final de gestação por LIN28b, podendo conferir um perfil mais invasivo devido a maior presença de LIN28b (tumorigênico). O Let-7 não parece ter um perfil específico para cada fase gestacional, exceto pelo Let-7f.

As proteínas NG2 e PDGFR β foram detectadas nas CTGs mais intensamente no terço final de gestação, entretanto não foram detectadas nos pericitos.

REFERÊNCIAS

- AMOROSO, E. C., Placentation. **Marshall's Physiology of Reproduction**, (A. S. Parkes, editor), Longmans Green and Co., London, 3rd edition, 1952, 9., 127.
- ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes & Development**, v. 22, n. 10, p. 1276–1312, 15 maio 2008. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1653708>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- ASSHETON, R., STEVENS, T. G. “ Notes on the Structure and Development of the Elephant's Placenta,” ‘ **Quart. Journ. Micr. Sci.**,’ vol. 49, 1906.
- BALZER, E.; MOSS, E. G. Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. **RNA biology**, v. 4, n. 1, p. 16–25, 27 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/rna.4.1.4364>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- BANDEIRA, D.S; CASAMITJANA, J; CRISAN, M. Pharmacology & Therapeutics Pericytes , integral components of adult hematopoietic stem cell niches. **Pharmacol Ther**;171:104–13. 2017.
- BARRETO, R. S. N. et al. Pericytes in the Placenta: Role in Placental Development and Homeostasis. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]1122p. 125–151.
- BARRETO, R. D. S. N. et al. Caracterização da fusão caruncular em gestações naturais e de conceitos bovinos clonados [Characterization of the caruncular fusion in gestations of natural and cloned bovine conceptuses]. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 10, p. 779–787, 2009.
- BAUR, R. Morphometry of the placental exchange area. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**, v. 53, n. 1, p. 3–65, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/878950>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- BIRBRAIR, A. et al. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. **Stem cells and development**, v. 22, n. 16, p. 2298–314, 15 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2012.0647>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- BIRBRAIR, A; T ZHANG, Z.M; WANG, M.L; MESSI, G.N; ENIKOLOPOV, A. MINTZ; O, DELBONO. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. 2013. *Stem Cell Res* 10:67-84.
- BJÖRKMAN, N. H. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 3, p. 249–58, ago. 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5750758>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – MAPA. Brasília, 25 nov. 2018.
- BURG, M. A.; GRAKO, K. A.; STALLCUP, W. B. Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. **Journal of cellular physiology**, v. 177, n. 2, p. 299–312, nov. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4652%28199811%29177%3A2%3C299%3A%3AAID-JCP12%3E3.0.CO%3B2-5>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- CANFIELD, J. et al. Decreased LIN28B in preeclampsia impairs human trophoblast differentiation and migration. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 2, p. 2759–2769, fev. 2019. Disponível em:

- <<https://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.201801163R>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Boletim do Bovino, ano 7, n. , dez. 2018.
- CORRÊA, I. P. et al. Expression of angiogenic factors in placenta of stressed rats. **Reproduction, fertility, and development**, v. 24, n. 6, p. 851–8, 2012. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD11202>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- DE SOUSA, P. A. et al. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 23–30, 1 jul. 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.1.23>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- FUJII, T. et al. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cellular reprogramming**, v. 12, n. 5, p. 617–25, out. 2010. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cell.2010.0017>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- GREENSTEIN, J. S.; MURRAY, R. W.; FOLEY, R. C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. **The Anatomical record**, v. 132, n. 3, p. 321–41, nov. 1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13637407>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- GROSS, TS et al. Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. **Placenta**. Volume 12, Issue 1, January–February, Pages 27-35. 1991.
- GROSSER, O. Vergleichende anatomie und enwicklungsgeschichte der eihaut und der placenta. Wien und Lepzig: Wilhelm Braumuller, 1909.
- GUILLOMOT, M.; GUAY, P. Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. **The Anatomical record**, v. 204, n. 4, p. 315–22, dez. 1982. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1092040404>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- HAMANO, R. et al. High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer. **British journal of cancer**, v. 106, n. 8, p. 1415–23, 10 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc201290>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- HANNA, J. et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 595–601, 8 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature08592>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- HEMBERGER, M. Genetic-epigenetic intersection in trophoblast differentiation: implications for extraembryonic tissue function. **Epigenetics**, v. 5, n. 1, p. 24–9, 1 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/epi.5.1.10589>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- HILL, J. R. et al. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1787–94, 1 dez. 2000. Disponível em: <<http://academic.oup.com/biolreprod/article/63/6/1787/2723498/Evidence-for-Placental-Abnormality-as-the-Major>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- HOLMGREN, L. et al. The expression of PDGF alpha- and beta-receptors in subpopulations of PDGF-producing cells implicates autocrine stimulatory loops in the control of proliferation in

- cytotrophoblasts that have invaded the maternal endometrium. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 6, n. 3, p. 219–31, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1389228>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- HUNT, J. S. et al. Localization and Characterization of Macrophages in Murine Uterus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 38, n. 2, p. 255–265, ago. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3897420>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas--A minireview. **Animal reproduction science**, v. 93, n. 3–4, p. 185–98, jul. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432005001703>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 693–706, 13 nov. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409013026>>. Acesso em: 1 jul. 2019.
- JAMES, A. W. et al. Perivascular Stem Cells: A Prospectively Purified Mesenchymal Stem Cell Population for Bone Tissue Engineering. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 510–519, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197855>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- JOUSAN, F.D; OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. J. Short-term culture of in vitro produced bovine preimplantation embryos with insulin-like growth factor-i prevents heat shock induced apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *Mol reprod dev*, v.75, n.4, p681-688, 2008
- KIMBER, S. J. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation. **Seminars in reproductive medicine**, v. 18, n. 3, p. 237–53, 2000. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2000-12562>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- KIMURA, K. et al. Effects of Mastectomy on Composition of Peripheral Blood Mononuclear Cell Populations in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1437–1444, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146474>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- KLISCH, K. et al. DNA Content and Ploidy Level of Bovine Placentomal Trophoblast Giant Cells. **Placenta**, v. 20, n. 5–6, p. 451–458, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419810>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- KLOOSTERMAN, W. P.; PLASTERK, R. H. A. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. **Developmental Cell**, v. 11, n. 4, p. 441–450, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17011485>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- KWAK-KIM, J. et al. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 72, n. 2, p. 129–40, ago. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12234>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- KYDD, J. H. et al. Expression of major histocompatibility complex (MHC) class 1 molecules on early trophoblast. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 463–77, 1991.

- Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1795291>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- KUNISAKI Y. et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 2013;502:637–43.
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122–34, 15 jul. 1994. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1211275>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- LEONARD, S. et al. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification -- facts and hypotheses -- a review. **Placenta**, v. 27 Suppl A, p. S40-6, abr. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400405003036>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- LIVAK, K; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. **Methods**. v.25, n4, p. 402-408, 2001.
- LUO, J.-L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2625–32, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI26322>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MANSOURI-ATTIA, N. et al. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5687–92, 7 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812722106>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MCWHORTER, E. S. et al. LIN28B regulates androgen receptor in human trophoblast cells through Let-7c. **Molecular reproduction and development**, 19 jun. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.23226>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- MAJEED AF, Al-Sadi HI, Ridha AM, 1995: Ovine placenta related to binucleated cells in fetal membrane retention. *Small Rumin Res* 17, 97–99.
- MEIRELLES, F. V et al. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 88–97, 2010. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD09229>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MIGLINO, M. A. et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604–17, 1 set. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07002658>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 37, n. 1, p. 53–6, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882246>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–663, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209134>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 80–87, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401634>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MOREAU, J. L. M. et al. Cited2 is required in trophoblasts for correct placental capillary patterning.

- Developmental biology**, v. 392, n. 1, p. 62–79, 1 ago. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160614002413>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- MOSSMAN, H. W. Vertebrate Fetal Membranes. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987.
- NATALE, B. V. et al. Reduced Uteroplacental Perfusion Pressure (RUPP) causes altered trophoblast differentiation and pericyte reduction in the mouse placenta labyrinth. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 17162, 21 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30464252>>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- OHLSSON, R. et al. PDGFB Regulates the Development of the Labyrinthine Layer of the Mouse Fetal Placenta. **Developmental Biology**, v. 212, n. 1, p. 124–136, ago. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001216069993065>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. J. Phenotypic characterization of macrophages in the endometrium of the pregnant cow. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 62, n. 6, p. 418–26, 6 dez. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2009.00761.x>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- PISKOUNOVA, E. et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1066–79, 23 nov. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741101289X>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- POLESSKAYA, A. et al. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. **Genes & development**, v. 21, n. 9, p. 1125–38, 1 maio 2007. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.415007>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- PRAZERES PHDM, SENA IFG, IDT B, DE AZEVEDO PO, ANDREOTTI JP, DE PAIVA AE, DE ALMEIDA VM, DE PAULA GUERRA DA, PINHEIRO DOS SANTOS GS, MINTZ A, DELBONO O, BIRBRAIR A (2017) Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue. *Dev Biol* 427:6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.001>
- PROEBSTL, D. et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *The Journal of experimental medicine*, v. 209, n. 6, p. 1219–34, 4 jun. 2012.
- REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1227–36, 1 dez. 1985. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod33.5.1227>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- RICHARDS, M. et al. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 1, p. 51–64, 1 jan. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.22-1-51>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- RICI, R. E. G. et al. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1–4, p. 29–38, out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008004703>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- ROBERTSON, S. A.; CARE, A. S.; SKINNER, R. J. Interleukin 10 Regulates Inflammatory Cytokine Synthesis to Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Abortion and Fetal Growth Restriction in Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 5, p. 738–748, 1 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215490>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

- ROUGET, C. Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. **Académie Des Sciences**, Paris, v. 5, n. 1, p.603-661, jun. 1873
- SÁ DA BANDEIRA, D.; CASAMITJANA, J.; CRISAN, M. Pericytes, integral components of adult hematopoietic stem cell niches. **Pharmacology & therapeutics**, v. 171, p. 104–113, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725816302327>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- SAMPSON, V. B. et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. **Cancer research**, v. 67, n. 20, p. 9762–70, 15 out. 2007. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-2462>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- SANTOS, F. et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Current biology : CB**, v. 13, n. 13, p. 1116–21, 1 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842010>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- SCHLAFFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal reproduction science**, v. 60–61, p. 145–60, 2 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844191>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- SEABROOK, J. L. et al. Role of LIN28A in mouse and human trophoblast cell differentiation. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 4, p. 95, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.113.109868>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- SIMS, D.E. Diversity Within Pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:842–6.
- SOUNDARARAJAN, R; RAO, A.J. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': Significance and contributory factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**. Article number: 15. 2004.
- SPENCER, T. E. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, fertility, and development**, v. 19, n. 1, p. 65–78, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389136>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- STARK, K. et al. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and “instruct” them with pattern-recognition and motility programs. *Nature Immunology*, Falta cidade, v. 14, n. 1, p.41-51, jan. 2013.
- STEFANI, G.; SLACK, F. J. Small non-coding RNAs in animal development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 219–230, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18270516>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- SU, J. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 12, 8 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24397284>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- TALLQUIST, M.; KAZLAUSKAS, A. PDGF signaling in cells and mice. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 4, p. 205–213, ago. 2004. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207812>>. Acesso em: 3 jul. 2019.
- THAXTON, J. E.; ROMERO, R.; SHARMA, S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 1144–54, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0900788>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- TSIALIKAS, J.; ROMER-SEIBERT, J. LIN28: roles and regulation in development and beyond. **Development (Cambridge, England)**, v. 142, n. 14, p. 2397–404, 15 jul. 2015. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.117580>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- VISWANATHAN, S. R. et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. **Nature genetics**, v. 41, n. 7, p. 843–8, 31 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.392>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- VAN SINDEREN, M. et al. The chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG4) regulates human trophoblast function. **Placenta**, v. 34, n. 10, p. 907–12, out. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400413006528>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- VAN WYNSBERGHE et al. LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Structural & Molecular Biology**. Volume 18, pages302–308. 2011.
- WANGO, E., WOODING, F. B. P. & HEAP, R. B. Differences in the role for prostaglandin E2 in steroid synthesis of isolated binucleate cells from sheep and goat placenta. **Journal of Endocrinology Suppl.** 131, 117. 1990.
- WILEY, A. A.; BARTOL, F. F.; BARRON, D. H. Histogenesis of the ovine uterus. **Journal of animal science**, v. 64, n. 4, p. 1262–9, 1 abr. 1987. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/64/4/1262-1269/4665847>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- WILLIAMS, W.F. et al. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention **Theriogenology**. Volume 28, Issue 2, August, Pages 213-223. 1987.
- WIMSATT, W. C. 'Complexity and Organization,' in PSA-1972 (Boston Studies in the Philosophy of Science, v. XX), edited by K. F. Schaffner and R. S. Cohen, Reidel, Dordrecht, pp. 67–86. 1974.
- WOODING FBP & BURTON GJ. Comparative Placentation: Structure, Function and Evolution. Springer-Verlag, Heidelberg. 2008
- WOODING FBP, STAPLES LD, PEACOCK MA. Structure of trophoblast papillae on the sheep conceptus at implantation. *J Anat*, v.134, p.507-516, 1982.
- WOODING, F.B.P. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *American Journal of Anatomy* 170: 233–250. 1984
- WOODING, F.B.P., CHAMBERS, S.G., PERRY, J.S., GEORGE, M., HEAP, R.B. Migration of Binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy. *Anatomy and Embryology* 158: 361–370. 1980.
- YEE, D. et al. MicroRNA-155 induction via TNF- α and IFN- γ suppresses expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in human primary cells. *Journal of Biological Chemistry*. October 23, 2017.
- ZHANG et al. LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell stem cell*. Volume 19, Issue 1, 7 July, Pages 66-80. 2016.

ZIMMERMANN, K W. Der feinere Bau der Blutkapillaren. **Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 68, n. 1, p.29-109, may 1923.